

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

ANA CLÁUDIA CHAGAS DE PAULA

**Estratégias de cultivo de células-tronco
derivadas do tecido adiposo humano para
promover a regeneração tecidual óssea *in vivo***

Belo Horizonte

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

**Estratégias de cultivo de células-tronco
derivadas do tecido adiposo humano para
promover a regeneração tecidual óssea *in vivo***

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial a obtenção do título de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Orientada: Ana Cláudia Chagas de Paula

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Góes

Belo Horizonte

2015



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE ANA CLÁUDIA CHAGAS DE PAULA. Aos dezessete dias do mês de agosto de 2015 às 13:30 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Estratégias de cultivo de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano para promover a regeneração tecidual óssea in vivo"", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Alfredo Miranda de Góes, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dra. Fabíola Mara Ribeiro (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Patrícia Valério (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Silviene Novikoff (Universidade Federal de São Paulo), aprovada; Dr. Pedro Pires de Carvalho (Vasco da Gama University School-Portugal), aprovada; Dr. Alfredo Miranda de Góes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 17 de agosto de 2015.

Dra. Fabíola Mara Ribeiro (UFMG)

Dra. Patrícia Valério (UFMG)

Dra. Silviene Novikoff (Universidade Federal de São Paulo)

Dr. Pedro Pires de Carvalho (Vasco da Gama University School-Portugal)

Dr. Alfredo Miranda de Góes - Orientador (UFMG)

Prof. Jader dos Santos Cruz
 Coordenador de Curso de Pós Graduação
 em Bioquímica e Imunologia
 ICB - UFMG

Dedico a tese à minha família e ao Guilherme.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Teresa de Calcutá (1910-1997)

Agradecimentos

Ao meu Deus e santo protetor, São Geraldo Magela, que me guiaram no caminho do conhecimento, colocando as pessoas certas e maravilhosas que tanto me ajudaram na realização do meu sonho.

À minha família, papai, mamãe e Dani por me apoiarem em tudo e me fazer sentir a pessoa mais amada! Amo vocês! Obrigada pelo incentivo.

Ao Guilherme por ser uma pessoa maravilhosa e ter dividido comigo todos os momentos dessa jornada. Pelo seu amor, carinho, cuidado e por fazer minha vida muito mais feliz.

Ao Prof. Dr. Alfredo M. Góes pela oportunidade, orientação e amizade. Grande cientista, pensador, idealizador e admirável ser humano. Foram muitos anos de aprendizado. Muito obrigada por acreditar no meu potencial. Qualquer agradecimento não seria capaz de descrever meu sentimento de profunda gratidão e amizade.

À Profa. Dra. Setsuko Sahara, pela amizade e tão dedicada orientação em meu doutorado sanduíche na King's College London. Agradeço imensamente e com carinho pela oportunidade de realizar um trabalho em seu grupo de pesquisa, além de vivenciar a experiência de estar ao lado de uma grande cientista como a Setsu.

À Dra. Carolina Barcellos Machado por sua indicação para realização do meu doutorado sanduíche na King's College London e por toda a sua atenção.

A todos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular pelos ensinamentos, boa convivência e apoio. Por tornarem o ambiente de trabalho um local de alegria e realização profissional. Aos que ficaram e aos que já saíram: Ana Carolina, Andrea, Anne, Cíntia, Carol Reis, Cris, Elis, Naira, Marina, Carol Andrade, Carol Melo, Ciça, Jerusa, Natássia, Eliza, Mariana, Ju, Lílian, Joyce, Maira, Dani, Artur, Pedro, Pablo, Michele, Estefânia, Vivi, Luiza, Ludmila, Junnia, Marcelo, Mariana Kunrath, Mateus, Raissa, Humberto, Aline e Catherine.

Agradeço ao Prof. Dawidson Gomes pela importante contribuição científica na minha formação.

Agradeço imensamente a Alessandra Zonari. Quanto aprendi com a sua sabedoria e grande coração. Sempre pude contar com ela nos momentos fáceis e de diversão, assim como nos mais difíceis e decisivos da minha pós-graduação. Eu não escolheria outra amiga e parceira de experimentos. Muito obrigada Lele!

À Thaís que esteve sempre ao meu lado e contribuiu imensamente para a realização desse trabalho. A sua ajuda e amizade foi essencial em cada momento. Seu conhecimento e seu apoio enriqueceram este trabalho. A Thaís é meu braço direito e esquerdo também, um verdadeiro anjo em minha vida! Essa conquista é nossa!

Agradeço imensamente a minha amiga Alexandra, companheira em todos os momentos, boas risadas, tornando a pesquisa e minha vida mais divertida do que poderia ser. Muito obrigada!

Não poderia deixar de agradecer a querida Betinha por todo carinho com que cuida das meninas do LICM, do laboratório e do biotério.

A todos da King's College London, investigadores, colegas, técnicos e equipe administrativa por me receberem tão bem. Agradeço imensamente ao Dr. Ivo Lieberam, Tom, Alex, Sarah, Suzana e Perrine. Em especial, as minhas amigas Marie e Eli pela atenção e carinho durante meu doutorado sanduíche! À Susan Fischer, pela ajuda com questões administrativas e carinho. À Gaby, quase uma mãe em Londres, por me acolher e por seus conselhos quando foi preciso. Muito obrigada!

À Universidade Federal de Minas Gerais, local de desenvolvimento deste trabalho. Assim como devo agradecer a King's College London, aonde também foi realizada parte significativa da minha formação.

À PHB Industrial S.A. pelo fornecimento do polímero.

Ao 3B's Research Group: Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics, grupo de Pesquisa do Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e

Medicina Regenerativa em Portugal. Em especial ao prof. Dr. Rui Reis e ao Dr. Vitor M. Correlo pelo desenvolvimento das matrizes tridimensionais.

À toda equipe e pacientes do Núcleo de Cirurgia Plástica, em Belo Horizonte, pela colaboração na coleta e fornecimento dos produtos de lipoaspiração.

Ao Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear pela irradiação das matrizes tridimensionais.

Ao Pablo pela sua atenção e dedicação em me ajudar com as cirurgias do ensaio *in vivo*. Assim como a Isabel e Tati.

À Pricila Cunha por todo o seu carinho e auxílio com as qPCR. Aprendi muito com você!

À Profa. Dra. Jankerle Boeloni, do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Espírito Santo, não só pelo carinho, mas também pelo auxílio na análise das lâminas histológicas.

Ao Dr. Wander Vasconcelos e ao Eduardo Nunes, do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, pela disponibilidade em realizar e nos ajudar com as análises de microtomografia computadorizada.

À Patrícia Angelo e Soraia Frade, extensivo ao Instituto Hermes Pardini, pela colaboração e viabilização do estudo citogenético realizado neste trabalho.

À Profa. Dra. Gerluza Silva e Dra. Érika Jorge por disponibilizar o Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e, especialmente ao técnico Francisco e seus alunos pela simpatia e acolhimento. É uma honra ter trabalhado no laboratório de vocês, os admiro muito e tenho grande gratidão por tudo.

À Profa. Dra. Rogéria Serakides por sempre disponibilizar o Laboratório de Patologia Veterinária. E a Profa. Dra. Eliane Melo por sua contribuição.

À Profa. Dra. Marivalda de Magalhães Pereira por sua disponibilidade quando preciso.

À Profa. Dra. Fabiola Ribeiro por sua disponibilidade quando preciso.

Aos Professores, funcionários e colegas do Departamento de Bioquímica e Imunologia, da Universidade Federal de Minas Gerais.

À Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto pela minha formação profissional.

A todos os meus professores e em especial à profa. Dra. Vera Lúcia de Miranda Guarda, minha orientadora de iniciação científica, que contribuiu muito para meu aprendizado.

À Tanare pelos ensinamentos.

A todos os meus amigos por fazerem parte da minha vida e meus estudos. Em especial: Marina, Daniela, Jana, Karime, Karolina, Lelius, Pataxó, Vanessa e Ana Carolina Dias.

À Eunice, Peco e Marília por todo o carinho dedicado.

À CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro. Em especial à ao CNPq pela bolsa de doutorado (processo nº 147387/2011-6) e a CAPES pela bolsa de doutorado sanduíche (processo nº PDSE99999.007082/2014-02).

A todos, o meu sincero muito obrigada!

Prefácio

Atualmente a comunidade científica está testemunhando avanços substanciais na compreensão da biologia das células-tronco humanas. As células-tronco adultas, células-tronco embrionárias, assim como as células-tronco de pluripotência induzida se tornaram atraentes para aplicações na medicina regenerativa, abrangendo tanto a terapia celular quanto a engenharia de tecidos, sendo também uma importante ferramenta para modelar doenças *in vitro* e no desenvolvimento de novas drogas. No entanto a ciência enfrenta grandes desafios e muitas pesquisas ainda são necessárias para possibilitar um uso seguro e efetivo dessas células.

Dessa forma essa tese aborda o cultivo de células-tronco derivadas do tecido adiposo humano e sua resistência para sofrer transformação espontânea em condições de cultivo livre de compostos xenogênicos. Além da avaliação da capacidade dessas células, associadas a uma matriz tridimensional de polihidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato, em sofrer diferenciação para células da linhagem osteogênica e regenerar defeito ósseo em calvária de camundongo através dos princípios da engenharia de tecidos. Os resultados obtidos resultaram na publicação de dois artigos, um na revista Stem Cells Research and Therapy (PAULA *et al.*, 2015) e outro na revista Tissue Engineering Part A (PAULA *et al.*, 2012). Esta pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG, sob a orientação do Dr. Alfredo Miranda de Goes.

A tese está organizada em resumo, listas de siglas e abreviaturas, lista de símbolos, lista de figuras, lista de tabelas, introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados, discussão, conclusões, perspectivas, referências bibliográficas e anexos.

Os anexos iniciam-se com um relatório do estudo realizado durante o estágio de doutorado sanduíche de seis meses realizado no MRC Centre for Developmental Neurobiology da King's College London, sob a orientação da Dra. Setsuko Sahara (**Anexo I**). Este aborda duas estratégias diferentes para estabelecer modelos *in vitro* da síndrome de Sotos. Nesta parte estão descritas a padronização da tecnologia de reprogramação de linfócitos B em células-tronco de pluripotência induzida paciente-específica, através da utilização de

vetores episomais. Assim como a padronização da tecnologia de engenharia genômica para introduzir mutações específicas da síndrome de Sotos em células somáticas, através de sgRNAs-Cas9n-CRISPR. Este anexo está organizado da mesma forma que o texto principal e independente deste.

Os demais anexos constituem a lista de artigos publicados referentes aos resultados apresentados nesta tese (**Anexo II.1**), lista de artigos adicionais (**Anexo II.2**), lista de apresentações em congressos (**Anexo III**), certificados de aprovação do estudo em Comitê de Ética (**Anexos IV e V**) e, por fim, a primeira página dos artigos publicados referente aos resultados apresentados nesta tese (**Anexo VI**).

Resumo

Grandes defeitos no crânio não regeneram satisfatoriamente, representando um importante problema biomédico. As atuais estratégias para regenerar o tecido ósseo ainda apresentam algumas limitações, dessa forma, a engenharia de tecidos é uma ciência atrativa para contornar tais limitações. Atualmente as células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (hASCs) estão em foco para aplicação na engenharia de tecidos. Previamente a sua aplicação clínica, as hASCs devem ser expandidas *ex vivo* para obter o número requerido de células para transplante. No entanto, a expansão *ex vivo* das células-tronco antes da aplicação clínica ainda representa um desafio. O soro fetal bovino (SFB) é amplamente empregado como um suplemento para meio de cultura e expõe os pacientes receptores a infecções e reações imunológicas após o transplante. Além disso, a expansão celular constitui um risco de transformação celular maligna. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar se há resistência para transformação maligna durante a expansão de hASCs em condição de cultura livre de componentes xenogênicos, usando o *pool* de soro alogênico humano (SH), assim como, avaliar a capacidade das hASCs, quando cultivadas em matrizes tridimensionais de polihidroxibutirato-co-3-hidroxicaprolato (PHB-HV), em se diferenciar em células da linhagem osteogênica e regenerar defeito de tamanho crítico em calvária de camundongos imunossuprimidos. As hASCs expandidas em meio suplementado com SH não apresentaram diferenças notáveis na morfologia, viabilidade, capacidade de diferenciação e imunofenótipo. A principal diferença observada foi um efeito proliferativo significativamente maior nas hASCs cultivadas em SH comparado ao SFB. Não existiu diferença significativa na expressão de c-FOS, mas a expressão da proteína c-MYC estava elevada nas culturas com SH comparado as culturas com SFB. No entanto, nenhuma diferença foi observada nos níveis de mRNA de *MYC*, *CDKN2A*, *ERBB2* e *TERT*. Além disso, as hASCs apresentaram cariótipo normal, sofreram senescência e não formaram tumores *in vivo*, eliminando a possibilidade de imortalização espontânea das hASCs na presença de SH. As matrizes de PHB-HV, desenvolvidas pela técnica de liofilização, apresentaram estrutura de poros e performance mecânica adequada, que permitiu a colonização celular. As matrizes não foram tóxicas para as células, como mostrado pelo ensaio de MTT. E a diferenciação osteogênica das hASCs cultivadas na matriz foi confirmada pela redução da proliferação, atividade de fosfatase alcalina, expressão gênica de *ALPL*, *COL1A1*, *RUNX2* e *BGLAP*, e expressão de marcadores ósseo, como colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina. Além disso, a matriz de PHB-HV demonstrou alto grau de biocompatibilidade *in vivo*. Na última etapa desta tese, embora as análises histológicas mostrassem uma boa progressão da injúria óssea com neoangiogênese, as matrizes tridimensionais de PHB-HV, colonizadas ou não por hASCs implantadas não foram capazes de regenerar o defeito de tamanho crítico em calvária após 12 semanas de implantação. No geral, os resultados obtidos sugerem que o SH é uma abordagem adequada e segura para cultivar hASCs e diferenciá-las em células da linhagem osteogênica destinadas para aplicações clínicas. E a matriz tridimensional de PHB-HV parece ser adequada para o crescimento e diferenciação das hASCs útil para engenharia de tecido ósseo, porém mais estudos são necessários.

Abstract

Large cranial defects do not regenerate successfully, posing an important biomedical issue. The current approaches to heal the bone tissue still face some limitations and thus, the tissue engineering is an attractive science to bypass these limitations. Human adipose-derived stem cells (hASCs) are currently a point of focus for tissue engineering applications. Prior to their clinical application, hASCs must be expanded *ex vivo* to obtain the required number of cells for transplantation. However, the *ex vivo* expansion of stem cells before clinical application remains a challenge. The fetal bovine serum (FBS) is largely used as a medium supplement and exposes the recipient patient to infections and immunological reactions after transplantation. Furthermore, the cell expansion poses a risk of malignant cell transformation. Therefore, the aim of this study was to evaluate if the hASCs are resistant to spontaneous transformation during expansion in a xeno-free culture condition, using a pooled allogeneic human serum (HS) as well as the capacity of hASCs cultured in poly-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-HV) scaffolds to differentiate in osteogenic lineages and to heal critical-size calvarial defect in immunodeficient mouse. The hASCs expanded in medium supplemented with HS did not show remarkable differences in morphology, viability, differentiation capacity and immunophenotype. The main difference observed was a significantly higher proliferative effect on hASCs cultured in HS compared to FBS. There was no significant difference in C-FOS expression, but C-MYC protein expression was enhanced in HS cultures compared to FBS cultures. However no difference was observed in *MYC*, *CDKN2A*, *ERBB2* and *TERT* mRNA levels. Moreover, the hASCs presented normal karyotype undergoing senescence, and did not form *in vivo* tumors, eliminating the possibility of spontaneous immortalization of hASCs in the presence of HS. The PHB-HV scaffolds developed by the freeze-drying technique showed an adequate porous structure and mechanical performance suitable for allowing cell colonization. The scaffolds were not toxic to cells as shown by MTT assay. And the osteogenic differentiation of hASCs cultured on scaffolds was confirmed by the reduction of the proliferation, the alkaline phosphatase activity, gene expression of *ALPL*, *COL1A1*, *RUNX2* and *BGLAP*, and the expression of bone markers, such as collagen type I, osteopontin and osteocalcin. Furthermore, the PHB-HV scaffold demonstrates high degree of biocompatibility *in vivo*. In the last step of this thesis, although the histological analysis showed a good progression of the bone injury with neoangiogenesis, the implanted PHB-HV scaffolds seeded with/without hASCs were not able to heal critical-size mouse calvarial defects after 12 weeks of implantation. Overall, the findings suggest that the HS is an approach suitable and safe to culture hASCs and differentiate these cells in osteogenic lineages intended for clinical applications. And the PHB-HV scaffold seems to be adequate for cell growth and differentiation of hASCs useful for bone tissue engineering, but further studies are needed.

Lista de Figuras

Figura 1. Processo de remodelamento ósseo.	3
Figura 2. Estrutura química do PHB-HV	8
Figura 3. Exemplo da padronização das reações de qPCR	33
Figura 4. Representação do procedimento cirúrgico para desenvolver o defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de camundongos BALB/c <i>nude</i>	52
Figura 5. Característica morfológica das hASCs na 4 ^a passagem de um doador representativo.....	55
Figura 6. Viabilidade e proliferação das hASCs avaliadas pelo ensaio de MTT.	56
Figura 7. Análise imunofenotípica das hASCs por citometria de fluxo..	58
Figura 8. Multipotência <i>in vitro</i> das hASCs	59
Figura 9. Expressão da proteína nuclear Ki-67 em hASCs.	60
Figura 10. Média da duplicação da população de hASCs acumulada.....	61
Figura 11. Curva de crescimento avaliando a cinética de proliferação das hASCs	62
Figura 12. Expressão de fatores de transcrição das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB.	63
Figura 13. Análise de qPCR mostrando a expressão gênica de <i>MYC</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>ERBB2</i> e <i>TERT</i> em hASCs	65
Figura 14. Senescência associada a β -galactosidase das hASCs	66
Figura 15. Análise citogenética das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB.	67
Figura 16. Ensaio de tumorigênese <i>in vivo</i>	68
Figura 17. Caracterização morfológica da matriz tridimensional de PHB-HV..	70
Figura 18. Avaliação por MEV da colonização das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASCs.	71
Figura 19. Citotoxicidade <i>in vitro</i> e proliferação das hASCs cultivadas em matrizes tridimensionais de PHB-HV avaliadas pelo ensaio de MTT.....	72

Figura 20. Ensaio de fosfatase alcalina das hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV durante a diferenciação osteogênica.	73
Figura 21. Expressão de proteínas de matriz óssea pelas hASCs cultivadas nas matrizes tridimensionais de PHB-HV durante a diferenciação osteogênica	74
Figura 22. Análise da expressão de <i>COL1A1</i> , <i>RUNX2</i> , <i>ALPL</i> e <i>BGLAP</i> por PCR.....	75
Figura 23. Análise histológica de H&E dos implantes subcutâneo da matriz de PHB-HV.....	76
Figura 24. Colonização das matrizes tridimensionais de PHB-HV pelas hASCs após 5 dias de cultura <i>in vitro</i>	77
Figura 25. Imagens macroscópicas representativas dos diferentes grupos experimentais ao final de 4 e 12 semanas de implantação.	78
Figura 26. Análise de microtomografia computadorizada do defeito ósseo na calvária de camundongos.....	79
Figura 27. Imagens histológicas coradas com H&E com visão panorâmica do defeito ósseo	80
Figura 28. Análise da região do defeito ósseo após 4 semanas.	81
Figura 29. Análise da região do defeito ósseo após 12 semanas..	82
Figura 30. Representação gráfica da quantificação relativa da expressão de <i>VEGFA</i> , <i>RUNX2</i> , <i>COL1A1</i> , <i>ALPL</i> e <i>BGLAP</i> por qPCR	83

Lista de Tabelas

Tabela 1. Componentes da parte orgânica da matriz óssea.....	2
Tabela 2. Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.	22
Tabela 3. Anticorpos utilizados no <i>western blot</i>	28
Tabela 4. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de qPCR.....	31
Tabela 5. Anticorpos primários utilizados na marcação das secções para imunofluorescência.	45
Tabela 6. Sequência dos <i>primers</i> utilizados nas reações de PCR.....	47
Tabela 7. Grupos experimentais do ensaio de defeito ósseo na calvária de camudongos.....	50

Lista de Abreviaturas e Siglas

μA	Microampère
μ-CT	Microtomografia computadorizada
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
ACTB	<i>actin, beta</i>
ALPL	<i>alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>
BCIP	5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato <i>p</i> -toluidina
BGLAP	<i>bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein</i>
BMSCs	Células-tronco derivadas da medula óssea
BSA	Albumina de soro bovino
CD	Grupamento de diferenciação
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
cDNA	DNA complementar
CDTN	Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear
CEMEL	Centro de Microscopia do Instituto de Ciências Biológicas
cm	Centímetro
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Dióxido de carbono
COL1A1	<i>collagen, type I, alpha 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DP	Duplicação da população
DPA	Duplicação da população acumulada
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamidina
ERBB2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
ESCs	Células-tronco embrionárias
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
g	Gravidade (força centrífuga)

GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GMP	Boas Práticas de Manipulação- <i>Good Manufacturing practices</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
hASCs	Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA	Antígeno leucocitário humano
HSCs	Células-tronco hematopoiéticas
HV	3-hidroxivalerato
IL	Interleucina
iPSCs	Células-tronco de pluripotência induzida
ISCT	Sociedade Internacional para Terapia Celular
Kb	Kilobase
KDa	Kilo Dalton
kg	Kilograma
KGy	Kilo Gray
kV	Kilo volt
L	Litro
m	Massa
M	Molar
mA	Miliampère
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm²	Milímetro quadrado
mM	Milimolar
MPa	Mega Pascal
ms	Milisegundo
MSCs	Células-tronco mesenquimais
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
NBT	Nitroblue tetrazólio clorídrico
NC	Número de células contadas ao alcançarem confluência

ng	Nanograma
NK	<i>Natural killer</i>
nM	Nanomolar
nº	Número
NS	Número de células semeadas
NTC	<i>No template control</i>
p	<i>para</i>
pb	Pares de base
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PHA	Polihidroxialcanoato
PHB	Poli-3-hidroxi-butirato
PHB-HV	Polihidroxibutirato-co-3-hidroxi-valerato
PLGA	Ácido polilático-co-glicólico
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real
<i>RUNX2</i>	<i>runt-related transcription factor 2</i>
SDS	Sulfato de sódio dodecil
SA-β-Gal	Senescência associada à atividade de β -galactosidase
SFB	Soro fetal bovino
SH	<i>Pool</i> de soro humano alogênico
SH-O	Meio osteogênico suplementado com SH
TAE	Tampão Tris-acetato-EDTA
TBST	Solução salina tamponada com Tris
TC	Horário de contagem das células
TD	Tempo de duplicação
<i>TERT</i>	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
TS	Horário em que as células foram semeadas
U	Unidade
v	Volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFA *vascular endothelial growth factor A*

vs *versus*

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
©	Copyright
®	Marca registrada
°C	Grau Celsius
™	Trade Mark
α	<i>Alfa</i>
β	<i>Beta</i>
γ	<i>Gamma</i>
ε	<i>Epsilon</i>

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de Figuras	iii
Lista de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas e Siglas	vi
Lista de Símbolos	x
1. Introdução	1
2. Objetivos	17
2.1. Objetivo geral.....	17
2.2. Objetivos específicos	17
3. Material e Métodos	18
3.1. <i>Pool</i> de soro humano alogênico.....	18
3.2. Meios de cultura celular	18
3.2.1. Meio de cultura basal.....	18
3.2.2. Meios de diferenciação	19
3.3. Isolamento e cultivo das hASCs.....	19
3.4. Viabilidade e proliferação celular <i>in vitro</i>	21
3.5. Caracterização do imunofenótipo das hASCs.....	22
3.6. Potencial de diferenciação multilinhagem <i>in vitro</i>	23
3.6.1. Diferenciação adipogênica.....	23
3.6.2. Diferenciação condrogênica	23
3.6.3. Diferenciação osteogênica.....	24
3.7. Expressão de Ki-67	25
3.8. Cinética de proliferação	26
3.8.1. Taxa de duplicação da população acumulada e tempo de duplicação	26
3.8.2. Curva de crescimento	27
3.9. Análise da expressão de fatores de transcrição	27
3.10. Análise da expressão gênica de <i>MYC</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>ERBB2</i> e <i>TERT</i>	29
3.10.1. Extração de RNA	29
3.10.2. Síntese do DNA complementar.....	30
3.10.3. Elaboração de oligonucleotídeos (<i>primers</i>) para qPCR.....	30
3.10.4. PCR	30
3.10.5. qPCR	32
3.10.6. Análise dos dados.....	35
3.11. Avaliação da senescência replicativa.....	35
3.12. Análise citogenética	36
3.13. Animais	36
3.14. Ensaio de tumorigênese <i>in vivo</i>	37
3.15. Processamento das matrizes tridimensionais de PHB-HV.....	38
3.16. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV	39
3.16.1. Microscopia eletrônica de varredura	39

3.16.2. Microtomografia computadorizada.....	39
3.16.3. Teste de compressão	40
3.16.4. Espectroscopia de energia dispersiva	40
3.17. Colonização <i>in vitro</i> das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASCs.....	40
3.18. Avaliação da colonização e adesão celular as matrizes tridimensionais de PHB-HV	41
3.19. Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i> e proliferação celular durante a diferenciação osteogênica.	42
3.20. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica	43
3.21. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação.....	44
3.21.1. Imunofluorescência das secções.....	44
3.21.2. PCR - Análise da expressão gênica de <i>COL1A1</i> , <i>RUNX2</i> , <i>ALPL</i> e <i>BGLAP</i>	46
3.22. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> da matriz tridimensional de PHB-HV	48
3.22.1. Procedimento cirúrgico da avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> das matrizes tridimensionais de PHB-HV	48
3.22.2. Avaliação dos implantes subcutâneos – análise histológica.....	49
3.23. Defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de camundongos	49
3.23.1. Colonização <i>in vitro</i> da matriz tridimensional de PHB-HV por hASCs	49
3.23.2. Análise da adesão e viabilidade celular através de imunofluorescência.....	50
3.23.3. Procedimento cirúrgico	51
3.24. Avaliação do reparo do defeito ósseo	52
3.24.1. Microtomografia computadorizada.....	52
3.24.2. Análise histológica	53
3.24.3. Análise da expressão gênica de <i>RUNX2</i> , <i>COL1A1</i> , <i>ALPL</i> , <i>BGLAP</i> e <i>VEGFA</i> (qPCR).....	53
4. Resultados	55
4.1. Isolamento e cultivo das hASCs.....	55
4.2. Viabilidade e proliferação celular <i>in vitro</i>	56
4.3. Caracterização do imunofenótipo das hASCs.....	56
4.4. Potencial de diferenciação multilinhagem <i>in vitro</i>	57
4.5. Expressão de Ki-67	59
4.6. Cinética de proliferação	61
4.6.1. Taxa de duplicação da população acumulada (DPA) e tempo de duplicação (TD)	61
4.6.2. Curva de crescimento	62
4.7. Análise da expressão de fatores de transcrição	62
4.8. Análise da expressão gênica de <i>MYC</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>ERBB2</i> e <i>TERT</i>	64

4.9. Avaliação da senescência replicativa.....	65
4.10. Análise citogenética	67
4.11. Ensaio de tumorigênese <i>in vivo</i>	67
4.12. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV	69
4.13. Colonização <i>in vitro</i> das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASCs.....	70
4.14. Análise da citotoxicidade <i>in vitro</i> e proliferação celular durante a diferenciação osteogênica.	72
4.15. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica	73
4.16. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação.....	73
4.17. Análise da expressão gênica de <i>COL1A1</i> , <i>RUNX2</i> , <i>ALPL</i> e <i>BGLAP</i> ... 75	
4.18. Avaliação da biocompatibilidade <i>in vivo</i> da matriz tridimensional de PHB-HV	75
4.19. Avaliação do reparo do defeito ósseo	77
4.19.1. Avaliação da adesão e viabilidade celular das matrizes colonizadas	77
4.19.2. Avaliação macroscópica das calvárias	77
4.19.3. Microtomografia computadorizada.....	79
4.19.4. Análise histológica	79
4.19.5. Análise da expressão gênica de <i>RUNX2</i> , <i>COL1A1</i> , <i>ALPL</i> , <i>BGLAP</i> e <i>VEGFA</i>	82
5. Discussão	84
6. Conclusões	101
7. Perspectivas	102
8. Referências Bibliográficas	103
Anexos	118
I. Pesquisa desenvolvida durante o estágio de doutorado no exterior ...	119
Resumo I	xi
Abstract I.....	xii
Lista de Figuras I.....	xiii
Lista de Tabelas I	xiv
Lista de Abreviaturas e Siglas I	xv
Lista de Símbolos I.....	xvii
I.1. Introdução.....	120
I.2. Objetivos	126
2.1. Objetivo geral.....	126
2.2. Objetivos específicos	126
I.3. Material e Métodos	127
3.1. Meios de cultura celular	127
3.2. Linhagens celulares	128
3.3. Cultivo dos linfócitos B-EBV.....	128
3.4. Cultivo dos fibroblastos humanos	129

3.5. Vetores episomais	129
3.6. Reprogramação dos fibroblastos humanos.....	131
3.7. Reprogramação dos linfócitos B-EBV	132
3.8. Imunofluorescência TRA-1-60.....	133
3.9. Edição do genoma das células HEK 293 FT.....	133
I.4. Resultados	141
4.1. Reprogramação de fibroblastos humanos em iPSCs.....	141
4.2. Reprogramação de linfócitos B-EBV em iPSCs.....	141
4.3. Introdução de mutações indel	144
I.5. Discussão	146
I.6. Conclusões	148
I.7. Perspectivas	149
I.8. Referências Bibliográficas	150
II. Publicações	153
II.1 Artigos referentes aos resultados apresentados nesta tese	153
II.2 Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese	153
III. Apresentações em Congressos	155
IV. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	157
V. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais ..	158
VI. Artigos publicados	159

1. Introdução

Os ossos e cartilagens formam o sistema esquelético e são responsáveis por sustentar o corpo, proteger órgãos vitais, constituir a base mecânica do movimento, manter a homeostase de cálcio, fosfato e glicose, além de alojar a medula óssea (fonte de células hematopoiéticas) (Hadjidakis & Androulakis, 2006; Wei & Karsenty, 2015).

Os dois tipos de osso são: cortical (representa 80% dos ossos) e trabecular (representa 20% dos ossos). A arquitetura dos mesmos e proporção variam de acordo com a função (Salgado et al., 2004). O osso cortical é denso e compacto com aproximadamente 10% de porosidade (Salgado et al., 2004). É encontrado nos ossos, formando uma fina camada de osso compacto sobre todos os ossos e tem como função fornecer resistência mecânica e proteção (Hadjidakis & Androulakis, 2006). Já o osso trabecular é menos denso e mais elástico com 50-90% de porosidade. É encontrado em metáfises de ossos longos e díplome de ossos chatos e é recoberto pelo osso cortical (Salgado et al., 2004), que além de sua função metabólica também é capaz de fornecer suporte mecânico (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

A matriz óssea é constituída por 25% de parte orgânica, que compreende as células (2-5%) e osteóide (**Tabela 1**), 70% de parte inorgânica, composta por hidroxiapatita e 5% de água (Sommerfeldt & Rubin, 2001). As células encontradas na matriz óssea são: osteoblastos, células derivadas de células-tronco mesenquimais (MSCs) responsáveis pela produção dos constituintes da matriz óssea e se encontram agrupadas e alinhadas à camada de matriz óssea que estão produzindo; osteócitos, componente celular mais abundante no osso, tem origem a partir de osteoblastos maduros que ficam retidos na matriz óssea calcificada (aproximadamente 15% dos osteoblastos), com atividade metabólica reduzida, mas ainda produzem proteínas de matriz; osteoclastos, células gigantes multinucleadas responsáveis pela reabsorção óssea, derivadas de células-tronco hematopoiéticas (HSCs) e MSCs (Sommerfeldt & Rubin, 2001).

Durante o desenvolvimento dos ossos, o processo de ossificação, pode ocorrer por dois diferentes mecanismos: (i) ossificação intramembranosa e (ii) ossificação endocondral (Yang, 2009). Na ossificação intramembranosa, as

células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos para formar a matriz óssea, processo pelo qual dá origem aos ossos do crânio, face e clavícula. Durante a ossificação endocondral as células mesenquimais se diferenciam em condrócitos, que sintetizam estruturas de colágeno tipo II e são subsequentemente substituídas por tecido ósseo e medula óssea, processo que dá origem a todos os ossos (exceto ossos do crânio, face e clavícula) (Yang, 2009; Zigdon-Giladi, 2015).

Tabela 1. Componentes da parte orgânica da matriz óssea.

Componente	Propriedades e funções
Colágeno tipo I	Principal componentem da matriz orgânica óssea (90%); fornece a estrutura, na qual minerais ósseos são depositados (Mackie, 2003; Salgado et al., 2004).
Sulfato de condroitina – decorina	Proteoglicana; co-localização com colágeno tipo I; regula a fibrogênese do colágeno (Mackie, 2003).
Sulfato de condroitina – biglicana	Proteoglicana; localização pericelular; modula a resposta de precursores de osteoblastos ao TGF- β (fator indutor de formação óssea) (Mackie, 2003).
Osteonectina Tenascina-C Fibronectina Membros da família da trombospondina	Glicoproteínas; regulam a adesão, migração, proliferação e diferenciação celular (Mackie, 2003).
Osteopontina	Glicoproteína; regula a adesão celular (osteoblasto e osteoclasto) (Mackie, 2003; Sikavitsas, Temenoff, & Mikos, 2001), a mineralização e está envolvida no remodelamento ósseo (Davies, 1996; Salgado et al., 2004).
Fosfatase alcalina	Proteína envolvida na sinalização transmembrana; regula a proliferação, migração e diferenciação de osteoblastos (Aubin, 2001).
Sialoproteína óssea	Glicoproteína; núcleo para mineralização e regula adesão celular (Davies, 1996).
Osteocalcina	Proteína γ -carboxilada (Gla); envolvida no remodelamento ósseo, estabiliza a matriz de hidroxiapatita, previne mineralização excessiva, com importante função endócrina (Mackie, 2003; Salgado et al., 2004; Sikavitsas et al., 2001; Wei & Karsenty, 2015).
Fosfatase alcalina	Polipeptídeo; promove formação de cristais na matriz (núcleos de mineralização) (Sikavitsas et al., 2001).

A formação do tecido ósseo ocorre em três fases: produção da matriz osteóide, maturação e mineralização da matriz. Inicialmente, os osteoblastos produzem o osteóide por deposição de colágeno tipo I. Em seguida há um aumento na taxa de mineralização na mesma proporção da síntese de colágeno. E no estágio final, ocorre uma diminuição na síntese de colágeno e a

mineralização continua até que o osteóide se torne completamente mineralizado (Hadjidakis & Androulakis, 2006).

O osso é um tecido metabolicamente ativo que se encontra em constante remodelamento pela ação equilibrada entre osteoblastos (síntese óssea) e osteoclastos (reabsorção óssea) (**Figura 1**). Este mecanismo além de manter a estrutura óssea de acordo com as necessidades mecânicas, ajudar a reparar microdanos ocorridos na matriz óssea, levando a renovação do osso, exerce papel importante na homeostasia de minerais (Alford et al., 2015; Hadjidakis & Androulakis, 2006).

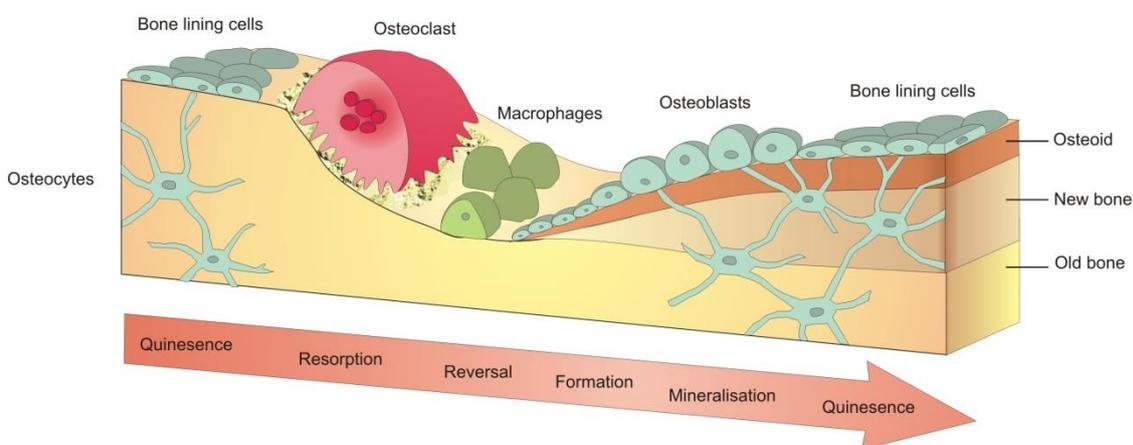


Figura 1. Processo de remodelamento ósseo. O osso é remodelado continuamente para manter a integridade do tecido. Durante esse processo, o osso velho ou injuriado é reabsorvido por osteoclastos e substituído por novo osteóide, secretado por osteoblastos. Copyright BTR©

O remodelamento ósseo é regulado sistemicamente por hormônios e localmente por citocinas, fatores de crescimento, mediadores inflamatórios (Hadjidakis & Androulakis, 2006), assim como por estímulo mecânico (Sommerfeldt & Rubin, 2001). Uma disfunção nessa regulação pode acarretar em diversas doenças ósseas como osteoporose (Kanis, 2002; Kanis et al., 2005), osteopetrose, hiperparatireoidismo e hipertireoidismo, doença de Paget e doença periodontal (Raisz, 1999). Além disso, existem outras condições clínicas como necrose avascular, infecções, anormalidades esqueléticas, trauma, ressecção de tumores que resultam em defeito ósseo (Dimitriou, Jones, McGonagle, & Giannoudis, 2011). Assim como em desordens genéticas como a osteogênese imperfeita (Gajko-Galicka, 2002; Venturi et al., 2006).

Nos últimos anos, tem-se observado o aumento global da expectativa de vida da população, consequência positiva do desenvolvimento humano,

entretanto, novos desafios surgem, como o aumento da incidência de doenças crônicas e degenerativas. Além disso, aumenta a suscetibilidade para lesões e traumas, com fraturas, devido ao déficit do estado de saúde da população idosa e até mesmo em decorrência de atos de violência (Jin et al., 2015).

A capacidade de regeneração intrínseca do osso sem formação de cicatriz através do remodelamento ósseo é conhecida (Sommerfeldt & Rubin, 2001). O reparo de lesão óssea requer uma série de eventos, molecular e celular, específicos e bem organizados. Este processo ocorre em três fases: inflamação, reparo e remodelamento.

Após a lesão, existe um sangramento inicial devido à ruptura de vasos nas extremidades do osso lesado e o tecido adjacente, resultando em um hematoma e secreção de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias. Interleucina (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , que exercem a função quimiotática de células endoteliais, fibroblastos, linfócitos e macrófagos (essencial para remoção do tecido necrótico), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que induz a angiogênese e fator de crescimento transformador (TGF)- β que é um potente quimiotático e estimula proliferação de MSCs no local da lesão, formando o tecido de granulação (Doblaré et al., 2004). Na próxima etapa, as MSCs podem diferenciar em condrócitos ou osteoblastos e a lesão pode ser reparada por dois mecanismos, ossificação intramembranosa ou endocondral. O tipo de reparo será modulado, principalmente, por influência mecânica no local da lesão (Doblaré et al., 2004; Thompson et al., 2002). Lesões em ossos anatomicamente estáveis sofrem reparo ósseo primário, na qual existe reparo ósseo direto, através da ossificação intramembranosa (Cheng et al., 2014). Mais comumente, ocorre reparo ósseo secundário, neste há a formação de calo cartilaginoso, que conecta as extremidades da fratura, onde subsequentemente ocorre a formação óssea sob o periósteo e há calcificação da cartilagem, formando o calo ósseo, através da ossificação endocondral. Paralelamente ao reparo, ocorre a angiogênese com aumento do fluxo sanguíneo no local. E após o reparo inicia-se a fase de remodelamento (Cheng et al., 2014; Einhorn & Gerstenfeld, 2014).

No entanto, nas situações em que o processo de regeneração do osso encontra-se comprometido ou insuficiente, como citado anteriormente, ou que o

defeito ósseo excede o tamanho crítico, resultando em sua não união, o tratamento padrão ouro, atualmente empregado, é o transplante de osso autólogo (Dimitriou et al., 2011).

O osso autólogo (tecido do próprio paciente) combina as principais propriedades requeridas em um material para reposição óssea: (i) osteoindutor, (ii) osteocondutor e (iii) osteogênese. Além disso, é compatível com o tecido receptor e não-imunogênico, reduzindo reações imunológicas e transmissão de doenças. No entanto, acarreta em um procedimento cirúrgico adicional ao paciente, causando desconforto e possíveis infecções (Dimitriou et al., 2011). É importante ressaltar que esse tipo de transplante apresenta uma grande limitação que é a quantidade de tecido ósseo que pode ser coletada sem causar morbidade do sítio doador (Salgado et al., 2004).

Diferentemente, o transplante de osso alogênico (tecido de um doador) que não envolve os problemas associados ao transplante autólogo, apresenta algumas desvantagens como diminuição da capacidade osteoindutora, escassez de doadores, assim como rejeição imunológica, transmissão de doenças e custo para a saúde pública do país (Dimitriou et al., 2011).

No Brasil, o número de transplantes de órgãos, aumentou em 118%, de 12722 cirurgias em 2002, para 24473 cirurgias em 2012, totalizando um investimento público na ordem de R\$ 1,4 bilhão (Portal Brasil, 2013). Nos EUA, o gasto com transplante de osso está em torno de \$ 2,5 bilhões (Amini et al., 2012). No Brasil, o número de transplantes de osso em 2014 foi de 21681, sendo 7,7% realizado em ortopedia homóloga, 92,1% em odontologia homóloga e menos que 1% em ortopedia autóloga (ABTO, 2014). No entanto, a doação e alocação de tecidos ainda é deficiente, sendo o número de transplantes realizados abaixo da necessidade estimada.

Nesse contexto, espera-se que o desenvolvimento de substitutos ósseos possa ser uma alternativa para contornar as desvantagens citadas tornando a medicina regenerativa um campo promissor.

A medicina regenerativa é uma área da pesquisa emergente que envolve a terapia celular e engenharia de tecidos com o objetivo de regenerar e/ou substituir órgãos e tecidos lesados ou perdidos (Ikada, 2006). Langer e Vacanti definiram a engenharia de tecidos, como um campo interdisciplinar que aplica os princípios da engenharia e das ciências da vida no desenvolvimento

de substitutos biológicos com o intuito de regenerar, reparar ou melhorar a função de um tecido (Langer & Vacanti, 1993). Ou seja, na engenharia de tecidos utiliza-se uma matriz estrutural, na qual podem ser incorporadas moléculas indutoras e servir como superfície para adesão e proliferação celular, síntese de moléculas bioativas e a formação de matriz extracelular, favorecendo a regeneração tecidual.

Para o sucesso da engenharia de tecidos, é preciso desenvolver matrizes estruturais que além de permitir o crescimento celular e estimular a regeneração tecidual, se ajustem anatomicamente ao tecido lesado (Tabata, 2009). Dessa forma, diferentes biomateriais estão sendo investigados para o desenvolvimento destas. Biomaterial compreende qualquer substância, sintética ou natural, destinada a interagir com sistemas biológicos com a finalidade de melhorar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função no organismo vivo melhorando a sua qualidade de vida (Williams, 1999).

Muitos avanços já ocorreram desde que Langer e Vacanti em 1993 descreveram os princípios da engenharia de tecidos. Alguns produtos baseados em células estão disponíveis comercialmente para tratamentos ortopédicos, como Osteocel® (NuVasive, USA), Trinity® Evolution™ (Orthofix, Netherlands) (Grayson et al., 2015), assim como produtos baseados em biomateriais, como Mastergraft® (Medtronic, USA), Mozaik™ (Integra, USA), BoneSave® (Stryker, UK), Infuse® (Medtronic, USA), mas nenhum consegue superar e substituir o enxerto de osso autólogo (Smith & Grande, 2015).

Para utilização na engenharia de tecido ósseo a matriz estrutural deve apresentar algumas propriedades intrínsecas ao biomaterial empregado e à sua arquitetura, para que seja adequada à função destinada. Dentre essas, a matriz deve ser (i) biocompatível, suportar atividade celular normal, sem qualquer efeito tóxico local ou sistêmico para o tecido normal (Williams, 2008; Yang et al., 2001); (ii) biodegradável e bioreabsorvível, capacidade de ser degradada em produtos não-tóxicos na mesma cinética em que o novo tecido é formado, de 3 a 9 meses (Bose et al., 2012; Williams, 2008; Yang et al., 2001); (iii) porosidade, os poros devem ter tamanho adequado, no mínimo 100 µm (Bose et al., 2012), e interconectados para permitir a penetração celular, produção da matriz extracelular e vascularização, além de microporosidade, menor que 8 µm viabilizando o crescimento de capilares (Salgado et al., 2004;

Tevlin et al., 2014); (iv) propriedades mecânicas, devem se assemelhar as propriedades do osso, variando entre o osso cortical (módulo compressivo entre 100 e 200 MPa) e o trabecular (módulo compressivo entre 2 e 20 MPa) (Bose et al., 2012; Tevlin et al., 2014); (v) osteocondutor, permitir adesão, proliferação e formação de matriz extracelular na superfície do material e (iv) osteoindutor, induzir a formação óssea através de sinalização biomolecular e recrutando células progenitoras (Bose et al., 2012).

Os biomateriais empregados em substitutos ósseos podem ser classificados em orgânicos, inorgânicos (Lichte et al., 2011) e compósitos (associação de dois ou mais biomateriais) (Cheung et al., 2007).

Os biomateriais inorgânicos compreendem os metais, que apesar de biocompatíveis, moldáveis e apresentarem alta resistência, não são biodegradáveis (Lichte et al., 2011); e as cerâmicas, que são biocompatíveis, osteoindutoras e osteocondutoras, no entanto apresentam baixa estabilidade mecânica, são quebradiças e sua biodegradabilidade é difícil de ser prevista comprometendo a estabilidade da matriz (Salgado et al., 2004).

Os biomateriais orgânicos compreendem os polímeros, que são biocompatíveis e biodegradáveis, apresentando um grande potencial para engenharia de tecido ósseo (Lichte et al., 2011). Os polímeros podem ser (i) naturais como: colágeno, fibrinogênio, quitosana, amido, ácido hialurônico e polihidroxicanoatos (PHA) e (ii) sintéticos como: poli(α -hidroxiácidos), poli(ϵ -caprolactona), poli(propileno fumaratos), poli(carbonatos) e poli(anidridos) (Salgado et al., 2004).

Dentre os vários polímeros biodegradáveis, destacam-se os PHA, poliésteres sintetizados através da fermentação de substratos de carbono por bactérias *Alcaligenes sp.* e estocados em grânulos citoplasmáticos de 0,2-0,5 μ m de diâmetro como reserva energética (Lee, 1996; Verlinden et al., 2007).

Os PHA são considerados biocompatíveis pelo fato de seu produto de degradação *in vivo*, D-3-hidroxi butirato, ser um constituinte normal do sangue humano (Köse et al., 2003), o que possibilita sua utilização médica para confecção de fios de sutura, curativos, sistema de liberação de drogas e matrizes estruturais para engenharia de tecidos (Chen & Wu, 2005).

Há aproximadamente 150 diferentes tipos de PHA conhecidos, dentre eles destaca-se o poli-3-hidroxi butirato (PHB), poli-4-hidroxi butirato, os co-

(Ribeiro-Samy et al., 2013), tecido cartilaginoso (Wu et al., 2013) e, inclusive tem se mostrado promissor para o tecido ósseo (Huang et al., 2010; Kumarasuriyar et al., 2005; Lu et al., 2013; Zhang et al., 2015).

Diversas técnicas têm sido empregadas para desenvolver matrizes estruturais com aplicação na engenharia de tecido ósseo: *solvent casting* (Murphy et al., 2002), *fiber bonding*, *melt based technologies* (Yang et al., 2001), *phase inversion*, *high pressure based methods*, *freeze drying* ou liofilização (Salgado et al., 2004), *rapid prototyping technologies* (Lichte et al., 2011) e *electrospinning* (Liu & Ma, 2004). A técnica de processamento escolhida deve ser consistente com as propriedades desejadas, assim como não afetar as propriedades do biomaterial (Salgado et al., 2004).

A técnica de liofilização é empregada no processamento de matrizes estruturais para regeneração óssea (Mao et al., 2003; Nam & Park, 1999; Köse, et al., 2003; Whang et al., 1998; Whang et al., 1995). Esta técnica baseia-se em uma indução térmica de separação de fase, na qual a temperatura de uma solução polimérica homogênea, disposta em um molde, diminui e há a formação de cristais do solvente. Uma vez separadas as fases, a fase rica em solvente, cristalizada, é removida por sublimação a vácuo deixando somente a espuma polimérica. O resultado final é a formação de matrizes altamente porosas, que podem apresentar porosidade acima de 90% e poros variando entre 20 e 200 μm . A estrutura dos poros depende das condições de pH, taxa de congelamento e pressão parcial empregadas durante o processamento (Puppi et al., 2010). Por ser uma técnica muito sensível, todos os parâmetros devem ser bem controlados durante o processamento das matrizes (Liu & Ma, 2004; Salgado et al., 2004).

À medida que a utilização de produtos da engenharia de tecidos se aproxima das aplicações clínicas, um grande desafio se estabelece para a obtenção de quantidade suficiente de células para o uso clínico. Uma célula ideal deve possuir algumas características como: estar disponível em quantidades suficientes, ser capaz de exercer a função destinada a ela, ser isolada com mínima morbidade da área doadora e ser compatível com o sistema imunológico do receptor (Jain et al., 2005). Dessa forma, a fonte de células empregada na engenharia de tecidos exerce um papel essencial para o seu sucesso.

As células podem ser classificadas, em relação ao tipo de doador, em (i) autólogas (células do próprio paciente), (ii) alogênicas (células de paciente diferente, mas da mesma espécie) e (iii) xenogênicas (células de origem em espécie diferente). No contexto da engenharia de tecidos, as células autólogas são mais apropriadas uma vez que as células alogênicas e xenogênicas, por serem imunogênicas, tornam necessário associar uma terapia imunossupressora. No entanto, a fonte de células autólogas é limitada, principalmente, quando o paciente encontra-se severamente acometido por uma doença (Ikada, 2006).

As células também podem ser classificadas com base no grau de diferenciação, em (i) células especializadas e (ii) células-tronco. A aplicação de células especializadas é limitada, pois estas não podem ser expandidas e coletadas em quantidade suficiente para o tratamento clínico (Ikada, 2006). Enquanto as células-tronco são células indiferenciadas com grande capacidade de proliferação e auto-renovação, e de diferenciação em linhagens especializadas (Mountford, 2008). Dessa forma, as células-tronco apresentam um enorme potencial para aplicação clínica.

As células-tronco estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto. De acordo com seu potencial de diferenciação as células-tronco podem ser: totipotentes, pluripotentes e multipotentes (Brignier & Gewirtz, 2010; Mountford, 2008).

Após a fecundação até o estágio de 4-8 células, as células totipotentes são capazes de dar origem a todos os tipos celulares e anexos embrionários (Fischbach & Fischbach, 2004). Com as subseqüentes divisões, as células que formam a massa interna do blastocisto são consideradas pluripotentes e perdem a capacidade de gerar um organismo completo, mas são capazes de diferenciar em células de origem nos três folhetos embrionários (ectoderma, endoderma e mesoderma). E após mais divisões, o potencial de diferenciação se torna mais restrito e as células, consideradas multipotentes, podem ser encontradas até a fase adulta (Brignier & Gewirtz, 2010).

A pluripotência e proliferação das células-tronco embrionárias (ESCs) geraram enorme expectativa para seu uso terapêutico, no entanto a capacidade de formar teratomas e envolvimento em questões éticas, decorrente do uso do embrião, ainda limitam sua utilização (Mountford, 2008).

Dessa forma as células-tronco adultas multipotentes são bastante atraentes. Acreditava-se que estas células só eram capazes de diferenciar em tipos celulares de mesma origem embrionária. No entanto, sob condições específicas, estas células podem sofrer transdiferenciação e dar origem a tipos celulares de origem em outro folheto embrionário, por um processo denominado plasticidade (Raff, 2003; Riekstina et al., 2009).

As células-tronco adultas podem ser isoladas de tecidos fetais, placenta, cordão umbilical e vários outros tecidos do indivíduo adulto (da Silva Meirelles, Chagastelles, & Nardi, 2006; De Coppi et al., 2007; Klein & Fauza, 2011). Sendo as mais estudadas as HSCs e as MSCs (Hipp & Atala, 2008).

As HSCs são responsáveis pela renovação de células sanguíneas da linhagem linfóide e mielóide (Hipp & Atala, 2008). Já as MSCs foram descritas primeiramente por Friedenstein, em 1968, como uma população de células aderentes, presente na medula óssea, capazes de auto-renovar e diferenciar em linhagens celulares de origem mesodérmica (osteoblastos, condroblastos e adipócitos) (Caplan & Bruder, 2001).

Recentemente, células com características semelhantes às MSCs da medula óssea foram isoladas em diversos tecidos, incluindo tecido adiposo (Zuk et al., 2001), pele (Toma et al., 2001), sistema nervoso (Kruger et al., 2002), polpa dentária (Gronthos et al., 2000) e líquido amniótico (De Coppi et al., 2007).

Dessa forma a Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) definiu as seguintes características como critério mínimo para se classificar as MSCs: (i) aderência a superfície plástica, (ii) multipotência *in vitro* e (iii) expressão de um conjunto de marcadores (grupamento de diferenciação - CD - 105, CD73 e CD90) e não expressão de outros (CD34, CD14, CD79a, CD19 e HLA-DR) (Dominici et al., 2006).

A porcentagem de MSCs existente em tecidos adultos é bastante baixa e isolar essas células para a utilização na medicina regenerativa é bastante complicado, dependendo do tecido. Sendo assim, as células-tronco adultas mais utilizadas para estudos nesta área são as células isoladas da medula óssea e do tecido adiposo (Romanov et al., 2005).

O tecido adiposo, de origem mesodérmica, dentre suas funções de reserva energética, envolvimento no metabolismo de gorduras e alguns

hormônios esteróides, é atualmente uma fonte de células-tronco denominadas células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASCs - *human adipose-derived stem cells*), conforme proposto por Zuk *et al.* em 2001 (Zuk *et al.*, 2001).

Do tecido adiposo é isolada a fração vascular estromal (FVS) que consiste de uma população heterogênea de células mesenquimais que inclui não somente as hASCs, HSCs e células progenitoras, mas também células endoteliais, eritrócitos, fibroblastos, linfócitos, monócitos/macrófagos e pericitos dentre outras. Após sua cultura, as hASCs podem ser purificadas, por sua aderência e lavagens da cultura que remove as células não aderentes (Bourin *et al.*, 2013).

O uso de hASCs apresenta várias vantagens em relação as células-tronco derivadas da medula óssea (BMSCs), pois o tecido adiposo subcutâneo é acessível e abundante, pode ser extraído por lipoaspiração (gera subproduto comumente descartado), e, dessa forma, as hASCs podem ser isoladas a partir de um procedimento menos invasivo que a aspiração da medula óssea e assim, uma grande quantidade de células pode ser isolada sem causar morbidade do sítio doador. O número de células-tronco em 1 grama de tecido adiposo é cerca de 500 vezes maior do que em 1 grama de medula óssea (Mizuno, 2009). Além disso, as hASCs proliferam mais rapidamente do que as BMSCs e podem ser cultivadas por maior tempo sem senescer (Locke *et al.*, 2009).

Já foi demonstrada a capacidade das hASC em diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipócitos, assim como mioblastos (Locke *et al.*, 2009; Zuk *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2001), células endoteliais (Zonari *et al.*, 2012), células hepáticas (Banas *et al.*, 2007) e células neuronais (Anghileri *et al.*, 2008).

As hASCs são células atrativas para a regeneração óssea, devido à sua capacidade de diferenciação osteogênica *in vitro*, através do enriquecimento do meio de cultura com fatores indutores já estabelecidos, como a dexametasona (induz a expressão do fator de transcrição RUNX2), o ácido ascórbico (aumenta a secreção de colágeno tipo I, por ser um co-fator de enzimas que hidroxilam resíduos de prolina e lisina no pró-colágeno) e o β -glicerofosfato

(constitui uma fonte de fosfato necessário para deposição de hidroxiapatita) (Langenbach & Handschel, 2013; Zomorodian & Eslaminejad, 2012).

Atualmente, estudos sugerem que as MSCs podem regenerar tecidos por dois diferentes mecanismos: (i) diferenciação em uma linhagem específica e dessa forma substituir o tecido lesado e (ii) através da secreção parácrina de fatores tróficos, modulando a inflamação, promovendo a angiogênese e recrutando células endógenas para induzir o reparo tecidual (Caplan & Dennis, 2006; Gimble et al., 2012; Phinney & Prockop, 2007; Yi & Song, 2012).

Outro mecanismo interessante na regeneração óssea é a mecanotransdução entre osteócitos e osteoblastos, que desencadeia a secreção de fatores solúveis pelos osteócitos expostos a estímulos, como por exemplo ultra-som, e estes fatores solúveis induzem a migração e maturação de células osteoprogenitoras em osteoblastos, favorecendo a regeneração óssea (Fung et al., 2014).

Após a avaliação de novos produtos *in vitro* é preciso avaliar sua eficiência através de ensaio *in vivo*. Os modelos animais, principalmente, os pequenos roedores são tradicionalmente a primeira escolha para avaliar respostas *in vivo*. O modelo de defeito ósseo na calvária é o padrão ouro para avaliar formação óssea intramembranosa *in vivo* em área sem sustentação de carga (Lee et al., 2015). O estudo *in vivo* da biologia de células humanas deve ser implantado em animais imunossuprimidos para evitar rejeição do enxerto pelo hospedeiro.

Diversos modelos de animais imunossuprimidos estão disponíveis e podem ser empregados para transplante de células humanas. Por exemplo, camundongos da linhagem *nude* (mutação no gene *Foxn1*) são atímicos, resultando em um número reduzido de linfócitos T; Scid (mutação no gene *Prkdc^{scid}*) a mutação na proteína quinase DNA-dependente necessária para ligar terminações não homólogas da dupla fita de DNA prejudica a produção de células B e T funcionais e Rag (*knockout* dos genes ativadores de recombinases 1 ou 2) as recombinases são necessárias para o rearranjo somático das imunoglobulinas nas células B e receptores de células T, gerando deficiência de células B e T (Belizario, 2009; Mombaerts et al., 1992).

Com o avanço das pesquisas e o aumento do número de ensaios clínicos para avaliar o potencial uso clínico das hASCs (Casteilla et al., 2011;

Garcia-Olmo et al., 2009; Gimble et al., 2012; Gimble et al., 2010; Mesimäki et al., 2009) é necessária uma expansão *ex vivo* dessas células, com intuito de alcançar o número adequado de células requerido. Além disso, é essencial controlar toda a etapa laboratorial, assegurando a qualidade das células (Bernardo et al., 2011; Gálvez et al., 2014; Gimble et al., 2012; Lindroos et al., 2011).

As regulamentações da *Food and Drugs Administration* (FDA) classificam os procedimentos envolvendo células de acordo com o grau de manipulação em: (i) mínima manipulação, como criopreservação de células autólogas e (ii) manipulação maior que mínima, por exemplo, expansão *ex vivo*, ativação celular, aplicação com componentes não teciduais e transplante de células ou tecidos alogênicos (Harvath, 2000; Lindroos et al., 2011).

Diferentemente da indústria farmacêutica, na qual há uma produção em massa, na engenharia de tecidos a demanda laboratorial é por um produto personalizado, praticamente, individualizado. De acordo com as normas de Boas Práticas de Manipulação (*Good Manufacturing practices*- GMP), para utilização de células-tronco, é necessário realizar em todas as fases do processo: testes funcionais; testes bacteriológicos (Gálvez et al., 2014); teste fenotípico e visual das culturas; testes que garantam que as células não sofreram transformação maligna (cariótipo, expressão de telomerase, c-myc, FISH) (Bernardo et al., 2011; Gimble et al., 2012) e um teste de qualidade final, incluindo viabilidade e fenotipagem, compatíveis com a rápida liberação das células (Burger, 2000; Lindroos et al., 2011).

Uma questão crucial na utilização clínica das células-tronco é a escolha de uma ótima estratégia de cultivo através da elaboração de um meio de cultura ideal que mimetize *in vitro* as condições fisiológicas, incluindo o tipo de superfície de cultura, temperatura, pH, osmolaridade até suporte de oxigênio e nutrientes, para manutenção do crescimento e funções metabólicas das células. O meio de cultura é um dos fatores mais importante para alcançar tal similaridade (Brunner et al., 2010). Entretanto, ainda não existe um consenso e, geralmente, as células são expandidas em meio de cultura clássico, por exemplo, o *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) e o *α -Minimum Essential Medium* (α -MEM) suplementados com soro fetal bovino (SFB)

(Lindroos et al., 2011), sendo o desenvolvimento de um meio de cultura ideal para MSCs ainda um importante desafio.

O soro animal é uma mistura de inúmeros constituintes (proteínas, fatores de adesão, enzimas, hormônios, fatores de crescimento, citocinas, lipídeos, ácidos graxos, vitaminas, elementos traço e carboidratos) que são responsáveis por fornecer (i) fatores de crescimento e hormônios, (ii) proteínas de transporte, (iii) fatores de adesão, (iv) fatores de detoxificação, (v) inibidores de protease, (vi) fatores para manutenção de pH e pressão osmótica e (vii) reduzir a tensão de cisalhamento (Brunner et al., 2010).

Do ponto de vista biológico e no contexto da engenharia de tecidos, a utilização do SFB como suplemento para o meio de cultura de células humanas é desvantajosa. SFB contém proteínas xenogênicas que podem provocar reações imunológicas (Selvaggi et al., 1997; Tuschong et al., 2002), ser internalizadas pelas células-tronco ou aderir à superfície dessas células (Heiskanen et al., 2007; Martin et al., 2005; Spees et al., 2004), conter endotoxinas e transmitir vírus, prions, bactérias e micoplasma (Mannello & Tonti, 2007; Will et al., 1996). Além disso, por ser um suplemento mal definido apresenta variação de lote para lote (Price & Gregory, 1982).

Dessa forma, novas abordagens estão sendo desenvolvidas para substituir o SFB, como o uso do soro humano AB (Aldahmash et al., 2011; Bieback et al., 2009; Kocaoemer et al., 2007; Lindroos et al., 2010; Shahdadfar et al., 2005), plasma rico em plaquetas ativadas por trombina (Bieback et al., 2009; Kocaoemer et al., 2007), lisado plaquetário (Bernardo et al., 2007; Bieback et al., 2009) e meio quimicamente definido (Chase et al., 2012; Mimura et al., 2011; Solmesky et al., 2010; Tarle et al., 2011; van der Valk et al., 2010).

Os meios quimicamente definidos livres de soro, constituídos por suplementos sintéticos que substituem o soro e reduzem a variabilidade, oferecem a alternativa mais promissora. Alguns estudos mostraram que o cultivo de MSCs em meio livre de soro é possível, entretanto as células parecem não manter o mesmo padrão de expansão observado quando se emprega soro (Agata et al., 2009; Rodrigues et al., 2010).

Existe ainda a preocupação de que as MSCs possam sofrer transformação maligna após expansão *in vitro* a longo prazo (Miura et al., 2006). A transformação maligna pode acarretar em taxa de proliferação

aumentada, morfologia alterada, anormalidades fenotípicas e citogenéticas, além disso, podem induzir formação de tumor. Por ainda não existir evidências conclusivas a respeito, células expandidas *in vitro* são adequadas para serem utilizadas em terapias, mas recomenda-se a realização dos ensaios genéticos, funcionais e fenotípicos antes de sua utilização terapêutica (Bernardo et al., 2011).

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar o cultivo das hASCs e a resistência para sofrer transformação espontânea em condições de cultura livre de componentes xenogênicos, assim como avaliar a capacidade dessas células associadas a uma matriz tridimensional de PHB-HV em diferenciar em células da linhagem osteogênica auxiliando na regeneração de defeito ósseo em calvária de camundongos.

2.2. Objetivos específicos

- Isolar e caracterizar hASCs em meio de cultura basal suplementado com *pool* de soro humano alogênico (SH).
- Investigar os fatores associados à proliferação celular na presença do SH como suplemento para o meio de cultura.
- Avaliar a possibilidade de transformação maligna espontânea das hASCs cultivadas em meio suplementado com SH.
- Desenvolver e caracterizar uma matriz tridimensional de PHB-HV para ser utilizada em abordagem de engenharia de tecido ósseo.
- Avaliar a adesão, viabilidade, proliferação e diferenciação das hASCs em células da linhagem osteogênica quando cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV *in vitro*.
- Avaliar a biocompatibilidade da matriz tridimensional de PHB-HV *in vivo* em ratos.
- Avaliar o potencial de regeneração de tecido ósseo *in vivo* utilizando a matriz tridimensional de PHB-HV cultivada ou não com hASCs em modelo de defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de camundongos imunossuprimidos (linhagem *nude*).

3. Material e Métodos

3.1. Pool de soro humano alogênico

O soro humano foi obtido de doadores voluntários, entre 20 e 40 anos, após a assinatura do termo de consentimento e de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer nº 11668613.7.0000.5149) (**Anexo IV**). Nenhuma evidência clínica e laboratorial de doenças metabólicas, hepatites, vírus da imunodeficiência humana (HIV) e outras complicações sistêmicas foram relatados para estes doadores.

O sangue total foi obtido através da coleta de sangue convencional com tubos a vácuo e sem anticoagulante (BD Biosciences), deixado coagular espontaneamente a 4°C e centrifugado a 252 g e a 20°C, por 15 minutos para separação do soro. O soro de diferentes doadores (20 doadores; sendo 5 de cada tipo sanguíneo: A, B, AB e O) foi removido dos tubos de coleta e misturado para produzir o SH. Posteriormente, o SH foi inativado a 56°C por 30 minutos e congelado a -20°C para ser utilizado na produção dos meios de cultura para as hASCs.

3.2. Meios de cultura celular

3.2.1. Meio de cultura basal

O meio de cultura basal consistiu de DMEM-*high glucose* (Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio (Cinética Química Ltda), 100 U/mL de penicilina, 0,10 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich), 60 mg/L de gentamicina (Schering-Plough) e 10% de SFB (Cripion Biotecnologia Ltda) ou 10% de SH.

O pH do meio foi ajustado para 7,2 e, em seguida, o meio foi filtrado com membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore).

3.2.2. Meios de diferenciação

3.2.2.1. Meio Adipogênico

Para produção do meio adipogênico foram adicionados ao meio de cultura basal suplementado com 10% de SFB ou SH os seguintes fatores indutores: 1 μM de dexametasona (Aché), 200 U/mL de insulina (Eli Lilly and Company), 200 μM de indometacina (Sigma-Aldrich), 500 μM de isobutilmetilxantina (Sigma-Aldrich).

3.2.2.2. Meio Condrogênico

Para produção do meio condrogênico foram adicionados ao meio de cultura basal suplementado somente com 1% de SFB ou SH os seguintes fatores indutores: 0,01 $\mu\text{g/mL}$ de $\text{TGF}\beta\text{-1}$ (Sigma-Aldrich), 1 mM de dexametasona (Aché), 5 mg/mL de ácido ascórbico (Ecibra), 200 U/mL de insulina (Eli Lilly and company), 3,25 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina (Wako), 1 mM de piruvato (Sigma-Aldrich) e 125 $\mu\text{g/mL}$ de albumina de soro bovino (BSA; PAA).

3.2.2.3. Meio Osteogênico

Para a produção do meio osteogênico foram acrescentados ao meio de cultura basal suplementado com 10% de SFB ou SH os seguintes fatores indutores: 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich), 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Ecibra) e 0,1 μM de dexametasona (Aché).

3.3. Isolamento e cultivo das hASCs

O isolamento e cultivo das hASCs foram realizados conforme descrito anteriormente (Zuk et al., 2001). O estudo foi realizado de acordo com as normas aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Parecer n° 11668613.7.0000.5149) (**Anexo IV**). Nenhuma doença metabólica, hepatites, HIV ou outra complicação sistêmica foram reportadas para estes doadores.

O tecido adiposo, de diferentes partes do corpo, flancos direito e esquerdo e regiões infra e supra umbilical, foi coletado de pacientes, entre 20 e 40 anos, submetidos à cirurgia de lipoaspiração por questões estéticas,

realizada Núcleo de Cirurgia Plástica, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Um volume de 60 mL de lipoaspirado foi acondicionado em seringa estéril e encaminhado ao Laboratório de Imunologia Celular e Molecular localizado no Instituto de Ciências Biológicas – UFMG.

Em capela de fluxo laminar vertical, o conteúdo da seringa foi transferido para tubos de polietileno de 50 mL (Sarstedt) para lavagens com mesmo volume de tampão fosfato salina (PBS) 0,15 M, pH 7,2, seguido de centrifugação a 252 g, 20°C por 6 minutos. Após a centrifugação o produto de lipoaspiração formou uma solução bifásica, cuja fase inferior continha a solução de PBS e células sanguíneas e a fase superior, o tecido adiposo.

A fase superior foi transferida para novo tubo de polietileno (50 mL) e tratada com solução de collagenase tipo I (Gibco) 0,075% em PBS 0,15 M, pH 7,2 (proporção de 1:1), por 1 hora, em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, para digestão da matriz extracelular. Durante este período, a cada 15 minutos, os tubos foram agitados vigorosamente.

Ao término do período de incubação, os tubos foram centrifugados a 252 g, 20°C por 10 minutos, para obter a fração vascular estromal que foi ressuspensa em 5 mL de meio de cultura basal suplementado com SFB e em meio de cultura basal suplementado com SH, transferida para garrafas de cultura celular T-25 (Sarstedt) e mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Após 12-28 horas de cultivo, o conteúdo das garrafas de cultura foi transferido para tubos de polietileno (50 mL) e centrifugado a 252 g, 20°C, por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado foi ressuspensa em 5 mL do respectivo meio de cultura basal e acondicionado em nova garrafa de cultura celular T-75 (Sarstedt).

A cada dois dias o meio de cultura foi removido e as células lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2, para remoção de células sanguíneas residuais e não aderentes, e em seguida foi adicionado novo meio de cultura basal. Quando as células atingiram 70-80% de confluência, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e tratadas com 1 mL de tripsina 0,05% ácido tetracético etilenodiamidina (EDTA; Invitrogen), por 5 minutos. Após a ação da tripsina, esta foi inativada com meio de cultura basal (9 mL), a suspensão formada foi dividida em duas novas

garrafas de cultura celular T-75 e acrescentado mais meio de cultura basal. As células foram expandidas dessa maneira para serem utilizadas nos demais experimentos.

3.4. Viabilidade e proliferação celular *in vitro*

A viabilidade e proliferação das hASCs foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico de MTT (Invitrogen), este baseia-se na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em células viáveis, em converter o sal de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium, que é solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. O número de células viáveis é diretamente proporcional à quantidade de cristais de formazan produzido (Mosmann, 1983).

As hASCs, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH na 4ª passagem, foram semeadas em placas de 24 poços (Sarstedt) na densidade de 5×10^3 células/poço contendo 1 mL do respectivo meio de cultura basal. As células foram incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 7, 14, 21 e 28 dias. Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi removido e substituído por 210 µL/poço do respectivo meio de cultura basal. Em seguida, foi acrescentado 170 µL/poço de solução de MTT 5 mg/mL (Invitrogen) e a placa incubada em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas.

Após o período de incubação as hASCs foram observadas ao microscópio óptico (Olympus IX70) para visualização dos cristais de formazan. Estes foram solubilizados através da adição de 210 µL/poço de uma solução de sulfato de sódio dodecil (SDS) 10% em água - HCl 0,01 M, seguido de incubação em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Em seguida, transferiu-se 100 µL de cada poço para uma placa de 96 poços (fundo reto), em triplicata, e a densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro Anthos 2010 (Biochromm) a 595 nm. Os dados foram adquiridos pelo programa ADAP Basic (Anthos Labtec).

Durante o experimento, todos os passos envolvendo o reagente MTT foram executados em condições mínimas de luminosidade.

3.5. Caracterização do imunofenótipo das hASCs

As hASCs, na 4ª e 10ª passagens, foram caracterizadas por citometria de fluxo para análise da expressão das moléculas de superfície celular que são marcadores expressos em MSCs (Bourin et al., 2013; Dominici et al., 2006; Mitchell et al., 2006).

Aproximadamente 5×10^5 hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH foram incubadas com 0,4 µg de cada anticorpo primário (**Tabela 2**) em placa de 96 poços (fundo em U) a 4°C por 30 minutos. Após a incubação, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 para remover os anticorpos primários não conjugados e incubadas com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 *goat* anti-camundongo IgG 2 mg/mL (Invitrogen), na diluição de 1:500, a 4°C por 30 minutos. Os anticorpos já conjugados a um fluorocromo não foram incubados com anticorpo secundário. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas com 200 µL de formaldeído a 2%. Como controle negativo de fluorescência, foi adicionado o anticorpo secundário a células não marcadas com o anticorpo primário. E células sem qualquer tipo de marcação foram utilizadas para avaliar o tamanho *versus* (vs) granulosidade com a finalidade de estabelecer a população a ser analisada.

A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo Guava® easyCyte™ 6-2 L Flow Cytometer (Millipore), utilizando-se o programa Incyte acquisition (Millipore). Foram adquiridos 15.000 eventos e os dados foram analisados no programa FlowJo 7.5.6 software (Treestar, Inc).

Tabela 2. Anticorpos utilizados na marcação celular para imunofenotipagem por citometria de fluxo.

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
CD90	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:40
CD166	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:60
CD105	Monoclonal	Camundongo	FITC	BD Biosciences	1:20
CD73	Monoclonal	Camundongo	PE	BD Biosciences	1:10
CD44	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:16
CD54	Monoclonal	Camundongo	FITC	Caltag Medsystems	1:20
CD45	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:25
CD34	Monoclonal	Camundongo	-	Santa Cruz Biotechnology	1:16
CD19	Monoclonal	Camundongo	-	BD Biosciences	1:60
HLA-ABC	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10
HLA-DR	Monoclonal	Camundongo	FITC	Abcam	1:10

3.6. Potencial de diferenciação multilinhagem *in vitro*

3.6.1. Diferenciação adipogênica

Para verificar se as hASCs eram capazes de se diferenciar na linhagem adipogênica, as células, na 4^a passagem, foram semeadas na densidade de 1×10^3 células/cm² em placas de 6 poços (Techno Plastic Products) e cultivadas em meio de cultura adipogênico específico a 37°C, em atmosfera úmida e 5% CO₂. O meio foi trocado a cada 2 dias. hASCs cultivadas em meio basal foram mantidas como controle.

Após 21 dias de indução, as culturas foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas em formaldeído 10% por 1 hora a temperatura ambiente. As células fixadas foram lavadas com isopropanol 60% e em seguida, submetidas à coloração de *Oil Red O* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. As células foram incubadas com solução de *Oil Red O* em isopropanol 60%, por 5 minutos, lavadas com água deionizada e contra-coradas com hematoxilina por 1 minuto.

Oil Red O é um corante de lipídeos neutros e a diferenciação adipogênica pode ser confirmada pela coloração em vermelho dos lipídeos acumulados no interior das células, quando observado em microscópio óptico (Olympus IX70). A fotodocumentação foi realizada utilizando-se câmera (Olympus Evolt E-300) acoplada ao microscópio.

3.6.2. Diferenciação condrogênica

Para promover a diferenciação condrogênica as hASCs, na 4^a passagem, foram cultivadas em um sistema de *pellet* de células. Para criar o *pellet*, aproximadamente 5×10^5 células foram recolhidas em 1 mL de meio de cultura basal em tubos de polietileno de 15 mL (Sarstedt) e centrifugadas a 800 g por 5 minutos. Em seguida, o meio sobrenadante foi removido cuidadosamente e os *pellets* foram incubados com 1 mL de meio condrogênico específico nos tubos de polietileno de 15 mL, a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 21 dias. O meio condrogênico foi renovado 1 vez por semana. Como controle hASCs foram cultivadas em meio de cultura basal nas mesmas condições.

Após 21 dias, os *pellets* foram lavados com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixados com formaldeído 10%, por 1 hora. Em seguida, os *pellets* foram processados e incluídos em parafina, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG. Os *pellets* foram desidratados em banhos de concentrações crescentes de etanol: 70%, 80%, 90%, 100% (2 vezes), por 4 minutos em cada um deles. Após a desidratação, os *pellets* foram diafanizados com dois banhos de 10 minutos em líquido miscível com o meio de inclusão (xilol/toluol). Para a inclusão os *pellets* foram embebidos na parafina líquida. Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia. Cortes de 5 µm de espessura foram montados em lâminas histológicas e corados com *Alcian Blue* 8GX (Sigma-Aldrich).

Para isso, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60°C por 15 minutos, seguido por banho em xilol (14 minutos) e hidratados em série gradual de etanol: 100% (2 vezes), 95%, 70% (4 minutos em cada banho). Após a lavagem em água, as lâminas foram incubadas com o corante *Alcian Blue* 1% em ácido acético pH 2,5, por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente por 2 minutos e os núcleos corados com hematoxilina, por 40 segundos. Após a lavagem em água corrente, os cortes foram desidratados em uma série crescente de etanol 70%, 95%, 100% (2 vezes). As lâminas foram montadas e observadas ao microscópio óptico (Olympus BX-41) e fotografadas por câmera acoplada (Q-Color3 digital da QImaging) revelando proteoglicanas e glicosaminoglicanas coradas em azul.

3.6.3. Diferenciação osteogênica

Para promover a diferenciação osteogênica as hASCs, na 4ª passagem, foram semeadas na densidade de $2,5 \times 10^3$ células/cm² em placa de 24 poços (NUNC) e incubadas com meio osteogênico a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ por 21 dias. Como controle hASCs foram cultivadas em meio de cultura basal nas mesmas condições. O meio de cultura foi renovado a cada 2 dias.

Após 21 dias, a diferenciação osteogênica foi avaliada pela coloração de *von Kossa*, que indica calcificação da matriz extracelular.

As culturas foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e fixadas em etanol 70% por 24 horas. Em seguida, as células foram lavadas com água, incubadas com solução de nitrato de prata 5% (Vetec) e expostas a luz ultravioleta por 1 hora. As células foram lavadas com água destilada e incubadas com solução de tiosulfato de sódio 5% (Cinética Química Ltda), por 5 minutos, e coradas com eosina, por 40 segundos. As culturas foram observadas ao microscópio óptico (Olympus IX70) e fotografadas (Sony Cyber-shot DSC-H3) para demonstração da presença de mineralização indicada pela coloração negra ou marron.

3.7. Expressão de Ki-67

As hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH, na 4^a e 10^a passagem, foram analisadas em relação a expressão do marcador de proliferação Ki-67. As células foram semeadas na densidade de 1×10^5 células em lamínulas de vidro de 22 x 22 mm e cultivadas por 24 horas nos respectivos meios de cultura basal. Em seguida, as células foram fixadas em formaldeído 10%, por 30 minutos a temperatura ambiente.

As hASCs fixadas foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e a membrana plasmática foi permeabilizada utilizando-se Triton-100X (Sigma) 0,2% em PBS 0,15 M, pH 7,2, por 10 minutos. Após a permeabilização, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e foi feito o bloqueio da reação com solução 3% PBS/BSA, por 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos primários: coelho anti-Ki-67 (1:50; Abcam) e para verificar a morfologia das células-tronco, foi utilizado o anticorpo de camundongo anti- α -tubulina (1:1000; Sigma), diluídos em solução 1% PBS/BSA.

Após incubação com anticorpo primário, as células foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes/10 minutos) e, em seguida, foram incubadas com o respectivo anticorpo secundário: Alexa Fluor 488 *goat* anti-coelho (1:500; Molecular Probes) e Alexa Fluor 555 *goat* anti-camundongo (1:500; Molecular Probes), diluídos em solução 1% PBS/BSA, por 1 hora em câmara úmida, protegido da luminosidade e em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com Hoechst 33258 pentahydrate

(Invitrogen) por 20 minutos para marcação do núcleo e as lâminulas montadas em lâminas de vidro utilizando Hydromount Aqueous (National Diagnostics).

As lâminas foram observadas em microscópio confocal LSM 5 Live (Zeiss) e as imagens foram analisadas utilizando a ferramenta *Cell counter* do programa Image J (National Institutes of Health) para a quantificação das células positivas para o marcador Ki-67 (fluorescência verde) em relação ao número total de núcleos (azul), sendo 10 diferentes imagens analisadas para cada amostra e o resultado expresso em porcentagem.

3.8. Cinética de proliferação

3.8.1. Taxa de duplicação da população acumulada e tempo de duplicação

Para avaliar a cinética de proliferação as hASCs foram expandidas e analisadas em cada passagem desde seu isolamento até a 14^a passagem. Em cada passagem foram semeadas 1×10^5 células/garrafa de cultura celular T-25 (Sarstedt) e incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ até alcançarem a confluência de 90%. Ao atingir a confluência as culturas foram contadas. Para a contagem, as células foram lavadas com 10 mL de PBS 0,15 M, pH 7,2 e removidas das garrafas de cultura celular utilizando solução de tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen), por 5 minutos. As células foram centrifugadas a 252 g, por 6 minutos e ressuspensas em 1 mL de meio de cultura basal suplementado com o respectivo soro para contagem do número de células utilizando um hemocítômetro (HBG).

A taxa de duplicação da população (DP) foi calculada somente a partir da 2^a passagem, pois o número de células aderentes só pode ser determinado a partir da 1^a passagem. Em cada passagem, após a contagem, as células foram replaqueadas na densidade inicial de 1×10^5 células/garrafa T-25. Caso as células não atingissem uma confluência mínima de 80% após 15 dias de cultivo, as culturas eram descontinuadas.

A DP foi determinada utilizando-se a seguinte fórmula: $DP = [\log_{10}NC - \log_{10}NS] \div \log_{10}2$, na qual, DP: taxa de duplicação da população; NC: número de células contadas ao alcançarem confluência; NS: número de células semeadas.

Para calcular a taxa de duplicação da população acumulada (DPA), a DP determinada em cada passagem foi adicionada a DP da passagem anterior (Kocaoemer et al., 2007).

Paralelamente, o tempo de duplicação (TD) das hASCs cultivadas nos diferentes meios de cultura foi determinado utilizando-se a seguinte fórmula: $TD = (TC - TS) \times \log_{10}2 \div \log_{10}(NC \div NS)$, na qual, TD: tempo de duplicação; TC: horário de contagem das células; TS: horário em que as células foram semeadas; NC: número de células contadas ao alcançarem confluência; NS: número de células semeadas.

3.8.2. Curva de crescimento

O tempo de crescimento das hASCs, cultivadas nos meios de cultura basal suplementado com SFB e SH, foi determinado pela contagem do número de células em tempo definidos. No tempo 0, 5×10^3 células, na 4ª passagem, foram semeadas em garrafas de cultura celular T-25 e incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂ pelos seguintes intervalos de tempo: 3, 5, 7, 9 e 11 dias. Ao final de cada tempo as células foram contadas em hemocítômetro (HBG). Uma curva de crescimento foi plotada e comparado o crescimento em ambos os suplementos utilizados na cultura celular.

3.9. Análise da expressão de fatores de transcrição

A expressão dos fatores de transcrição c-FOS e c-MYC pelas hASCs foi avaliada na 4ª e 10ª passagem. As células foram semeadas em uma densidade de 5×10^5 células/placa de cultura de 60 mm e cultivadas em seus respectivos meios de cultura basal suplementado com SFB e SH por 3 dias, quando alcançaram confluência de 80-90%.

Para a avaliação da expressão da proteína c-FOS, as culturas foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 gelado e coletadas por lise com tampão de lise (20 mM HEPES, pH 7,0, 10 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0,5% Nonidet P-40). A suspensão resultante foi incubada em gelo, por 10 minutos e homogeneizada utilizando vortex. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1500 g, por 5 minutos, para sedimentar o núcleo. O sobrenadante foi centrifugado a 16000 g, por 20 minutos e o sobrenadante resultante constituiu a fração não nuclear.

Para extrair as proteínas nucleares, o *pellet* composto dos núcleos isolados foram ressuspensos em tampão NETN (150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 0,5% Nonidet P-40) e o lisado nuclear foi coletado após centrifugação a 16000 g por 20 minutos a 4°C.

Para a avaliação da expressão da proteína c-MYC as hASCs, na 4ª e 10ª passagem, foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 gelado e coletadas por lise com tampão NETN. A suspensão foi incubada em gelo, por 10 minutos e então centrifugada a 16000 g, por 20 minutos. O sobrenadante resultante consistiu o lisado celular de interesse.

A concentração proteica das amostras foi determinada usando o método de Bradford (BioRad). A expressão dos fatores de transcrição foi avaliada por *western blot*.

Dessa forma, amostras de proteína (30 µg) foram separadas por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (Biorad) utilizando sistema de transferência semi-seco (BioRad). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em solução salina tamponada com Tris (TBST; 1 M Tris e 3 M NaCl, pH 7,4 com 0,5% Tween-20), por 1 hora. Em seguida, as membranas foram incubadas, *overnight* a 4°C, com os anticorpos primários (**Tabela 3**) diluídos em leite 5% em TBST. Após a incubação com anticorpos primários, as membranas foram lavadas com TBST (3 vezes/5 minutos) e incubadas com anticorpo secundário anti-coelho ou anti-camundongo conjugado a peroxidase (1:5000; Sigma-Aldrich), por 1 hora a temperatura ambiente. A pureza das frações nuclear e não-nuclear foi confirmada usando os anticorpos LAMINA B1, como um marcador nuclear e GAPDH como um marcador não-nuclear.

Tabela 3. Anticorpos primários utilizados no *western blot*.

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
c-FOS	Policlonal	Coelho	-	Sigma-Aldrich	1:2000
LAMINA B1	Policlonal	Coelho	-	Abcam	1:2000
c-MYC	Policlonal	Coelho	-	Sigma-Aldrich	1:500
GAPDH	Policlonal	Coelho	-	Santa Cruz Biotechnology	1:500

Em seguida as membranas foram lavadas em TBST (3 vezes/5 minutos) e as bandas foram reveladas por reação de quimioluminescência com ECL

Plus (Amersham) por 5 minutos e analisadas quantitativamente usando o programa Image J (National Institutes of Health).

3.10. Análise da expressão gênica de *MYC*, *CDKN2A*, *ERBB2* e *TERT*

As hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH, na 4^a e 10^a passagem, foram avaliadas por reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) em relação a expressão dos seguintes transcritos gênicos: *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog (MYC)*; *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*; *v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2 (ERBB2)* e *telomerase reverse transcriptase (TERT)*. *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* foi usado como gene de referência.

3.10.1. Extração de RNA

A extração do RNA total foi feita utilizando 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen) para cada placa de cultura de 60 mm após a lavagem das culturas com PBS 0,15 M, pH 7,2. A solução de trizol contendo as células foi recolhida em um tubo e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio (Merck) e o tubo foi vigorosamente agitado por cerca de 20 segundos. Posteriormente, os tubos foram centrifugados por 15 minutos, a 12000 *g* e 4°C. A fase aquosa e incolor, situada na parte superior do tubo, foi transferida para um novo tubo, no qual foram adicionados 500 µL de álcool isopropílico (Amresco). Os tubos foram então incubados a temperatura de -70°C, por aproximadamente 1 hora. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 12000 *g* e 4°C. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 1 mL de etanol (Merck) 75% gelado. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos, a 7500 *g* e 4°C. Descartou-se novamente o sobrenadante e, após a evaporação do etanol, o precipitado formado foi diluído em 50 µL de H₂O ultra pura (Invitrogen). Por fim, a suspensão foi homogeneizada a 58°C por 10 minutos.

A concentração do RNA total foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer). A relação entre as leituras realizadas a 260 e a 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa

do grau de pureza do referido RNA. Foi considerada pura, a amostra que apresentava a relação entre 1,8 e 2,0.

3.10.2. Síntese do DNA complementar

As amostras foram tratadas com DNase previamente a síntese do DNA complementar (cDNA) para certificar que o RNA isolado não estava contaminado com DNA genômico. O tratamento com DNase foi realizado de acordo com as instruções do fabricante, Promega.

A síntese de cDNA foi realizada utilizando o Kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas). O RNA total (1 µg) de cada amostra foi incubado com 0,5 µg de oligo(dT)₁₈, a 65°C por 5 minutos. Logo após, foi adicionado às amostras, 5X *Reaction buffer*, 20 U Ribolock™ *Ribonuclease inhibitor*, 10 mM desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs) mix, e estas foram incubadas a 37°C, por 5 minutos. Em seguida, foram adicionadas 200 U da enzima RevertAid™ H Minus M-MuLV RT e as amostras incubadas por 60 minutos a 42°C. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70°C, por 5 minutos.

3.10.3. Elaboração de oligonucleotídeos (*primers*) para qPCR

Os pares de primers específicos para cada gene de interesse (**Tabela 4**) foram desenhados através do programa Primer3 versão 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os parâmetros selecionados no programa Primer3 para a elaboração dos oligonucleotídeos foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular variasse entre 70 e 150 pares de base (pb), apresentasse teor de GC entre 30 e 60%, não apresentasse complementariedade entre si ou mesmo estruturas secundárias estáveis e apresentasse temperatura de anelamento de 60°C.

3.10.4. PCR

Reações de amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR) foram feitas com o objetivo de confirmar a especificidade dos pares de *primers*. Cada reação de amplificação continha 10 ng de cDNA, 1,5 mM de MgCl₂, tampão PCR 1X (Invitrogen), 0,2 mM de cada um dos dNTPs (dATP, dCTP,

Tabela 4. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de qPCR.

Gene	NOME	Espécie	Sinônimo	Sequencia (5' - 3')		Tamanho do fragmento	Concentração dos <i>primers</i>	Tm	Sequência de referência NCBI/referência
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Homo sapiens</i>	GAPDH	F	GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC	105 pb	0,5 µm	60°C	NM_002046.5
				R	AAGGGGTCATTGATGGCAAC				
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	<i>Homo sapiens</i>	P16	F	GCCGATCCAGGTCATGATGA	105 pb	0,2 µm	60°C	NM_000077.4
				R	ACGGGTCGGGTGAGAGTG				
ERBB2	<i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	HER2	F	GAACTCACCTACCTGCCCCAC	102 pb	0,2 µm	60°C	NM_004448.3
				R	GACCTGCCTCACTTGGTTGT				
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>	<i>Homo sapiens</i>	c-MYC	F	AGAGTTTCATCTGCGACCCG	76 pb	0,3 µm	60°C	NM_002467.4
				R	AAGCCGCTCCACATACAGTC				
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>	<i>Homo sapiens</i>	TERT	F	CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA	145 pb	0,5 µm	60°C	NM_198253.2
				R	GGATGAAGCGGAGTCTGGA				
ACTB	<i>Actin, beta</i>	<i>Mus musculus</i>	Beta-actina	F	GGATGCAGAAGGAGATTACTACTG	90 pb	0,3 µm	60°C	*
				R	CGATCCAGAGAGAGAGTACTTG				
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	<i>Mus musculus</i>	Colágeno tipo 1	F	CTTCACCTACAGCACCCCTTG TG	65 pb	0,3 µm	60°C	NM_007742.3
				R	TGACTGTCTTGCCCCAAGTTC				
RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	<i>Mus musculus</i>	RUNX2	F	AATGCCTCCGCTGTTATGAAAA	64 pb	0,5 µm	60°C	NM_001146038.2
				R	TCCGGCCCACAAATCTCA				
ALPL	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	<i>Mus musculus</i>	Fosfatase alcalina	F	CAGTAACCGCTGCCCGAAT	55 pb	0,5 µm	60°C	X13409.1
				R	TCCTCGCCCGTGTTGTG				
BGLAP	<i>Bone gamma carboxyglutamate protein</i>	<i>Mus musculus</i>	Osteocalcina	F	TGACCTCACAGATGCCAAGC	92 pb	0,3 µm	60°C	NM_007541.3
				R	GCCGGAGTCTGTTCCTACTACC				
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>	<i>Mus musculus</i>	VEGF	F	GTACCTCCACCATGCCAAGTG	63 pb	0,5 µm	60°C	NM_001287056.1
				R	TGGGACTTCTGCTCTCCTTCTG				

*(Morais et al., 2013)

dGTP, dTTP), 0,25 μ M de cada *primer* e 1,25 unidades de GoTaq® DNA Polymerase (Promega), totalizando um volume final de 20 μ L.

Os ciclos de amplificação foram: etapa inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos (desnaturação), temperatura específica para cada *primer* por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 20 segundos (extensão) e uma última etapa de extensão foi realizada a 72°C por 5 minutos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação (NTC- *no template control*) para cada par de *primers*, onde água estéril foi acrescentada no lugar de cDNA.

Os produtos de PCR, em paralelo com marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder; Invitrogen), foram aplicados em gel de agarose 1-2% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Tris 40 mM, pH 7,6; ácido acético 20 mM; EDTA 1 mM). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts por aproximadamente 60 minutos em TAE 1X. As bandas foram reveladas por brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5 μ g/mL em TAE 1x. Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta.

3.10.5. qPCR

3.10.5.1. Teste de concentração ótima dos primers

A concentração ótima de cada par de *primers* foi determinada através de ensaios de qPCR. Considerando os genes avaliados as concentrações testadas foram 0,2; 0,4; 0,5 e 0,6 μ M. As concentrações otimizadas de cada par de *primers* foram descritas na (**Tabela 4**).

3.10.5.2. Determinação da eficiência de amplificação dos primers

Curvas padrão para cada gene foram geradas através de ensaios de qPCR envolvendo diluições logarítmicas seriadas de um cDNA controle (teste de eficiência de amplificação da qPCR): 1, 1:10, 1:100 e 1:1000 (**Figura 3 A**). Cada diluição foi testada em triplicata.

A partir dos valores de Ct foi construída uma curva-padrão, onde a média dos Ct obtidos, em cada concentração, variava em função do logaritmo

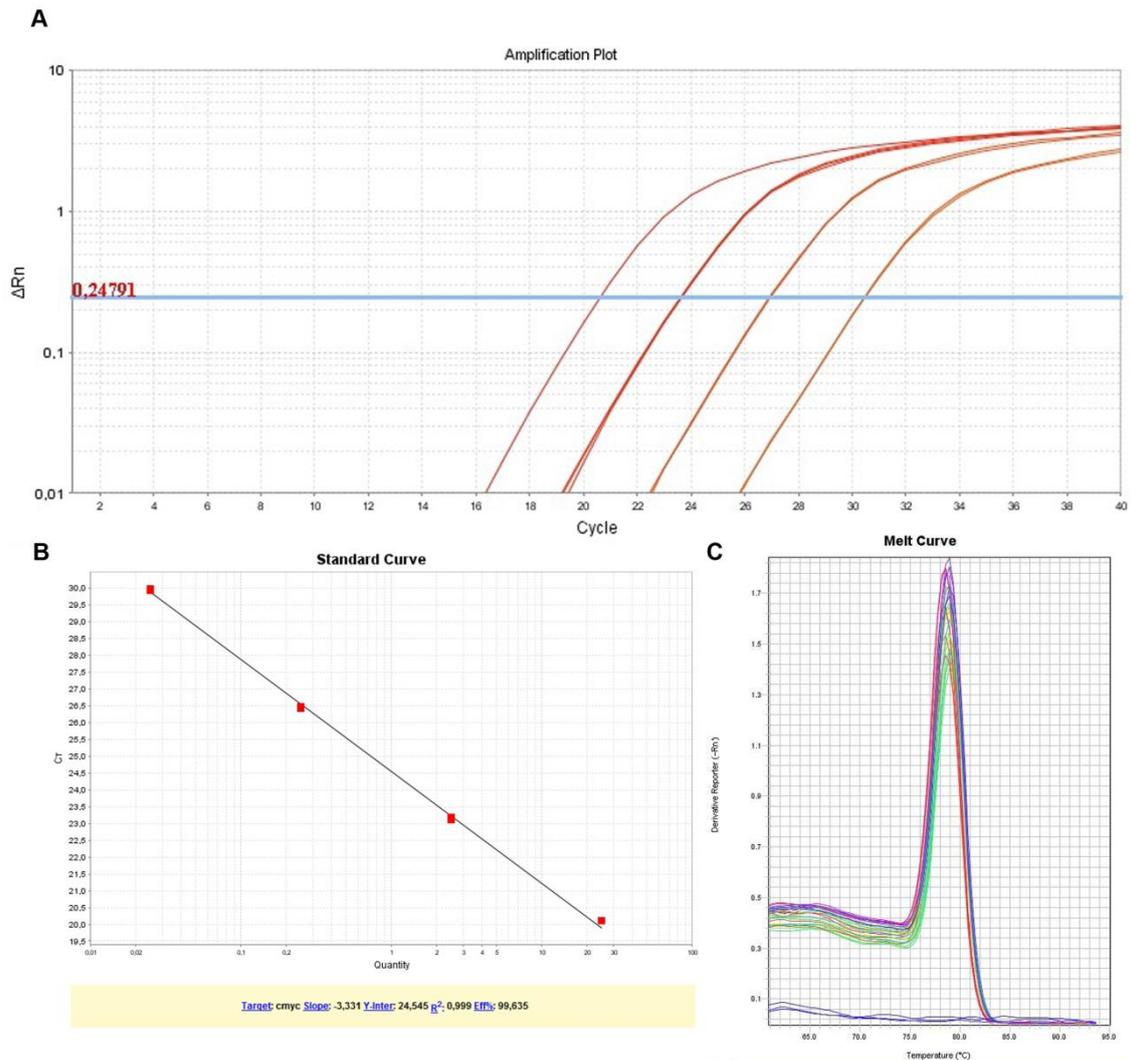


Figura 3. Exemplo da padronização das reações de qPCR. (A) Resultado das amplificações com emprego dos *primers* para o gene *MYC*. É possível observar as curvas de amplificação referentes a cada diluição de cDNA testada. É notável a relação inversa existente entre a quantidade de cDNA empregada na reação e o valor alcançado de Ct. (B) Regressão linear baseada nas médias dos Cts para amplificações relativas ao gene *MYC*. No gráfico, as unidades do eixo x representam a quantidade de cDNA nas diluições seriadas de 4 vezes. (C) Curvas de dissociação contínua obtidas para os transcritos relativos ao gene *MYC*. É possível observar picos aproximados de fluorescência entre as reações, indicando a presença de um fragmento de DNA amplificado específico, cuja média da temperatura de dissociação está entre 75 e 80°C.

da concentração de cDNA. O coeficiente angular da reta (*slope*) obtido (*a*, em $y = ax + b$) foi utilizado para cálculo da eficiência da amplificação dos *primers*, através da seguinte fórmula: $Eficiência = (10^{-1/a} - 1) \times 100$ sendo, *a*: coeficiente angular da reta.

Foram aceitos valores de eficiência entre 1,80 e 2,10 (**Figura 3 B**). A partir desse teste padronizou-se a quantidade de cDNA a ser utilizada em todos os ensaios de qPCR (10 ng/amostra).

3.10.5.3. Especificidade da amplificação

A especificidade da amplificação pôde ser verificada pela temperatura de desnaturação do produto amplificado, que depende de seu tamanho e constituição de nucleotídeos. Assim, a especificidade da amplificação foi verificada a partir de uma única temperatura de dissociação para cada segmento gênico amplificado em todas as amostras testadas. Em todos os resultados obtidos foi observado somente um pico na curva de dissociação (*melting curve*), sugerindo a presença de somente um fragmento de DNA amplificado pelos *primers* (**Figura 3 C**).

3.10.5.4. Reações

Após todas as padronizações, cada reação de qPCR continha 10 µL de SYBR® *Green PCR Master Mix 2X* (Applied Biosystems), 10 ng de cDNA, cada par de *primers* em sua concentração ótima e água *nuclease-free* em quantidade suficiente para um volume final de 20 µL.

As condições de amplificação consistiram em uma etapa inicial a 50°C por 2 minutos, uma etapa de desnaturação a 95°C por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de: 95°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento) e 75°C por 1 minuto (extensão), seguido de mais um ciclo a 75°C por 10 minutos para o término da reação. Após os 45 ciclos de amplificação, todas as amostras foram submetidas à desnaturação gradual para determinação da curva de dissociação. Em todas as reações foi feito um NTC para cada par de *primers*.

Todo procedimento para a qPCR foi feito na plataforma de instrumentação Applied Biosystems 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems), e os dados foram processados pelo 7500 Software, versão 2.3 (Applied Biosystems).

3.10.6. Análise dos dados

A expressão quantitativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo Ct, quantificação relativa (Schmittgen & Livak, 2008). A expressão relativa do gene apresenta os dados do gene de interesse relativo a algum gene de controle interno (gene de referência). Os genes de referência são aqueles cuja expressão é dita constitutiva, ou seja, apresentam pouca variação entre diversas condições. Os níveis de mRNA alvo foram normalizados de acordo com o gene de referência *GAPDH*.

O cálculo da expressão gênica foi realizado utilizando-se o método:

$$2^{-\Delta Ct}$$

Sendo, $\Delta Ct = Ct (gene\ alvo) - Ct (gene\ de\ referência; GAPDH)$

Os resultados foram plotados na forma de gráfico utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

3.11. Avaliação da senescência replicativa

A senescência associada à atividade de β -galactosidase pH-dependente (SA- β -Gal) das hASCs, cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB e SH, foi analisada em cada passagem utilizando um kit de coloração SA- β -gal (Sigma Aldrich).

As hASCs, na densidade de 5×10^3 células/cm², em cada passagem, foram semeadas em placa de 24 poços e cultivadas por 24 horas. Após este tempo, a monocamada de células foi lavada com PBS 0,15 M, pH 7,2 (2 vezes) e fixadas com tampão de fixação (2% formaldeído e 0,2% glutaraldeído em solução salina) por 6 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes) e incubadas com solução corante X-gal [5-bromo-4-chloro-3-indolyl P3- D-galactoside, 400 mM de ferrocianeto de potássio e 400 mM de ferricianeto de potássio, NaCl e MgCl₂), por 4 horas a 37°C, na ausência de luminosidade e CO₂.

Ao final do período de incubação, a solução corante foi substituída por PBS 0,15 M, pH 7,2 e as culturas observadas em microscópio óptico (Olympus IX70) e fotografadas utilizando câmera acoplada (Qimaging).

Imagens de 10 diferentes campos foram analisadas utilizando a ferramenta *Cell counter* do programa Image J (National Institutes of Health). A

percentagem de células expressando β -galactosidase (representada por uma coloração cyan perinuclear) em relação ao número total de células em cultura foi determinada. Os resultados foram plotados em gráfico utilizando o GraphPad Prism 5.0.

3.12. Análise citogenética

A análise citogenética das hASCs, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB e SH, foi realizada nas 4^a e 10^a passagens, pelo Setor de Desenvolvimento e Inovação do Instituto Hermes Pardini. Para isso, as células foram cultivadas em garrafas T-75 (Sarstedt) até alcançarem confluência de 90%. Neste momento a divisão celular foi bloqueada através da incubação das culturas com 0,1 μ g/mL da solução KaryoMax colcemid (Invitrogen) em PBS 0,15 M, pH 7,2 por 15 minutos, com intuito de obter maior número de células em metáfase. Subsequentemente, as células foram coletadas, por tratamento com tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen) e ressuspensas em solução hipotônica de KCl 0,075 M (Merck). As células foram deixadas sedimentar espontaneamente, por 10 minutos e, em seguida, fixadas em solução de metanol absoluto e ácido acético glacial (3:1; Merck).

As células foram espalhadas em lâminas de vidro e avaliadas em relação ao bandamento G e análise cromossômica de acordo com o *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2013). As imagens e laudos foram fornecidos pela Especialista Laboratorial Pleno, Soraia Patrícia de Paula Jesuíno Frade, do Instituto Hermes Pardini.

3.13. Animais

Todos os procedimentos envolvendo animais estão de acordo com os princípios éticos da experimentação animal, adotados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (processo nº: 373/2012) (**Anexo V**).

No ensaio de tumorigênese e regeneração de defeito ósseo em calvária foram utilizados camundongos, *Mus musculus*, da linhagem BALB/c *nude*, adquiridos do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Campinas, Brasil.

No ensaio de biocompatibilidade *in vivo* das matrizes tridimensionais de PHB-HV foram utilizados ratos, *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Lewis, adquiridos do Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas, UFMG.

3.14. Ensaio de tumorigênese *in vivo*

A avaliação da tumorigenicidade das hASCs, cultivadas em meio de cultura suplementado com SH, foi realizada em camundongos *Mus musculus* BALB/c *nude*.

Foram utilizados 3 animais por grupo no ensaio. Estes eram machos de 8 semanas e peso de aproximadamente 20 gramas.

Os animais foram mantidos antes e durante o experimento, no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, dentro de mini-isoladores individuais de polisulfona autoclaváveis, de 30 x 20 x 21 cm de tamanho, com maravalha autoclavada (121°C/30 minutos), recebendo alimentação sólida balanceada e água autoclavada *ad libitum*.

No ensaio 4 grupos experimentais foram avaliados: (i) MDA-MB-231 (células de câncer de mama- controle positivo), (ii) células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs) FN052- controle positivo, (iii) hASC (teste) e (iv) solução salina (controle negativo).

A linhagem de células MDA-MB-231 foi obtida da ATCC e a linhagem FN052 foi gentilmente cedida pelo Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias, Brasil. Como outros autores já reportaram que as MSCs cultivadas *in vitro* em meio de cultura suplementado com SFB podem ser expandidas por inúmeras passagens sem adquirir potencial de formação de tumores e/ou teratomas e de acordo com os requerimentos éticos, as hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB não foram avaliadas neste ensaio.

As hASCs, cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH, na 4ª passagem, foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 e aproximadamente 1×10^6 células foram recolhidas por tratamento com tripsina 0,05% EDTA (Invitrogen). Em seguida, as células foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (2 vezes) e ressuspensas em solução de PBS 0,15 M, pH 7,2 com 50% de

matrigel (BD Biosciences). Imediatamente, a suspensão de células foi injetada no espaço subcutâneo da região dorso-lateral dos camundongos. Os animais foram monitorados até o aparecimento de tumor visível.

Após observação de tumor visível e palpável, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Os tumores foram removidos, fotografados e mensurados suas dimensões com paquímetro digital. Em seguida, os tumores foram fixados em *p*-formaldeído 4% por 1 hora, processados e incluídos em parafina, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG.

Os tumores foram desidratados por imersão em concentrações crescente de etanol: 70%, 80%, 90%, 100% (2 vezes), por uma hora em cada um deles. Após a desidratação, os tumores foram diafanizados com três banhos (20 minutos cada) em líquido miscível com o meio de inclusão (xilol/toluol). Para a inclusão os tumores foram embebidos em parafina líquida (60°C). Os blocos de parafina obtidos foram submetidos à microtomia. Cortes histológicos de 6 µm de espessura foram preparados e corados por hematoxilina e eosina (H&E).

Os cortes de H&E foram analisados em microscópio óptico (Olympus BX-41) e fotografados por câmera acoplada (Q-Color3 digital, QImaging).

3.15. Processamento das matrizes tridimensionais de PHB-HV

O PHB-HV, peso molecular 425,692 kDa, utilizado na produção das matrizes tridimensionais era constituído por 12% de HV. Este polímero foi obtido a partir da fermentação da cana-de-açúcar por bactérias do gênero *Alcaligenes*, produzido e fornecido pela PHB Industrial S/A, Serrana – SP, Brasil.

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram processadas pelo Grupo “3B’s *Research Group in Biomaterials, Biodegradables and Biomimetics*” – Instituto Europeu de Excelência em Engenharia de Tecidos e Medicina Regenerativa, Braga, Portugal.

Para o desenvolvimento das matrizes tridimensionais de PHB-HV foi utilizada a técnica de liofilização. O pó do polímero PHB-HV, sem nenhum tratamento adicional para purificação, foi dissolvido em clorofórmio (VWR

International) a 60°C, sob constante agitação magnética até a dissolução completa, obtendo a solução polimérica com concentração final de 7,5% PHB-HV (m/v). A esta solução polimérica foi adicionada uma fase aquosa de ácido acético (Panreac) para obter uma emulsão, que foi congelada a -80°C e subsequentemente liofilizada (Telstar) a -76,6°C, por 94 horas. As matrizes tridimensionais produzidas foram cortadas em matrizes de tamanho menor com aproximadamente 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura.

Todas as matrizes tridimensionais de PHB-HV utilizadas neste projeto foram esterilizadas por irradiação gama, a 15 KGy, por 30 minutos, realizada no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN) – UFMG.

3.16. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV

3.16.1. Microscopia eletrônica de varredura

A arquitetura das matrizes tridimensionais de PHB-HV em relação a características de superfície, tamanho e distribuição dos poros foi preliminarmente observada por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Para essas análises as amostras foram submetidas a metalização com ouro, prévia a observação ao microscópio eletrônico de varredura DSM950 (Zeiss) a 15 kV e distância de trabalho de 20 mm, realizado no Centro de Microscopia do Instituto de Ciências Biológicas (CEMEL) – UFMG.

3.16.2. Microtomografia computadorizada

Para a análise da estrutura tridimensional interna das matrizes foi utilizado um equipamento de microtomografia computadorizada (μ -CT) SkyScan 1072, como uma técnica não destrutiva.

As matrizes tridimensionais foram analisadas em modo de alta-resolução de 6,9 mm x/y/z e tempo de exposição de 1792 ms. Os parâmetros de energia definidos no scanner foram de 50 kV e 185 mA. Imagens seriadas obtidas foram reconstruídas tridimensionalmente, utilizando o programa CT-Vol image (SkyScan) e, NRecon e CT-Na, para analisar a microestrutura das matrizes, morfologia dos poros e determinar a porosidade e tamanho dos poros.

3.16.3. Teste de compressão

As propriedades mecânicas da matriz tridimensional de PHB-HV foram determinadas utilizando um equipamento universal de ensaios mecânicos Instron 4505.

Para os ensaios de tração, as matrizes tridimensionais foram produzidas com as seguintes dimensões: 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura.

Os testes foram realizados sob uma carga de compressão à velocidade de 2 mm/minuto a temperatura ambiente.

As propriedades mecânicas das matrizes tridimensionais foram analisadas em ambas as direções, transversal e radial para confirmar se a anisotropia morfológica observada poderia afetar o comportamento mecânico. Para cada direção testada, os resultados apresentados são uma média obtida entre 5 diferentes amostras.

3.16.4. Espectroscopia de energia dispersiva

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram analisadas através de espectroscopia de energia dispersiva (EDS), com o objetivo de caracterizar e confirmar os constituintes químicos através da captação de raios-X característicos resultantes da interação do feixe primário de elétrons com a amostra.

As matrizes foram submetidas a metalização com ouro, prévia a observação ao microscópio eletrônico de varredura, através do qual as áreas a serem analisadas por EDS foram escolhidas. O espectrômetro de energia dispersiva (Quanta 200 - FEG - FEI - 2006) – Centro de Microscopia/UFMG, utilizado, fornece as informações qualitativa e semi-quantitativa de cada área analisada.

3.17. Colonização *in vitro* das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASCs

As hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH foram semeadas sobre as matrizes de PHB-HV, na densidade de 5×10^3 células/matriz tridimensional formando uma gotícula de meio contendo as

células sobre a matriz, já dispostas em placas de 48 poços, na ausência de meio de cultura. A placa foi incubada a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas, para a adesão celular à matriz. Após a incubação, foi adicionado 1 mL/poço de meio de cultura basal e as células foram cultivadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Em alguns ensaios após 24 horas de incubação com o meio de cultura basal, este foi substituído pelo meio osteogênico suplementado com SH (SH-O) para indução da diferenciação osteogênica. Estas matrizes tridimensionais foram cultivadas por 7, 14, 21 e 28 dias, com troca do meio de cultura realizado 3 vezes por semana. Após cada intervalo de cultivo, as amostras foram utilizadas em ensaios, descritos a seguir, para comprovar a diferenciação das hASCs em células da linhagem osteogênica.

3.18. Avaliação da colonização e adesão celular as matrizes tridimensionais de PHB-HV

Análises por MEV foram realizadas para confirmar a presença, adesão, distribuição e morfologia das hASCs cultivadas nas matrizes de PHB-HV.

Após a colonização das matrizes, estas foram mantidas em meio de cultura basal suplementado com SH. Após 7, 14, 21 e 28 dias, as matrizes colonizadas foram preparadas para análise por MEV.

A primeira etapa do processamento consiste na fixação das células, assim o meio de cultura foi delicadamente removido e as amostras lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes). Em seguida, as amostras foram fixadas com glutaraldeído a 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, em volume suficiente para cobrir as matrizes, por um período de no mínimo 2 horas a temperatura ambiente.

Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (3 vezes, por 10 minutos) e em seguida adicionado tetróxido de ósmio (Electron Microscopy Sciences) a 1% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, a 4°C, por 1 hora e protegido de luminosidade. As amostras foram novamente lavadas com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (3 vezes, por 10 minutos) e adicionada solução de ácido tânico 1% em água destilada, por 20 minutos, seguida de lavagens com tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 (3 vezes, por 10 minutos) e

adicionada nova solução de tetróxido de ósmio a 1% em água destilada, a 4°C, por 1 hora, protegido da luz.

Ao término desta etapa, as amostras foram lavadas com água destilada (3 vezes, por 10 minutos), iniciando-se a etapa de desidratação das amostras, através da imersão das mesmas em gradiente de álcool etílico em concentrações crescente - 30%, 50%, 70%, 90% - (2 vezes, por 10 minutos cada) e por fim, em álcool etílico 100%, por 30 minutos.

Finalizada a desidratação, as amostras permaneceram em álcool 100% até a secagem em ponto crítico de CO₂, realizado no aparelho de ponto crítico (CPD-020; Balzers), CEMEL do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, processo pelo qual o álcool é substituído por CO₂, evitando dano à célula, causado pela tensão superficial durante o processo de evaporação natural.

As amostras secas foram aderidas sobre suporte de alumínio e submetidas ao processo de metalização com ouro. As imagens foram obtidas no Microscópio Eletrônico de Varredura DSM950 (Zeiss), utilizando voltagem de 10 kV e distância de trabalho de 14 mm. A metalização e MEV foram realizadas no CEMEL do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG.

3.19. Análise da citotoxicidade *in vitro* e proliferação celular durante a diferenciação osteogênica.

As matrizes de PHB-HV colonizadas por hASCs foram mantidas por 7, 14, 21 e 28 dias em meio de cultura basal e meio osteogênico, suplementado com SH. Após cada tempo de cultivo a viabilidade e proliferação das hASCs cultivadas nas matrizes de PHB-HV foram avaliadas pelo ensaio de MTT, conforme descrito no *item 3.4*.

Para evitar a possível interferência da matriz tridimensional no processo de colorimetria, foi realizado o ensaio somente com as matrizes sem células. Dos valores obtidos para as matrizes com células cultivadas em meio de cultura basal, nos diferentes tempos, foi subtraído o valor da média obtido somente com as matrizes.

3.20. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada pelo kit de ensaio de 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina (BCIP) - nitroblue tetrazólio clorídrico (NBT) (Gibco). Este ensaio é baseado na reação cromogênica decorrente da clivagem de um grupamento fosfato do BCIP pela fosfatase alcalina produzida pelas células. Essa reação produz um próton que reduz o NBT, formando um precipitado insolúvel de cor púrpura (Valerio et al., 2004).

As matrizes de PHB-HV foram colonizadas por hASCs e induzidas a diferenciação osteogênica conforme descrito no *item 3.17*. Ao término de cada período de incubação, o meio de cultura foi retirado e descartado, as matrizes colonizadas foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (2 vezes) e incubadas com 200 µL/poço da solução de BCIP-NBT (preparada de acordo com as instruções do fabricante) a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 2 horas.

Após o período de incubação observou-se, em microscópio óptico (Olympus IX70), a formação dos precipitados púrpura. Em seguida, foram adicionados 210 µL/poço de SDS 10%-HCl para a solubilização dos precipitados e as placas foram incubadas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 18 horas. Transferiu-se 100 µL de cada poço, em triplicata, para uma placa de 96 poços (fundo reto) e a densidade óptica foi mensurada em espectrofotômetro Anthos 2010 (Biochromm) a 595 nm. Os dados foram adquiridos pelo programa ADAP Basic (Anthos Labtec). Durante o experimento, todos os passos envolvendo os reagentes foram executados em condições de mínima luminosidade.

Como controle foram utilizadas matrizes colonizadas com hASCs em meio de cultura basal, nas mesmas condições. E para evitar a possível interferência da matriz tridimensional no processo de colorimetria, também foi realizado o ensaio somente com as matrizes sem células e dos valores de densidade óptica obtidos para as matrizes com células, nos diferentes tempos, foi subtraído o valor da média obtido somente com as matrizes.

3.21. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação

As matrizes de PHB-HV colonizadas por hASCs induzidas a diferenciação osteogênica em meio suplementado com SH, descrito no *item* 3.17, foram analisadas por imunofluorescência, para detectar a expressão de proteínas específicas, produzidas por osteoblastos e por PCR, para detectar a expressão gênica de marcadores associados a diferenciação de osteoblastos.

3.21.1. Imunofluorescência das secções

As amostras das matrizes de PHB-HV foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (2 vezes) para retirar o meio de cultura e fixadas em solução de *p*-formaldeído a 4% em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,4, por 24 horas. Em seguida, foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2, por 5 minutos e colocadas em solução de sacarose a 10% em PBS 0,15 M, a 4°C, por 6 horas. Após esse período, as amostras foram transferidas para uma solução de sacarose a 20% em PBS 0,15 M, pH 7,2, a 4°C, por 24 horas. Posteriormente as amostras foram congeladas a -30°C, em meio de inclusão para criostato, solúvel em água (Easy Path). Secções histológicas de 10 µm foram obtidas em criostato (Leica CM1510S-Leica Microsystems) e estas foram mantidas a -20°C até o momento de realizar a marcação para imunofluorescência.

Secções de todos os grupos e diferentes intervalos de indução foram descongeladas por 10 minutos e em seguida iniciadas a etapa de hidratação, através da imersão das mesmas em uma série decrescente de etanol: etanol 100% (3 vezes), 95% e 80%, por 5 minutos cada. Para finalizar, as secções foram imersas em 6 banhos de água destilada, por 5 minutos e 3 banhos de PBS 0,15 M, pH 7,2, por 5 minutos.

A etapa de permeabilização foi realizada incubando as secções com solução Triton X-100 a 0,25% e BSA a 2% em PBS (200 µL/secção) por 1 hora, em câmara úmida a temperatura ambiente. As secções foram lavadas através da imersão em PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes, por 5 minutos) e incubadas com solução de BSA a 2% e Tween 20 a 0,1% em PBS, por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente.

Após a permeabilização, as secções foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes, por 5 minutos), e feito o bloqueio de reações inespecíficas, incubando as secções com solução de 5% de soro de cabra e BSA a 1% em PBS, por 1 hora em câmara úmida a temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram lavadas novamente em solução de PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes, por 5 minutos).

Posteriormente, as secções foram incubadas com os anticorpos primários (**Tabela 5**) diluídos em solução de Triton X-100 a 0,025% e BSA a 0,2% em PBS 0,15 M, pH 7,2, por 2 horas, em câmara úmida, a temperatura ambiente.

Tabela 5. Anticorpos primários utilizados na marcação das secções para imunofluorescência.

Antígeno	Tipo	Espécie	Conjugado	Fornecedor	Diluição
OSTEOPONTINA	Policlonal	Coelho	-	Abcam	1:200
OSTEOCALCINA	Monoclonal	Camundongo	-	Abcam	10 µg/mL
COLÁGENO I	Monoclonal	Camundongo	-	Abcam	1:200

Após incubação com anticorpo primário, as secções foram novamente lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes, por 5 minutos) e, em seguida, foram incubadas com os respectivos anticorpos secundários Alexa Fluor 488 *goat* anti-camundongo IgG 2 mg/mL (1:500; Invitrogen) ou Alexa Fluor 488 *goat* anti-coelho IgG 2 mg/mL (1:500; Invitrogen), diluídos em solução de Triton X-100 a 0,025% e BSA a 0,2% em PBS 0,15 M, pH 7,2, por 1 hora em câmara úmida, na ausência de luminosidade e a temperatura ambiente. Os controles negativos foram feitos utilizando-se apenas a marcação com os respectivos anticorpos secundários.

Posteriormente, as secções foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes, por 5 minutos) e incubadas com a sonda Hoechst 33258 pentahydrate 1 µg/mL (Invitrogen), por 20 minutos, para marcação do núcleo. Em seguida, foram feitas novas lavagens com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes, por 10 minutos). E as lâminas montadas com Hydromount Aqueous (National Diagnostics) e lamínulas.

As lâminas montadas foram visualizadas e analisadas através do Microscópio Confocal LSM 510 Meta (Zeiss), CEMEL do Departamento de

Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se o programa Carl Zeiss Laser Scanning Microscope LSM 510©.

3.21.2. PCR - Análise da expressão gênica de COL1A1, RUNX2, ALPL e BGLAP

As amostras de PHB-HV colonizadas por hASCs e induzidas a diferenciação obtidas após cada intervalo de tempo, assim como a cultura de monocamada em meio de cultura basal suplementado com SH (controle) foram avaliadas por reações de PCR em relação a expressão dos seguintes transcritos gênicos: *collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)*, *runt-related transcription factor 2 (RUNX2)*, *alkaline phosphatase, liver/bone/kidney (ALPL)*, e *bone gamma-carboxyglutamate (gla) protein (BGLAP)*. *GAPDH* foi usado como gene de referência.

A extração do RNA dos constructos e das culturas em monocamada, após cada intervalo de tempo foi realizada utilizando TRIZOL (Invitrogen). O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante e previamente descrito no *item 3.10.1*.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase (Promega) e, em seguida, sintetizado o cDNA, pelo tratamento com RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (Fermentas) previamente descrito no *item 3.10.2*.

Os pares de *primers* específicos para cada gene de interesse (**Tabela 6**) foram desenhados através do programa Primer3 versão 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os parâmetros selecionados no programa para a elaboração dos *primers* foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular variasse entre 100 e 700 pb, apresentasse teor de GC entre 30 e 60% e não apresentasse complementariedade entre si ou mesmo estruturas secundárias estáveis.

Após a síntese do cDNA, foram realizadas as reações de PCR para cada par de *primer*, conforme descrito no *item 3.10.4*. Os resultados foram visualizados por expressão de bandas de tamanho esperado para cada par de *primers*.

Tabela 6. Sequência dos *primers* utilizados nas reações de PCR.

Gene	Nome	Espécie	Sinônimo	Sequencia (5' - 3')		Tamanho fragmento	Concentração primers	Tm	Sequência de referência NCBI																																								
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	<i>Homo sapiens</i>	GAPDH	F	ACATCGCTCAGACACCATG	143 pb	0,5 µm	60°C	NM_002046.5																																								
				R	TGTAGTTGAGGTCAATGAAGGG					ALPL	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	<i>Homo sapiens</i>	Fosfatase alcalina	F	TGGTGGGAAGGAGGCAGAATTGAC	581 pb	0,5 µm	62°C	NM_000478.4	R	CAGGACGCTCAGGGGGTAGA	COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Colágeno tipo I	F	TGACGAGACCAAGAACTG	600 pb	0,5 µm	62°C	XM_011524341.1	R	CCATCCAAACCACTGAAACC	BGLAP	<i>Bone gamma carboxyglutamate protein</i>	<i>Homo sapiens</i>	Osteocalcina	F	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	297 pb	0,5 µm	59°C	NM_199173.4	R	CGGGCCGTAGAAGCGCCGATA	RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	RUNX2
ALPL	<i>Alkaline phosphatase, liver/bone/kidney</i>	<i>Homo sapiens</i>	Fosfatase alcalina	F	TGGTGGGAAGGAGGCAGAATTGAC	581 pb	0,5 µm	62°C	NM_000478.4																																								
				R	CAGGACGCTCAGGGGGTAGA					COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Colágeno tipo I	F	TGACGAGACCAAGAACTG	600 pb	0,5 µm	62°C	XM_011524341.1	R	CCATCCAAACCACTGAAACC	BGLAP	<i>Bone gamma carboxyglutamate protein</i>	<i>Homo sapiens</i>	Osteocalcina	F	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	297 pb	0,5 µm	59°C	NM_199173.4	R	CGGGCCGTAGAAGCGCCGATA	RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	RUNX2	F	CCAGGCAGTTCCCAAGCATTT	377 pb	0,5 µm	53°C	NM_001024630.3	R	TCCATCAGCGTCAACACCATC				
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>	<i>Homo sapiens</i>	Colágeno tipo I	F	TGACGAGACCAAGAACTG	600 pb	0,5 µm	62°C	XM_011524341.1																																								
				R	CCATCCAAACCACTGAAACC					BGLAP	<i>Bone gamma carboxyglutamate protein</i>	<i>Homo sapiens</i>	Osteocalcina	F	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	297 pb	0,5 µm	59°C	NM_199173.4	R	CGGGCCGTAGAAGCGCCGATA	RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	RUNX2	F	CCAGGCAGTTCCCAAGCATTT	377 pb	0,5 µm	53°C	NM_001024630.3	R	TCCATCAGCGTCAACACCATC																
BGLAP	<i>Bone gamma carboxyglutamate protein</i>	<i>Homo sapiens</i>	Osteocalcina	F	ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	297 pb	0,5 µm	59°C	NM_199173.4																																								
				R	CGGGCCGTAGAAGCGCCGATA					RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	RUNX2	F	CCAGGCAGTTCCCAAGCATTT	377 pb	0,5 µm	53°C	NM_001024630.3	R	TCCATCAGCGTCAACACCATC																												
RUNX2	<i>Runt related transcription factor 2</i>	<i>Homo sapiens</i>	RUNX2	F	CCAGGCAGTTCCCAAGCATTT	377 pb	0,5 µm	53°C	NM_001024630.3																																								
				R	TCCATCAGCGTCAACACCATC																																												

3.22. Avaliação da biocompatibilidade *in vivo* da matriz tridimensional de PHB-HV

Para a avaliação da biocompatibilidade *in vivo* da matriz tridimensional de PHB-HV, foram feitos implantes subcutâneos em *Rattus norvegicus albinus*, da linhagem Lewis. Para a realização do estudo foram utilizados 3 animais para cada período experimental (1, 4 e 8 semanas), fêmeas, com idade variando entre 60 e 70 dias e peso médio de 250 gramas na data do experimento inicial.

Os animais foram mantidos antes e durante o experimento, no Biotério do Departamento de Bioquímica e Imunologia, do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, dentro de gaiolas individuais de policarbonato, de 30 x 50 cm de tamanho, com maravalha, recebendo alimentação sólida balanceada e água filtrada *ad libitum*.

3.22.1. Procedimento cirúrgico da avaliação da biocompatibilidade *in vivo* das matrizes tridimensionais de PHB-HV

Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados com solução de Ketamina (Francootar 10%) e Cloridrato de Xylazina (Virbaxyl 2%), na proporção 1:1 e na dose 0,10 mL/100 gramas de massa corporal, via intramuscular. Foi realizada a tricotomia da região e assepsia com PVPI (solução de iodo a 10%).

Posicionado em decúbito ventral e com o auxílio de bisturi, uma incisão longitudinal na pele que recobre o dorso do animal foi realizada. Foi feito o implante subcutâneo da matriz tridimensional de PHB-HV, com aproximadamente 6 mm de diâmetro e 4 mm de altura, previamente esterilizada (*item 3.15*). A pele foi repostada e suturada com fio de sutura de algodão 4.0.

Após o procedimento, os animais foram mantidos em aquecimento por um período de 6 horas antes de retornarem para as condições de temperatura, ventilação e iluminação ambiente. Durante todo período do ensaio, os animais foram observados diariamente.

3.22.2. Avaliação dos implantes subcutâneos – análise histológica

Os implantes foram avaliados após 1, 4 e 8 semanas da cirurgia. Após os tempos determinados, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. O implante extraído foi fixado em *p*-formaldeído 4% e incluído em parafina (Sigma) para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG e descrito previamente no *item 3.14*.

Cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos por microtomia, fixados em lâminas de vidro e corados por H&E.

3.23. Defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de camundongos

Para a avaliação do potencial de regeneração do osso promovido pelo implante das matrizes tridimensionais de PHB-HV cultivadas ou não com hASCs em meio de cultura suplementado com SH, foi realizado defeito ósseo de tamanho crítico (4 mm) na calvária de camundongos *Mus musculus*, linhagem BALB/c *nude* (Gupta et al., 2008). Para a realização do estudo foram utilizados 12 animais por grupo, sendo subdivididos dentro do grupo 6 animais para cada período experimental (**Tabela 7**); machos, com idade em torno de 60 dias e peso médio de 20 gramas na data inicial do experimento.

Os animais foram mantidos antes e durante o experimento, no Biotério do Instituto de Ciências Biológicas/UFMG, dentro de mini-isoladores individuais de polisulfona autoclaváveis, de 30 x 20 x 21 cm de tamanho, com maravalha autoclavada (121°C/30 minutos), recebendo alimentação sólida balanceada e água autoclavada *ad libitum*.

3.23.1. Colonização *in vitro* da matriz tridimensional de PHB-HV por hASCs

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram produzidas conforme descrito no *item 3.15*. Para avaliação da capacidade da matriz tridimensional de PHB-HV em reparar defeito ósseo de tamanho crítico realizado na calvária de camundongos, as matrizes foram cortadas com bisturi circular e lâminas de bisturi, nas seguintes dimensões: 4 mm de diâmetro e 1 mm de espessura. Em

seguida, as matrizes com as dimensões otimizadas foram esterilizadas por irradiação gama, a 15 KGy, por 30 minutos realizada no CDTN-UFMG.

As matrizes tridimensionais de PHB-HV foram distribuídas em placas de 48 poços, sendo disposta uma matriz por poço. Em seguida, 5×10^5 hASCs, cultivadas em meio de cultura suplementado com SH, foram semeadas sobre cada matriz pertencentes ao grupo que recebeu célula (**Tabela 7**). A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, para que ocorresse a adesão celular na matriz. Após a incubação, acrescentou-se a cada poço, 1 mL de meio de cultura basal suplementado com SH. As matrizes pertencentes ao grupo experimental que não recebeu células, também foram mantidas em meio de cultura basal suplementado com SH, nas mesmas condições experimentais. As matrizes foram cultivadas por 5 dias e, em seguida, foram utilizadas no ensaio *in vivo*.

Antes da implantação das matrizes no defeito ósseo, estas foram lavadas cuidadosamente com PBS 0,15 M, pH 7,2 estéril para prevenir a transferência de fatores de crescimento derivados do meio de cultura.

Tabela 7. Grupos experimentais do ensaio de defeito ósseo na calvária de camundongos.

Grupo experimental	Cultivo <i>in vitro</i>	Número de animais
Controle (vazio)	-	12 (6/período)
PHB-HV	Meio de cultura basal suplementado com SH	12 (6/período)
PHB-HV+hASCs	Meio de cultura basal suplementado com SH	12 (6/período)

3.23.2. Análise da adesão e viabilidade celular através de imunofluorescência

Para verificar a adesão e viabilidade celular das matrizes implantadas, matrizes tridimensionais de PHB-HV colonizadas com hASCs foram avaliadas por imunofluorescência utilizando-se calceína-AM (BD Biosciences), este composto não fluorescente, quando penetra nas células viáveis pode ser hidrolisado por esterases intracelular em sua forma aniônica, que é fluorescente.

Imediatamente após as cirurgias algumas amostras de matrizes tridimensionais de PHB-HV+hASCs, já lavadas com PBS, foram incubadas com

calceína 3 µg/mL em PBS 0,15 M, pH 7,2, por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido de luminosidade. Em seguida, as matrizes foram lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes/ 5 minutos) e fixadas com formaldeído 10% em PBS 0,15 M, pH 7,2, por 30 minutos. Após a fixação, as células foram incubadas com Hoechst 33258 pentahydrate 1 µg/mL (Invitrogen) por 20 minutos para marcação dos núcleos e lavadas com PBS 0,15 M, pH 7,2 (3 vezes/10 minutos).

As matrizes colonizadas foram observadas em microscópio confocal LSM 5 Live (Zeiss) e imagens adquiridas com programa Zen (Zeiss).

3.23.3. Procedimento cirúrgico

Inicialmente os animais foram pesados e anestesiados por via inalatória com 1,5-3,0% de isoflurano, em circuito anestésico com oxigênio 100%. Foi realizado tratamento profilático com cefalotina (15 mg/kg, dose única) por via intramuscular.

O animal foi posicionado em decúbito ventral e realizada a assepsia do sítio cirúrgico com PVPI (solução de iodo a 10%). Com o auxílio de um bisturi, uma incisão na linha mediana sagital foi realizada e o osso parietal foi perfurado com uma perfuratriz (Aesculap Hilan), criando um defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de 4 mm. A dura máter foi mantida sem nenhuma lesão. Os implantes foram colocados no local do defeito, de acordo com os grupos descritos na **Tabela 7**. A pele dos animais foi suturada com fio de sutura de *nylon* 4.0. O procedimento cirúrgico está ilustrado na **Figura 4**.

Após o procedimento, os animais foram mantidos sob aquecimento por um período de 4 horas antes de retornarem para os mini-isoladores e as condições de temperatura, ventilação e iluminação controladas. Durante todo o período do ensaio, os animais foram observados diariamente.

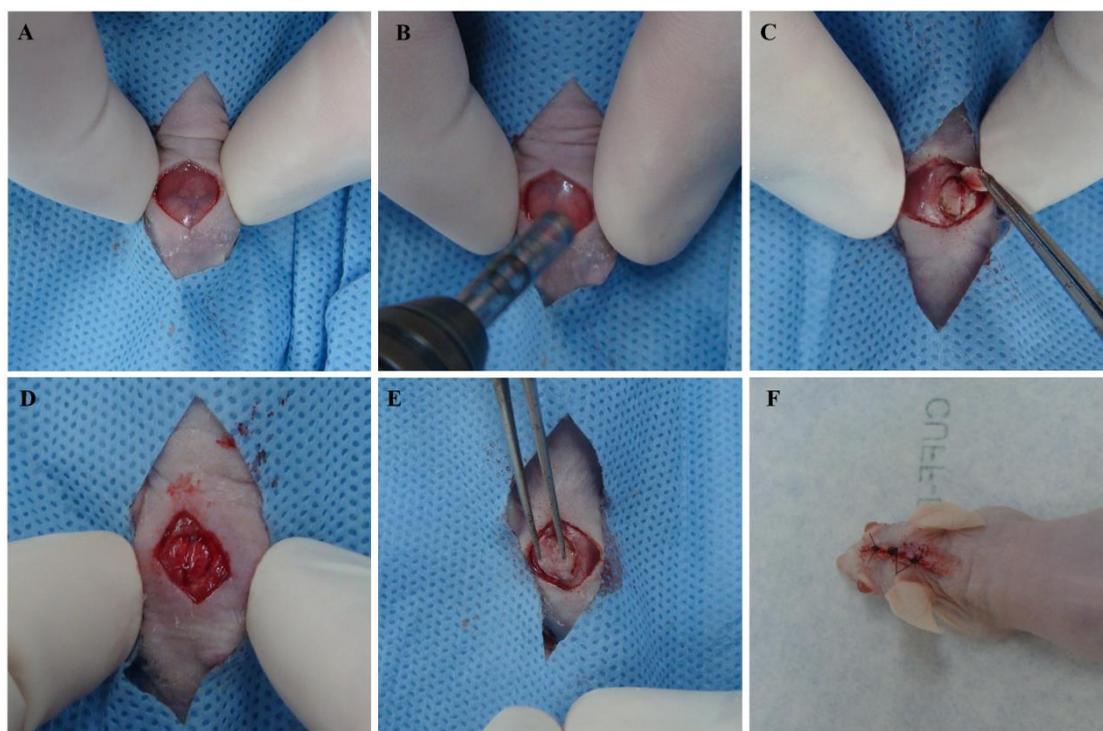


Figura 4. Representação do procedimento cirúrgico para desenvolver o defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de camundongos BALB/c *nude*. (A) Incisão na linha mediana sagital; (B) perfuração do osso parietal; (C) remoção do osso parietal; (D) lesão óssea de 4 mm de diâmetro; (E) Implantação da matriz tridimensional de acordo com o grupo experimental; (F) Pele suturada.

3.24. Avaliação do reparo do defeito ósseo

Após 4 e 12 semanas da cirurgia os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os crânios, após a dissecação, foram fotografados para análise macroscópica. Imediatamente os crânios foram fixados em solução de *p*-formaldeído 4% por 48 horas e, em seguida, dispostos em tubos de 30 mm em etanol 70% e as calvárias foram destinadas para as análises por μ -CT (2 amostras por grupo) e histologia (4 amostras por grupo). Para a avaliação da expressão gênica por qPCR, imediatamente após a dissecação dos crânios, a região do implante foi isolada e congelada a -80°C (2 amostras por grupo).

3.24.1. Microtomografia computadorizada

As calvárias coletadas, fixadas e dispostas em tubos de 30 mm em etanol 70% foram analisadas por μ -CT, utilizando o aparelho Skyscan 1172.

Os implantes foram analisados em modo de alta resolução de 8,9 μ m e tempo de exposição de 590 ms. Os parâmetros de energia definidos no

scanner foram de 48 kV e 204 μ A. Imagens seriadas obtidas foram reconstruídas tridimensionalmente, utilizando o programa NRecon.

A configuração do aparelho permitiu detectar a densidade óssea baseado no osso natural do crânio. Dessa forma, o osso maduro e a estrutura óssea nova formada de similar densidade foram observados em cor cinza, enquanto o tecido de baixa densidade óssea foi eliminado e observados em preto.

3.24.2. Análise histológica

As calvárias destinadas a avaliação histológica, já fixadas, foram descalcificadas em solução de EDTA 10%, pH 7,2 por 7 dias.

Após a descalcificação, os crânios foram lavados abundantemente em água corrente e o local do implante foi seccionado em 2 metades (parte anterior e posterior), por corte transversal do crânio com auxílio de lâmina *Gillete*. Ambas as partes foram processadas pela técnica de inclusão em Paraplast (Sigma) para análises histológicas, de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, do Departamento de Morfologia, ICB, UFMG e previamente descrito no *item 3.14*.

Foram obtidos cortes transversais de 5 μ m de espessura por microtomia e corados por H&E. As lâminas de H&E foram analisadas por microscopia óptica, pela qual foi feita o *screening* das lâminas em campos sucessivos do menor para maior aumento.

Para avaliar a neovascularização, foram contados os vasos sanguíneos em imagens consecutivas (de uma extremidade a outra do corte) obtidas em aumento de 40x, de 3 cortes histológicos de cada grupo. Para contagem foi utilizada a ferramenta *Cell counter* do programa Image J (National Institutes of Health). Os resultados representam a média do número de vasos/mm² para cada grupo.

3.24.3. Análise da expressão gênica de *RUNX2*, *COL1A1*, *ALPL*, *BGLAP* e *VEGFA* (qPCR)

As amostras de calvárias foram avaliadas por reações de qPCR em relação a expressão dos seguintes transcritos gênicos: *RUNX2*, *COL1A1*,

ALPL, *BGLAP* e *vascular endothelial growth factor A (VEGFA)*. *Actin, beta (ACTB)* foi usado como gene de referência.

A extração de RNA total foi feita somente da região do implante, congelada imediatamente após a eutanásia dos animais. O implante foi mantido congelado com nitrogênio líquido e assim macerado vigorosamente, em gral com pistilo. Após completamente macerado foi adicionado 1 mL de Trizol (Invitrogen) e macerado, a temperatura ambiente, até formação de uma pasta que derreteu após descongelamento. O conteúdo macerado foi recolhido em tubos de 1,5 mL. Em seguida, a extração do RNA total foi realizada conforme procedimento descrito no *item 3.10.1*.

As amostras de RNA total foram tratadas com DNase (Promega) e, em seguida, sintetizado o cDNA, pelo tratamento com RevertAid™ H Minus M-MuLV RT (Fermentas) previamente descrito no *item 3.10.2*.

Os pares de *primers* específicos para cada gene de interesse (**Tabela 4**) foram desenhados conforme descrito no *item 3.10.3*. Os pares de *primers* e reações de qPCR foram padronizadas e realizadas de acordo com os protocolos descritos anteriormente no *item 3.10.4* e *3.10.5*.

3.24.3.1. Análise dos dados

A expressão quantitativa dos genes de interesse foi determinada pelo método comparativo Ct, quantificação relativa (Schmittgen & Livak, 2008). A expressão relativa do gene apresenta os dados do gene de interesse relativo a algum gene de controle interno (gene de referência) e calibrador (osso maduro). Os níveis de mRNA alvo foram normalizados de acordo com o gene de referência *ACTB* e o calibrador para cada gene testado.

O cálculo da expressão gênica foi realizado utilizando-se o método:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Sendo,

$$\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência (ACTB)}] - [Ct \text{ (calibrador)} - Ct \text{ (ACTB)}]$$

Os resultados foram plotados na forma de gráfico utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

4. Resultados

4.1. Isolamento e cultivo das hASCs

O isolamento das hASCs usando ambos os meios de cultura basal, suplementado com SFB e SH foi satisfatória. As culturas primárias, obtidas após o processamento do lipoaspirado, eram compostas por uma população heterogênea de células, apresentando células aderentes à superfície plástica das garrafas de cultura, de formato fusiforme e células não aderentes, de formato arredondado.

Ao longo do cultivo, com a expansão celular e com a troca dos meios de cultura, o número de células não aderentes diminuiu em ambas as culturas, predominando a população de células aderentes de formato fusiforme, com potencial de auto-renovação e formação de colônias.

O diferencial entre os dois tipos de cultura, é que na presença de meio de cultura basal suplementado com SH, as células apresentaram um tamanho menor, menos grânulos citoplasmáticos, menor aderência à superfície plástica e maior tendência a se aglomerar ao alcançar confluência. Além disso, essas culturas apresentavam-se sempre mais densas quando comparadas as culturas cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB (**Figura 5**).

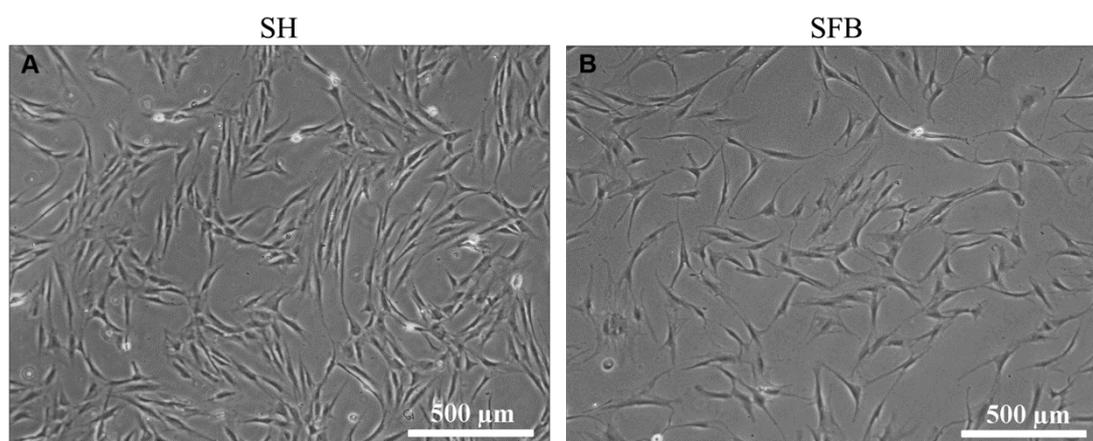


Figura 5. Característica morfológica das hASCs na 4^a passagem de um doador representativo. As células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (A) SH e (B) SFB apresentaram formato fusiforme.

4.2. Viabilidade e proliferação celular *in vitro*

As hASCs cultivadas em meio de cultura basal, suplementado com os dois tipos de soro, foram capazes de metabolizar o MTT e produzir cristais de formazan. O aumento da densidade óptica, observado ao longo dos tempos de cultivo avaliados, indicou que o tipo de suplemento utilizado não interferiu na viabilidade dessas células (**Figura 6**). As culturas de hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH apresentaram maiores valores de densidade óptica, que pode ser devido ao maior número de células em cultura, indicando uma proliferação aumentada na presença deste suplemento.

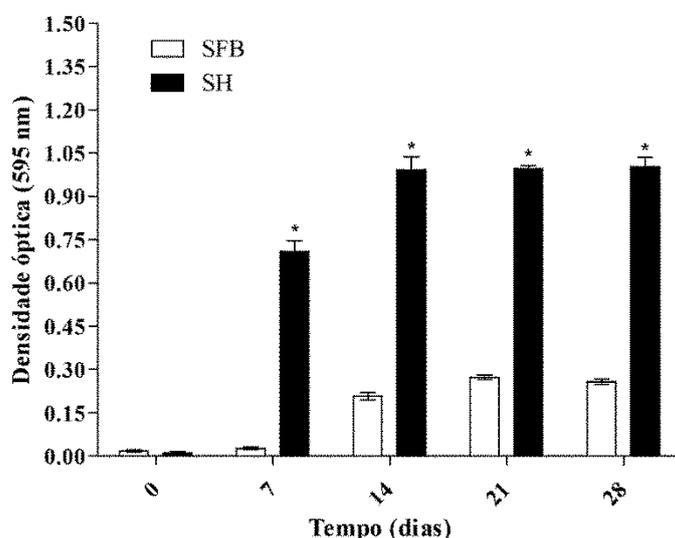


Figura 6. Viabilidade e proliferação das hASCs avaliadas pelo ensaio de MTT realizado após 7, 14, 21 e 28 dias de cultura em ambos os meios de cultura basal (SH e SFB). Os resultados foram baseados nos valores de densidade óptica mensurados a 595 nm e representam a viabilidade e proliferação das hASCs. Os resultados representam a média \pm EMP (n=3). Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* foi realizado. *p<0,05: SH vs SFB.

4.3. Caracterização do imunofenótipo das hASCs

A caracterização das populações de hASCs em relação ao imunofenótipo foi realizada na 4^a e 10^a passagens e a seguir estão representados os histogramas das populações de hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB (**Figura 7**).

Tamanho celular e granulosidade foram medidos durante a citometria de fluxo utilizando as configurações *forward* e *side-scatter* e os resultados mostraram que as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado

com SH (**Figura 7 A**) eram menores e apresentavam menos granulosidade comparado as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB (**Figura 7 B**).

Os níveis de expressão dos marcadores de superfície não mudaram significativamente entre as passagens e entre os diferentes suplementos empregados nos meios de cultura.

O perfil imunofenotípico das hASCs, em ambos os meios de cultura, na 4^a e 10^a passagem (**Figura 7 C-D**), indicou que mais de 90% das hASCs expressaram marcadores de MSCs CD105, CD166, CD90, CD73 e moléculas de adesão CD44 e CD54, e menos de 2% da população de células foi positiva para marcadores de HSCs CD45, CD34, CD19 e HLA-DR. Além disso, aproximadamente 100% das hASCs, em ambos os meios de cultura, expressaram HLA-ABC.

4.4. Potencial de diferenciação multilinhagem *in vitro*

O potencial de diferenciação das hASCs nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica foi confirmado pela coloração de *Oil Red O*, *Alcian Blue* e *von Kossa*, respectivamente (**Figura 8**).

As imagens de *Oil Red O* demonstram que após 21 dias de cultivo em meio específico, as células em meio suplementado com SH (**Figura 8 A**) e com SFB (**Figura 8 E**), foram capazes de produzir e estocar lipídeos em vacúolos no citoplasma, corados em vermelho.

A diferenciação condrogênica foi observada em ambas as condições de cultura, SH (**Figura 8 B**) e SFB (**Figura 8 D**), evidenciada pela marcação de glicosaminoglicanas, em azul, após coloração com *Alcian blue* 21 dias após o estímulo com meio específico.

A deposição de matriz mineralizada, nas culturas de SH (**Figura 8 C**) e SFB (**Figura 8 F**), pôde ser observada pela coloração de *von Kossa*, comprovando que as hASCs foram capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica quando devidamente estimuladas por 21 dias.

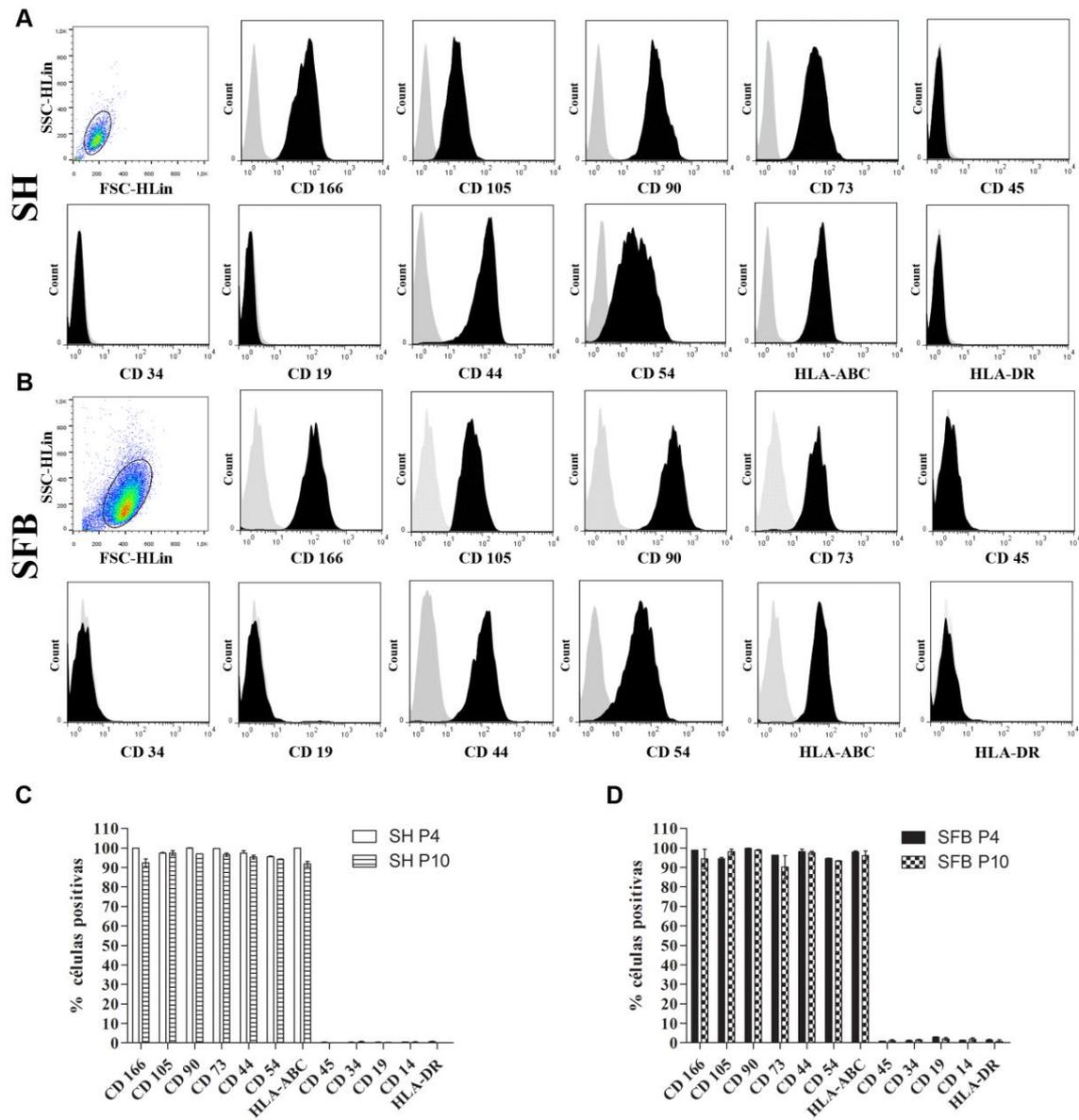


Figura 7. Análise imunofenotípica das hASCs por citometria de fluxo. Os *dot plots* representam o tamanho celular vs granulosidade das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (A) SH e (B) SFB. A expressão dos marcadores de MSCs, HSCs e HLA estão demonstrados em histogramas representativos para culturas em (A) SH e (B) SFB, na 4ª passagem. O pico em cinza representa o controle do anticorpo secundário e o pico em preto representa a marcação de células positivas para o marcador analisado. As populações avaliadas expressaram CD166, CD105, CD90, CD73, CD44, CD54 e HLA-ABC, e não expressaram CD45, CD34, CD19 e HLA-DR. Os gráficos de barra representam a análise quantitativa do padrão de expressão dos marcadores pelas hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com (C) SH e (D) SFB na 4ª e 10ª passagem.

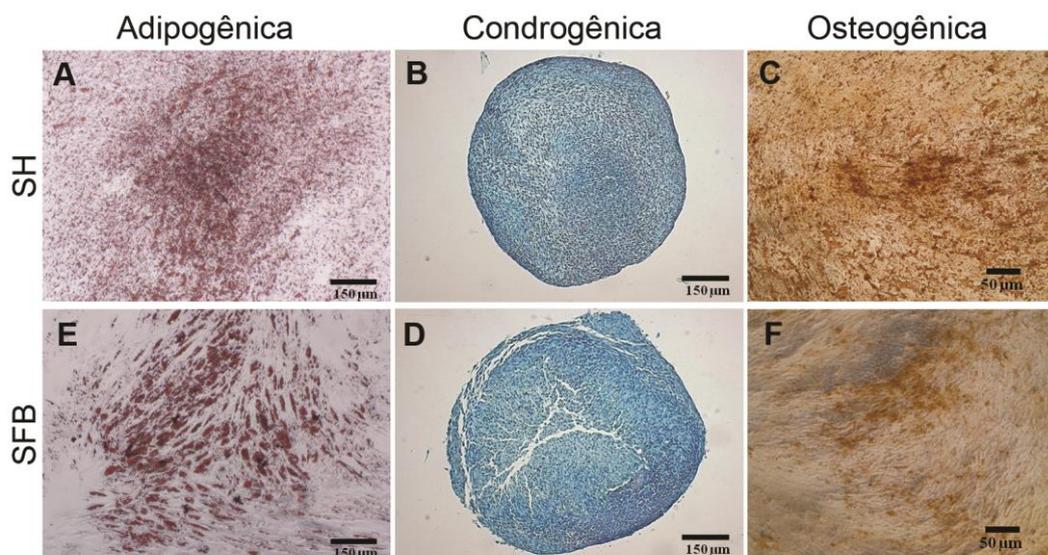


Figura 8. Multipotência *in vitro* das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB na 4^a passagem. Coloração de *Oil Red O* mostrou consistente diferenciação adipogênica, marcando em vermelho os vacúolos lipídicos intracelulares nas hASCs cultivadas em meio suplementado com (A) SH e (E) SFB; barra de escala 150 µm. A coloração de *Alcian Blue* confirmou a diferenciação condrogênica das hASCs cultivadas em (B) SH e (D) SFB, marcando em azul as glicosaminoglicanas; barra de escala 150 µm. A coloração de *von Kossa* mostrou a deposição de matriz mineralizada nas culturas de hASCs em (C) SH e (F) SFB, confirmando a diferenciação osteogênica; barra de escala 50 µm.

4.5. Expressão de Ki-67

A expressão nuclear da proteína Ki-67, marcador de proliferação celular, foi evidenciada pela fluorescência verde nos núcleos das hASCs e a fluorescência vermelha indicou a expressão de α -tubulina, demonstrando a morfologia das células (**Figura 9 A**). A porcentagem de células positivas para Ki-67 em cultura foi de aproximadamente 81,64% para hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementando com SH, na 4^a passagem. Este valor diminuiu significativamente para 37,77% das hASCs positivas na 10^a passagem. No entanto, as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementando com SFB apresentaram uma expressão de Ki-67 significativamente menor na 4^a passagem, com aproximadamente 8,25% das células positivas e cerca de 6,54% das células positivas na 10^a passagem, mas nenhuma diferença significativa foi observada entre as diferentes passagens (**Figura 9 B**).

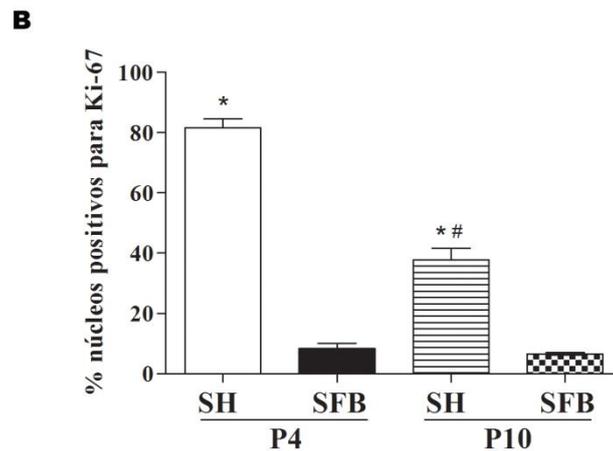
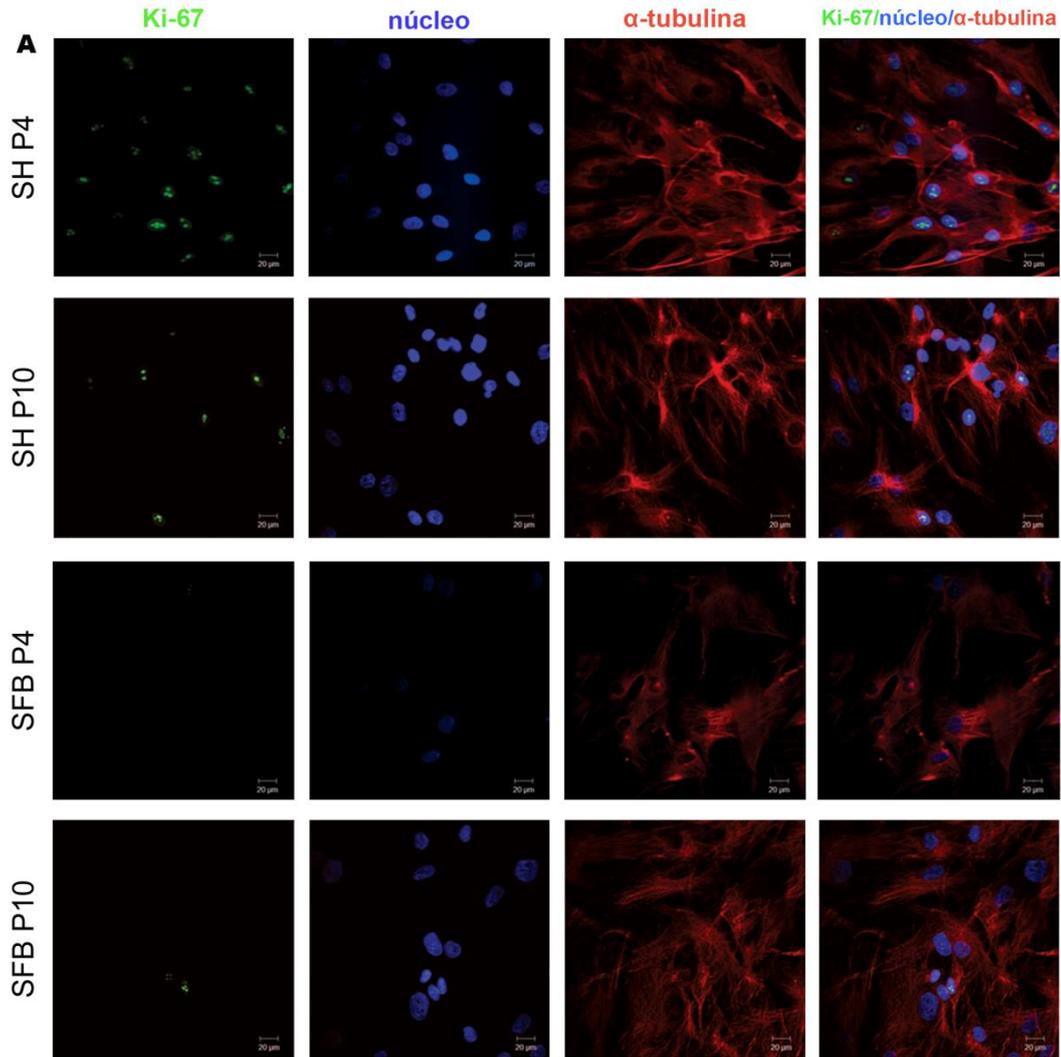


Figura 9. Expressão da proteína nuclear Ki-67 em hASCs. (A) Imagens confocal da expressão de Ki-67 (verde) em núcleos (azul) e α -tubulina (vermelho), mostrando a morfologia das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementando com SH e SFB, nas 4^a e 10^a passagem (P); barra de escala 20 μ m. (B) Percentagem de células positivas para Ki-67 em relação ao número total de células, os resultados estão expressos como média \pm EMP (n=3). Análise estatística de variância (*one-way*) seguida do teste de *Tukey* foi realizada. * $p < 0,05$: SH vs SFB e # $p < 0,05$: SH P4 vs SH P10.

4.6. Cinética de proliferação

4.6.1. Taxa de duplicação da população acumulada (DPA) e tempo de duplicação (TD)

Observou-se uma DPA significativamente maior na população de células cultivadas em meio de cultura basal suplementando com SH comparado ao SFB (**Figura 10**), esta DPA foi contínua e observada até a 14^a passagem. Em contraste, as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB apresentaram uma proliferação contínua, porém menor, que foi observada somente até a 10^a passagem, uma vez que a partir da 8^a passagem, as hASCs levaram mais de 2 semanas para alcançar a confluência desejada.

Para cada doador avaliado, o TD foi consistentemente mais rápido quando as hASCs foram cultivadas em meio de cultura basal suplementando com SH ($24,3 \pm 1,9$ horas) comparado com as hASCs em meio com SFB ($122,1 \pm 1,8$ horas).

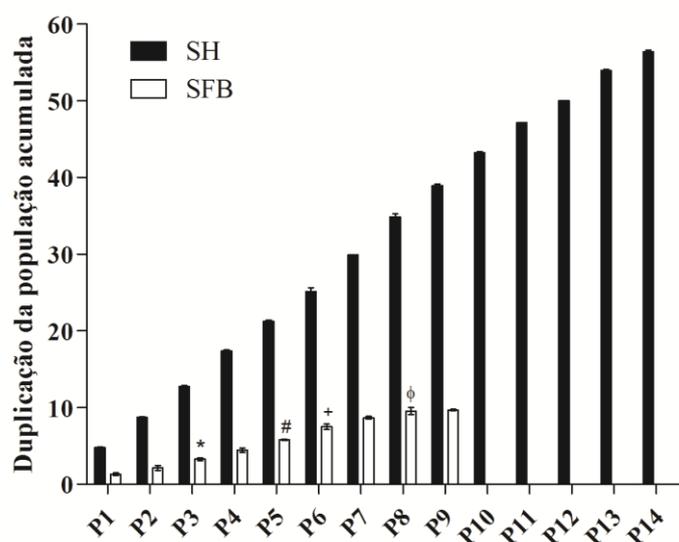


Figura 10. Média da duplicação da população de hASCs acumulada. A DPA foi avaliada e expressa em função do número de passagem para as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH (preto) e SFB (branco). Os resultados representam a média \pm EMP (n=3). Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* foi realizado. $p < 0,05$: SH vs SFB em todas as passagens avaliadas e para SH ao longo das passagens. Para as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB * $p < 0,05$: P1 vs P3; # $p < 0,05$: P3 vs P5; † $p < 0,05$: P5 vs P6; ‡ $p < 0,05$: P6 vs P8.

4.6.2. Curva de crescimento

Para avaliar melhor o período de maior proliferação foi realizada uma curva de crescimento, utilizando um mesmo número inicial de células e a proliferação foi verificada em tempos determinados de 3, 5, 7, 9 e 11 dias após o início do cultivo. A curva de crescimento das hASCs (**Figura 11**), cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH, mostrou um crescimento inicial acelerado das hASCs a partir do 7º dia de cultivo, enquanto as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB só ocorreu a partir do 9º dia de cultivo. Após o 9º dia de cultivo, as hASCs cultivadas em SH já tinham alcançado a confluência da garrafa de cultura celular estagnando, provavelmente, a proliferação celular enquanto as culturas de SFB continuaram a proliferar.

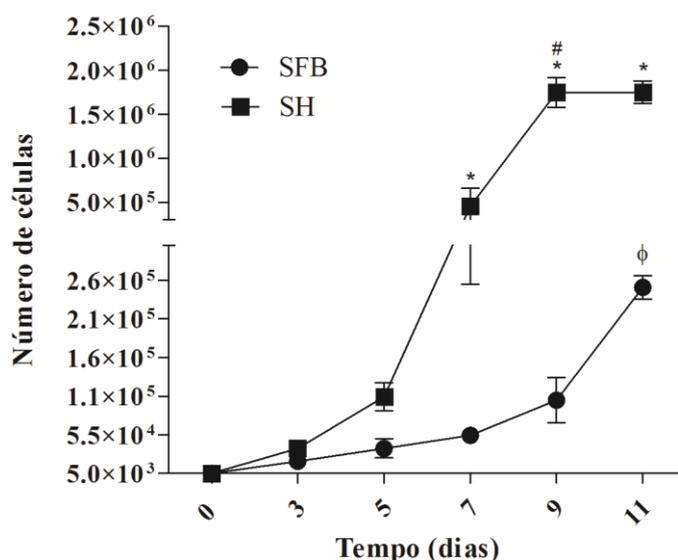


Figura 11. Curva de crescimento avaliando a cinética de proliferação das hASCs. As hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH apresentou uma proliferação inicial acelerada em relação as células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SFB. Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* ($n=3$) mostrou que $*p<0,05$: SFB vs SH, nos dias 7, 9 e 11. Considerando o crescimento entre a população de células no mesmo meio de cultivo: $\#p<0,05$: dia 7 vs dia 9 (SH), $\phi p<0,05$: dia 9 vs dia 11 (SFB).

4.7. Análise da expressão de fatores de transcrição

Diante da proliferação celular aumentada observada nas hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH, foram avaliados os fatores de transcrição c-FOS e c-MYC por *western blot*. Não foi observada

nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão da proteína c-FOS em células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH comparado ao SFB, na 4^a passagem (**Figura 12 A**).

No entanto, uma diferença significativa no nível de expressão da proteína c-MYC foi observada nas hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH comparadas a sua expressão em células cultivadas em SFB em ambas as passagens avaliadas (4^a e 10^a), sendo os níveis de expressão de c-MYC maior nas hASCs cultivadas em SH. Nenhuma diferença significativa foi observada dentro do mesmo grupo considerando as diferentes passagens (**Figura 12 B**).

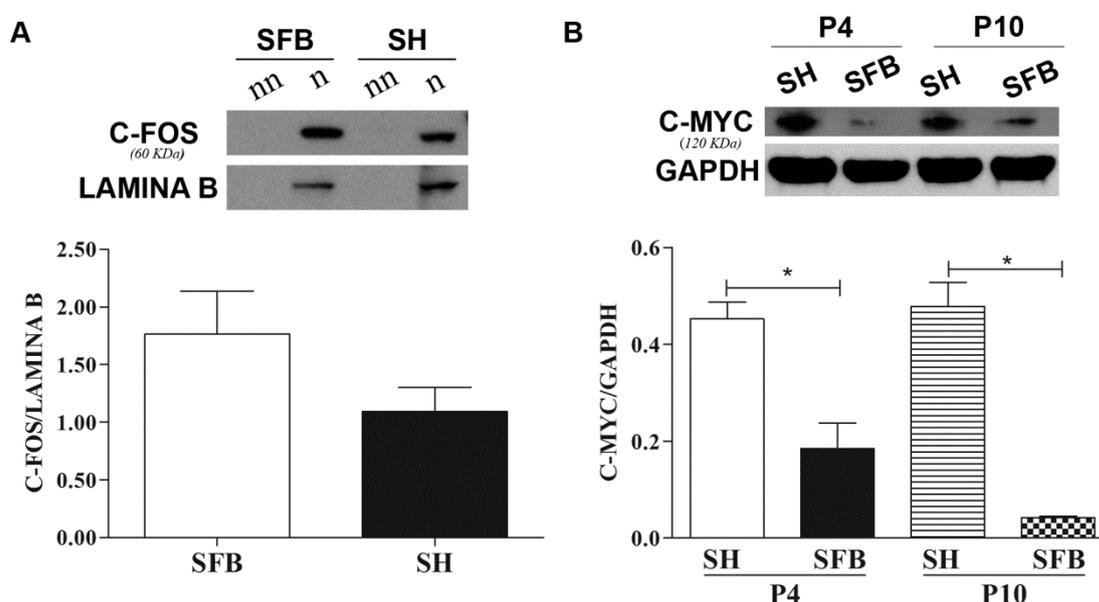


Figura 12. Expressão de fatores de transcrição das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB. (A) *Imunoblot* representativo da expressão do fator de transcrição c-FOS (60 kDa) de frações nucleares das hASCs na 4^a passagem. Análise da densidade das bandas não mostrou diferença significativa na expressão de c-FOS pelas hASCs em ambos os meios de cultura. LAMINA B (60 kDa) foi usada como controle de pureza das frações nucleares (n, nuclear e nn, não-nuclear). Os resultados plotados em gráfico foram analisados estatisticamente por teste *t-student*. Nenhuma diferença significativa foi detectada (significância estatística foi determinada para $p < 0,05$, *two-tailed*; $n=3$). (B) *Imunoblot* representativo para expressão do fator de transcrição c-MYC (120 kDa) de extratos totais das hASCs, nas 4^a e 10^a passagem. Análise da densidade das bandas mostrou maior expressão de c-MYC por hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH que em SFB, em ambas as passagens avaliadas. GAPDH (37 kDa) foi usado como controle de pureza para os extratos totais. O gráfico de barras mostrou que as hASCs cultivadas em SH apresentou uma expressão de c-MYC elevada em comparação as células cultivadas em meio suplementado com SFB. Análise estatística de variância (*one-way*) seguida do teste de *Tukey* foi realizada ($n=3$). * $p < 0,05$: SH vs SFB.

4.8. Análise da expressão gênica de *MYC*, *CDKN2A*, *ERBB2* e *TERT*

Para avaliar o padrão de proliferação das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB observado foram avaliados a expressão gênica de *MYC*, *CDKN2A*, *ERBB2* e *TERT*.

Em relação ao nível de expressão de *MYC*, não foi observada nenhuma diferença significativa na expressão de *MYC* nas hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB, na 4^a passagem. No entanto, na 10^a passagem a expressão de *MYC* diminuiu significativamente em ambas as culturas e nenhuma diferença significativa foi observada entre as duas condições de cultura (**Figura 13 A**).

Houve uma expressão significativamente maior de *CDKN2A* em hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB comparado com SH, na 4^a passagem. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre as culturas, na 10^a passagem. E, comparando a mesma condição de cultura (SH ou SFB) houve uma diminuição significativa na expressão de *CDKN2A* da 4^a para a 10^a passagem (**Figura 13 B**).

Da mesma forma, houve uma expressão significativamente maior de *ERBB2* em hASCs cultivadas em SFB comparado ao SH, nas 4^a e 10^a passagem. Assim como um aumento na expressão desse gene nas células cultivadas em SFB da 4^a para a 10^a passagem. Mas nenhuma diferença significativa foi observada nas culturas de hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH em diferentes passagens (**Figura 13 C**).

A expressão de *TERT* pelas hASCs cultivadas em ambos os meios de cultura (SH e SFB) foi baixa (**Figura 13 D**). Houve uma maior expressão de *TERT* pelas hASCs cultivadas em meio suplementado com SH na 4^a passagem. Porém nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão de *TERT* foi observado em hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH e SFB, na 10^a passagem. No entanto, independente do suplemento para meio de cultura utilizado foi observada uma redução significativa na expressão de *TERT* na 10^a passagem comparado a 4^a passagem.

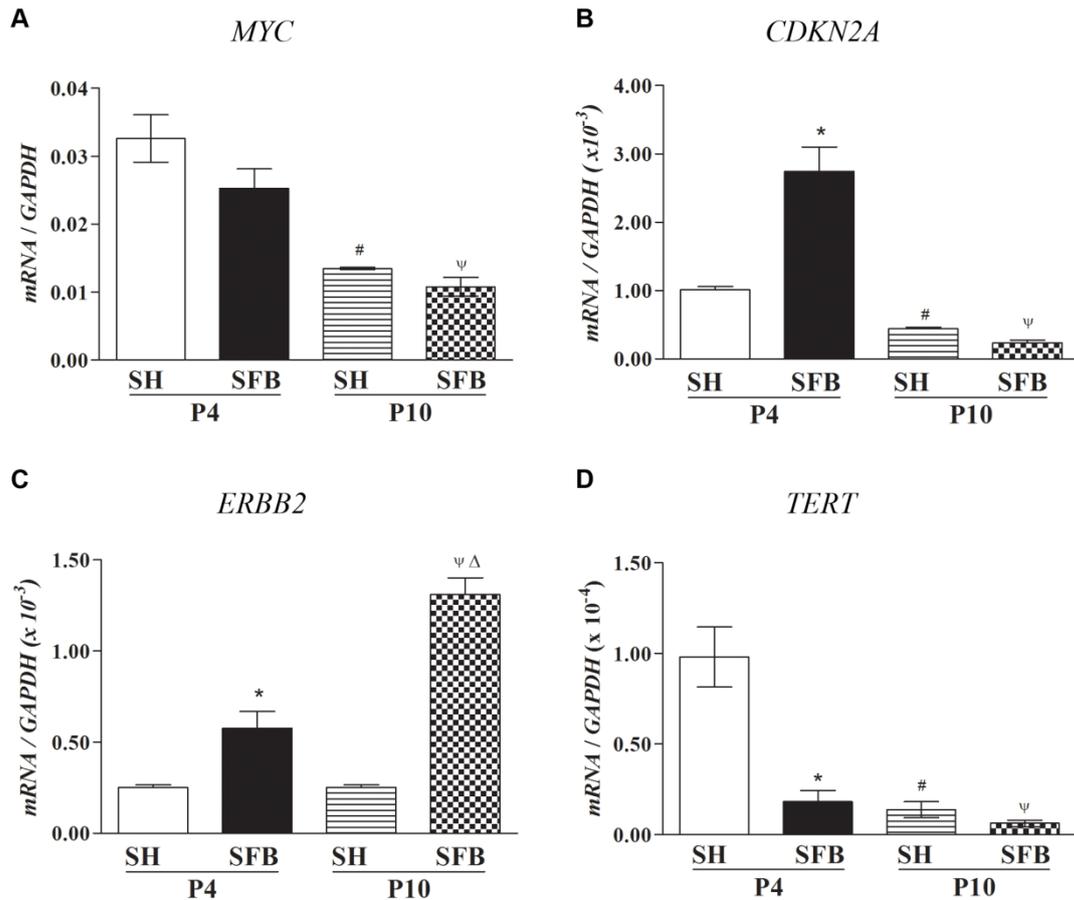


Figura 13. Análise de qPCR mostrando a expressão gênica de (A) *MYC*, (B) *CDKN2A*, (C) *ERBB2* e (D) *TERT* em hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB, na 4ª e 10ª passagem. A expressão gênica foi calculada pelo método de $2^{-\Delta Ct}$ e *GAPDH* foi usado como o gene de referência para normalizar os dados. Análise estatística de variância (*one-way*) e teste de *Tukey* foi realizada ($n=3$). * $p<0,05$: SH vs SFB, na 4ª passagem; # $p<0,05$: SH 4ª passagem vs 10ª passagem; $\psi p<0,05$: SFB 4ª passagem vs 10ª passagem; $\Delta p<0,05$: SH vs SFB, na 10ª passagem.

4.9. Avaliação da senescência replicativa

A senescência celular foi avaliada pela coloração de SA- β -gal, que detecta células senescentes individualizadas pela coloração de X-gal. Além disso, as células senescentes apresentam mudanças em sua morfologia, devido ao aumento celular e presença de mais vacúolos citoplasmáticos, que foram características observadas em hASCs senescentes (**Figura 14 A-B**).

A coloração de X-gal mostrou que somente 1,33% das hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH foram positivas para β -gal na 10ª passagem (**Figura 14 C**). No entanto, as hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB expressaram β -gal precocemente em relação as

células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH, com

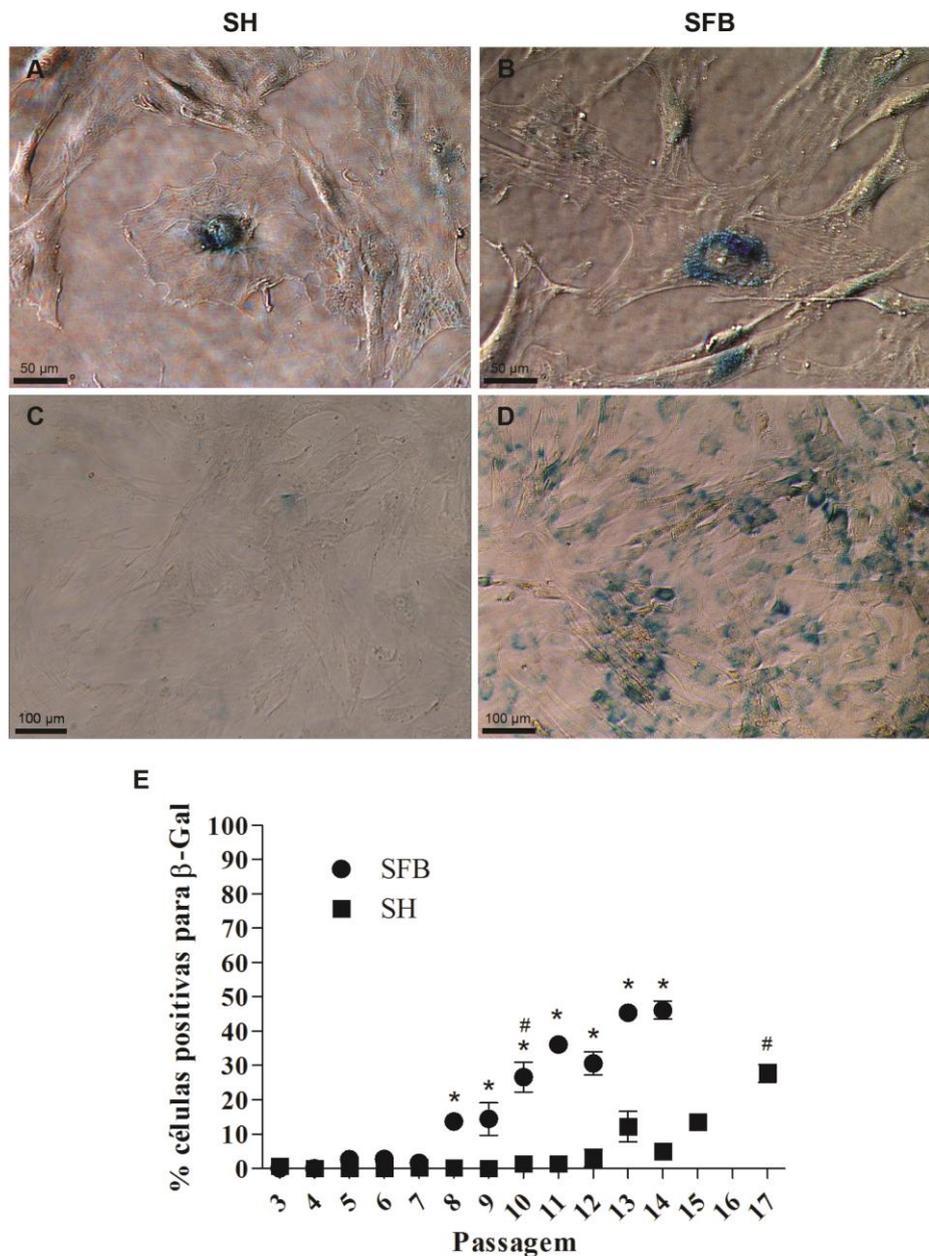


Figura 14. Senescência associada a β -galactosidase das hASCs. (A-B) Coloração de SA- β -gal mostrando a formação de precipitado *cyan* em células senescentes; barra de escala 50 μ m. Imagens representativas de hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com (C) SH e (D) SFB na 10^a passagem, demonstrando a expressão precoce de β -gal por hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB; barra de escala 100 μ m. (E) Percentagem de células β -gal-positivas em relação ao número total de células em cultura foi avaliado em cada passagem e os resultados expressos como média \pm EMP (n=3). Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* foi realizada. * $p < 0,05$: SH vs SFB, após 8^a passagem. # $p < 0,05$: indica a passagem em que a percentagem de células senescentes, na mesma condição de cultura, aumentou.

25,63% das hASCs em SFB senescentes na 10^a passagem (**Figura 14 D**), que é um nível de senescência significativo comparado com as passagens anteriores. A percentagem de hASCs, cultivadas em meio suplementado com SH, senescentes aumentou significativamente somente após a 17^a passagem comparada as passagens anteriores, com aproximadamente 27% das células em cultura senescentes (**Figura 14 E**).

4.10. Análise citogenética

O cariótipo das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB foi analisado e as células apresentaram cariótipos 46, XX em ambos os meios de cultura e em ambas as passagens avaliadas (4^a e 10^a), confirmando um cariótipo diplóide normal e demonstrando que nenhuma alteração cromossômica ocorreu nas células cultivadas *in vitro* (**Figura 15**).

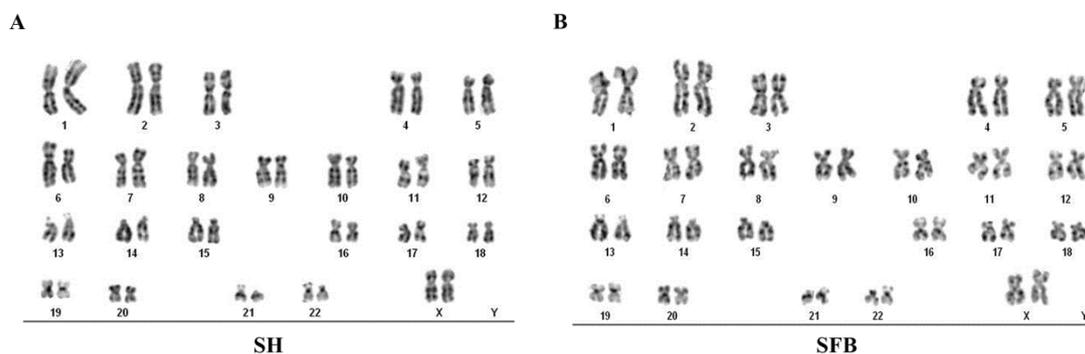


Figura 15. Análise citogenética das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH e SFB. As hASCs apresentaram cariótipo diplóide normal, que foi mantido após o cultivo celular em meio suplementado com (A) SH e (B) SFB, não sendo observado nenhum padrão nuclear anormal durante o cultivo celular. Os cariótipos apresentados são representativos de hASCs na 10^a passagem.

4.11. Ensaio de tumorigênese *in vivo*

As hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH foram avaliadas em relação a capacidade de formar tumores *in vivo*. As hASCs injetadas em camundongos imunossuprimidos não foram capazes de formar tumores após 24 semanas de acompanhamento (**Figura 16 A**). Análise histológica da região aonde as células foram injetadas não revelaram nenhuma

célula anormal ou diferenças teciduais, somente as características esperadas para o tecido subcutâneo, entre a derme e tecido muscular (**Figura 16 B**).

Os animais injetados com células MDA-MB-231 (controle positivo) formaram tumores 5 semanas após a injeção. Os tumores apresentaram dimensões de aproximadamente 8,13 mm x 7,02 mm x 5,46 mm. Análises histológicas por H&E revelaram a presença de tumores sólidos com pleomorfismo, atividade mitótica e tumores bem delineados (**Figura 16 C**). Além disso, foi observado necrose na área interna de alguns tumores.

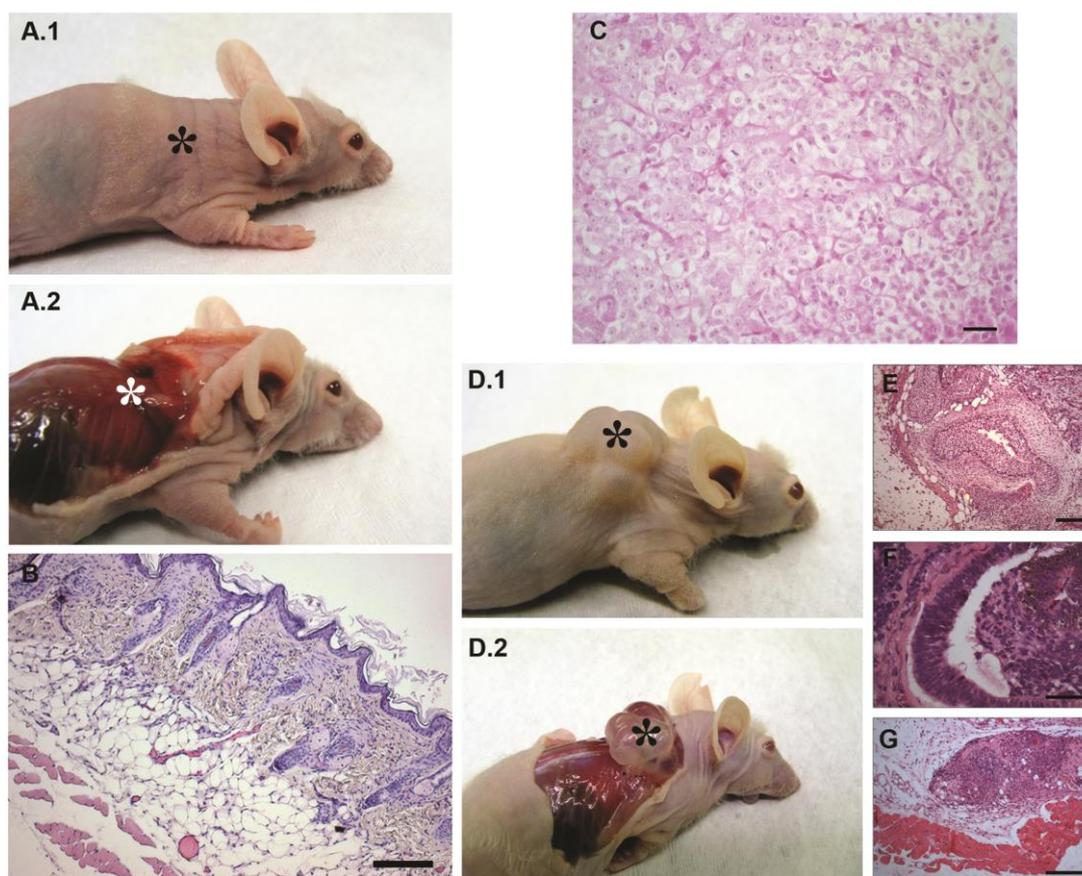


Figura 16. Ensaio de tumorigênese *in vivo*. (A) hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH foi injetada na região dorso-lateral subcutânea de camundongos imunossuprimidos e não formaram tumores. (B) Análise histológica de H&E da região de transplante mostrou camadas da pele normais; barra de escala 150 μ m. (C) Análise histológica de H&E de tumores formados após transplante de células MDA-MB-231 revelaram pleiomorfismo, atividade mitótica e tumores bem delimitados; barra de escala 30 μ m. (D) O mesmo número de células iPS FN052 formaram teratomas. Os tumores apresentaram (E) epitélio de transição (endoderma; barra de escala 150 μ m), (F) ectoderma neural (ectoderma; barra de escala 50 μ m), e (G) músculo esquelético (mesoderma; barra de escala 150 μ m), como mostrado pela coloração de H&E. * indica a região dorso-lateral aonde as células foram transplantadas.

Os animais injetados com células iPS FN052 (controle positivo) formaram tumores visíveis no local da injeção após 12 semanas. Os tumores apresentaram dimensões aproximadas de 14,16 mm x 15,86 mm x 8,04 mm (**Figura 16 D**). Os tumores eram heterogêneos e análise histológica revelou tecidos com origem nos 3 folhetos embrionários, caracterizando um teratoma. Secções teciduais representativas de H&E indicaram a presença de epitélio de transição (endoderma; **Figura 16 E**), ectoderma neural (ectoderma; **Figura 16 F**) e músculo esquelético (mesoderma; **Figura 16 G**).

4.12. Caracterização das matrizes tridimensionais de PHB-HV

As matrizes tridimensionais de PHB-HV (7,5% - m/v) foram produzidas pela técnica de liofilização e estas foram reduzidas ao diâmetro de 6 mm e 4 mm de altura (**Figura 17 A**).

As análises morfológicas das matrizes por MEV (**Figura 17 B**) mostraram, preliminarmente, que estas possuíam alta porosidade, com poros interconectados e anisotropia, com poros arredondados na direção transversal e poros laminares na direção radial.

Além disso, a análise por μ -CT revelou que as matrizes possuíam uma porosidade de $88,1 \pm 0,3\%$ e o tamanho médio dos poros $163,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ (**Figura 17 C-D**).

Os testes mecânicos revelaram que as matrizes processadas possuíam melhores propriedades mecânicas na direção transversal em comparação a direção radial. O módulo compressivo para as direções transversal e radial foram $32,09 \pm 0,273 \text{ MPa}$ e $1,24 \pm 0,307 \text{ MPa}$, respectivamente.

A análise por EDS das matrizes tridimensionais de PHB-HV detectou a presença dos seguintes elementos na superfície das matrizes C, O, e Au (este último proveniente da técnica de processamento das matrizes para microscopia), que confirmou a composição orgânica das espécies (**Figura 17 E**).

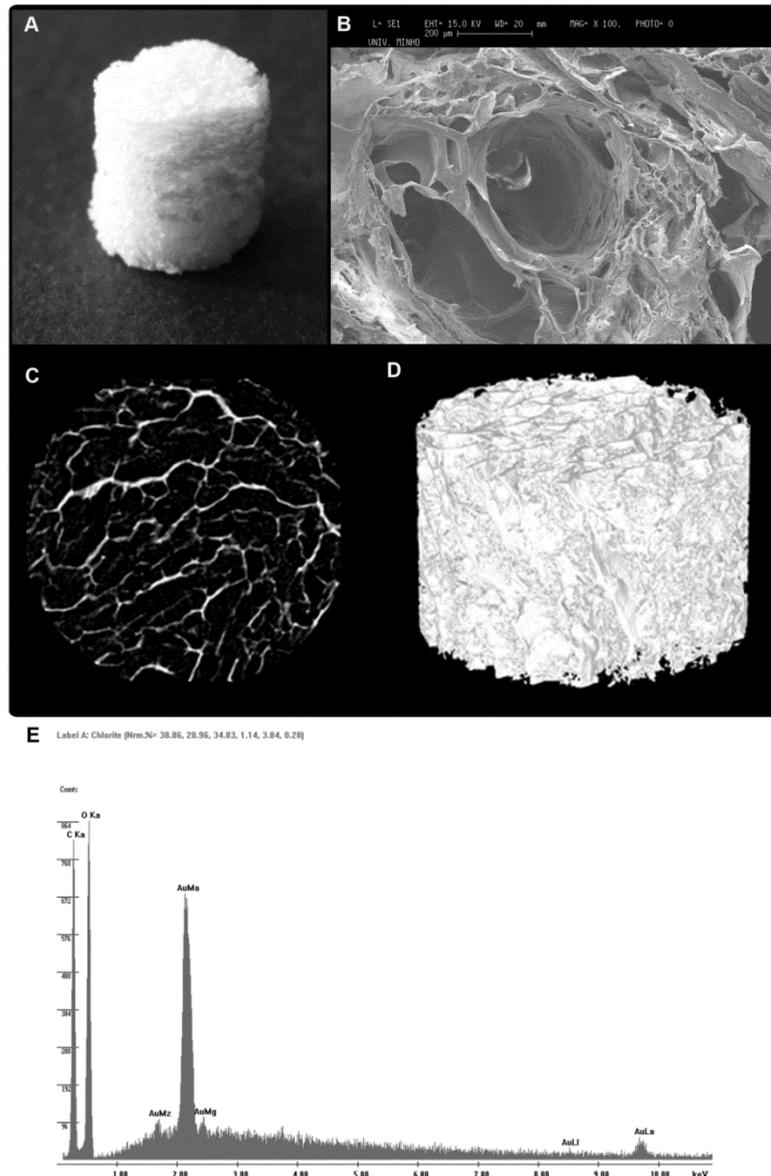


Figura 17. Caracterização morfológica da matriz tridimensional de PHB-HV. (A) Imagem macroscópica da matriz. (B) Micrografia ilustrativa da estrutura interna da matriz tridimensional de PHB-HV. Imagens representativas da matriz tridimensional de PHB-HV obtidas por μ -CT (C) bidimensional e (D) tridimensional. (E) Espectro obtido por EDS mostrando a presença de carbono e oxigênio nas matrizes tridimensionais de PHB-HV.

4.13. Colonização *in vitro* das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASCs

A partir das imagens obtidas por MEV, pôde-se observar a presença de hASCs com morfologia típica, aderidas a superfície da matriz tridimensional de PHB-HV, a partir de 7 dias de cultivo em diante. As micrografias de MEV mostraram alta densidade celular em regiões internas da matriz, sem a oclusão de poros (**Figura 18 A-C**).

As células, em geral, apresentavam-se achatadas e aderidas a superfície homogênea da matriz ou no interior de poros (**Figura 18 D-E**), comunicando com outras células através da emissão de prolongamentos citoplasmáticos (**Figura 18 F**). Em algumas células havia a presença de muitas vesículas na superfície da membrana celular (**Figura 18 G**).

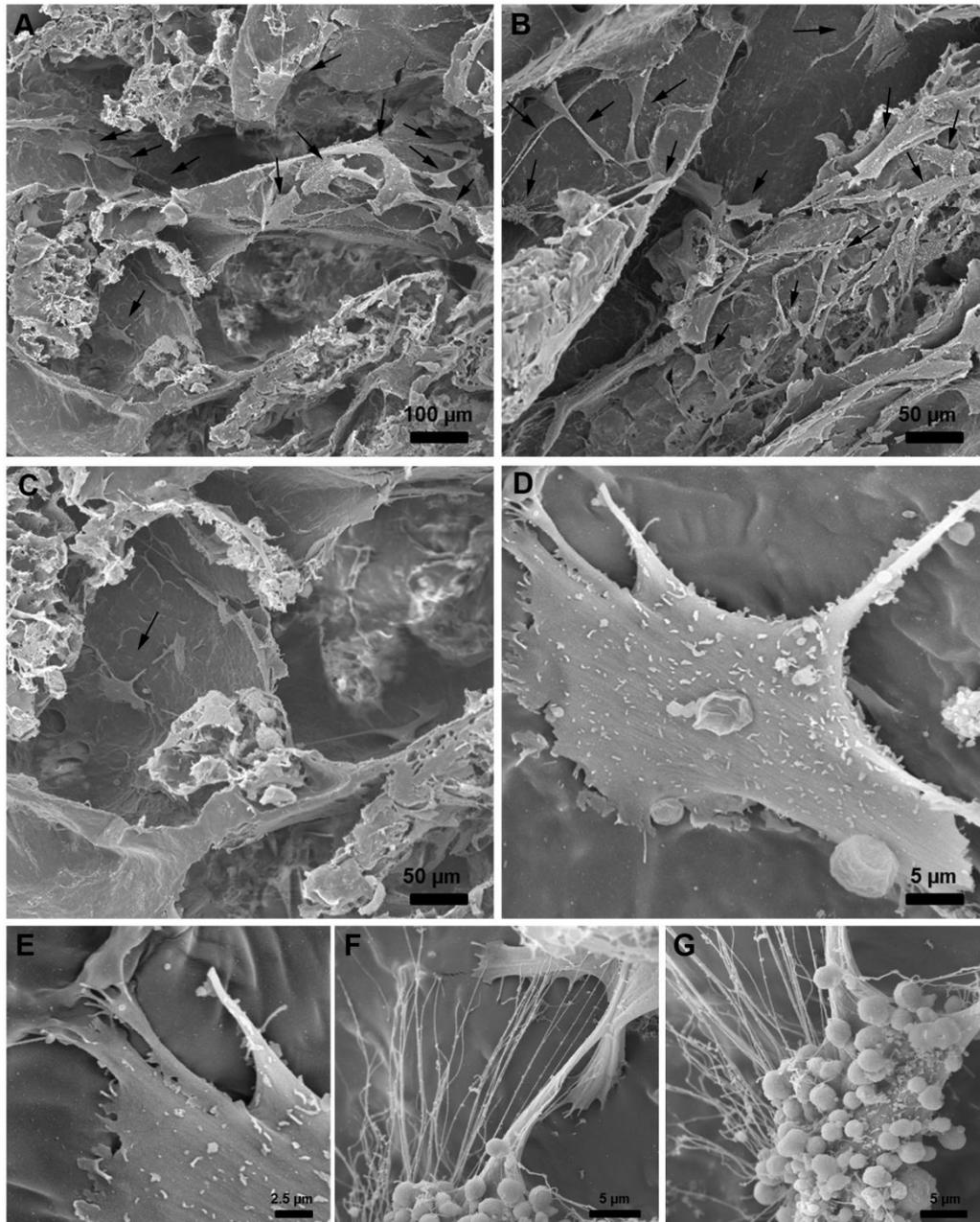


Figura 18. Avaliação por MEV da colonização das matrizes tridimensionais de PHB-HV por hASCs. (A-C) Imagens da superfície interna da matriz tridimensional de PHB-HV mostrando hASCs aderidas (setas pretas) e colonizando o interior das matrizes. Em detalhe, (D) uma célula achatada e aderida à superfície da matriz tridimensional; prolongamentos citoplasmáticos promovendo a (E) adesão celular e (F) comunicação celular; (G) vesículas aderidas a superfície da célula.

4.14. Análise da citotoxicidade *in vitro* e proliferação celular durante a diferenciação osteogênica.

As hASCs cultivadas em matrizes tridimensionais de PHB-HV e meio de cultura basal suplementado com SH foram capazes de metabolizar o MTT em cristais de formazan, demonstrando a viabilidade e proliferação celular em função do tempo (**Figura 19**). Durante a indução da diferenciação osteogênica das hASCs, os resultados de densidade óptica mostraram uma alta proliferação celular inicial até o 14^o dia, exibindo proliferação superior a observada para as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH. A proliferação das hASCs em meio osteogênico estabilizou enquanto as hASCs cultivadas em meio de cultura basal continuaram a proliferar.

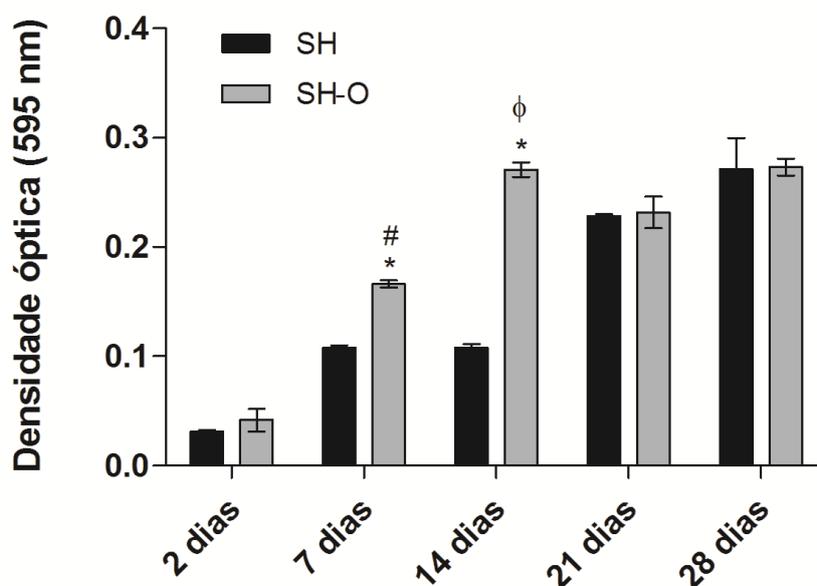


Figura 19. Citotoxicidade *in vitro* e proliferação das hASCs cultivadas em matrizes tridimensionais de PHB-HV avaliadas pelo ensaio de MTT. Os resultados são baseados na densidade óptica a 595 nm e representam a viabilidade e proliferação das hASCs, cultivadas nas matrizes e em meio de cultura basal e meio osteogênico, em função do tempo. Os resultados representam a média \pm EMP (n=3). Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* foi realizada. * $p < 0,05$: SH vs SH-O; # $p < 0,05$: SH-O dia 2 vs dia 7; $\phi p < 0,05$: SH-O dia 7 vs dia 14.

4.15. Avaliação da atividade da fosfatase alcalina durante a indução da diferenciação osteogênica

A atividade da fosfatase alcalina das hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV durante a diferenciação osteogênica foi avaliada pelo ensaio de BCIP-NBT.

Pôde-se observar que as hASCs em meio osteogênico suplementado com SH apresentaram nível de atividade da fosfatase alcalina inferior ou próximo ao do controle. No entanto ao 21º dia de indução as culturas com meio osteogênico apresentaram um aumento significativo do nível de atividade da fosfatase alcalina em relação ao controle e diminuiu novamente após 28 dias de indução (**Figura 20**).

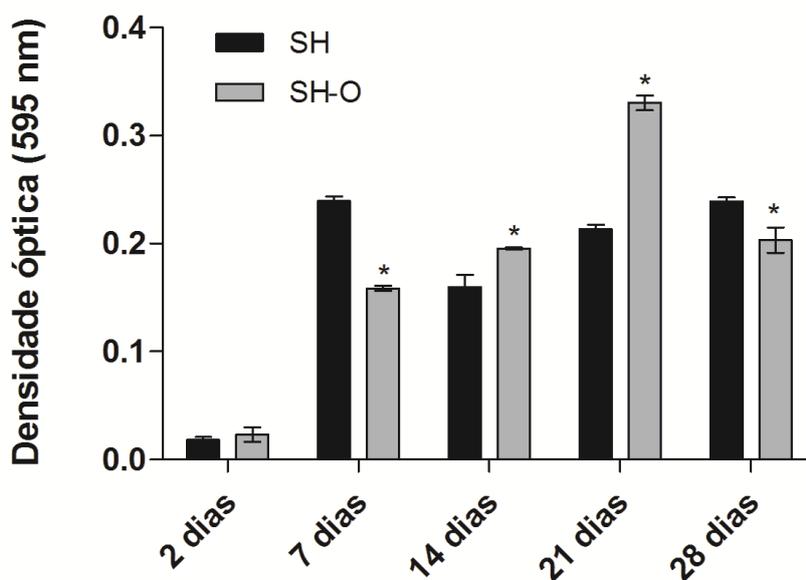


Figura 20. Ensaio de fosfatase alcalina das hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV durante a diferenciação osteogênica. Os maiores níveis de fosfatase alcalina foram observados ao 21º dia de indução. Os resultados representam a média \pm EMP (n=3). Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* foi realizada. * $p < 0,05$: SH vs SH-O.

4.16. Avaliação da expressão de marcadores de células da linhagem osteogênica durante a indução da diferenciação

Para avaliar a diferenciação osteogênica das hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV e em meio osteogênico suplementado com SH, a expressão de proteínas específicas de células ósseas foram analisadas por imunofluorescência de secções obtidas nos diferentes tempos avaliados.

Pôde ser observada a expressão de colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina a partir do 14º dia de indução (**Figura 21**). A arquitetura das matrizes tridimensionais pôde ser observada através das imagens de luz transmitida. O padrão de expressão das proteínas pôde ser observado por fluorescência verde que não ficou restrito ao redor do núcleo celular.

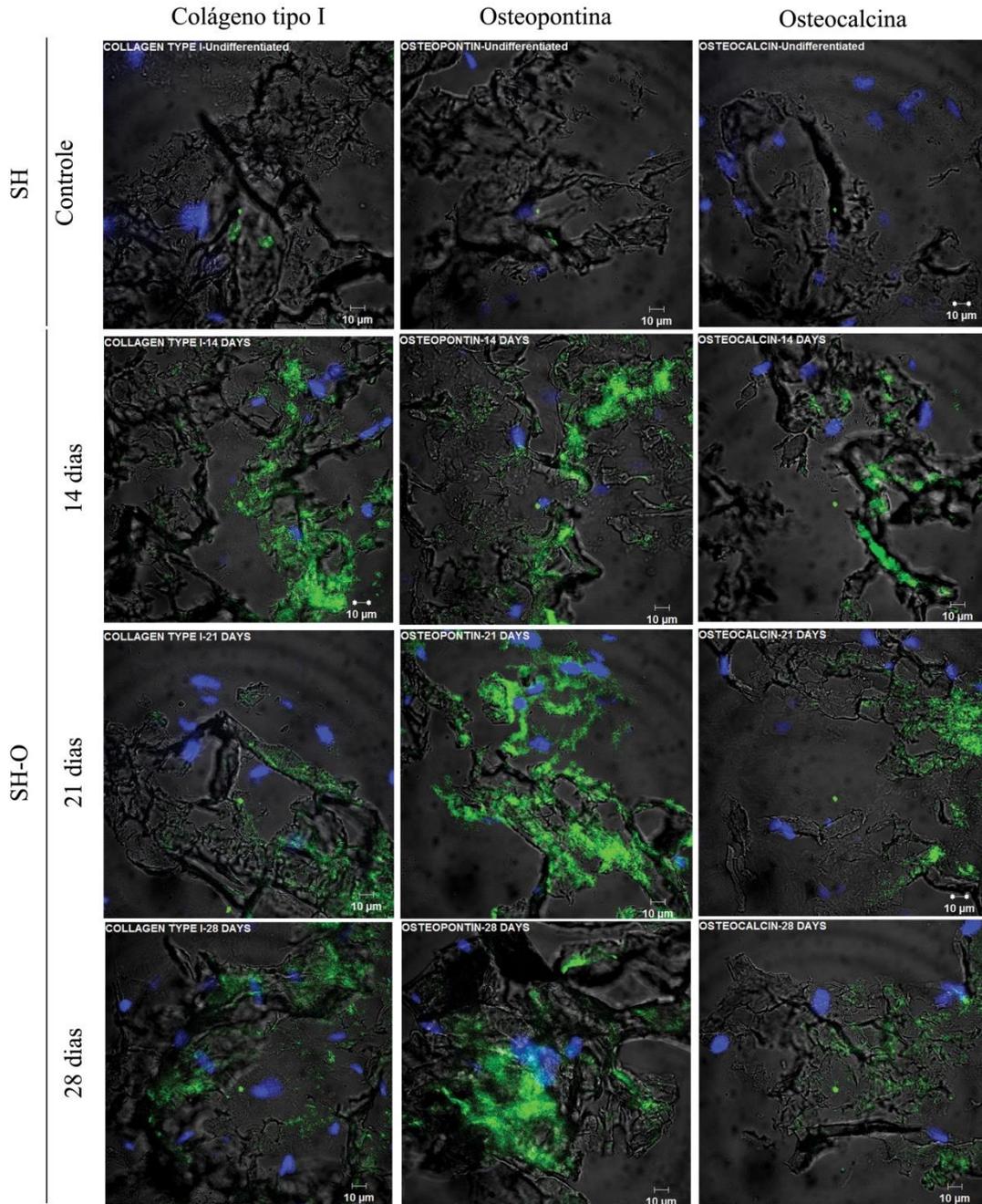


Figura 21. Expressão de proteínas de matriz óssea pelas hASCs cultivadas nas matrizes tridimensionais de PHB-HV durante a diferenciação osteogênica. A expressão das proteínas de colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina foram representadas por fluorescência verde, os núcleos celulares em azul e a estrutura das matrizes pôde ser observada pela imagem de luz transmitida.

4.17. Análise da expressão gênica de *COL1A1*, *RUNX2*, *ALPL* e *BGLAP*

Com o intuito de confirmar a diferenciação osteogênica das hASCs cultivadas sobre matriz tridimensional de PHB-HV, a expressão de mRNA de marcadores ósseos foram analisadas por PCR ao longo da indução da diferenciação.

As hASCs expressaram genes específicos relacionados a linhagem óssea (**Figura 22**). Os transcritos gênicos *COL1A1*, *RUNX2* e *ALPL* foram detectados em todos os tempos avaliados, incluindo no controle (hASCs cultivadas em monocamada em meio de cultura basal suplementado com SH), sendo mais evidente nas células induzidas a diferenciação. A expressão de *BGLAP* diferiu dos demais marcadores, não sendo detectada no controle e sendo detectada somente nas hASCs cultivadas sobre as matrizes tridimensionais de PHB-HV e meio osteogênico em todos os tempos avaliados.

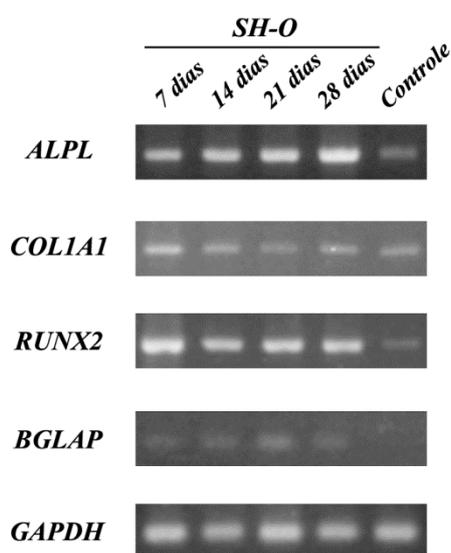


Figura 22. Análise da expressão de *COL1A1*, *RUNX2*, *ALPL* e *BGLAP* por PCR. A expressão dos marcadores pelas hASCs cultivadas em matrizes tridimensionais de PHB-HV durante a diferenciação osteogênica está representada através das bandas em imagens de gel de agarose. As hASCs cultivadas em monocamada em meio de cultura basal suplementado com SH representam as amostras controle. *GAPDH* foi utilizado como gene de referência.

4.18. Avaliação da biocompatibilidade *in vivo* da matriz tridimensional de PHB-HV

As análises histológicas por H&E permitiram observar o encapsulamento do material e uma resposta inflamatória do tipo corpo estranho (**Figura 23**).

Após 1 semana do implante das matrizes, pôde-se observar material amorfo eosinofílico e acelular caracterizando a matriz tridimensional de PHB-HV. A matriz tridimensional estava completamente encapsulada e íntegra, com presença de infiltrado inflamatório neutrofílico multifocal moderado, com presença de raras células mononucleares e vasos no interior do material implantado, caracterizando uma inflamação aguda.

Após 4 semanas, pôde-se observar a presença de tecido conjuntivo, com infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal moderado, células gigantes e vasos distribuídos difusamente pelo implante, caracterizando uma inflamação crônica.

Ao final de 8 semanas, o material implantado estava bem delimitado com proliferação do tecido conjuntivo fibroso entremeando a matriz de PHB-HV, com presença de células gigantes (tipo corpo estranho), caracterizando uma inflamação granulomatosa.

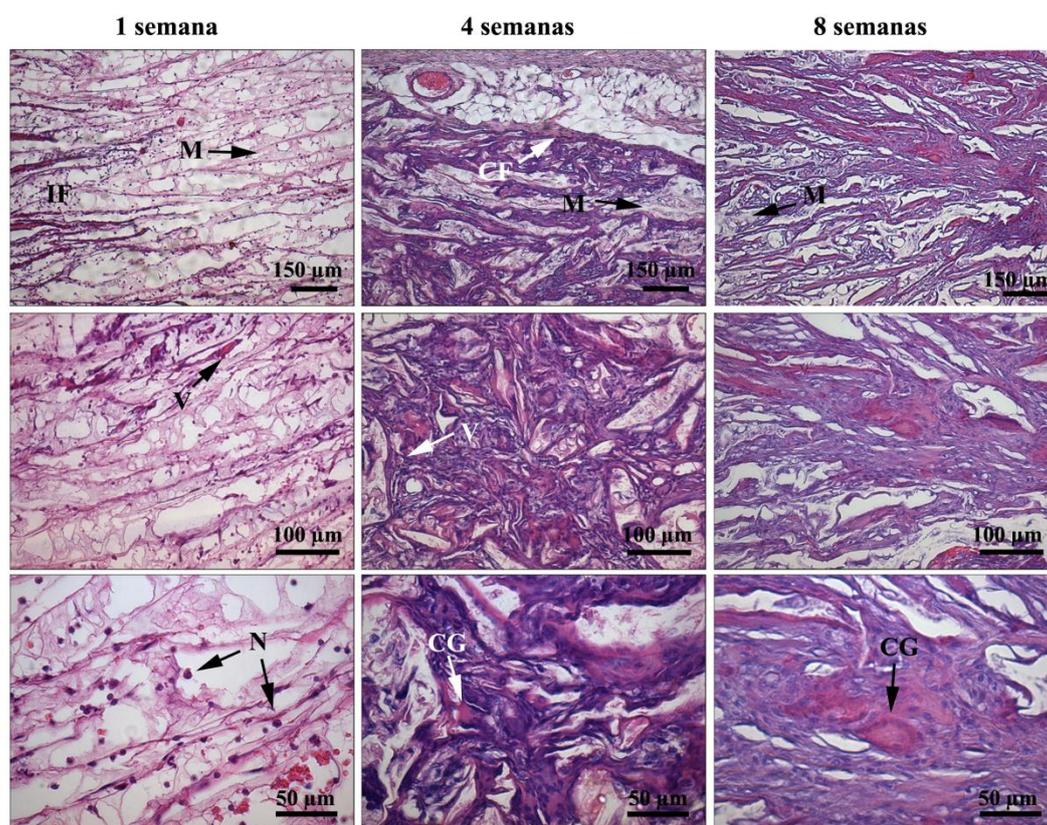


Figura 23. Análise histológica de H&E dos implantes subcutâneo da matriz de PHB-HV evidenciando uma reação do tipo corpo estranho. M-matriz tridimensional de PHB-HV; IF-infiltrado inflamatório; CF-cápsula fibrosa; V-vaso sanguíneo; N-neutrófilo; CG-célula gigante.

4.19. Avaliação do reparo do defeito ósseo

4.19.1. Avaliação da adesão e viabilidade celular das matrizes colonizadas

No intuito de determinar se as hASCs semeadas na matriz tridimensional de PHB-HV estavam aderidas após 5 dias de cultivo *in vitro* e viáveis no momento da implantação no defeito ósseo, realizou-se ensaio de calceína imediatamente após as cirurgias. Através da microscopia confocal, observou-se células aderidas à matriz de PHB e que estas estavam viáveis (fluorescência verde). Devido à irregularidade da superfície e porosidade da matriz, células foram observadas em diferentes profundidades **Figura 24**.

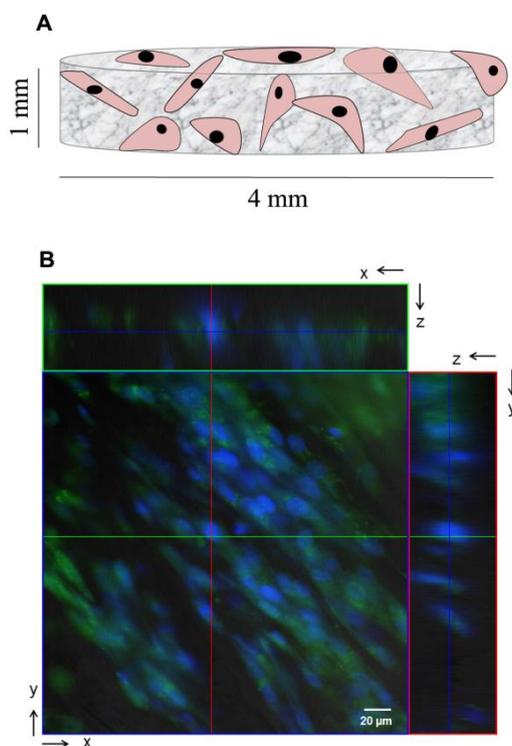


Figura 24. Colonização das matrizes tridimensionais de PHB-HV pelas hASCs após 5 dias de cultura *in vitro*. (A) Representação esquemática da matriz de PHB-HV otimizada para ser implantada no defeito ósseo. (B) Microscopia confocal das hASCs aderidas na matriz tridimensional de PHB-HV. Secção XY demonstrando a presença de células em diferentes camadas.

4.19.2. Avaliação macroscópica das calvárias

Para verificar o potencial da matriz tridimensional de PHB-HV colonizada ou não com hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH em

promover a regeneração óssea foi realizado defeito ósseo de tamanho crítico (4 mm) na calvária de camundongos imunossuprimidos.

Durante todo o período do experimento, os camundongos apresentaram-se saudáveis. Imagens digitais macroscópicas foram capturadas ao final de cada período de análise (4 e 12 semanas após o implante). Pôde-se observar a pele regenerada em todos os grupos (**Figura 25 A**). De maneira geral, após a dissecação, pôde-se observar a persistência do defeito ósseo de tamanho crítico no grupo controle. A presença da matriz tridimensional de PHB-HV, com ou sem células, nos demais grupos pôde ser observada no local implantado, integrada ao tecido adjacente (**Figura 25 B**).

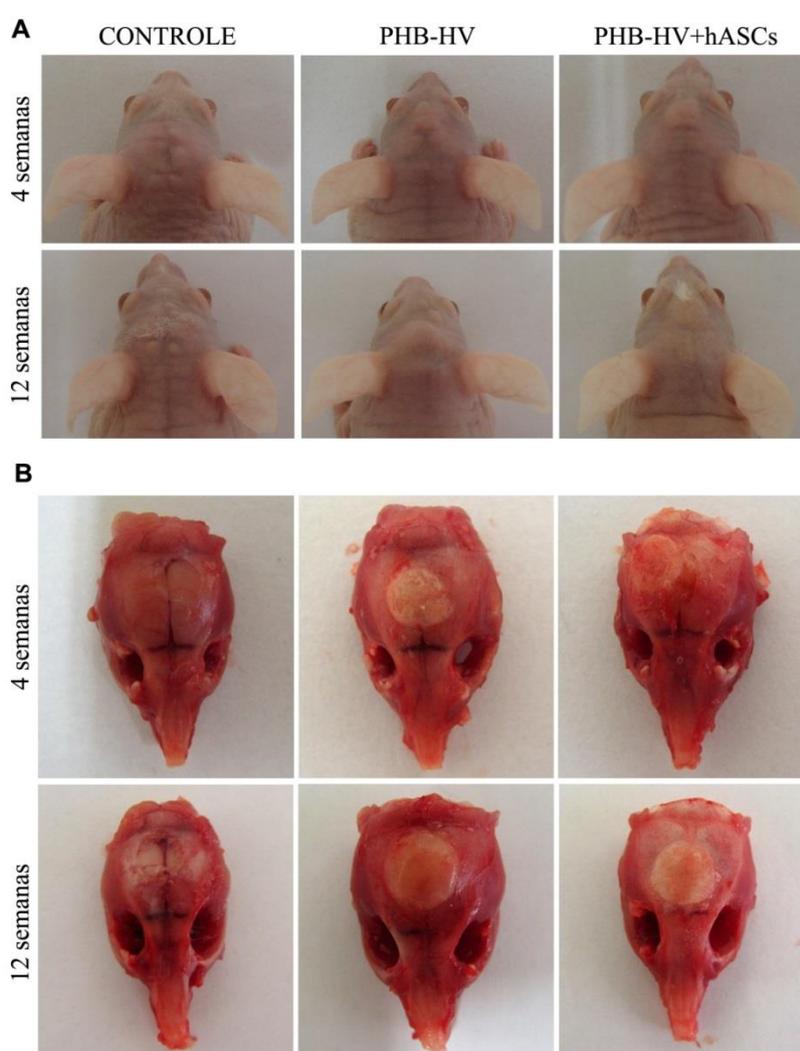


Figura 25. Imagens macroscópicas representativas dos diferentes grupos experimentais ao final de 4 e 12 semanas de implantação da matriz de PHB-HV com ou sem hASCs. (A) Regeneração da pele no local da sutura. (B) Crânios dissecados revelando fenda óssea intensa no grupo controle e a integração da matriz implantada ao tecido adjacente nos demais grupos.

4.19.3. Microtomografia computadorizada

Imagens de μ -CT foram capturadas ao final de 4 e 12 semanas para avaliar a densidade óssea no local do defeito, porém não foi observado osso regenerado nas calvárias avaliadas (**Figura 26 A**). A quantificação de área de osso neoformado em relação ao tamanho do defeito não mostrou diferença significativa entre os grupos (**Figura 26 B**), com menos de 10% do defeito ósseo regenerado ao final de 12 semanas de implantação em todos os grupos avaliados.

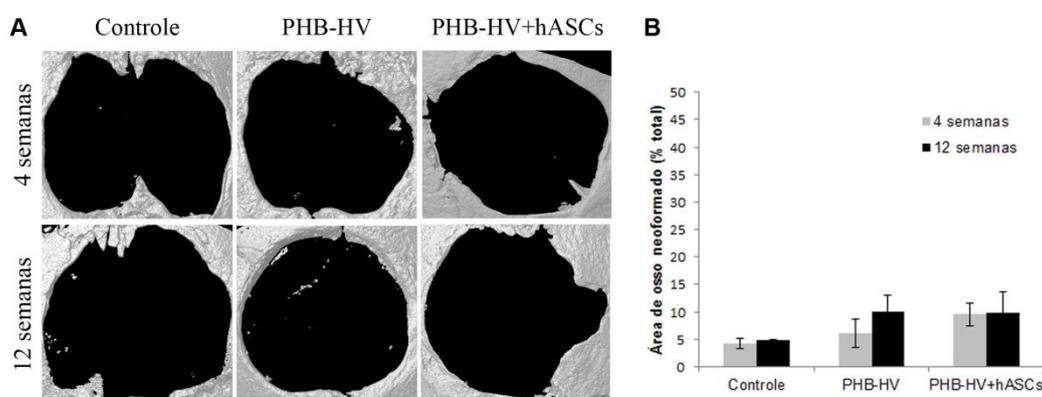


Figura 26. Análise de microtomografia computadorizada do defeito ósseo na calvária de camundongos. (A) Imagens de μ -CT após 4 e 12 semanas de implante. (B) Quantificação da área de osso neoformado em relação à área total do defeito ósseo calculada para cada grupo nos diferentes tempos (n=2).

4.19.4. Análise histológica

A partir das análises histológicas por H&E pôde-se observar a integração do material implantado ao osso adjacente e ao final de 12 semanas a matriz tridimensional de PHB-HV estava presente em todos os grupos em que foi implantada. Tanto na região do implante quanto nos tecidos adjacentes não foram observados focos necróticos. Após 12 semanas de implantação, nenhum animal de nenhum grupo experimental apresentou regeneração do defeito ósseo (tamanho da fenda óssea de aproximadamente 4 mm). Entretanto animais do grupo PHB-HV apresentaram focos sugestivos de formação de matriz óssea mineralizada (osso primário) (**Figura 27**).

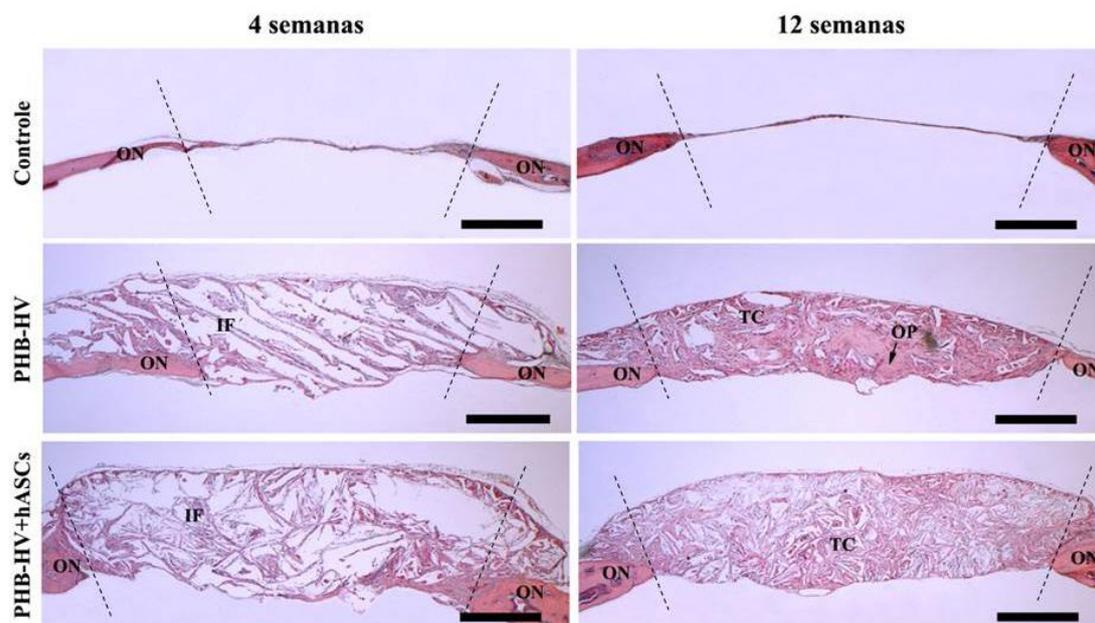


Figura 27. Imagens histológicas coradas com H&E com visão panorâmica do defeito ósseo demonstrando a progressão do defeito ao longo dos tempos avaliados (4 e 12 semanas). As linhas tracejadas delimitam as extremidades do defeito ósseo. Focos de osso primário foram observados somente no grupo PHB-HV após 12 semanas de implantação. IF-infiltrado inflamatório; ON-osso nativo; OP-osso primário (neoformado); TC-tecido conjuntivo fibroso. Barra de escala 650 μ m.

Após 4 semanas da realização do defeito ósseo, pôde-se observar no grupo controle uma fenda óssea intensa na calota craniana substituída por material focal discreto constituído por células alongadas e infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal discreto. Nos demais grupos: PHB-HV e PHB-HV+hASCs, foi observado a presença de um infiltrado inflamatório linfo-histiocitário multifocal discreto, associado a presença de células gigantes (tipo corpo estranho) e material amorfo eosinofílico e acelular caracterizando a matriz tridimensional de PHB-HV (**Figura 28 A**). Houve uma vascularização multifocal moderada nos grupos PHB-HV e PHB-HV+hASCs, significativamente maior no grupo PHB-HV+hASCs comparado grupo controle (**Figura 28 B**).

Ao final de 12 semanas, foi observado no grupo controle uma fenda óssea intensa na calota craniana substituída por material focal discreto constituído por células alongadas. Nos grupos PHB-HV e PHB-HV+hASCs foi observado presença de tecido conjuntivo fibroso entremeado a matriz tridimensional e substituindo a fenda óssea, com a presença de um infiltrado

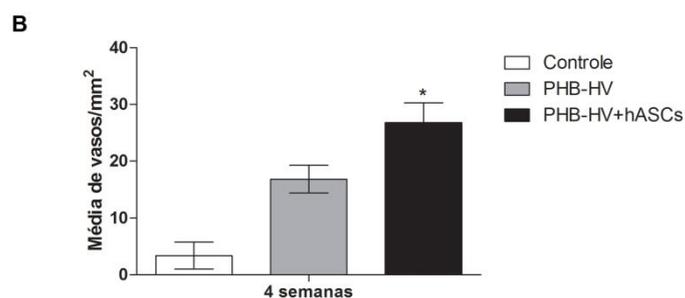
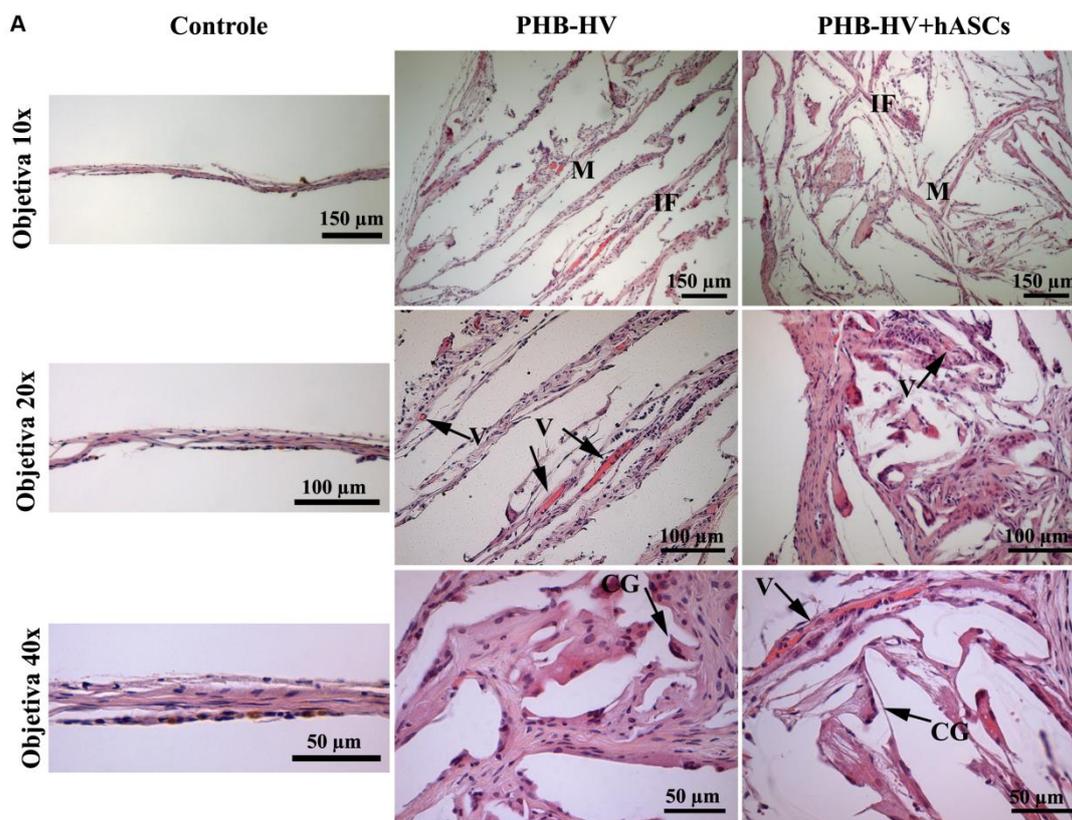


Figura 28. Análise da região do defeito ósseo após 4 semanas. (A) Análise histológica por coloração de H&E. (B) Representação gráfica da neovascularização no implante, representada pelo número de vasos/mm². Análise estatística de variância (*one-way*) e pós-teste de *Bonferroni* foi realizada (n=4). *p<0,05: Controle vs PHB-HV+hASCs. ON-osso nativo; M-matriz tridimensional de PHB-HV; IF-infiltrado inflamatório; CG-célula gigante; V-vaso sanguíneo.

inflamatório linfo-histiocitário multifocal discreto, associado a presença de células gigantes (tipo corpo estranho) multifocais em intensa quantidade. No grupo PHB-HV foram observadas áreas focais de formação de matriz óssea mineralizada, entretanto no grupo PHB-HV+hASCs não foi observado nenhuma evidência de neoformação óssea (**Figura 29 A**). Houve um aumento na vascularização no grupo PHB-HV e a vascularização foi significativamente maior nos grupos avaliados em comparação ao grupo controle (**Figura 29 B**).

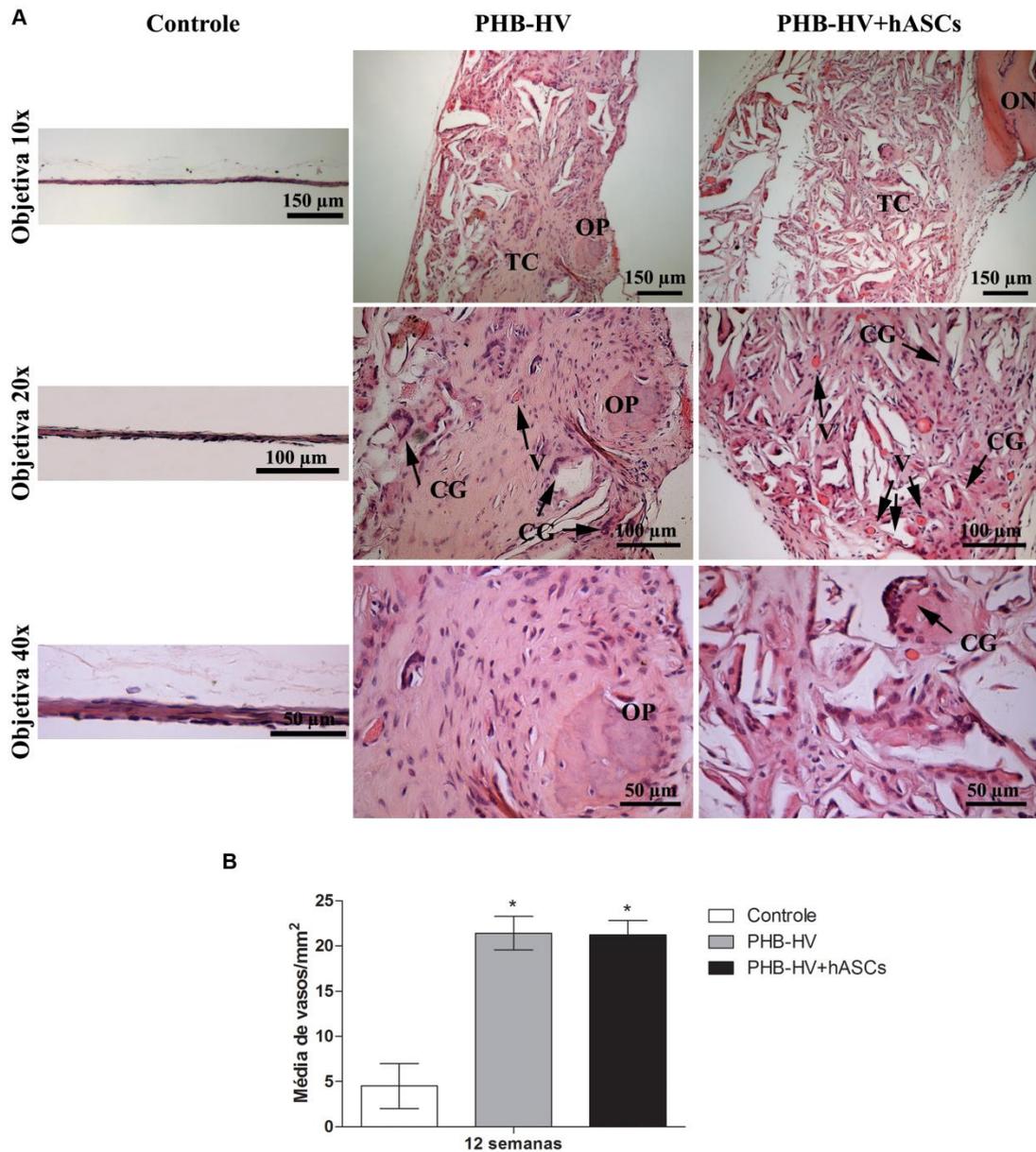


Figura 29. Análise da região do defeito ósseo após 12 semanas. (A) Análise histológica por coloração de H&E após 12 semanas de implante. (B) Representação gráfica da neovascularização no implante após 12 semanas, representada pelo número de vasos/mm². Análise estatística de variância (*one-way*) e pós-teste de *Bonferroni* foi realizada (n=4). *p<0,05: Controle vs PHB-HV ou PHB-HV+hASCs. ON-osso nativo; OP-osso primário; TC-tecido conjuntivo fibroso; CG-célula gigante; V-vaso sanguíneo.

4.19.5. Análise da expressão gênica de *RUNX2*, *COL1A1*, *ALPL*, *BGLAP* e *VEGFA*

Para avaliar a evolução do processo regenerativo do defeito ósseo nos diferentes grupos também foram feitas análise da expressão relativa de mRNA de marcadores de diferenciação em osteoblastos por qPCR.

A análise da expressão do fator angiogênico *VEGFA*, nos diferentes grupos e tempo demonstrou que houve um aumento significativo na expressão de *VEGFA* somente no grupo PHB-HV após 12 semanas do implante da matriz no defeito ósseo (**Figura 30 A**).

A expressão de *RUNX2*, *COL1A1*, *ALPL* e *BGLAP* nos grupos PHB-HV e PHB-HV+hASCs foi significativamente menor que a expressão no tecido ósseo normal após 4 e 12 semanas de implante em todos os grupos, exceto a expressão de *BGLAP*, no grupo PHB-HV+hASCs após 12 semanas, na qual houve aumento da expressão atingindo níveis similares ao do osso normal (**Figura 30 B-E**).

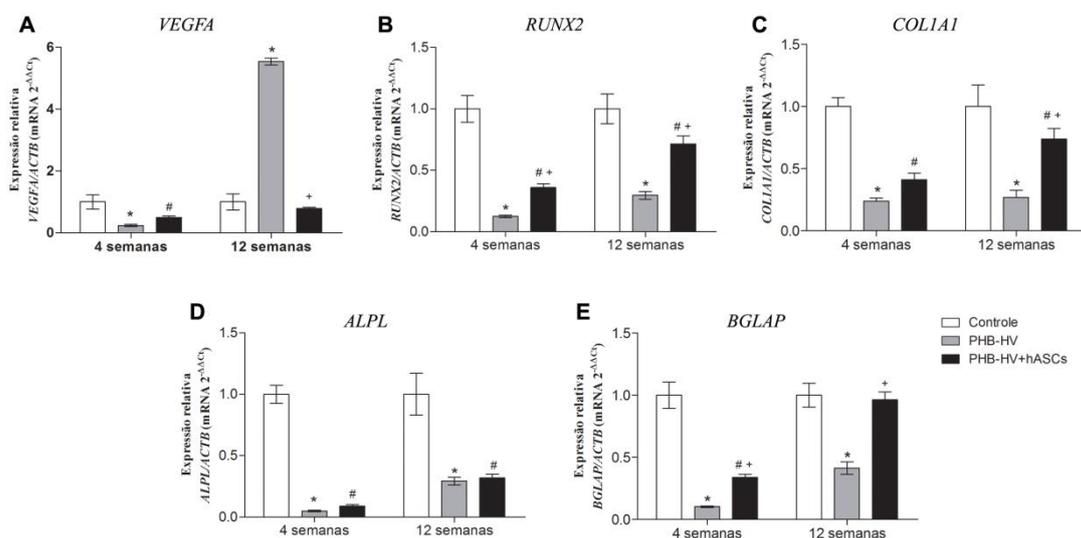


Figura 30. Representação gráfica da quantificação relativa da expressão de *VEGFA*, *RUNX2*, *COL1A1*, *ALPL* e *BGLAP* por qPCR, normalizados em relação ao gene de referência (*ACTB*) e calibrador (osso maduro). Análise estatística de variância e pós-teste de *Bonferroni* foi realizado (n=2). *p<0,05: PHB-HV vs controle; #p<0,05: PHB-HV+hASCs vs controle; +p<0,05: PHB-HV vs PHB-HV+hASCs.

5. Discussão

Existem inúmeros ensaios clínicos avaliando o potencial da aplicabilidade das hASCs na medicina regenerativa (Casteilla et al., 2011; Garcia-Olmo et al., 2009; Gimble et al., 2012, 2010; Mesimäki et al., 2009). Atualmente, a engenharia de tecidos é uma estratégia promissora, contudo ainda enfrenta alguns desafios como, alcançar quantidade de células adequada (Seong et al., 2010), condições ótimas de cultura (Mannello & Tonti, 2007) e desenvolver matrizes estruturais eficientes (Dimitriou et al., 2011; Seong et al., 2010).

Neste estudo utilizou-se o SH, obtido de doadores com diferente tipo sanguíneo, que pode ser produzido em grande quantidade e a qualidade facilmente controlada de acordo com os padrões rotineiramente utilizados em bancos de sangue e regulamentações das GMP. Adicionalmente, para reduzir a variabilidade imposta pela composição dos soros, cada lote de SH foi produzido com o soro de pelo menos 20 doadores diferentes (5 de cada tipo sanguíneo: A, B, AB e O).

Estudos prévios mostraram que os antígenos ABO assim como outros antígenos baseados em carboidratos e proteínas não foram detectados na superfície de MSCs e que estas células não adsorvem os antígenos imunogênicos ABO do meio de cultura suplementado com derivados humanos (Moll et al., 2014; Schäfer et al., 2011), o que viabiliza o uso do SH como suplemento para o meio de cultura.

O isolamento e expansão das hASCs empregando meio de cultura suplementado com SH foi satisfatória e as características morfológicas das células foi comparável as observadas para hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SFB. As células, em ambos os meios de cultura, apresentaram morfologia fibroblastóide, aderentes a superfície plástica e formaram diversas colônias. No entanto, as hASCs cultivadas em SH apresentaram menor tamanho, granulosidade e aderência, crescimento mais denso e tendência em aglomerar ao alcançar confluência. Estas observações estão de acordo com um estudo publicado (Kocaoemer et al., 2007), mostrando características similares para as hASCs cultivadas em soro humano AB e plasma rico em plaquetas. Além disso, uma análise completa do genoma das

hASCs cultivadas em meio suplementado com soro humano AB detectou menor expressão gênica de proteínas da matriz extracelular e adesão (por exemplo fibromodulina) (Bieback et al., 2010), corroborando a observação de adesão celular a superfície plástica reduzida durante a cultura com suplementos derivados de humanos. Entretanto, as hASCs cultivadas em meio de cultura suplementado com SH não diminuíram a expressão de moléculas de adesão a superfície tais como CD44 e CD54. A expressão foi de aproximadamente 95,50% para CD54 e 98,40% para CD44 nas culturas de hASCs cultivadas em SH, enquanto nas culturas de hASCs cultivadas em SFB, a expressão foi de aproximadamente 94,56% para CD54 e 97,40% para CD44.

O ensaio baseado na atividade metabólica de MTT foi realizado em vários pontos de tempo para determinar a viabilidade e proliferação celular na presença dos diferentes suplementos para o meio de cultura, SH e SFB. Os resultados de MTT são diretamente proporcionais ao número de células viáveis e revelaram que as hASCs cultivadas em meio com SH estavam viáveis e apresentavam maior grau de proliferação comparado as células cultivadas em meio com SFB.

Além disso, as hASCs cultivadas em meio suplementado com SH foram capazes de diferenciar nas linhagens adipogênica, condrogênica e osteogênica da mesma forma que as hASCs cultivadas em meio suplementado com SFB.

A caracterização imunofenotípica das hASCs confirmou o menor tamanho e granulosidade das células quando cultivadas em SH. Mas nenhuma diferença significativa na expressão dos marcadores de superfície foi observada entre as duas diferentes condições de cultura e passagens avaliadas. A maioria das hASCs cultivadas em meio suplementado com SH e SFB foram positivas para os marcadores de MSCs (>90%) e tiveram baixa expressão dos marcadores de HSCs (<2%), corroborando com os resultados reportados para hASCs cultivadas na presença de outros suplementos humanos (Bieback et al., 2010; Kocaoemer et al., 2007; Lindroos et al., 2010).

Então, as hASCs cultivadas em, SH assim como em SFB, foram (i) aderentes a superfície plástica de cultura, (ii) viáveis, (iii) expressaram antígenos de superfície específicos para MSCs e não expressaram marcadores de HSCs e (iv) foram capazes de diferenciar em múltiplas linhagens celulares sob estímulo específico. Dessa forma, as hASCs cultivadas em meio

suplementado com SH estão de acordo com os critérios mínimos para definir as MSCs (Dominici et al., 2006) e hASCs (Bourin et al., 2013) estabelecidos e aceitos pela *International Federation for Adipose Therapeutics and Science* e *International Society for Cellular Therapy*.

Como as culturas de hASCs em meio com SH apresentavam-se mais densas quando comparadas as culturas em meio com SFB, a expressão celular de Ki-67 foi avaliada. A proteína Ki-67 é um excelente marcador para determinar a fração proliferativa de uma dada população celular, pois o Ki-67 está presente em células normais durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2, e mitose), mas está ausente na intérfase (G0) (Scholzen & Gerdes, 2000). Uma fração significativamente maior de hASCs foi positiva para Ki-67 nas culturas suplementadas com SH comparadas as culturas suplementadas com SFB na 4ª passagem, confirmando as observações visuais de que as culturas em meio com SH estavam mais densas. No entanto, a fração de células expressando Ki-67 cultivadas em SH diminuiu na 10ª passagem, mas ainda continuou maior que nas células cultivadas em SFB.

A avaliação da expressão de Ki-67 fornece informação sobre o estado das células, mas não sobre a taxa de proliferação. Dessa forma, foi realizado um estudo da cinética de proliferação das hASCs. A DPA foi significativamente maior para culturas suplementadas com SH comparado a DPA das culturas suplementadas com SFB e esta foi constante ao longo das passagens. Além disso, a DPA das células cultivadas em meio suplementado com SFB foi avaliada somente até a 10ª passagem porque após a 8ª passagem as hASCs levaram mais de 15 dias para alcançar a confluência esperada. Provavelmente esta diminuição da proliferação ocorreu devido ao fato de as hASCs entrarem em senescência a partir da 8ª passagem quando cultivadas em SFB, como será discutido posteriormente.

A análise da curva de crescimento demonstrou que as hASCs cultivadas em SH proliferam mais rápido que em SFB nas passagens iniciais. Além disso, o TD das hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH foi aproximadamente 5 vezes mais curto que com SFB. Esta cinética de proliferação observada para as células cultivadas em SH é clinicamente relevante e torna o SH um suplemento para meio de cultura atrativo, pois uma

grande quantidade de células requeridas para um transplante pode ser obtido em menor período de tempo quando expandidas *in vitro*.

Inúmeros estudos têm reportado que as MSCs cultivadas *in vitro* podem ser expandidas por múltiplas duplicações celulares sem perder seu potencial de diferenciação. Entretanto, esse cultivo em longo prazo pode desencadear anormalidades cromossômicas com (Røsland et al., 2009) ou sem evidência de transformação maligna (Tarte et al., 2010). Recentemente, outros estudos hipotetizaram que a transformação maligna observada para MSCs (Røsland et al., 2009) foi devido a uma contaminação mínima com a linhagem celular HT1080 desde as primeiras semanas de cultivo das MSCs, que permaneceu indetectável por meses até as MSCs entrarem em senescência (Garcia et al., 2010; Torsvik et al., 2010).

Embora a maioria das culturas de MSCs humanas *in vitro* pareçam estáveis, o número de células expandidas está relacionado à taxa de crescimento e uma maior taxa proliferativa pode potencializar o risco de ocorrência de anormalidade citogenética e de promover a tumorigenicidade das MSCs humanas, como apresentado nos relatórios do encontro europeu com especialistas no campo das MSCs (Barkholt et al., 2013). É provável que a maioria das anormalidades celulares resulte em senescência celular, mas é difícil excluir o risco de transformação celular. A ocorrência de anormalidades genéticas parece estar relacionada mais ao processo de cultivo das células do que a fatores derivados do paciente (Barkholt et al., 2013), mas alguns cientistas afirmam que a suscetibilidade a transformação maligna pode estar estritamente conectada com a origem tecidual (Bernardo et al., 2007; Tarte et al., 2010).

Dessa forma é importante identificar e definir condições ideais de cultura, que evitem a ocorrência de anormalidades cromossômicas. Neste contexto, é importante esclarecer se a taxa de proliferação observada para as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH pode estar associada a uma transformação maligna dessas células. Não existe ainda nenhuma evidência na literatura que o soro humano possa constituir um substituto seguro ou não para o SFB no cultivo das hASCs. Sendo este o primeiro estudo que investiga a proliferação e exclusão de qualquer evidência de transformação maligna espontânea das hASCs cultivadas em SH.

Baseado na rápida proliferação das hASCs cultivadas em meio suplementado com SH foi avaliado a expressão dos fatores de transcrição c-FOS e c-MYC. Estes fatores são conhecidos por transmitir sinal proliferativo e regular o crescimento e apoptose (Choi et al., 2008; Mori et al., 2004). Porém, sua expressão desregulada tem sido associada à malignidade humana (Donnell et al., 2006; O'Donnell et al., 2005; Tulchinsky, 2000). Os níveis de expressão de c-FOS foram similares nas hASCs cultivadas em ambos os meios de cultura. Enquanto os níveis de expressão de c-MYC nas hASCs cultivadas em SH foram maiores que em SFB, em ambas as passagens avaliadas (4^a e 10^a passagem).

Um estudo realizado com células de murinos demonstrou forte associação entre a superexpressão de c-MYC e tumorigênese (Miura et al., 2006) e, portanto esta maior expressão de c-MYC pelas hASCs poderia disparar a transformação maligna espontânea dessas células. Todavia, a análise da expressão gênica de *MYC* por qPCR revelou níveis similares de expressão deste transcrito gênico por hASCs cultivadas em SH e SFB, na 4^a e 10^a passagem. Além disso, a expressão de *MYC* diminuiu nas hASCs cultivadas em ambos os meios de cultura na 10^a passagem em relação a 4^a passagem. Rabbits *et al.* mostraram que mRNA de *MYC* está presente, em níveis equivalentes, em todas as etapas do ciclo celular (Rabbits et al., 1985). Além disso, o gene *MYC* (capaz de ser modulado pós-transcricionalmente) é ativado em G0 para G1 por estímulos externos, por exemplo, fatores de crescimento. Uma análise *in vivo* de *MYC* mostrou que a síntese *de novo* ocorre em G1 e G2, pois a meia vida da proteína é de aproximadamente 20-30 minutos em ambas as fases. Além disso, o nível de *MYC* aumenta rapidamente quando as células reiniciam o ciclo celular, subsequentemente diminuem assim que as culturas entram em quiescência (Bretones et al., 2014; Rabbits et al., 1985).

Então o mecanismo preciso de como a expressão de c-MYC pelas hASCs é estimulada pelo SH presente no meio de cultura ainda precisa ser esclarecido, mas é possível que o c-MYC seja o sinal proliferativo responsável pelo padrão de proliferação aumentado observado nas hASCs cultivadas em meio suplementado com SH.

A expressão constitutiva de *TERT*, gene que controla o tamanho das terminações teloméricas, previne a senescência celular, aumentando a proliferação e mantendo a capacidade de diferenciação das MSCs (Bischoff et al., 2012; Simonsen et al., 2002). Além disso, já foi descrito que c-MYC ativa a transcrição de *TERT* e dessa forma contribui para manutenção da proliferação de células tumorais ao longo do ciclo celular (Bretones et al., 2014). Então, foi avaliado neste trabalho a expressão de *TERT* pelas hASCs cultivadas *in vitro*. As hASCs cultivadas em ambos os tipos de suplementos expressaram baixos níveis de *TERT*, ajudando a excluir a possibilidade de imortalização espontânea das hASCs na presença de SH. Os resultados deste trabalho corroboram outros estudos mostrando que as MSCs normalmente apresentam baixos níveis de atividade da telomerase (Bieback et al., 2009; Bischoff et al., 2012).

Estudos anteriores provaram que a diminuição da expressão do gene supressor de tumor *CDKN2A* (que codifica a proteína p16) está envolvida na transformação das MSCs (Rodriguez et al., 2009; Rubio et al., 2008) e em diversos tipos de câncer (Qiu et al., 2011), sendo, então, um excelente marcador para ajudar na identificação de células tumorais (Rajamani et al., 2014). Na 4^a passagem, as hASCs cultivadas em SH tiveram baixa expressão de *CDKN2A* comparado as culturas com SFB. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre as culturas com SH e SFB, na 10^a passagem.

A expressão do proto-oncogene *ERBB2* também foi avaliada, este gene codifica o receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano, que é um receptor tirosina kinase transmembrana. A ativação deste oncogene resulta na superexpressão de sua proteína e conseqüentemente em uma sinalização celular anormal, contribuindo para progressão do câncer. A superexpressão de *ERBB2* tem sido associada com diferentes tipos de tumores malignos em diversos estudos (Das et al., 2014; Qi et al., 2012; Shoda et al., 2014; Wang et al., 2014). Felizmente, os resultados mostraram que as hASCs cultivadas na presença de ambos os suplementos para o meio de cultura tiveram baixa expressão de *ERBB2*.

A senescência replicativa está associada com a perda do DNA telomérico em cada divisão celular devido à incompleta replicação das terminações teloméricas (Bischoff et al., 2012). Como foi discutido

anteriormente, as hASCs tiveram uma baixa expressão do gene *TERT*. Dessa forma, a ocorrência da senescência celular replicativa era esperada para as hASCs ao longo do cultivo. Os resultados demonstraram que as hASCs cultivadas em SFB podem ser cultivadas até a 8ª passagem sem nenhuma evidência de senescência replicativa, corroborando um estudo prévio, no qual a senescência foi observada somente após a DPA entre 6 e 16 semanas de cultivo (Wagner et al., 2008). Em contraste, as células cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH sofreram senescência mais lentamente e puderam ser cultivadas até a 17ª passagem sem senescência significativa. Pode-se concluir que o ritmo da senescência foi afetado pelas condições de cultura. Em ambas as culturas celulares positivas para SA- β -gal, as células diminuíram a proliferação assim que iniciaram a senescência. Este resultado demonstra o programa premeditado das células em senescência que é disparado, independentemente do tipo de cultura utilizado, com o intuito de proteger as células de mutações acumuladas no DNA após as divisões celulares, evitando que as células se tornem malignas (Wagner et al., 2008).

Para excluir células com anormalidade genética nas culturas suplementadas com SH foi realizado uma análise do cariótipo destas. A análise confirmou que nenhuma alteração cromossômica ocorreu com as hASCs, obtendo cariótipos estruturalmente e numericamente normais. Este resultado indica que a estabilidade genômica das hASCs cultivadas em SH é mantida independentemente de sua alta taxa proliferativa.

Apesar do potencial de proliferação, diferenciação e expressão de c-MYC, as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH não formaram tumores *in vivo*, de acordo com o esperado para MSCs. Tumores malignos e teratomas foram observados somente para os grupos controle, MDA-MB-231 e iPSCs, respectivamente. O teratoma (formação tumoral não maligna) é constituído por tecidos originados em todas as 3 camadas germinativas, sendo esta uma característica *sine qua non* de células-tronco pluripotentes (Prokhorova et al., 2009) e foi observado somente no grupo controle iPSCs.

Adicionalmente ao risco imposto pelo uso de SFB na expansão *ex vivo* das hASCs para propósitos clínicos, a transformação maligna *in vitro* é um outro risco potencial (Bernardo et al., 2011). Alguns grupos relataram que

MSCs expandidas *ex vivo* em meio suplementado com SFB sofreram transformação maligna (Miura et al., 2006; Rubio et al., 2008) exibindo uma aumentada taxa de proliferação, alteração da morfologia, superexpressão de c-MYC e alta atividade da telomerase, o que permite que as células escapem da senescência, apresentem anormalidades citogenéticas e formem tumores quando injetadas em camundongos imunossuprimidos (Bernardo et al., 2011; Miura et al., 2006; Rubio et al., 2008).

Ao contrário, esta pesquisa mostrou que as hASCs cultivadas em meio de cultura basal suplementado com SH aumentaram a proliferação, provavelmente devido a expressão de c-MYC aumentada, mas sem expressão de *TERT* e mantendo cariótipos normais. Apesar da senescência tardia comparada as células cultivadas em SFB, as hASCs cultivadas em SH não foram capazes de escapar da senescência. Além disso, nenhum tumor foi formado por essas células *in vivo*. Dessa forma este estudo excluiu a possibilidade da imortalização espontânea das hASCs. Esta caracterização completa é extremamente importante considerando a abordagem de um cultivo de hASCs em meio livre de compostos xenogênicos e garantir os padrões de qualidade e segurança requerida para o uso clínico dessas células na medicina regenerativa.

Neste estudo, também foi desenvolvido uma matriz tridimensional de PHB-HV, aonde foram cultivadas as hASCs para indução da diferenciação osteogênica e sua utilização na regeneração óssea. O PHB-HV pertence a um grupo de polímeros de nova geração com aplicação na área médica, por ser natural, biocompatível, biodegradável, não-tóxico, termoplástico e piezoeletrônico (Köse et al., 2003). Dessa forma, este polímero foi escolhido para o desenvolvimento das matrizes.

Através da técnica de liofilização, foram obtidas matrizes estruturais de PHB-HV com poros de tamanho médio de $163,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ e estrutura de poros altamente interconectados, essencial para colonização celular, manter o contato célula-célula e vascularização.

As matrizes desenvolvidas apresentaram melhores propriedades mecânicas na direção transversal que na direção radial, sendo estruturas anisotrópicas, o que é interessante considerando que o osso apresenta esse mesmo tipo de propriedade (Doblaré et al., 2004; Mathieu et al., 2006). O EDS

confirmou a composição típica de poliéster (carbono e oxigênio). Dessa forma, as propriedades da matriz tridimensional de PHB-HV estão de acordo com o idealizado para os substitutos ósseos (Salgado et al., 2004).

Optou-se por utilizar as hASCs por apresentarem várias vantagens para o emprego na engenharia de tecidos, como: (i) poder ser uma fonte autóloga de células; (ii) poder ser coletada por procedimento pouco invasivo, a partir do subproduto da cirurgia de lipoaspiração (técnica menos invasiva que a punção de medula óssea); (iii) estar disponível em grande quantidade, podendo ser expandidas rapidamente; (iv) ser capazes de diferenciar em múltiplas linhagens, inclusive em linhagem osteogênica e (v) não estar envolvida nas questões éticas associadas ao uso das ESCs (Gimble et al., 2007; Lindroos et al., 2011; Mizuno, 2009).

A terapia celular tem se tornado comum e, dessa forma, o uso clínico de células-tronco precisa estar de acordo com as normas de GMP (Lindroos et al., 2011). Como foi previamente avaliado e discutido, o SH parece ser um substituto adequado para o SFB. Portanto, na tentativa de substituir o SFB e atender as regulamentações da GMP, nos requisitos de segurança e eficácia (Lindroos et al., 2011; Mannello & Tonti, 2007), foi empregado neste trabalho o cultivo tridimensional das hASCs em meio de cultura suplementado com o SH.

As hASCs cultivadas na matriz de PHB-HV foram capazes de aderir a superfície da matriz e penetrar através dos poros até a parte interna sem ocluir os mesmos. As células foram capazes de estabelecer conexões com células vizinhas, através de prolongamentos citoplasmáticos. Portanto, pode-se afirmar que a estrutura da matriz é adequada para permitir a infiltração e crescimento celular. Além disso, em algumas células foram observadas inúmeras vesículas na superfície da membrana, que podem indicar a síntese e secreção proteica.

Para avaliar a citotoxicidade de um material, o ensaio de MTT é o mais utilizado (Onuki et al., 2008). As hASCs cultivadas sobre a matriz de PHB-HV mostraram-se viáveis no ensaio de MTT e que continuaram proliferando durante os tempos avaliados, demonstrando que a matriz de PHB-HV não é citotóxica. Quando as hASCs foram induzidas a diferenciação osteogênica, elas continuaram viáveis e com um alto grau de proliferação no período inicial, que se estabilizou após o 14º dia de indução, sugerindo o início da diferenciação osteogênica. Esta observação está de acordo com a capacidade

intrínseca das células-tronco em auto-renovar e em diminuir seu potencial de proliferação proporcionalmente a diferenciação (Mountford, 2008).

A fosfatase alcalina pertence a uma classe de proteínas de superfície celular que são ligadas covalentemente ao fosfatidilinositol na membrana plasmática, sugerindo seu envolvimento em sinalização transmembrana e regula a proliferação, migração e diferenciação em linhagem osteoblástica (Aubin, 2001). A fosfatase alcalina é um dos marcadores de indiferenciação das ESCs, mas também é descrito como um marcador para as hASCs (Riekstina et al., 2009). O aumento da atividade da fosfatase alcalina é considerado um marcador precoce da diferenciação osteogênica (antes da mineralização e da expressão de proteínas não-colágena da matriz), amplamente empregado em outros trabalhos (Aubin, 2001; Jaiswal et al., 1997). Os resultados obtidos, neste estudo, mostraram que a atividade da fosfatase alcalina das hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV e em meio osteogênico suplementado com SH, foi máxima no 21º dia de indução, sugerindo um fenótipo osteogênico inicial e corroborando o ensaio de proliferação, que evidenciou o mesmo número de células em cultura na ausência de estímulo osteogênico e que não elevou a expressão de fosfatase alcalina.

A alteração no fenótipo das hASCs em diferenciação foi evidenciada no ensaio de imunofluorescência das secções das matrizes colonizadas para os marcadores específicos de osteoblastos como, colágeno tipo I, osteopontina e osteocalcina.

As imagens adquiridas revelaram que a estrutura tridimensional da matriz de PHB-HV forneceu o arcabouço necessário para adesão, penetração e proliferação celular em partes internas desta. Assim como induziu a expressão de proteínas associadas a mineralização, caracterizando um estágio mais tardio da diferenciação osteogênica (Lian & Stein, 1992).

O colágeno tipo I, principal proteína da matriz óssea, é uma das primeiras proteínas expressas por células osteoprogenitoras, sua deposição como matriz extracelular aparece relativamente cedo na diferenciação de osteoblastos precedendo e sinalizando para regular a expressão de fosfatase alcalina e outros marcadores de osteoblastos (Aubin, 2001).

A osteopontina é uma fosfoproteína expressa em diversos tecidos, incluindo o osso, onde é produzida por osteoblastos durante os diferentes estágios da maturação tecidual. Embora esta proteína secretada seja incorporada na matriz mineralizada, ela pode ser encontrada também em fluidos biológicos (soro, urina e fluido seminal). Durante a diferenciação osteoblástica *in vitro*, existe uma produção inicial de osteopontina durante o período proliferativo, que decai e é induzida novamente com o início da mineralização, alcançando seu pico máximo durante a mineralização. A expressão de osteopontina intracelular, em células da linhagem óssea, durante a proliferação parece estar relacionada a migração celular. Enquanto a expressão de osteopontina extracelular durante a mineralização está relacionada as propriedades da proteína (fosfoproteína) que possui inúmeros sítios de ligação de cálcio, importantes tanto para proliferação celular quanto para mineralização da matriz óssea (Lian & Stein, 1992; Sodek et al., 2000).

A osteocalcina, proteína dependente de vitamina K, por sua vez, é expressa tardiamente, somente após o estágio de proliferação e induzida somente após o início da mineralização da matriz extracelular. Sua expressão é tardia durante o desenvolvimento do osteoblasto, pois é uma proteína ligante de cálcio, com 3 resíduos de ácido γ -carboxiglutâmico que liga fortemente a hidroxiapatita e contribui para regular a porção mineral do osso atuando como inibidor da nucleação mineral *in vitro* e promovendo a diferenciação e ativação de osteoclastos *in vivo* (Lian & Stein, 1992). Recentemente, foi demonstrado que antes da deposição de osteocalcina na matriz óssea, esta pode ser secretada e, assim quantificada no meio de cultura antes do estágio de mineralização, representando um bom marcador para predizer o potencial osteogênico das células (Nakamura et al., 2009). A osteocalcina também é um hormônio que regula a secreção de insulina e homeostase da glicose. E a insulina sinaliza para osteoblastos inibindo a expressão de osteoprotegerina que é um inibidor de diferenciação de osteoclastos, favorecendo a reabsorção óssea. Dessa forma insulina e osteocalcina estão conectadas por um loop de regulação, sendo a osteocalcina necessária para homeostase da glicose (Wei & Karsenty, 2015).

A diferenciação das hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV sob estímulo do meio osteogênico também foi confirmada pela expressão

gênica do fator de transcrição *RUNX2*, essencial para diferenciação osteogênica de células progenitoras, *COL1A1*, *ALPL* e *BGLAP*.

O *RUNX2*, fator de transcrição membro da família de domínio *Runt*, liga-se a promotores específicos e regula a transcrição de inúmeros genes (*COL1A1*, *BGLAP*, *SSP1* e *VEGF*) necessários para desenvolvimento do osteoblasto (Lee et al., 2015; Lian & Stein, 2003).

Os resultados indicaram que as hASCs cultivadas em matrizes tridimensionais de PHB-HV e em meio osteogênico suplementado com SH passaram pelas três fases fenotípicas da diferenciação osteogênica como descrito por Lian & Stein (Lian & Stein, 1992): (i) proliferação celular, fase na qual há expressão de genes do ciclo celular e crescimento (*MYC*, *c-FOS*, histonas) assim como genes associados a formação da matriz extracelular (*TGF-β*, *RUNX2* e *COL1A1*) e a síntese de colágeno tipo I começa assim que os osteoblastos começam a se diferenciar a partir dos seus precursores; (ii) formação da matriz extracelular, com elevada atividade de fosfatase alcalina e, por fim, (iii) mineralização da matriz óssea, estágio de maior expressão de osteopontina e osteocalcina e deposição de minerais (Lian & Stein, 1992).

Os resultados obtidos demonstram a diferenciação osteogênica das hASCs quando cultivadas nas matrizes tridimensionais de PHB-HV e em meio suplementado com SH *in vitro*. Porém considerando uma aplicação clínica desta matriz de PHB-HV associada às hASCs para regeneração óssea, estudos *in vivo* são de extrema importância.

A biocompatibilidade de um material pode ter grande impacto a curto e longo prazo na engenharia de tecidos e deve ser levada em consideração. Já foi descrito que o PHB-HV é degradado *in vivo* em D-3-hidroxibutirato, um constituinte normal do sangue humano (Köse et al., 2003). Neste trabalho foi mostrado que a implantação das matrizes de PHB-HV em ratos desencadeou uma resposta inflamatória caracterizada como reação de corpo estranho. Imediatamente após a implantação da matriz de PHB-HV foi observado uma inflamação aguda, progredindo para uma inflamação crônica e formação do tecido de granulação no local do material implantado. Externamente ao material foi observada a formação de uma cápsula fibrosa. Macrófagos e células gigantes foram observados no interior da matriz porosa.

Sabe-se que os macrófagos exercem papel fundamental, através da secreção de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e também enzimas proteolíticas, como metaloproteinases, responsáveis por degradar o material. Além disso, os macrófagos ativados se fundem em células gigantes multinucleadas, que contribuem para manutenção do ambiente pró-inflamatório assim como fagocitam as partículas de biomaterial degradado (Anderson et al., 2008; Van Putten et al., 2013).

Em seguida, o potencial de regeneração óssea da matriz tridimensional de PHB-HV cultivada ou não com as hASCs foi avaliado e comparado a um grupo controle onde o local do defeito permaneceu vazio e sem tratamento.

O modelo utilizado foi o defeito ósseo de tamanho crítico na calvária de camundongos imunossuprimidos BALB/c *nude* (atímicos) (Gupta et al., 2008; Levi et al., 2010). Esse modelo de defeito ósseo em calvária de camundongos é padrão para avaliar a osteogênese *in vivo*. Entretanto apresenta a desvantagem de avaliar somente a formação óssea intramembranosa em área de não sustentação de carga (Alberius & Johnell, 1991), não fornecendo informações sobre a regeneração de defeitos em ossos longos, na qual ocorre a formação óssea endoncondral. Mas este modelo é de grande importância visto que o defeito ósseo de calvária é um cenário clínico comum na ortopedia crânio-facial (Gupta et al., 2008).

Além disso, a maioria de estudos para elucidar a biologia das células-tronco tem sido realizada em modelos murinos, mas geralmente os resultados obtidos nestes animais nem sempre podem ser extrapolados para humanos. Um exemplo é a diferenciação das ASCs de camundongos em linhagem osteogênica *in vitro*, que requer a suplementação do meio de cultura com ácido retinóico (Wan et al., 2006), enquanto este suplemento não é necessário para diferenciação osteogênica de hASCs e sim a dexametasona (Zuk et al., 2001).

Diante dessa e outras diferenças entre os tipos celulares de diferentes espécies optamos por investigar o papel das hASCs em associação com as matrizes tridimensionais de PHB-HV na regeneração óssea utilizando modelo animal de camundongos imunossuprimidos com intuito de evitar qualquer resposta de rejeição do implante pelo hospedeiro. É importante ressaltar que o modelo animal é amplamente utilizado na pesquisa, devido a sua disponibilidade e facilidade de manuseio, mas as conclusões extraídas destes

estudos não podem ser totalmente redirecionadas aos humanos e sim utilizadas como base para novos estudos.

As hASCs cultivadas na matriz de PHB-HV previamente ao implante estavam viáveis pré e pós implantação, conforme o ensaio de calceína realizado após a realização das cirurgias.

Após 4 e 12 semanas de implantação das matrizes no defeito ósseo, pôde-se observar a completa regeneração da pele no sítio de sutura. A matriz de PHB-HV implantada demonstrou possuir propriedades mecânicas suficiente para substituir o osso removido e integrar ao tecido adjacente, enquanto nos animais pertencentes ao grupo controle foram observadas fendas ósseas intensas. As reconstruções tridimensionais de μ -CT revelaram que após 4 e 12 semanas após o implante, os defeitos mantiveram seu diâmetro, sem sinal de regeneração no período e animais avaliados.

Análises histológicas demonstraram uma boa integração da matriz de PHB-HV e PHB-HV+hASCs com o tecido adjacente e o osso nas extremidades do defeito estava viável. Ao final de 12 semanas não foi observada a formação completa de novo tecido ósseo em nenhum dos grupos.

Tanto no grupo PHB-HV e PHB-HV+hASCs pôde-se observar a presença de células gigantes após 4 semanas que se tornou mais intensa após 12 semanas. As células gigantes são responsáveis pela fagocitose e reabsorção do biomaterial resultante da resposta do organismo ao corpo estranho (Anderson et al., 2008; Van Putten et al., 2013). Apesar da presença de células gigantes, após 12 semanas em todos os grupos com matriz tridimensional, não houve a completa reabsorção desta matriz.

Ao final de 12 semanas, o grupo PHB-HV apresentou pequenos focos de formação de matriz óssea mineralizada. Sem nenhuma evidência de tecido neoformado no grupo PHB-HV+hASCs. Esse resultado demonstra que a presença da matriz tridimensional de PHB-HV favoreceu a formação do tecido ósseo novo. Interessante observar que os focos de formação óssea estavam localizados próximo à dura mater, suportando a idéia de sinalização parácrina da dura mater, favorecendo a formação óssea da direção endocranial para ectocranial como o observado anteriormente por outros autores (Cowan et al., 2004).

Estudos demonstraram a capacidade de MSCs em reparar defeitos ósseos por uma ação direta, baseado em sua habilidade de gerar osteoprogenitores e osteoblastos. Mas o potencial de osteogênese dessas células tem sido favorecido pela introdução simultânea de fatores de crescimento, fatores osteoindutores, sistemas de liberação controlada e manipulações genéticas das células (Jones & Yang, 2011). Além disso, as MSCs podem favorecer a regeneração tecidual por uma ação indireta, efeito parácrino, através da secreção de citocinas e fatores de crescimento (efeito antiapoptótico, imunoregulatório e estímulo de migração de células endógenas e angiogênese), com importante papel também na fase inicial da lesão controlando o processo inflamatório (Caplan & Dennis, 2006; Jones & Yang, 2011).

O potencial de diferenciação *in vitro* das hASCs em células da linhagem osteogênica na presença do SH, foi demonstrada anteriormente neste trabalho. Além disso, inúmeros estudos foram capazes de demonstrar a capacidade de hASCs em regenerar defeito ósseo de tamanho crítico em calvária (Cowan et al., 2004; Fan et al., 2015; Lee et al., 2015; Levi et al., 2010; Qureshi et al., 2015; Yoon et al., 2007). No entanto, neste ensaio *in vivo* não observamos a influência direta das hASCs juntamente com a matriz tridimensional de PHB-HV em promover a regeneração tecidual.

Apesar disso, a contribuição inicial das hASCs, implantadas juntamente com a matriz de PHB-HV, parece ter permitido uma vascularização mais precoce, observada após 4 semanas de implante neste grupo. Já foi demonstrado que as hASCs podem secretar fatores angiogênicos como VEGF, HGF e bFGF *in vitro* e *in vivo* favorecendo a angiogênese (Caplan & Dennis, 2006; Locke et al., 2009; Rehman et al., 2004). E após 12 semanas a vascularização em ambos os grupos PHB-HV e PHB-HV+hASCs se igualaram.

As análises por qPCR revelaram um aumento significativo na expressão de *VEGFA* após 12 semanas no grupo PHB-HV, o que pode explicar o aumento na formação de vasos observada neste grupo somente após 12 semanas. Alguns estudos demonstraram que *VEGFA* além do importante efeito angiogênico, essencial durante a formação óssea por permitir comunicação entre osteoblastos e células endoteliais, exerce também um papel importante na mineralização em resposta a injúria óssea, por estimular migração de

osteoblastos e diferenciação, assim como inibir a apoptose destas células (Behr et al., 2012; Street et al., 2002).

De modo geral, a expressão de transcritos gênicos *RUNX2*, *COL1A1*, *ALPL* e *BGLAP* foi baixa após 4 semanas de implante, aumentando após 12 semanas, porém estes níveis ainda estavam abaixo do observado no osso normal. De forma intrigante, a presença da matriz PHB-HV+hASCs parece ter induzido a expressão maior desses marcadores ao final de 12 semanas, em comparação ao grupo PHB-HV, no qual foram observados alguns focos de mineralização.

Recentemente vários trabalhos têm demonstrado que tanto a resposta imune inata quanto adaptativa são essenciais no reparo de injúrias do tecido ósseo. O processo inflamatório na fase inicial (IL-1, IL-6 e TNF α) é essencial no recrutamento de células, remoção de tecido necrótico e angiogênese (Einhorn & Gerstenfeld, 2014). No entanto, a influência do sistema imune sobre os osteoblastos ainda é pouco entendida e o papel de linfócitos e citocinas na biologia dessas células durante reparo de injúrias ósseas continua desconhecido (Neve et al., 2011). Evidências de que envolvimento de células T é essencial no controle de reparo de fraturas foram descritas por outros estudos. Recentemente um estudo utilizando camundongos *Rag1*^{-/-} apresentaram reparo de fratura óssea prejudicada em relação ao reparo ocorrido em animais imunocompetentes, devido a uma maturação e substituição da cartilagem mais lenta e menor mineralização. No entanto, os animais parecem ter recuperado as funções mecânicas mais rapidamente que os animais imunocompetentes. Além disso, a citocina pró-inflamatória IL-17F, secretada por linfócitos Th17 parece ser um mediador chave da resposta do sistema imune na osteogênese, estimulando a maturação dos osteoblastos (Nam et al., 2012).

O camundongo BALB/c *nude*, possui uma mutação no gene *Foxn1* que acarreta em ausência de pelos e timo nesses animais, conseqüentemente reduz o número de linfócitos T maduros e caracteriza-se por uma resposta imune humoral (IgM) e aumento de células NK (*natural killer*). Esses animais são amplamente empregados como modelos para transplantes xenogênicos, incluindo células humanas, estudos de tumores, metástase e de novas terapias (Belizario, 2009). Modelos para avaliar reparo ósseo de tamanho crítico em

calvária (Gupta et al., 2008) e ossos longos (Zwingenberger et al., 2013) foram estabelecidos para estes animais.

Apesar da diferenciação osteogênica das hASCs *in vitro* ter sido observada após 21 dias, em monocamada ou cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV e que outro estudo que demonstrou que hASCs associadas a uma matriz polimérica de ácido polilático-co-glicólico (PLGA) recoberta com apatita foram capazes de regenerar defeitos de tamanho crítico em calvária de camundongos imunossuprimidos CD-1 *nude* após 8 semanas (Levi et al., 2010), neste trabalho não foi observada a regeneração óssea.

Os resultados deste estudo sugerem que a matriz de PHB-HV, tanto na presença quanto na ausência de hASCs, parece exercer pequena função na regeneração óssea, no entanto, os resultados devem ser cuidadosamente interpretados considerando que o modelo de camundongo BALB/c *nude* utilizado pode ter influenciado negativamente ou retardado o processo de regeneração do defeito ósseo sugerindo a necessidade de prolongar o tempo de avaliação.

6. Conclusões

Através deste estudo, foi possível expandir satisfatoriamente hASCs *ex vivo* em meio de cultura suplementado com SH, que além de promover um aumento na taxa de proliferação celular, mantém a estabilidade fenotípica, genética e funcional dessas células sem nenhuma evidência de transformação maligna. Este suplemento é, então, adequado para o cultivo celular, favorecendo que o número de células viáveis necessário para terapia seja alcançado em menor período de tempo e suportando um transplante seguro e efetivo para o paciente de acordo com as normas de GMP. Foi possível ainda alcançar um fenótipo osteogênico utilizando as hASCs cultivadas na matriz tridimensional de PHB-HV e meio de cultura osteogênico suplementado com SH. A matriz tridimensional de PHB-HV, além de possuir uma estrutura adequada para permitir a colonização celular e diferenciação osteogênica celular, não foi tóxica para as hASCs e é biocompatível *in vivo*. No entanto, não foi alcançada uma regeneração do defeito ósseo de tamanho crítico realizado na calvária de camundongos imunossuprimidos utilizando a matriz de PHB-HV, em associação ou não com as hASCs. Sugerindo que o tempo de avaliação do reparo pode ter sido insuficiente, principalmente considerando o modelo animal empregado. Sendo assim, os resultados obtidos neste trabalho de tese e o conhecimento gerado serão úteis tanto para viabilizar a medicina regenerativa assim como para estudos futuros.

7. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos, pode-se traçar algumas questões que precisam ainda ser investigadas:

- 1- Utilizar o *pool* de soro humano alogênico como alternativa para cultivo de MSCs para fins terapêuticos.
- 2- Avaliar a piezoelectricidade da matriz de PHB-HV e sua influência no comportamento das hASCs *in vitro* e *in vivo*.
- 3- Incorporar fatores de crescimento e fatores osteoindutores para favorecer o potencial de regeneração óssea das hASCs.
- 4- Avaliar o potencial de regeneração óssea da matriz tridimensional de PHB-HV com ou sem hASCs em diferentes modelos animais.
- 5- Investigar o papel da imunidade celular no processo de regeneração óssea.
- 6- Avaliar o potencial da matriz de PHB-HV na regeneração de outros tecidos.

8. Referências Bibliográficas

- ABTO. (2014). Registro brasileiro de transplantes (2007-2014), 4.
- Agata, H., Watanabe, N., Ishii, Y., Kubo, N., Ohshima, S., Yamazaki, M., ... Kagami, H. (2009). Feasibility and efficacy of bone tissue engineering using human bone marrow stromal cells cultivated in serum-free conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 382(2), 353–358. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.023>
- Alberius, P., & Johnell, O. (1991). Repair of intra-membranous bone fractures and defects in rats. Immunolocalization of bone and cartilage proteins and proteoglycans. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 19(1), 15–20. [http://doi.org/10.1016/S1010-5182\(05\)80266-5](http://doi.org/10.1016/S1010-5182(05)80266-5)
- Aldahmash, A., Haack-Sørensen, M., Al-Nbaheen, M., Harkness, L., Abdallah, B. M., & Kassem, M. (2011). Human Serum is as Efficient as Fetal Bovine Serum in Supporting Proliferation and Differentiation of Human Multipotent Stromal (Mesenchymal) Stem Cells In Vitro and In Vivo. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(4), 860–868. <http://doi.org/10.1007/s12015-011-9274-2>
- Alford, A. I., Kozloff, K. M., & Hankenson, K. D. (2015). Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 65, 20–31. <http://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.05.008>
- Amini, A. R., Adams, D. J., Laurencin, C. T., & Nukavarapu, S. P. (2012). Optimally Porous and Biomechanically Compatible Scaffolds for Large-Area Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A*, 18(13-14), 1376–1388. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0076>
- Anderson, J. M., Rodriguez, A., & Chang, D. T. (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*, 20(2), 86–100. <http://doi.org/10.1016/j.smim.2007.11.004>
- Anghileri, E., Marconi, S., Pignatelli, A., Cifelli, P., Galié, M., Sbarbati, A., ... Bonetti, B. (2008). Neuronal differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(5), 909–916. <http://doi.org/10.1089/scd.2007.0197>
- Aubin, J. E. (2001). Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2(1), 81–94. <http://doi.org/10.1023/A:1010011209064>
- Banas, A., Teratani, T., Yamamoto, Y., Tokuhara, M., Takeshita, F., Quinn, G., ... Ochiya, T. (2007). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as a source of human hepatocytes. *Hepatology*, 46(1), 219–228. <http://doi.org/10.1002/hep.21704>
- Barkholt, L., Flory, E., Jekerle, V., Lucas-Samuel, S., Ahnert, P., Bisset, L., ... Salmikangas, P. (2013). Risk of tumorigenicity in mesenchymal stromal cell-based therapies - Bridging scientific observations and regulatory viewpoints. *Cytotherapy*, 15(7), 753–759. <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.03.005>
- Behr, B., Sorkin, M., Lehnhardt, M., Renda, A., Longaker, M. T., & Quarto, N. (2012). A Comparative Analysis of the Osteogenic Effects of BMP-2, FGF-2, and VEGFA in a Calvarial Defect Model. *Tissue Engineering Part A*, 18(9-10), 1079–1086. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0537>
- Belizario, J. E. (2009). Immunodeficient Mouse Models: An Overview. *The Open Immunology Journal*, 2(1), 79–85. <http://doi.org/10.2174/1874226200902010079>

- Bernardo, M. E., Avanzini, M. A., Perotti, C., Cometa, A. M., Moretta, A., Lenta, E., ... Locatelli, F. (2007). Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *Journal of Cellular Physiology*, 211(1), 121–130. <http://doi.org/10.1002/jcp.20911>
- Bernardo, M. E., Cometa, A. M., Pagliara, D., Vinti, L., Rossi, F., Cristantielli, R., ... Locatelli, F. (2011). Ex vivo expansion of mesenchymal stromal cells. *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 24(1), 73–81. <http://doi.org/10.1016/j.beha.2010.11.002>
- Bernardo, M. E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A. M., Avanzini, M. A., Moretta, A., ... Locatelli, F. (2007). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer Research*, 67(19), 9142–9149. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-4690>
- Bieback, K., Ha, V. A.-T., Hecker, A., Grassl, M., Kinzebach, S., Solz, H., ... Bugert, P. (2010). Altered gene expression in human adipose stem cells cultured with fetal bovine serum compared to human supplements. *Tissue Engineering. Part A*, 16(11), 3467–3484. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0727>
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., & Klüter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, 27(9), 2331–2341. <http://doi.org/10.1002/stem.139>
- Bischoff, D. S., Makhijani, N. S., & Yamaguchi, D. T. (2012). Constitutive expression of human telomerase enhances the proliferation potential of human mesenchymal stem cells. *Biores Open Access*, 1(6), 273–279. <http://doi.org/10.1089/biores.2012.0252>
- Bose, S., Roy, M., & Bandyopadhyay, A. (2012). Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. <http://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.07.005>
- Bourin, P., Bunnell, B. a., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., ... Gimble, J. M. (2013). 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 So. *Cytotherapy*, 15(6), 641–648. <http://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- Bretones, G., Delgado, M. D., & León, J. (2014). Myc and cell cycle control. *Biochim Biophys Acta*, (Epub ahead of print). <http://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.03.013>
- Brignier, A. C., & Gewirtz, A. M. (2010). Embryonic and adult stem cell therapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125(2 SUPPL. 2), S336–S344. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.09.032>
- Brunner, D., Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*, 27(1), 53–62.
- Burger, S. R. (2000). Design and operation of a current good manufacturing practices cell-engineering laboratory. *Cytotherapy*, 2(2), 111–122. <http://doi.org/10.1080/146532400539116>
- Caplan, a I., & Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 7(6), 259–264. [http://doi.org/10.1016/S1471-4914\(01\)02016-0](http://doi.org/10.1016/S1471-4914(01)02016-0)

- Caplan, A. I., & Dennis, J. E. (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of Cellular Biochemistry*, 98(5), 1076–1084. <http://doi.org/10.1002/jcb.20886>
- Casteilla, L., Planat-Benard, V., Laharrague, P., & Cousin, B. (2011). Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World Journal of Stem Cells*, 3(4), 25–33. <http://doi.org/10.4252/wjsc.v3.i4.25>
- Chase, L. G., Yang, S., Zachar, V., Yang, Z., Lakshmiopathy, U., Bradford, J., ... Vemuri, M. C. (2012). Development and Characterization of a Clinically Compliant Xeno-Free Culture Medium in Good Manufacturing Practice for Human Multipotent Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 1(10), 750–758. <http://doi.org/10.5966/sctm.2012-0072>
- Chen, G. Q., & Wu, Q. (2005). The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials. *Biomaterials*, 26(33), 6565–6578. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.04.036>
- Cheng, C. W., Solorio, L. D., & Alsberg, E. (2014). Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnology Advances*, 32(2), 462–484. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.12.012>
- Cheng, M. L., Chen, P. Y., Lan, C. H., & Sun, Y. M. (2011). Structure, mechanical properties and degradation behaviors of the electrospun fibrous blends of PHBHHx/PDLLA. *Polymer*, 52(6), 1391–1401. <http://doi.org/10.1016/j.polymer.2011.01.039>
- Cheung, H. Y., Lau, K. T., Lu, T. P., & Hui, D. (2007). A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development. *Composites Part B: Engineering*, 38(3), 291–300. <http://doi.org/10.1016/j.compositesb.2006.06.014>
- Choi, S.-C., Kim, S.-J., Choi, J.-H., Park, C.-Y., Shim, W.-J., & Lim, D.-S. (2008). Fibroblast growth factor-2 and -4 promote the proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells by the activation of the PI3K-Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Stem Cells and Development*, 17(4), 725–736. <http://doi.org/10.1089/scd.2007.0230>
- Cowan, C. M., Shi, Y.-Y., Aalami, O. O., Chou, Y.-F., Mari, C., Thomas, R., ... Longaker, M. T. (2004). Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology*, 22(5), 560–567. <http://doi.org/10.1038/nbt958>
- Da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science*, 119(Pt 11), 2204–2213. <http://doi.org/10.1242/jcs.02932>
- Das, K., Gunasegaran, B., Tan, I. B., Deng, N., Lim, K. H., & Tan, P. (2014). Mutually exclusive FGFR2, HER2, and KRAS gene amplifications in gastric cancer revealed by multicolour FISH. *Cancer Letters*, 353(2), 167–175. <http://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.021>
- Davies, J. E. (1996). In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anatomical Record*, 245(2), 426–445. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2<426::AID-AR21>3.0.CO;2-Q](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<426::AID-AR21>3.0.CO;2-Q)
- De Coppi, P., Bartsch, G., Siddiqui, M. M., Xu, T., Santos, C. C., Perin, L., ... Atala, A. (2007). Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nature Biotechnology*, 25(1), 100–106. <http://doi.org/10.1097/01.ogx.0000261640.52511.eb>
- Dimitriou, R., Jones, E., McGonagle, D., & Giannoudis, P. V. (2011). Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Medicine*, 9(1), 66. <http://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>

- Dimitriou, R., Mataliotakis, G. I., Angoules, A. G., Kanakaris, N. K., & Giannoudis, P. V. (2011). Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury*, *42*(SUPPL. 2), S3–S15. <http://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.015>
- Doblaré, M., García, J. M., & Gómez, M. J. (2004). Modelling bone tissue fracture and healing: A review. *Engineering Fracture Mechanics*, *71*(13-14), 1809–1840. <http://doi.org/10.1016/j.engfracmech.2003.08.003>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., ... Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*(4), 315–317. <http://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Donnell, K. a O., Yu, D., Zeller, K. I., Kim, J., Racke, F., Thomas-tikhonenko, A., & Dang, C. V. (2006). Activation of Transferrin Receptor 1 by c-Myc Enhances Cellular Proliferation and Tumorigenesis Activation of Transferrin Receptor 1 by c-Myc Enhances Cellular Proliferation and Tumorigenesis †. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(6), 2373–2386. <http://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2373>
- Einhorn, T. a., & Gerstenfeld, L. C. (2014). Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nature Reviews Rheumatology*, *11*(1), 45–54. <http://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>
- Fan, J., Im, C. S., Cui, Z.-K., Guo, M., Bezouglaia, O., Fartash, A., ... Lee, M. (2015). Delivery of Phenamil Enhances BMP-2-Induced Osteogenic Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells and Bone Formation in Calvarial Defects. *Tissue Engineering Part A*, *21*, 150610082930009. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2014.0489>
- Fischbach, G. D., & Fischbach, R. L. (2004). Science and society Stem cells: science , policy , and ethics. *Science and Society*, *114*(10), 1364–1370. <http://doi.org/10.1172/JCI200423549.1364>
- Fukada, E., & Ando, Y. (1986). Piezoelectric properties of poly-β-hydroxybutyrate and copolymers of β-hydroxybutyrate and β-hydroxyvalerate. *International Journal of Biological Macromolecules*, *8*(6), 361–366. [http://doi.org/10.1016/0141-8130\(86\)90056-5](http://doi.org/10.1016/0141-8130(86)90056-5)
- Fung, C. H., Cheung, W. H., Pounder, N. M., Harrison, A., & Leung, K. S. (2014). Osteocytes exposed to far field of therapeutic ultrasound promotes osteogenic cellular activities in pre-osteoblasts through soluble factors. *Ultrasonics*, *54*(5), 1358–1365. <http://doi.org/10.1016/j.ultras.2014.02.003>
- Gajko-Galicka, A. (2002). Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. *Acta Biochimica Polonica*, *49*(2), 433–441.
- Gálvez, P., Clares, B., Bermejo, M., Hmadcha, A., & Soria, B. (2014). Standard Requirement of a Microbiological Quality Control Program for the Manufacture of Human Mesenchymal Stem Cells for Clinical Use. *Stem Cells and Development*, *23*(10), 1074–1083. <http://doi.org/10.1089/scd.2013.0625>
- García, S., Martín, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., García-Castro, J., & Bernad, a. (2010). Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*, *316*(9), 1648–1650. <http://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.016>
- García-Olmo, D., Herreros, D., Pascual, M., Pascual, I., De-La-Quintana, P., Trebol, J., & García-Arranz, M. (2009). Treatment of enterocutaneous fistula in Crohn's Disease with adipose-derived stem cells: A comparison of protocols with and without cell expansion.

International Journal of Colorectal Disease, 24(1), 27–30. <http://doi.org/10.1007/s00384-008-0559-0>

- Gimble, J. M., Bunnell, B. a, & Guilak, F. (2012). Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regenerative Medicine*, 7(2), 225–235. <http://doi.org/10.2217/rme.11.119>
- Gimble, J. M., Guilak, F., & Bunnell, B. a. (2010). Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(2), 19. <http://doi.org/10.1186/scrt19>
- Gimble, J. M., Katz, A. J., & Bunnell, B. a. (2007). Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circulation Research*, 100(9), 1249–1260. <http://doi.org/10.1161/01.RES.0000265074.83288.09>
- Grayson, W. L., Bunnell, B. a., Martin, E., Frazier, T., Hung, B. P., & Gimble, J. M. (2015). Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(3), 140–150. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2014.234>
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(25), 13625–13630. <http://doi.org/10.1073/pnas.240309797>
- Gupta, D. M., Kwan, M. D., Slater, B. J., Wan, D. C., & Longaker, M. T. (2008). Applications of an athymic nude mouse model of nonhealing critical-sized calvarial defects. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 19(1), 192–197. <http://doi.org/10.1097/scs.0b013e31815c93b7>
- Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1092, 385–396. <http://doi.org/10.1196/annals.1365.035>
- Harvath, L. (2000). Food and Drug Administration's proposed approach to regulation of hematopoietic stem/progenitor cell products for therapeutic use. *Transfusion Medicine Reviews*, 14(2), 104–111. [http://doi.org/10.1016/S0887-7963\(00\)80002-4](http://doi.org/10.1016/S0887-7963(00)80002-4)
- Heiskanen, A., Satomaa, T., Tiitinen, S., Laitinen, A., Mannelin, S., Impola, U., ... Laine, J. (2007). N-glycolylneuraminic acid xenoantigen contamination of human embryonic and mesenchymal stem cells is substantially reversible. *Stem Cells*, 25(1), 197–202. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0444>
- Hipp, J., & Atala, A. (2008). Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Reviews*, 4(1), 3–11. <http://doi.org/10.1007/s12015-008-9010-8>
- Huang, W., Shi, X., Ren, L., Du, C., & Wang, Y. (2010). PHBV microspheres - PLGA matrix composite scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(15), 4278–4285. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.059>
- Ikada, Y. (2006). Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 3(10), 589–601. <http://doi.org/10.1098/rsif.2006.0124>
- ISCN. (2013). *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature*. (L. Shaffer & M. McGowan-Jordan, J; Schmid, Eds.). S Karger, Basel.
- Jain, R. K., Au, P., Tam, J., Duda, D. G., & Fukumura, D. (2005). Engineering vascularized tissue. *Nature Biotechnology*, 23(7), 821–823. <http://doi.org/10.1038/nbt0705-821>

- Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, a I., & Bruder, S. P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 64(2), 295–312. [http://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4644\(199702\)64:2<295::aid-jcb12>3.0.co;2-i](http://doi.org/10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<295::aid-jcb12>3.0.co;2-i)
- Jin, K., Simpkins, J. W., Ji, X., Leis, M., & Stambler, I. (2015). The Critical Need to Promote Research of Aging and Aging-related Diseases to Improve Health and Longevity of the Elderly Population. *Aging and Disease*, 6(1), 1–5. <http://doi.org/10.14336/AD.2014.1210>
- Jones, E., & Yang, X. (2011). Mesenchymal stem cells and bone regeneration: Current status. *Injury*, 42(6), 562–568. <http://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.030>
- Kanis, J. a, Borgstrom, F., De Laet, C., Johansson, H., Johnell, O., Jonsson, B., ... Khaltsev, N. (2005). Assessment of fracture risk. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 16(6), 581–589. <http://doi.org/10.1007/s00198-004-1780-5>
- Kanis, J. a. (2002). Osteoporosis III: Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk. *Lancet*, 359(9321), 1929–1936. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)08761-5](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)08761-5)
- Ke, S., Huang, H., Ren, L., & Wang, Y. (2009). Nearly constant dielectric loss behavior in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) biodegradable polyester. *Journal of Applied Physics*, 105(9), 3–6. <http://doi.org/10.1063/1.3125271>
- Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2007). Production of poly(3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid) having a high hydroxyvalerate content with valeric acid feeding. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 457–461. <http://doi.org/10.1007/s10295-007-0207-7>
- Klein, J. D., & Fauza, D. O. (2011). Amniotic and placental mesenchymal stem cell isolation and culture. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 698, 75–88. http://doi.org/10.1007/978-1-60761-999-4_7
- Kocaoemer, A., Kern, S., Klüter, H., & Bieback, K. (2007). Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*, 25(5), 1270–1278. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0627>
- Kruger, G. M., Mosher, J. T., Bixby, S., Joseph, N., Iwashita, T., & Morrison, S. J. (2002). Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, 35(4), 657–669. [http://doi.org/10.1016/S0896-6273\(02\)00827-9](http://doi.org/10.1016/S0896-6273(02)00827-9)
- Kumarasuriyar, A., Jackson, R. A., Grøndahl, L., Trau, M., Nurcombe, V., & Cool, S. M. (2005). Poly(beta-hydroxybutyrate-co-beta-hydroxyvalerate) supports in vitro osteogenesis. *Tissue Engineering*, 11(7-8), 1281–1295. <http://doi.org/10.1089/ten.2005.11.1281>
- Kuppan, P., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-based nanofibrous scaffolds to support functional esophageal epithelial cells towards engineering the esophagus. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 25(6), 574–93. <http://doi.org/10.1080/09205063.2014.884427>
- Langenbach, F., & Handschel, J. (2013). Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(5), 117. <http://doi.org/10.1186/scrt328>

- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). - ARTICLES Tissue Engineering. *Science*, 260(May), 920–926. <http://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lee, J. M., Kim, E. A., & Im, G.-I. (2015). Healing of tibial and calvarial bone defect using Runx-2-transfected adipose stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(2), 107–112. <http://doi.org/10.1007/s13770-014-0070-3>
- Lee, S. Y. (1996). Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*, 49(1), 1–14. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19960105\)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19960105)49:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-P)
- Levi, B., James, A. W., Nelson, E. R., Vistnes, D., Wu, B., Lee, M., ... Longaker, M. T. (2010). Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS ONE*, 5(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011177>
- Lian, J. B., & Stein, G. S. (1992). Concepts of osteoblast growth and differentiation: basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 3(3), 269–305. <http://doi.org/10.1177/10454411920030030501>
- Lian, J. B., & Stein, G. S. (2003). Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Current Pharmaceutical Design*, 9(32), 2677–2685. <http://doi.org/10.2174/1381612033453659>
- Lichte, P., Pape, H. C., Pufe, T., Kobbe, P., & Fischer, H. (2011). Scaffolds for bone healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*, 42(6), 569–573. <http://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.033>
- Lindroos, B., Aho, K.-L., Kuokkanen, H., Rätty, S., Huhtala, H., Lemponen, R., ... Miettinen, S. (2010). Differential gene expression in adipose stem cells cultured in allogeneic human serum versus fetal bovine serum. *Tissue Engineering. Part A*, 16(7), 2281–2294. <http://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0621>
- Lindroos, B., Suuronen, R., & Miettinen, S. (2011). The Potential of Adipose Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cell Reviews and Reports*, 7(2), 269–291. <http://doi.org/10.1007/s12015-010-9193-7>
- Liu, X., & Ma, P. (2004). Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 32(3), 477–486.
- Locke, M., Windsor, J., & Dunbar, P. R. (2009). Human adipose-derived stem cells: Isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ Journal of Surgery*, 79(4), 235–244. <http://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2009.04852.x>
- Lu, T.-Y., Lin, B., Kim, J., Sullivan, M., Tobita, K., Salama, G., & Yang, L. (2013). Repopulation of decellularized mouse heart with human induced pluripotent stem cell-derived cardiovascular progenitor cells. *Nature Communications*, 4, 2307. <http://doi.org/10.1038/ncomms3307>
- Mackie, E. J. (2003). Osteoblasts: Novel roles in orchestration of skeletal architecture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 35(9), 1301–1305. [http://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00107-9](http://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00107-9)
- Mannello, F., & Tonti, G. a. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, o. *Stem Cells*, 25(7), 1603–1609. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0127>

- Mao, J. S., Zhao, L. G., Yin, Y. J., & Yao, K. De. (2003). Structure and properties of bilayer chitosan-gelatin scaffolds. *Biomaterials*, 24(6), 1067–1074. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00442-8](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00442-8)
- Martin, M. J., Muotri, A., Gage, F., & Varki, A. (2005). Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nature Medicine*, 11(2), 228–232. <http://doi.org/10.1038/nm1181>
- Mathieu, L. M., Mueller, T. L., Bourban, P.-E., Pioletti, D. P., Müller, R., & Månson, J.-A. E. (2006). Architecture and properties of anisotropic polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 27(6), 905–916. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.07.015>
- Mesimäki, K., Lindroos, B., Törnwall, J., Mauno, J., Lindqvist, C., Kontio, R., ... Suuronen, R. (2009). Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 38(3), 201–209. <http://doi.org/10.1016/j.ijom.2009.01.001>
- Mimura, S., Kimura, N., Hirata, M., Tateyama, D., Hayashida, M., Umezawa, A., ... Furue, M. K. (2011). Growth factor-defined culture medium for human mesenchymal stem cells. *International Journal of Developmental Biology*, 55(2), 181–187. <http://doi.org/10.1387/ijdb.103232sm>
- Mitchell, J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., ... Gimble, J. M. (2006). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2), 376–385. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0234>
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H. M., Molinolo, A. a, Fu, B., Patel, V., ... Shi, S. (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*, 24(4), 1095–1103. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0403>
- Mizuno, H. (2009). Adipose-derived Stem Cells for Tissue Repair and Regeneration: Ten Years of Research and a Literature Review. *Journal of Nippon Medical School*, 76(2), 56–66. <http://doi.org/10.1272/jnms.76.56>
- Moll, G., Hult, A., Von Bahr, L., Alm, J. J., Heldring, N., Hamad, O. a., ... Le Blanc, K. (2014). Do ABO blood group antigens hamper the therapeutic efficacy of mesenchymal stromal cells? *PLoS ONE*, 9(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0085040>
- Mombaerts, P., Iacomini, J., Johnson, R. S., Herrup, K., Tonegawa, S., & Papaioannou, V. E. (1992). RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell*, 68(5), 869–877. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90030-G](http://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90030-G)
- Morais, E. A., Fernandes, V. C., Aparecida, G., Silva, B., Gomes, D. A., & Goes, A. M. De. (2013). Immunization with rPb27 Protects Mice from the Disruption of VEGF Signaling in Paracoccidioides brasiliensis Infection. *Journal of Life Sciences*, 7(9), 913–927.
- Mori, S., Sakamoto, A., Yamashita, K., Fujimura, L., Arima, M., Hatano, M., ... Tokuhisa, T. (2004). Effect of c-fos overexpression on development and proliferation of peritoneal B cells. *International Immunology*, 16(10), 1477–1486. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxh149>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63. [http://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

- Mountford, J. C. (2008). Human embryonic stem cells: Origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine*, 18(1), 1–12. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2007.00807.x>
- Murphy, W. L., Dennis, R. G., Kileny, J. L., & Mooney, D. J. (2002). Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering*, 8(1), 43–52. <http://doi.org/10.1089/107632702753503045>
- Nakamura, A., Dohi, Y., Akahane, M., Ohgushi, H., Nakajima, H., Funaoka, H., & Takakura, Y. (2009). Osteocalcin secretion as an early marker of in vitro osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering. Part C, Methods*, 15(2), 169–180. <http://doi.org/10.1089/ten.tec.2007.0334>
- Nam, D., Mau, E., Wang, Y., Wright, D., Silkstone, D., Whetstone, H., ... Alman, B. (2012). T-lymphocytes enable osteoblast maturation via IL-17F during the early phase of fracture repair. *PLoS ONE*, 7(6). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0040044>
- Nam, Y. S., & Park, T. G. (1999). Porous biodegradable polymeric scaffolds prepared by thermally induced phase separation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 47(1), 8–17. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(199910\)47:1<8::AID-JBM2>3.0.CO;2-L](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(199910)47:1<8::AID-JBM2>3.0.CO;2-L)
- Neve, A., Corrado, A., & Cantatore, F. P. (2011). Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell and Tissue Research*, 343(2), 289–302. <http://doi.org/10.1007/s00441-010-1086-1>
- O'Donnell, K. a, Wentzel, E. a, Zeller, K. I., Dang, C. V., & Mendell, J. T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), 839–843. <http://doi.org/10.1038/nature03677>
- Onuki, Y., Bhardwaj, U., Papadimitrakopoulos, F., & Burgess, D. J. (2008). A review of the biocompatibility of implantable devices: current challenges to overcome foreign body response. *Journal of Diabetes Science and Technology (Online)*, 2(6), 1003–1015. [http://doi.org/10.1016/S0091-679X\(07\)83003-2](http://doi.org/10.1016/S0091-679X(07)83003-2)
- Phinney, D. G., & Prockop, D. J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells*, 25(11), 2896–2902. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0637>
- Portal Brasil. (2013). No Title. Retrieved from <http://www.brasil.gov.br/saude/2013/10/numero-de-transplantes-no-pais-cresce-118-na-ultima-decada>
- Price, P. J., & Gregory, E. a. (1982). Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro*, 18(6), 576–584. <http://doi.org/10.1007/BF02810081>
- Prokhorova, T. a, Harkness, L. M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schröder, H. D., Burns, J. S., & Kassem, M. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem Cells and Development*, 18(1), 47–54. <http://doi.org/10.1089/scd.2007.0266>
- Puppi, D., Chiellini, F., Piras, a. M., & Chiellini, E. (2010). Polymeric materials for bone and cartilage repair. *Progress in Polymer Science*, 35(4), 403–440. <http://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2010.01.006>
- Qi, Y., Su, T., Zhang, X., Jiang, Y., Yuan, W., Wang, W., ... Ning, G. (2012). Gene expression profiles of pheochromocytomas with ERBB2 overexpression reveal a new molecular mechanism tumourigenicity. *Clinical Endocrinology*, 77(3), 399–406. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2012.04388.x>

- Qiu, W., Sahin, F., Iacobuzio-Donahue, C. a, Garcia-Carracedo, D., Wang, W. M., Kuo, C.-Y., ... Su, G. H. (2011). Disruption of p16 and activation of Kras in pancreas increase ductal adenocarcinoma formation and metastasis in vivo. *Oncotarget*, 2(11), 862–73. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3259996&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Qureshi, A. T., Doyle, A., Chen, C., Coulon, D., Dasa, V., Del Piero, F., ... Hayes, D. J. (2015). Photoactivated miR-148b–nanoparticle conjugates improve closure of critical size mouse calvarial defects. *Acta Biomaterialia*, 12, 166–173. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.010>
- Rabbitts, P. H., Watson, J. V, Lamond, A., Forster, A., Stinson, M. a, Evan, G., ... Rabbitts, T. H. (1985). Metabolism of c-myc gene products: c-myc mRNA and protein expression in the cell cycle. *The EMBO Journal*, 4(8), 2009–2015.
- Raff, M. (2003). : Fact or Artifact? *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1), 1–22. <http://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.111301.143037>
- Raisz, L. G. (1999). Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical Chemistry*, 45(8 Pt 2), 1353–1358.
- Rajamani, K., Li, Y. S., Hsieh, D. K., Lin, S. Z., Harn, H. J., & Chiou, T. W. (2014). Genetic and epigenetic instability of stem cells. *Cell Transplantation*. <http://doi.org/10.3727/096368914X678472>
- Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., ... March, K. L. (2004). Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*, 109(10), 1292–1298. <http://doi.org/10.1161/01.CIR.0000121425.42966.F1>
- Ribeiro-Samy, S., Silva, N. a., Correlo, V. M., Fraga, J. S., Pinto, L., Teixeira-Castro, A., ... Reis, R. L. (2013). Development and characterization of a PHB-HV-based 3D scaffold for a tissue engineering and cell-therapy combinatorial approach for spinal cord injury regeneration. *Macromolecular Bioscience*, 13(11), 1576–1592. <http://doi.org/10.1002/mabi.201300178>
- Riekstina, U., Cakstina, I., Parfejevs, V., Hoogduijn, M., Jankovskis, G., Muiznieks, I., ... Ancans, J. (2009). Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis. *Stem Cell Reviews and Reports*, 5(4), 378–386. <http://doi.org/10.1007/s12015-009-9094-9>
- Rodrigues, M., Griffith, L. G., & Wells, A. (2010). Growth factor regulation of proliferation and survival of multipotential stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(4), 32. <http://doi.org/10.1186/scrt32>
- Rodriguez, R., Rubio, R., Masip, M., Catalina, P., Nieto, A., de la Cueva, T., ... García-Castro, J. (2009). Loss of p53 induces tumorigenesis in p21-deficient mesenchymal stem cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(4), 397–407. <http://doi.org/10.1593/neo.81620>
- Romanov, Y. A., Darevskaya, A. N., Merzlikina, N. V., & Buravkova, L. B. (2005). Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: Isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 140(1), 138–143. <http://doi.org/10.1007/s10517-005-0430-z>
- Røslund, G. V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., ... Schichor, C. (2009). Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal

- stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer Research*, 69(13), 5331–5339. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4630>
- Rubio, D., Garcia, S., Paz, M. F., de la Cueva, T., Lopez-Fernandez, L. a., Lloyd, A. C., ... Bernard, A. (2008). Molecular characterization of spontaneous mesenchymal stem cell transformation. *PLoS ONE*, 3(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0001398>
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromolecular Bioscience*, 4(8), 743–765. <http://doi.org/10.1002/mabi.200400026>
- Schäfer, R., Schnaidt, M., Klaffschenkel, R. a., Siegel, G., Schüle, M., Rädlein, M. A., ... Flegel, W. a. (2011). Expression of blood group genes by mesenchymal stem cells. *British Journal of Haematology*, 153(4), 520–528. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2011.08652.x>
- Schmittgen, T. D., & Livak, K. J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature Protocols*, 3(6), 1101–1108. <http://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>
- Scholzen, T., & Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology*, 182(3), 311–322. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(200003\)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9)
- Selvaggi, T. a, Walker, R. E., & Fleisher, T. a. (1997). Development of antibodies to fetal calf serum with arthus-like reactions in human immunodeficiency virus-infected patients given syngeneic lymphocyte infusions. *Blood*, 89(3), 776–779.
- Seong, J. M., Kim, B.-C., Park, J.-H., Kwon, I. K., Mantalaris, A., & Hwang, Y.-S. (2010). Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical Materials (Bristol, England)*, 5(6), 062001. <http://doi.org/10.1088/1748-6041/5/6/062001>
- Shahdadfar, A., Frønsdal, K., Haug, T., Reinholt, F. P., & Brinchmann, J. E. (2005). In vitro expansion of human mesenchymal stem cells: choice of serum is a determinant of cell proliferation, differentiation, gene expression, and transcriptome stability. *Stem Cells*, 23(9), 1357–1366. <http://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0094>
- Shoda, K., Masuda, K., Ichikawa, D., Arita, T., Miyakami, Y., Watanabe, M., ... Otsuji, E. (2014). HER2 amplification detected in the circulating DNA of patients with gastric cancer: a retrospective pilot study. *Gastric Cancer*, 2. <http://doi.org/10.1007/s10120-014-0432-5>
- Sikavitsas, V. I., Temenoff, J. S., & Mikos, A. G. (2001). Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials*, 22(19), 2581–2593. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00002-3](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00002-3)
- Simonsen, J. L., Rosada, C., Serakinci, N., Justesen, J., Stenderup, K., Rattan, S. I. S., ... Kassem, M. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature Biotechnology*, 20(6), 592–596. <http://doi.org/10.1038/nbt0602-592>
- Smith, B. D., & Grande, D. a. (2015). The current state of scaffolds for musculoskeletal regenerative applications. *Nature Reviews Rheumatology*, 11(4), 213–222. <http://doi.org/10.1038/nrrheum.2015.27>
- Sodek, J., Ganss, B., & McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine: An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(3), 279–303. <http://doi.org/10.1177/10454411000110030101>

- Solmesky, L., Lefler, S., Jacob-Hirsch, J., Bulvik, S., Rechavi, G., & Weil, M. (2010). Serum free cultured bone marrow mesenchymal stem cells as a platform to characterize the effects of specific molecules. *PLoS ONE*, 5(9), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0012689>
- Sommerfeldt, D., & Rubin, C. (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *European Spine Journal*, 10(SUPPL. 2), 86–95. <http://doi.org/10.1007/s005860100283>
- Spees, J. L., Gregory, C. a., Singh, H., Tucker, H. A., Peister, A., Lynch, P. J., ... Prockop, D. J. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, 9(5), 747–756. <http://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.02.012>
- Squio, C. R., & Falcão De Aragão, G. M. (2004). Estratégias de cultivo para produção dos plásticos biodegradáveis poli(3-hidroxiacetato) e poli(3-hidroxiacetato-co-3-hidroxiacetato) por bactérias. *Química Nova*, 27(4), 615–622. <http://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400016>
- Street, J., Bao, M., deGuzman, L., Bunting, S., Peale, F. V., Ferrara, N., ... Filvaroff, E. H. (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(15), 9656–9661. <http://doi.org/10.1073/pnas.152324099>
- Tabata, Y. (2009). Biomaterial technology for tissue engineering applications. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 6 Suppl 3(March), S311–S324. <http://doi.org/10.1098/rsif.2008.0448.focus>
- Tarle, S. a., Shi, S., & Kaigler, D. (2011). Development of a serum-free system to expand dental-derived stem cells: PDLSCs and SHEDs. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 66–73. <http://doi.org/10.1002/jcp.22304>
- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., ... Sensebe, L. (2010). Brief report Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*, 115(8), 1549–1553. <http://doi.org/10.1182/blood-2009-05-219907>.The
- Tevlin, R., McArdle, a., Atashroo, D., Walmsley, G. G., Senarath-Yapa, K., Zielins, E. R., ... Wan, D. C. (2014). Biomaterials for Craniofacial Bone Engineering. *Journal of Dental Research*, 93(12), 1187–1195. <http://doi.org/10.1177/0022034514547271>
- Thompson, Z., Miclau, T., Hu, D., & Helms, J. a. (2002). A model for intramembranous ossification during fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*, 20(5), 1091–1098. [http://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00017-7](http://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00017-7)
- Toma, J. G., Akhavan, M., Fernandes, K. J., Barnabé-Heider, F., Sadikot, a, Kaplan, D. R., & Miller, F. D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature Cell Biology*, 3(9), 778–784. <http://doi.org/10.1038/ncb0901-778>
- Torsvik, A., Røslund, G. V., Svendsen, A., Molven, A., Immervoll, H., McCormack, E., ... Bjerkvig, R. (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: Putting the research field on track - Letter. *Cancer Research*, 70(15), 6393–6396. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1305>
- Torun Köse, G., Kenar, H., Hasirci, N., & Hasirci, V. (2003). Macroporous poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) matrices for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 24(11), 1949–1958. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00613-0](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00613-0)

- Torun Köse, G., Korkusuz, F., Korkusuz, P., Purali, N., Özkul, a., & Hasirci, V. (2003). Bone generation on PHBV matrices: An in vitro study. *Biomaterials*, 24(27), 4999–5007. [http://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00417-4](http://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00417-4)
- Tulchinsky, E. (2000). Fos family members: Regulation, structure and role in oncogenic transformation. *Histology and Histopathology*, 15(3), 921–928.
- Tuschong, L., Soenen, S. L., Blaese, R. M., Candotti, F., & Muul, L. M. (2002). Immune response to fetal calf serum by two adenosine deaminase-deficient patients after T cell gene therapy. *Human Gene Therapy*, 13(13), 1605–1610. <http://doi.org/10.1089/10430340260201699>
- Valerio, P., Pereira, M. M., Goes, A. M., & Leite, M. F. (2004). The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*, 25(15), 2941–2948. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.086>
- Van der Valk, J., Brunner, D., De Smet, K., Fex Svenningsen, Å., Honegger, P., Knudsen, L. E., ... Gstraunthaler, G. (2010). Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicology in Vitro*, 24(4), 1053–1063. <http://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>
- Van Putten, S. M., Ploeger, D. T. a, Popa, E. R., & Bank, R. a. (2013). Macrophage phenotypes in the collagen-induced foreign body reaction in rats. *Acta Biomaterialia*, 9(5), 6502–6510. <http://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.01.022>
- Venturi, G., Tedeschi, E., Mottes, M., Valli, M., Camilot, M., Viglio, S., ... Tatò, L. (2006). Osteogenesis imperfecta: clinical, biochemical and molecular findings. *Clinical Genetics*, 70(2), 131–139. <http://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00646.x>
- Verlinden, R. a J., Hill, D. J., Kenward, M. a., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), 1437–1449. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03335.x>
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., ... Ho, A. D. (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: A continuous and organized process. *PLoS ONE*, 3(5). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0002213>
- Wan, D. C., Shi, Y.-Y., Nacamuli, R. P., Quarto, N., Lyons, K. M., & Longaker, M. T. (2006). Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33), 12335–12340. <http://doi.org/10.1073/pnas.0604849103>
- Wang, H., Ahn, S., Kim, S., Park, S., Park, S., Han, H., ... Lee, H. (2014). Detection of circulating tumor cells in patients with breast cancer using the quantitative RT-PCR assay for monitoring of therapy efficacy. *Experimental and Molecular Pathology*, 97(3), 445–452. <http://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.09.003>
- Wei, J., & Karsenty, G. (2015). An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. <http://doi.org/10.1007/s11154-014-9307-7>
- Whang, K., Thomas, C. H., Healy, K. E., & Nuber, G. (1995). A novel method to fabricate bioabsorbable scaffolds. *Polymer*, 36(4), 837–842. [http://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)93115-3](http://doi.org/10.1016/0032-3861(95)93115-3)
- Whang, K., Tsai, D. C., Nam, E. K., Aitken, M., Sprague, S. M., Patel, P. K., & Healy, K. E. (1998). Ectopic bone formation via rhBMP-2 delivery from porous bioabsorbable polymer

- scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42(4), 491–499. [http://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19981215\)42:4<491::AID-JBM3>3.0.CO;2-F](http://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19981215)42:4<491::AID-JBM3>3.0.CO;2-F)
- Will, R. ., Ironside, J. ., Zeidler, M., Estibeiro, K., Cousens, S. ., Smith, P. ., ... Hofman, a. (1996). A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*, 347(9006), 921–925. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)91412-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)91412-9)
- Williams, D. F. (1999). *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University Press.
- Williams, D. F. (2008). On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*, 29(20), 2941–2953. <http://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>
- Wu, J., Xue, K., Li, H., Sun, J., & Liu, K. (2013). Improvement of PHBV Scaffolds with Bioglass for Cartilage Tissue Engineering. *PLoS ONE*, 8(8). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0071563>
- Yang, S., Leong, K. F., Du, Z., & Chua, C. K. (2001). The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Engineering*, 7(6), 679–689. <http://doi.org/10.1089/107632701753337645>
- Yang, Y. (2009). Skeletal Morphogenesis and Embryonic Development. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism: Seventh Edition*, 19(3)(3), 1–10. <http://doi.org/10.1002/9780470623992.ch1>
- Yi, T., & Song, S. U. (2012). Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their therapeutic applications. *Archives of Pharmacal Research*, 35(2), 213–221. <http://doi.org/10.1007/s12272-012-0202-z>
- Yoon, E., Dhar, S., Chun, D. E., Gharibjanian, N. a., & Evans, G. R. D. (2007). In Vivo Osteogenic Potential of Human Adipose-Derived Stem Cells/Poly Lactide-Co-Glycolic Acid Constructs for Bone Regeneration in a Rat Critical-Sized Calvarial Defect Model. *Tissue Engineering*, 13(3), 619–627. <http://doi.org/10.1089/ten.2006.0102>
- Zhang, S., Prabhakaran, M. P., Qin, X., & Ramakrishna, S. (2015). Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate containing scaffolds and their integration with osteoblasts as a model for bone tissue engineering. *Journal of Biomaterials Applications*, 29(10), 1394–1406. <http://doi.org/10.1177/0885328214568467>
- Zigdon-Giladi, H. (2015). Recent advances in bone regeneration using adult stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 7(3), 630. <http://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i3.630>
- Zomorodian, E., & Baghaban Eslaminejad, M. (2012). Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration. *Stem Cells International*, 2012. <http://doi.org/10.1155/2012/980353>
- Zonari, A., Cerqueira, M. T., Novikoff, S., Goes, A. M., Marques, A. P., Correlo, V. M., & Reis, R. L. (2014). Poly(hydroxybutyrate- co -hydroxyvalerate) Bilayer Skin Tissue Engineering Constructs with Improved Epidermal Rearrangement. *Macromolecular Bioscience*, 14(7), 977–990. <http://doi.org/10.1002/mabi.201400005>
- Zonari, A., Novikoff, S., Electo, N. R. P., Breyner, N. M., Gomes, D. a., Martins, A., ... Goes, A. M. (2012). Endothelial differentiation of human stem cells seeded onto electrospun polyhydroxybutyrate/polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate fiber mesh. *PLoS ONE*, 7(4). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0035422>

- Zuk, P. a, Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, a J., ... Hedrick, M. H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211–228. <http://doi.org/10.1089/107632701300062859>
- Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., ... Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), 4279–4295. <http://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>
- Zwingenberger, S., Niederlohmann, E., Vater, C., Rammelt, S., Matthys, R., Bernhardt, R., ... Stiehler, M. (2013). Establishment of a femoral critical-size bone defect model in immunodeficient mice. *Journal of Surgical Research*, 181(1), 1–8. <http://doi.org/10.1016/j.jss.2012.06.039>

Anexos

I. Pesquisa desenvolvida durante o estágio de doutorado no exterior– Modelagem da Síndrome de Sotos *in vitro* utilizando células-tronco de pluripotência induzida e engenharia genômica

**Modelagem da Síndrome de Sotos *in vitro*
utilizando células-tronco de pluripotência
induzida e engenharia genômica**

Pesquisa desenvolvida no MRC Centre for Developmental Neurobiology, King's College London em Londres, Reino Unido, apresentada nesta tese como um dos requisitos da bolsa CAPES de doutorado sanduíche no exterior, processo: BEX 7082/14-2; novembro 2014 – abril 2015.

Aluna: Ana Cláudia Chagas de Paula

Orientadora: Prof. Dra. Setsuko Sahara.

Resumo I

A Síndrome de Sotos é uma disordem neurológica autossômica dominante caracterizada por supercrescimento, acromegalia, anomalias faciais e dificuldade de aprendizagem associada a outras características. Mutações e deleções no gene *NSD1*, localizado no cromossomo 5q35, é a principal causa dessa doença. A maior barreira para se estudar a Síndrome de Sotos é a inacessibilidade do córtex cerebral. Portanto, a geração de células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs) oferece uma nova estratégia para modelar doenças humanas. Assim como a engenharia genômica, usando o sistema Cas-CRISPR pode gerar linhagens celulares modificadas para estudos funcionais. Ambos os sistemas tem potencial aplicação na ciência básica, medicina e biotecnologia. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi estabelecer modelos da Síndrome de Sotos *in vitro*. Linfócitos B imortalizados por vírus Epstein Barr (EBV), derivados de pacientes acometidos pela Síndrome de Sotos (mutação *frameshift* 6450-1insC, exon 22) e doadores normais, foram reprogramados com uso de vetores episomais não integrativos. Inúmeras colônias de iPSCs foram geradas e expressaram o marcador de pluripotência TRA-1-60. E o sistema de edição de genoma sgRNAs-Cas9n-CRISPR através da via de reparo de junção de terminações não homologas (NHEJ) foi capaz de gerar aproximadamente $35,5 \pm 0,8\%$ de mutações indel em células HEK 293 FT na região do gene *NSD1* (afetado na Síndrome de Sotos pela mutação *missense* 6014G→A, exon 20). Essas duas abordagens representam estratégias eficientes e promissoras para gerar modelos para estudos *in vitro* de doenças genéticas humanas, como a Síndrome de Sotos. Estes modelos podem ser utilizados para realização de estudos de patogênese e de desenvolvimento e seleção de fármacos para o tratamento desta síndrome.

Abstract I

The Sotos Syndrome is an autosomal dominant neurological disorder characterized by overgrowth, acromegalic features, facial anomalies and learning disabilities associated to other features. Mutations and deletions of the *NSD1* gene located at chromosome 5q35 are the major cause of this disease. The major barrier to research Sotos Syndrome is inaccessibility of cerebral cortex. Therefore the generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) offers a new strategy for modelling human diseases. As well as the genome engineering using the CRISPR-Cas system can generate modified cell lines for functional studies. Both systems have potential application across basic science, medicine and biotechnology. Thus the aim of this study was to establish Sotos syndrome models *in vitro*. Epstein Barr virus (EBV)-immortalized B lymphocytes derived from Sotos syndrome-patients (frameshift mutation 6450-1insC, exon 22) and normal donors were reprogrammed with the use of non-integrating episomal vectors. Several colonies of iPSCs were generated and expressed the pluripotency marker TRA-1-60. And the genome editing sgRNAs-CRISPR-Cas9n system via nonhomologous end joining (NHEJ) pathway of repair was able to introduce approximately $35.5 \pm 0.8\%$ of indel mutations in HEK 293 FT lines at the region of *NSD1* gene (affected in Sotos syndrome by missense mutation 6014G→A, exon 20). These two approaches represent efficient and promising strategies to generate human genetic disease models for studies *in vitro*, as Sotos syndrome. These models can be used in pathogenesis studies and, development and screening of drugs for this syndrome.

Lista de Figuras I

Figura I. 1. Vetores episomais utilizados para reprogramar os linfócitos B-EBV	130
Figura I. 2. Reprogramação de fibroblastos humanos em iPSCs	141
Figura I. 3. Imagem representativa de uma colônia de iPSCs derivada de fibroblastos humanos expressando TRA-1-60	142
Figura I. 4. Reprogramação dos linfócitos B-EBV em iPSCs	143
Figura I. 5. Imagem representativa de colônias de iPSCs derivadas de linfócitos B-EBV expressando TRA-1-60.....	143
Figura I. 6. Edição do genoma de células humanas HEK 293 FT - gene <i>EMX1</i> alvo, como controle do sistema Cas9n-CRISPR	144
Figura I. 7. Edição do genoma de células humanas HEK 293 FT – gene <i>NSD1</i> alvo.....	145

Lista de Tabelas I

Tabela I. 1. Solução de nucleofecção de fibroblastos humanos	131
Tabela I. 2. Solução de nucleofecção para linfócitos B-EBV	132
Tabela I. 3. Sequência de oligonucleotídeos para clonagem de sgRNAs e validação	134
Tabela I. 4. Condições para hibridização dos produtos de PCR.....	139

Lista de Abreviaturas e Siglas I

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
A	Adenina
C	Citosina
cm²	Centímetro quadrado
CO₂	Dióxido de carbono
CRISPR	Repetições palindrômicas pequenas, regularmente inter-espaçadas, agrupadas- <i>clustered</i> , <i>regularly interspaced</i> , <i>short palindromic repeats</i>),
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DSB	Quebra na dupla fita- <i>double stranded break</i>
EBNA	Antígeno nuclear Epstein Barr 1
EBV	Vírus Epstein Barr
EDTA	Ácido tetracético etilenodiamidina
EMX1	<i>empty spiracles homeobox 1</i>
ESCs	Células-tronco embrionárias
<i>f_{cut}</i>	Fração do produto de PCR clivado
FGFb	Fator de crescimento de fibroblasto básico
<i>Fwd</i>	<i>Forward</i>
G	Guanina
<i>g</i>	Gravidade (força centrífuga)
HDR	Reparo direto homólogo
iPSCs	Células-tronco de pluripotência induzida
LB	Luria-Bertani
M	Molar
Mb	Megabase
MEFs	Fibroblastos embrionários de camundongo
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar

n	Nickase
ng	Nanograma
NHEJ	Junção de terminações não homologas
nM	Nanomolar
<i>NSD1</i>	<i>Nuclear receptor-binding SET domain-containing 1</i>
NTC	<i>No template control</i>
oRG	Células tipo glia radial
PAM	Motivo adjacente protoespaçador- <i>protospacer adjacente motif</i>
pb	Pares de bases
<i>Rev</i>	<i>Reverse</i>
rpm	Rotações por minuto
S	SURVEYOR
SFB	Soro fetal bovino
sgRNAs	Pequenos RNAs guia
SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
ssODNs	Oligonucleotídeos de DNA fita-simples
T	Timina
TAE	Tris-acetato-EDTA
TALENs	Nucleases efectoras tipo-ativador de transcrição- <i>transcription activator-like effector nuclease</i>
TBE	Tris-borato-EDTA
U	Unidade
ZFNs	Nucleases dedo de zinco- <i>zinc finger nucleases</i>

Lista de Símbolos I

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
β	<i>Beta</i>

I.1. Introdução

O córtex cerebral é o centro de integração e execução do sistema nervoso central dos mamíferos, constituindo mais de 75% do cérebro humano (Mountcastle, 1998). O córtex cerebral contém 2 classes principais de neurônios: aproximadamente 80% são neurônios excitatórios, neurônios glutamatérgicos de projeção gerados por células progenitoras e células-tronco corticais, enquanto 20% são interneurônios GABAérgicos que são gerados fora e migram para o córtex durante o desenvolvimento (Wonders & Anderson 2006). Os neurônios glutamatérgicos de projeção compõem 6 camadas do córtex adulto e são gerados em uma ordem temporal específica, com os neurônios da camada inferior produzidos primeiro e os da camada superior depois (Mountcastle, 1998). Em camundongos este processo ocorre em aproximadamente 6 dias e em humanos a neurogênese cortical demora mais de 70 dias (Shi et al., 2012). Uma vez gerados, os neurônios corticais de projeção formam microcircuitos entre as camadas corticais (Douglas & Martin 2004).

As células da zona ventricular neuroepitelial constituem a principal população de células progenitoras e células-tronco primárias do córtex cerebral, no entanto, recentemente, outras 2 populações de células progenitoras neuronais foram identificadas em camundongos e humanos: célula progenitora basal e células tipo glia radial (oRG). O número aumentado de células oRG parecem ter importante contribuição no tamanho do córtex humano, assim como, na diversificação dos tipos de neurônios nas camadas superiores (Wang et al., 2011).

Apesar do aumento do volume do cérebro estar relacionado ao aumento das funções cognitivas dos animais durante a evolução, as alterações patológicas do tamanho do cérebro, como a macrocefalia em humanos muitas vezes é acompanhada de redução da função cognitiva (Nguyen & Thomson 2015).

A macrocefalia é definida como um aumento da circunferência frontal-occipital de acordo com a idade (Gooskens et al. 1988; Nguyen & Thomson 2015). É um sintoma comum de diversas condições, como hidrocefalias congênitas, síndrome do X frágil, síndrome de Sotos, síndrome de Wiedemann,

síndrome de Alexander, doença de Tay Sachs, osteopetrose, talassemia, e outras (Nguyen & Thomson 2015; Williams et al., 2008). A macrocefalia acompanhada de um alargamento do volume cerebral (megalencefalia) é um dos sintomas de muitas síndromes de etiologia genética associada a um retardo mental grave, como autismo (Hardan et al., 2001), síndrome do X frágil (Crawford et al., 2001) e síndrome de Sotos.

A síndrome de Sotos (OMIM * 117550) foi descrita pela primeira vez em 1964 por Sotos *et al.* (Sotos et al., 1964). É uma disordem neurológica, considerada autossômica dominante, caracterizada por crescimento do crânio excessivo do estágio pré-natal até a infância, anormalidades faciais com características acromegálicas, idade óssea avançada, dificuldade de aprendizagem, retardo mental, e ocasionalmente anormalidade cerebral, convulsões e outras características. A principal causa desta síndrome tem sido identificada como uma haploinsuficiência do gene *NSD1* (*Nuclear receptor-binding SET domain-containing 1*), na região 5q35, devido a mutações intragênicas de *NSD1*, deleção parcial de *NSD1* ou microdeleções e translocações cromossômicas (Kurotaki et al., 2002).

Já foram identificadas 117 diferentes mutações em *NSD1*, incluindo deleções de 1-10 pb, inserções de 1-17 pb, mutações *nonsense*, mutações *frameshift* e mutações *missense*. Dentre estas, pode-se citar a mutação *frameshift* (modifica o quadro de leitura dos códons) 6450-1insC, com a inserção de uma citosina no exon 22 e a mutação *missense* (codifica um aminoácido diferente) 6014G->A, com a substituição de uma guanina por adenina no exon 20, que ocasiona na codificação de uma glutamina no lugar da arginina na proteína (R2005Q) (Tatton-Brown et al., 2005).

A proteína *NSD1* (2686 aminoácidos) contém múltiplos domínios funcionais, incluindo PHD, envolvido na regulação da cromatina; PWWP, seu papel ainda não está bem estabelecido, mas está provavelmente envolvido em interações proteína-proteína (Baujat & Cormier-Daire 2007); SET, que confere atividade histona metil-transferase, ativando positiva e negativamente a transcrição gênica, dependendo do contexto do promotor do gene alvo (Wagner & Carpenter 2012); e dois distintos domínios de interação com receptor de hormônio nuclear, chamado NID^{-L} E NID^{+L}, permite a proteína *NSD1* interagir com o domínio de ligação de receptores de hormônios

nucleares e assim atuar como co-repressor e co-ativador nuclear (Baujat & Cormier-Daire 2007; Kurotaki et al. 2002).

Defeito no gene *NSD1* além de estar envolvido na patogênese de doenças como a Síndrome de Sotos, também está associado aos cânceres de próstata, pulmão e mama, leucemia mielóide aguda e anemia refratária (Rayasam et al. 2003; Wagner & Carpenter 2012).

No contexto da síndrome de Sotos, a haploinsuficiência de *NSD1* induz um super crescimento devido à atividade co-repressora de genes que promovem o crescimento (Kurotaki et al., 2002).

Apesar das diferenças entre células humanas e células animais, os animais, em especial os camundongos, servem como excelentes modelos para investigar o desenvolvimento neural.

O gene ortólogo de *NSD1* em camundongos (*Nsd1*) é altamente conservado com 83% de homologia em nível de aminoácidos. Foi desenvolvido um modelo de camundongos da síndrome de Sotos, *Df(13)Ms2Dja^{+/-}*, que carrega uma deleção de 1,5 Mb no cromossomo 13 equivalente a região do cromossomo humano 5q35.2-q35.5, com 36 genes conservados entre camundongos e humanos. No entanto, os animais são viáveis, férteis e indistinguíveis dos animais normais em termos de morfologia facial, crânio e apresentam crescimento pós-natal reduzido, não recapitulando o fenótipo macrocefálico observado em pacientes portadores da síndrome de Sotos (Migdalska et al., 2012). Este modelo sugere que os genes *Nsd1* e *NSD1* exercem funções diferentes na regulação do crescimento de camundongos e humanos.

Diante dessas diferenças fenotípicas entre diferentes espécies, há uma crescente busca por modelos de doenças humanas *in vitro*, que não podem ser estudadas em modelos animais (*in vivo*).

As células-tronco embrionárias (ESCs), isoladas da massa interna do blastocisto são capazes de diferenciar em células de origem dos três folhetos embrionários, sendo consideradas pluripotentes. Sua descoberta gerou enorme expectativa para seu uso terapêutico, no entanto, sua capacidade de formar teratomas e envolvimento em questões éticas, políticas e religiosas, decorrente do envolvimento do embrião, tem limitado sua utilização (Mountford, 2008). Mas o desenvolvimento das células-tronco de pluripotência induzida (iPSCs)

pode ser uma forma de contornar as limitações éticas relacionados às ESCs. Através da reprogramação de células somáticas, por transferência nuclear de alguns fatores de transcrição (*OCT4*; *SOX2*; *MYC* ou *NANOG*, *KLF4* e *LIN28*), é possível reverter e alcançar o estado de pluripotência das ESCs (Takahashi & Yamanaka, 2006). Além disso, as iPSCs são células paciente-específicas fornecendo um modelo inigualável para se estudar patogênese de doenças em diferentes *backgrounds* genéticos, assim como no desenvolvimento e teste de novas drogas (Bellin et al., 2012; Robinton & Daley, 2012).

Atualmente, inúmeros métodos estão disponíveis para gerar iPSCs humanas. Os fatores de reprogramação podem ser introduzidos nas células somáticas por métodos integrativos, que geram iPSCs com transgenes inseridos randomicamente em seu genoma e métodos não integrativos, que geram iPSCs sem transgenes integrados permanente. Os métodos integrativos podem ser (i) viral, que usam vetores retrovirais (pMXs, pLib ou pMSCV), lentivírus (derivados de HIV) e (ii) não viral, que usam transposons (piggyBac). Os métodos não integrativos podem ser (i) viral, que usam adenovírus e vírus Sendai e (ii) não viral, que usam vetores episomais, mRNAs, micro-RNA e pequenas moléculas (por exemplo, ácido valpróico) (Bellin et al., 2012; Robinton & Daley, 2012).

Yu *et al.* descreveram vetores episomais baseados em oriP/antígeno nuclear Epstein Barr 1 (EBNA) que através de uma única transfecção são capazes de reprogramar fibroblastos em iPSCs. Estes plasmídeos não necessitam do empacotamento viral e podem ser removidos das células por cultivo em ausência de seleção por drogas (Yu et al., 2009).

O uso de iPSCs é atraente, principalmente, para modelagem de doenças em tecidos que são particularmente inacessíveis para estudo, como, por exemplo, coração e cérebro. Inúmeros protocolos têm descrito a diferenciação de neurônios, hepatócitos e cardiomiócitos *in vitro* (Cheung et al., 2012; Shi et al., 2012). Dessa forma, a diferenciação de iPSCs paciente-específica tem sido utilizado recentemente para modelagem da patogênese de diversas doenças neurológicas, como a doença de Parkinson (Devine et al., 2011), distonia familiar (Lee et al., 2009), Alzheimer (Yagi et al., 2011), síndrome do X frágil (Urbach et al., 2010), entre outras. Além disso, há enormes avanços para criar modelos da rede neural *ex vivo*. Shi *et al.* desenvolveram um robusto processo

mimetizando o desenvolvimento cortical humano a partir de hESCs, viabilizando a modelagem de doenças neurológicas (Shi et al., 2012).

Além da reprogramação de células somáticas, o advento de novas tecnológicas de edição de genoma baseadas em nucleases dedo de zinco (ZFNs-*zinc finger nucleases*), nucleases efetoras tipo-ativador de transcrição (TALENs-*transcription activator-like effector nucleases*) e nucleases Cas associadas a repetições palindrômicas pequenas, regularmente inter-espaçadas, agrupadas (CRISPR-*clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats*), permitem que mutações específicas sejam introduzidas em células humanas permitindo a modelagem de doenças genéticas assim como, pode ser utilizada para corrigir mutações específicas em linhagens celulares.

As tecnologias de ZFNs e TALENs promovem quebras na dupla fita (DSB-*double stranded breaks*) de DNA em *locus* específico através de ligação de domínios catalíticos da endonuclease modulada por proteínas ligantes. Diferentemente, a Cas-CRISPR é uma nuclease guiada por pequenos RNAs (sgRNAs), que pareiam com o DNA alvo e promovem a DSB (Wood et al., 2011).

A Cas-CRISPR é um sistema imune adaptativo de micróbios que usa nucleases guiadas por RNA para clivar elementos genéticos estranhos. A nuclease Cas9, do sistema CRISPR tipo II derivada de *Streptococcus pyogenes* guiada por sgRNAs tem como alvo o DNA que precede o motivo adjacente protoespaçador (PAM-*protospacer adjacent motif*) 5'-NGG, promovendo DSB aproximadamente 3 pares de bases (pb) *upstream* a região PAM (Ran et al., 2013; Sternberg et al., 2014).

Após a DSB, o DNA pode sofrer reparo por duas vias, reparo direto homólogo (HDR) de alta fidelidade e ocorre na presença de um molde de reparo (oligonucleotídeos de DNA fita-simples - ssODNs) ou junção de terminações não-homóloga (NHEJ) suscetível a erros e ocorre na ausência de molde de reparo. Ambas as vias de reparo podem ser utilizadas na edição de genoma com um objetivo específico. A NHEJ pode ser utilizada para promover *knockout* de genes e a HDR é efetiva para promover pequenas edições do genoma, como inserção de um nucleotídeo (Ran et al., 2013).

A utilização da nuclease Cas9 em células humanas geram um número significativo de mutações *off-target* (Fu et al., 2013). Dessa forma, a substituição do aspartato por uma alanina (D10A) no domínio RuvC I da Cas9 converte essa nuclease em uma *nickase* (n) (Cong et al., 2013). A Cas9n com um par de sgRNAs *offset* opostos no sítio alvo, favorece o sistema de reparo via HDR e minimiza mutações *off-target* por cada sgRNA-Cas9n, permitindo uma edição do genoma precisa.

I.2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estabelecer modelos da síndrome de Sotos *in vitro* através da reprogramação e edição do genoma de células somáticas.

2.2. Objetivos específicos

- Estabelecer linhagens de iPSCs a partir de linfócitos B-EBV obtidos de pacientes com síndrome de Sotos e pacientes normais.
- Estabelecer mutação relacionada a síndrome de Sotos em células humanas através da tecnologia de edição de genoma Cas9n-CRISPR.

I.3. Material e Métodos

3.1. Meios de cultura celular

3.1.1. Meio de cultura para linfócitos B-EBV

O meio de cultura para linfócitos B-EBV consistiu de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (SFB) não inativado (Hyclone).

3.1.2. Meio de cultura para iPSCs modificado

O meio de cultura para iPSCs modificado para linfócitos B consistiu de DMEM/F12 Glutamax (Gibco), suplementado com 20% *knockout serum replacement* (Invitrogen), 1x aminoácidos não-essenciais (Gibco), 20 ng/mL de fator de crescimento de fibroblasto básico (FGFb) (PeproTech), 0,001% de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich), 0,001% de gelatina (Milipore), 5% de meio hibridoma livre de proteína (Gibco), 0,5 mM de butirato de sódio (Sigma-Aldrich) e 1 μ L de RepSox (Sigma-Aldrich).

3.1.3. Meio de cultura para iPSCs

O meio de cultura para iPSCs consistiu de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) *knockout* (Gibco) suplementado com 2 mM de L-glutamina (Invitrogen), 20% *knockout serum replacement* (Invitrogen), 1x aminoácidos não-essenciais (Gibco), 8 ng/mL de FGFb (PeproTech) e 0,001% de β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

3.1.4. Meio de cultura basal

O meio de cultura basal consistiu de DMEM Glutamax (Gibco) suplementado com SFB inativado (Hyclone), 1% PenStrep (Gibco) e 0,001% β -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich).

3.1.5. Meio condicionado por fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) – placa de MEFs

MEFs inativados previamente com mitomicina C (1 mg/mL) e mantidos em nitrogênio líquido foram rapidamente descongelados em banho a 37°C, ressuspensos em 10 mL de meio de cultura basal e centrifugados a 200 g por 6 minutos. Os MEFs foram ressuspensos em meio de cultura basal, semeados em placas de 6 poços (previamente tratadas com solução de gelatina 0,01%, por 5 minutos), na densidade de 5×10^4 células/cm², e cultivados em meio de cultura basal até a adesão dos MEFs. Em seguida, o meio de cultura basal foi substituído por meio de cultura para iPSCs para produção do meio condicionado por MEFs.

3.2. Linhagens celulares

A linhagem de linfócitos B-EBV GM19974, normais, foram obtidas de pacientes clinicamente saudáveis (linfócitos *wild type*). A linhagem de linfócitos B-EBV GM19977, com mutação 6450-1insC, no exon 22 do gene *NSD1*, foram obtidas de pacientes clinicamente afetados pela síndrome de Sotos (linfócitos mutados). A linhagem de fibroblastos humano GM00500, normais, foram obtidos de tecido saudável de adulto. Todas as linhagens foram adquiridas no Coriell Cell Repositories, Coriell Institute for Medical Research, USA. As linhagens foram expandidas e estocadas em nitrogênio líquido de acordo com os protocolos recomendados pelo Coriell Institute.

3.3. Cultivo dos linfócitos B-EBV

Os linfócitos B-EBV foram descongelados por incubação rápida em banho à 37°C, ressuspensos em meio de cultura para linfócitos B-EBV e cultivados na densidade mínima de 2×10^5 células/mL, em garrafas T25 (10-20 mL de meio/garrafa) mantidas na posição vertical a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. A cada 3 dias de cultivo, o meio de cultura foi trocado. Ao atingir o platô de crescimento, de aproximadamente 1×10^6 células/mL, as células foram subcultivadas. Para o subcultivo, as células eram recolhidas em um tubo 15 mL e centrifugadas a 200 g, por 5 minutos. Em seguida as células eram

resuspendidas em meio de cultura para linfócitos B-EBV, divididas em novas garrafas T25 na densidade mínima de cultura e cultivados a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Posteriormente, os linfócitos B-EBV foram utilizados para produção das iPSCs-paciente específica.

3.4. Cultivo dos fibroblastos humanos

Os fibroblastos humanos foram descongelados por incubação rápida em banho a 37°C, ressuspensos em 10 mL de meio de cultura basal e cultivados em garrafas T25 (previamente tratadas com solução de gelatina 0,01% por 5 minutos), a 37°C atmosfera úmida e 5% CO₂. A cada 3 dias de cultivo, o meio de cultura foi trocado. Ao atingir a confluência de 80% as células foram subcultivadas. Para o subcultivo, as células eram lavadas com PBS 0,15 M pH 7,4 (2 vezes), tratadas com tripsina 0,05% ácido tetracético etilenodiamidina (EDTA), por 3 minutos. Em seguida, as células eram ressuspensas em meio de cultura basal, divididas em novas garrafas T25 e incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Posteriormente, os fibroblastos foram utilizados para produção das iPSCs como controle experimental.

3.5. Vetores episomais

Para reprogramar os linfócitos B-EBV em iPSCs foram utilizados os seguintes vetores episomais baseados em EBNA-1/OriP, descritos por Yu *et al.* (Yu *et al.*, 2009): pEP4 E02S EN2K (Addgene), que expressa *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *KLF4*; pCEP4-M2L (Addgene), que expressa *MYC* e *LIN28*; e pEP4 E02S ET2K (Addgene), que expressa *OCT4*, *SOX2*, *SV40LT* e *KLF4* (**Figura 1**). Como controle experimental foi utilizado o vetor de expressão pCAG-GFP (Addgene) para expressão de *GFP*.

Os plasmídeos foram expressos em *Escherichia coli*. Para isso, 1 µL de plasmídeo foi misturado e incubado com 40 µL da bactéria *E. coli*, em gelo por 30 minutos. Em seguida, sofreram choque térmico a 42°C, por 45 segundos em thermomixer (Eppendorf) e imediatamente após isso foram incubados em gelo. Após o choque térmico adicionou-se 500 µL de meio Luria-Bertani (LB) ao tubo contendo as bactérias e plasmídeos. Os tubos foram incubados, em agitação a 37°C por 1 hora. Após a incubação, um volume de 250 µL da suspensão de

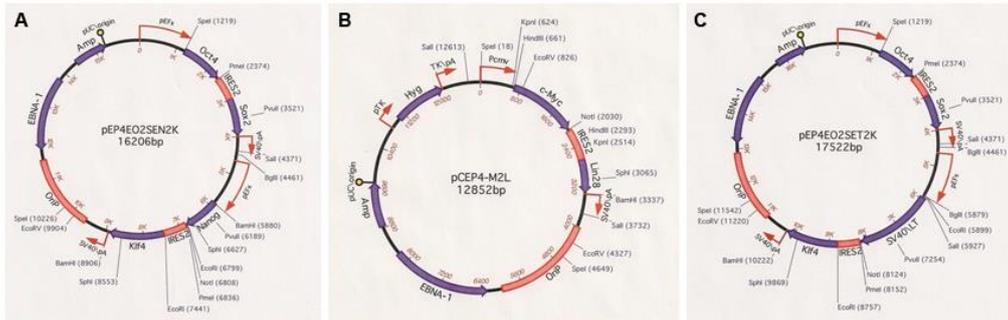


Figura I. 1. Vetores episomais utilizados para reprogramar os linfócitos B-EBV (Yu et al., 2009). (A) pEP4 E02S EN2K (*OCT4*, *SOX2*, *NANOG* e *KLF4*); (B) pCEP4-M2L (*MYC* e *LIN28*); (C) pEP4 E02S ET2K (*OCT4*, *SOX2*, *SV40LT* e *KLF4*).

bactérias e plasmídeos foram plaqueados em LB/ágar (contendo carbenicilina a 100 µg/mL) e incubadas overnight a 37°C. Em seguida, selecionou-se 1 colônia e esta foi expandida para a amplificação em pequena escala dos clones contendo os plasmídeos recombinantes em 3 mL de meio LB (contendo carbenicilina 100 µg/mL) em tubos de 10 mL, por incubação a 37°C e agitação a 250 rpm por 8 horas. Após incubação, a cultura foi diluída 1:30 em volume de 50 mL de meio LB (contendo carbenicilina a 100 µg/mL) e incubados overnight a 37°C sob agitação a 250 rpm.

Em seguida, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 5000 g e o DNA plasmidial foi purificado utilizando Gene Jet Plasmid Midi-prep Kit (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

Os plasmídeos obtidos foram esterilizados por precipitação em etanol para posteriormente serem utilizados na reprogramação dos linfócitos B-EBV.

Uma alíquota de cada plasmídeo (20-40 µg) foi adicionada em um tubo de 1,5 mL. Acrescentou-se um volume de água DNase free, quantidade suficiente para 100 µL, 10 µL de acetato de sódio 3 M e 100 µL de 2-propanol. Os tubos foram agitados vigorosamente e em seguida centrifugados a 11000 g, por 10 minutos. Cuidadosamente o sobrenadante foi removido e adicionado 1 mL de etanol 70%, os tubos foram invertidos inúmeras vezes e centrifugados a 11000 g, por 10 minutos. Os tubos foram abertos somente em cabine de segurança, o etanol foi removido cuidadosamente e, esta etapa foi repetida mais uma vez. Em seguida, os tubos foram mantidos abertos, para evaporação total do etanol e em seguida o DNA plasmidial foi ressuspensionado em 20 µL de água DNase free. A concentração e pureza (A260:280 razão >1,8) dos

plasmídeos foi determinada em Nano Vue (GE Health care life sciences). E os plasmídeos foram armazenados a -20°C.

3.6. Reprogramação dos fibroblastos humanos

Os fibroblastos humanos foram reprogramados em iPSCs usando o kit Amaxa Human Dermal Fibroblast-Adult NHDF (Lonza) como controle dos vetores episomais. Para a nucleofecção, 4×10^5 fibroblastos humanos foram ressuspensos em meio DMEM Glutamax (Gibco), sem os demais suplementos utilizados em cultura e centrifugados a 200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de nucleofecção NHDF com a combinação de vetores episomais (**Tabela I. 1**). A suspensão de células foi transferida para cubetas apropriadas, dispostas no Nucleofector device (Lonza) e submetidas ao programa P-022. Imediatamente após a nucleofecção, as células foram cuidadosamente transferidas para placa de cultura de 6 poços, na densidade de 5×10^5 células/poço e cultivadas com 2 mL de meio de cultura para iPSCs, a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Tabela I. 1. Solução de nucleofecção de fibroblastos humanos

Solução		Quantidade (1 reação)
Solução de nucleofecção NHDF		82 µL
Suplemento		18 µL
Plasmídeos 2 µg	pEP4 E02S EN2K	0,7 µg
	pCEP4-M2L	0,8 µg
	pEP4 E02S ET2K	0,5 µg
*controle (opcional)	pCAG-GFP	2 µg

Após 24 horas, a expressão de GFP pelos fibroblastos do grupo controle foi determinada por visualização em microscópio de fluorescência (Nikon) e a eficiência de nucleofecção calculada. Para o cálculo da eficiência de nucleofecção, imagens de diferentes campos (5 campos) foram capturadas e a porcentagem de células GFP-positivas em relação ao número total de células foi determinada, utilizando a ferramenta Cell counter do software Image J (National Institutes of Health).

O meio de cultura foi trocado no 2º dia pós-nucleofecção por meio de cultura para iPSCs condicionado por MEFs. O meio de cultura foi trocado diariamente e as culturas monitoradas em microscópio óptico para detecção de possíveis colônias de iPSCs. Durante os primeiros 18 dias de cultivo foi adicionado 0,5 mM de butirato de sódio (Sigma-Aldrich) ao meio de cultura.

3.7. Reprogramação dos linfócitos B-EBV

Os linfócitos B-EBV foram reprogramados em iPSCs usando o Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V (Lonza) conforme descrito por Choi *et al.* (Choi *et al.*, 2011). Para a nucleofecção, 1×10^6 linfócitos B – EBV (*wild type* e mutados) foram ressuspensos em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich), sem os demais suplementos utilizados em cultura e centrifugados a 200 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de solução de nucleofecção V com a combinação de vetores episomais (**Tabela I. 2**). A suspensão de células foi transferida para cubetas apropriadas, dispostas no Nucleofector device (Lonza) e submetidas ao programa X-005. Imediatamente após a nucleofecção, as células foram cuidadosamente transferidas para placa de cultura de 6 poços, na densidade de 5×10^5 células/poço e cultivadas com 3 mL de meio de cultura para iPSCs modificado, a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

Tabela I. 2. Solução de nucleofecção para linfócitos B-EBV

Solução		Quantidade (1 reação)
Solução de nucleofecção V		82 µL
Suplemento		18 µL
Plasmídeos 10 µg	pEP4 E02S EN2K	3,5 µg
	pCEP4-M2L	4,0 µg
	pEP4 E02S ET2K	2,5 µg
*controle (opcional)	pCAG-GFP	10 µg

Após 24 horas, a expressão de GFP pelos linfócitos B-EBV do grupo controle foi determinada por visualização em microscópio de fluorescência (Nikon) e a eficiência de nucleofecção calculada conforme descrito no *item 3.6*. A viabilidade dos linfócitos B-EBV 24 horas pós-nucleofecção foi avaliada por contagem das células com corante Trypan blue (Lonza). Os linfócitos foram

diluídos em solução 0,4% Trypan blue (proporção 1:1). E dessa forma, as células não viáveis, coradas em azul e as células viáveis, não coradas foram contadas em hemocítômetro (HGB) e a porcentagem de células viáveis determinada.

O meio de cultura para iPSCs modificado foi trocado diariamente, sendo cuidadosamente removido 50% do meio velho e adicionado 50% de meio novo, até o dia 9º dia pós-nucleofecção. A partir deste dia, as células foram coletadas e transferidas para placas de cultura de 6 poços com MEFs (previamente preparada) e cultivadas com meio de cultura para iPSCs (2 mL/poço). O meio de cultura para iPSCs foi renovado diariamente e as culturas monitoradas em microscópio óptico para detecção de possíveis colônias de iPSCs.

3.8. Imunofluorescência TRA-1-60

Após a visualização de possíveis colônias, as culturas provenientes de fibroblastos e linfócitos B-EBV foram analisadas em relação à expressão de TRA-1-60 para confirmação da reprogramação em iPSCs. Foi utilizado TRA-1-60 *mouse anti-human* mAb Alexa Fluor 488 *Conjugate Kit for Live Cell Imaging* (Molecular Probes), de acordo com as instruções do fabricante. O anticorpo foi centrifugado a 10000 g por 2 minutos e somente o sobrenadante utilizado. As células em cultura foram incubadas com o anticorpo, adicionado diretamente no meio de cultura na diluição de 1:50, por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas gentilmente com FluoroBrite™ DMEM (2 vezes por 2 minutos). Em seguida, as células em meio FluoroBrite™ DMEM foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Nikon) e a presença de colônias de iPSCs foi detectada por fluorescência verde. Em seguida, o meio foi substituído por meio de cultura para iPSCs e as células incubadas novamente a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂.

3.9. Edição do genoma das células HEK 293 FT

O estabelecimento da tecnologia de edição de genoma baseada no sistema sgRNAs-Cas9n-CRISPR para introdução de mutações por inserção ou

deleção (indel) no gene *NSD1*, específico da mutação 6014G→A da Síndrome de Sotos foi realizada em células HEK 293 FT.

3.9.1. Customização dos sgRNAs

Os sgRNAs específicos para introduzir mutação indel no *locus* *NSD1_6014* (**Tabela I. 3**) foram elaborados através da ferramenta *online* CRISPR Design Tool (<http://crispr.mit.edu/>). Esta ferramenta utiliza uma sequência de entrada, que consiste no fragmento de DNA genômico da região de interesse, identifica e classifica os potenciais sítios alvo, gerando as sequências de sgRNAs *top* e *bottom* de 20 pb *upstream* a 5'-NGG. Computacionalmente prediz os sítios *off-target* para cada sítio de interesse. Para padronização do sistema de edição de genoma, foi reproduzido em paralelo o sistema utilizado para introdução de mutações indel no gene *EMX1* (*empty spiracles homeobox 1*) publicado recentemente (Ran et al., 2013).

Tabela I. 3. Sequência de oligonucleotídeos para clonagem de sgRNAs e validação

Oligonucleotídeos	Sequência 5'-3'
<i>NSD1_6014_sgRNA-top 1</i>	CACCgTAGGACCGAATCATTGATGC
<i>NSD1_6014_sgRNA-bottom 1</i>	AAACGCATCAATGATTCGGTCCTAc
<i>NSD1_6014_sgRNA-top 2</i>	CACCgACTTCCTGAGACCTCTGCTG
<i>NSD1_6014_sgRNA-bottom 2</i>	AAACCAGCAGAGGTCTCAGGAAGTc
<i>EMX1_sgRNA-top 1</i>	CACCgGAGTCCGAGCAGAAGAAGAA
<i>EMX1_sgRNA-bottom 1</i>	AAACTTCTTCTTCTGCTCGGACTCc
<i>EMX1_sgRNA-top 9</i>	CACCgGCCGTTTGTACTTTGTCTC
<i>EMX1_sgRNA-bottom 9</i>	AAACGAGGACAAAGTACAAACGGCc
U6-Forward (Fwd)	GAGGGCCTATTTCCCATGATTCC

3.9.2. Preparação das construções de expressão sgRNAs

Para gerar as construções de expressão de sgRNAs usamos a clonagem dos sgRNAs em vetor px330-U6-Chimeric_BB_CBh-hSpCas9n (Addgene) para co-expressão com Cas9n.

Os oligonucleotídeos para cada sgRNA foram ressuspendidos em água ultra pura para uma concentração final de 100 µM. Para a fosforilação e anelamento dos oligonucleotídeos de sgRNAs *top* e *bottom*, foi preparada uma mistura com 1 µL de cada sgRNA *top* e *bottom* (100 µM), 1 µL de tampão de ligação T4 10x (Biolabs), 1 µL de T4 PNK (Biolabs) e 6 µL de água ultra pura. Em seguida, os oligonucleotídeos foram fosforilados e anelados em

termociclador (Eppendorf) usando os seguintes parâmetros: 37°C por 30 minutos, 95°C por 5 minutos e resfriamento para 25°C a 5°C por minuto. Os oligonucleotídeos anelados e fosforilados foram diluídos em água ultra pura a temperatura ambiente (1:200).

Em seguida cada sgRNA foi clonado em px330-U6-Chimeric_BB_CBh-hSpCas9n. A reação de ligação de cada sgRNA foi delineada da seguinte forma: 100 ng de px330-U6-Chimeric_BB_CBh-hSpCas9n, 2 µL dos oligonucleotídeos de sgRNAs anelados e fosforilados, 2 µL de tampão Fast Digest 1x (Thermo Scientific), 1 µL de DTT 10 mM (Promega), 1 µL de ATP 10 mM (Promega), 1 µL de Fast Digest BsbI (ThermoScientific), 0,5 µL de T7 ligase (Enzomatics) e água ultra pura em quantidade suficiente para 20 µL de reação total foram misturados e incubados por 1 hora em termociclador (Eppendorf) usando os seguintes parâmetros, ciclos de 1-6 a 37°C por 5 minutos e 21°C por 5 minutos. Um controle negativo, foi realizado sem a ligação dos oligonucleotídeos de sgRNA.

Os plasmídeos foram transformados em bactérias *E. coli* competente (Stbl3). Um volume de 10 µL do produto de ligação de cada sgRNA foi adicionado em 500 µL de *E. coli*, em gelo. Essa mistura foi incubada em gelo por 10 minutos e, em seguida, submetidas a um choque térmico a 42°C por 30 segundos e imediatamente retornadas ao gelo e mantidas por 2 minutos. Foi adicionado 1,5 mL de meio *Super Optimal Broth* (SOB) (contendo carbenicilina a 100 µg/mL) as bactérias e, estas foram incubadas a 37°C por 30 minutos sob agitação. Em seguida, 700 µL de bactérias foram plaqueadas em meio LB/ágar (contendo carbenicilina a 100 µg/mL) e a placa incubada a 37°C *overnight*. No dia seguinte, as placas foram inspecionadas em relação ao crescimento de colônias nas placas com px335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n, com insertos de sgRNAs. Colônias não eram esperadas nas placas com o controle negativo (px335-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9n, sem o inserto de sgRNA). Uma colônia de cada placa de sgRNA foi selecionada para conferência da inserção correta do sgRNA. A colônia selecionada foi coletada e transferida para 3 mL de meio LB (contendo 100 µg/mL de carbenicilina) e incubada a 37°C sob agitação *overnight*.

Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado utilizando o kit Gene Jet Plasmid Mini-prep (Thermo Scientific), de acordo com as instruções do

fabricante. A concentração dos plasmídeos foram medidas em Nano Vue (GE Health care life sciences). Para validação das sequências de plasmídeos de CRISPR, os plasmídeos purificados por Mini-Prep foram diluídos em água ultra-pura para um volume de 15 µL e concentração de 100 ng/µL e sequenciadas a partir do promotor U6 usando o *primer* U6-Fwd (**Tabela I. 3**) através de Smart Seq realizado pela Eurofins genomics (UK). Todas as colônias selecionadas apresentaram a correta inserção da sequência de 20 nucleotídeos (sgRNA).

Para utilização dos plasmídeos na transfecção das células HEK 293 FT, estes foram esterilizados por precipitação em etanol, descrita no *item 3.5*.

3.9.3. Cultura e transfecção das células HEK 293 FT

As células HEK 293 FT foram cultivadas em placa de 6 poços, em meio de cultura basal a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. A cada 3 dias de cultivo, o meio de cultura foi trocado. Ao atingir a confluência de 80% as células foram subcultivadas, para isso, as células eram lavadas com meio de cultura basal novo e dissociadas por pipetagem. Em seguida, as células eram divididas em novos poços, na proporção de 1:4 poços, e incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Após a expansão celular, 1x10⁵ células/poço foram semeadas em placas de 24 poços e cultivadas com 500 µL meio de cultura basal (sem PenStrep e β-mercaptoetanol) a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Após 72 horas e uma confluência de aproximadamente 70%, as células foram transfectadas com Lipofectamina 2000 (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Uma solução de 500 ng de plasmídeo foi diluído em Opti-MEM (Gibco) e uma solução de Lipofectamina 2000 2 µL/poço também foi diluída em Opti-MEM. Em seguida, a solução de plasmídeo e Lipofectamina 2000 foi misturada na proporção de 1:1 e incubada por 5 minutos a temperatura ambiente. Um volume de 100 µL da mistura de plasmídeo-Lipofectamina foi adicionada em cada poço com células HEK 293 FT. A transfecção foi realizada em triplicata de amostras. Além da transfecção com a combinação de *NSD1_6014_sgRNAs* 1 e 2 ou *EMX1_sgRNAs* 1 e 9 (padrão), foi realizado a transfecção com cada sgRNA, somente px335-U6-Chimeric-BB-CBh-hSpCas9n e com pCAG-GFP como controles experimentais. As células

foram incubadas a 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂, por 3 dias. A eficiência de transfecção foi avaliada 24 horas após a transfecção de acordo com o procedimento descrito no *item* 3.6.

3.9.4. Extração do DNA genômico

Após 3 dias de transfecção, o DNA genômico das células HEK 293 FT foi extraído. As células foram dissociadas por pipetagem, recolhidas em tubos de 1,5 mL e centrifugadas a 200 *g* por 5 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi completamente removido e descartado e para extração do DNA genômico o *pellet* de células foi incubado com 50 µL de Quick Extract solution (Epicenter) a 65°C por 15 minutos, 68°C por 15 minutos e 98°C por 15 minutos sob agitação em thermomixer (Eppendorf). A concentração do DNA genômico extraído foi quantificada em Nano Vue (GE Health care life sciences).

3.9.5. Validação da introdução de mutações indel por ensaio de nuclease SURVEYOR

Este ensaio baseia-se na ação de uma endonuclease de DNA específica para *mismatch*, esta endonuclease SURVEYOR (S) escaneia mutações e polimorfismos desconhecidos na fita dupla de DNA e cliva o DNA no lado 3' do sítio de *mismatch* em ambas as fitas, com alta especificidade nos sítios de *mismatch* por substituição de base, inserção ou deleção (Qiu et al., 2004).

3.9.5.1. Elaboração de oligonucleotídeos (*primers*) para o ensaio SURVEYOR

Os pares de *primers* específicos que flanqueia o sítio alvo de ação do CRISPR foram desenhados através do programa Primer3 versão 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os parâmetros selecionados no programa Primer3 para a elaboração dos *primers* foram: amplificar fragmentos cujo peso molecular fosse maior que 70 pb após a clivagem por nuclease S; apresentasse teor de GC entre 45-60%, não apresentasse complementaridade entre si ou mesmo estruturas secundárias estáveis e deveria estar localizado a uma distância maior que 50 pb externa a região de possível inserção da mutação. Os *primers* para detectar mutação no gene *NSD1* foram

NSD1_6014_Fwd: 5'-GAAAGTGGGACAAGCTGCTATT-3' e
NSD1_6014_Reverse (Rev): 5'-TAGCAGGGGAAGATGAAAAGAG-3',
tamanho do fragmento 677 pb. Os *primers* descritos por Ran *et al.* foram
empregados para detectar mutação no gene *EMX1*, sendo *EMX1-Fwd*: 5'-
CCATCCCCTTCTGTGAATGT-3' e *EMX1-Rev*: 5'-
GGAGATTGGAGACACGGAGA-3', tamanho do fragmento 639 pb (Ran *et al.*,
2013).

3.9.5.2. PCR de alta fidelidade

A região genômica que flanqueia o sítio alvo do CRISPR para cada gene foi amplificada por PCR de alta fidelidade.

Cada reação de amplificação continha 250 ng de DNA, 200 µM de cada um dos quatro desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs; dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 300 nM de cada *primer* (Fwd e Rev), tampão PCR de alta fidelidade 1X (Roche), 2,6 U de Expand High Fidelity enzyme mix (Roche) e água ultra pura em quantidade suficiente para um volume final de 50 µL.

Os ciclos de amplificação foram: etapa inicial de desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguido por 30 ciclos de: 94°C por 15 segundos (desnaturação), 60°C por 30 segundos (anelamento) e 72°C por 45 segundos (extensão) e uma última etapa de extensão foi realizada a 72°C por 7 minutos. Em todas as reações foi feito um controle branco de amplificação (NTC- *no template control*) para cada par de *primers*, onde água estéril foi acrescentada no lugar de DNA.

Os produtos de PCR, em paralelo com marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder; Biolabs), foram aplicados em gel de agarose 1-2% em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 1X (Invitrogen). A corrida eletroforética foi realizada a 100 volts por aproximadamente 60 minutos em TAE 1X. As bandas foram reveladas por brometo de etídeo a uma concentração final de 0,5 µg/mL em TAE 1x. Os tamanhos dos fragmentos foram visualizados sob luz ultravioleta.

Os produtos de PCR de alta fidelidade foram purificados através do Gene Jet PCR Purification kit (Thermo Scientific). A concentração do produto de PCR purificado foi quantificada em Nano Vue (GE Health care life sciences) e normalizadas para uma concentração final de 25 ng/µL utilizando água ultra pura.

3.9.5.3. Hibridização

Para hibridização, foi adicionado 1,6 µL de tampão Expand High Fidelity 10x, com MgCl₂ para cada 14,4 µL do produto de PCR (25 ng/µL). As amostras de células transfectadas com pCAG-GFP foram misturadas com amostras de células transfectadas com sgRNAs na proporção de 1:1. E um controle foi realizado utilizando somente amostra controle (pCAG-GFP). Em seguida as amostras foram hibridizadas em termociclador (Eppendorf) seguindo as condições descritas na (Tabela I. 4).

Tabela I. 4. Condições para hibridização dos produtos de PCR

Ciclo	Condição
1	95°C, 10 minutos
2	95-85°C, -2°C/segundo
3	85°C, 1 minuto
4	85-75°C, -0,3°C/segundo
5	75°C, 1 minuto
6	75-65°C, -0,3°C/segundo
7	65°C, 1 minuto
8	65-55°C, -0,3°C/segundo
9	55°C, 1 minuto
10	55-45°C, -0,3°C/segundo
11	45°C, 1 minuto
12	45-35°C, -0,3°C/segundo
13	35°C, 1 minuto
14	35-25°C, -0,3°C/segundo
15	25°C, 1 minuto
16	25-4°C, -0,3°C/segundo
17	4°C, hold

3.9.5.4. Tratamento com nuclease S

As amostras hibridizadas (360 ng) foram tratadas com 1 µL nuclease S (IDT), MgCl₂ (1/10 volume de reação) e 1 µL de *enhancer* S (IDT), gentilmente misturadas e incubadas a 42°C por 60 minutos. Após a incubação, uma solução para terminar a reação foi adicionada (1/10 volume de reação), misturadas e as reações visualizadas em gel de poliacrilamida.

3.9.5.5. Visualização e análise do resultado

Os produtos de digestão pela nuclease S foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 4-20% gradiente (BioRad) utilizando tampão Tris-borato-EDTA (TBE) 1x, pH 8,3 a 100 volts. As amostras correram em paralelo com o padrão de peso molecular (100 pb DNA Ladder, Biolabs).

Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com SYBR Gold dye (Molecular Probes) diluído em TBE 1x, pH 8,3 (1:10), por incubação por 30 minutos.

A imagem do gel foi revelada e adquirida através do sistema Odyssey Fc Imager (Licor) e filtro 600 nm.

A análise dos resultados baseia-se no aparecimento de 1 banda do tamanho esperado para o fragmento de amplificação pela PCR de alta fidelidade nas amostras controle, enquanto nas amostras transfectadas com sgRNAs hibridizadas com o controle, devem aparecer bandas adicionais. Eventualmente bandas inespecíficas podem ocorrer, sendo essencial a realização do controle para comparação.

A estimativa de mutações indel inseridas é calculada a partir da intensidade integrada de pixels das bandas reveladas, quantificada pelo programa Image J (National Institutes of Health). Para determinação da fração de produto de PCR clivado (f_{cut}) foi utilizada a seguinte fórmula: $f_{cut} = (b + c)/(a + b + c)$, na qual, a : intensidade integrada do produto de PCR não digerido, b e c : são a intensidade integrada de cada produto de clivagem. A ocorrência de mutações indel pode ser estimada pela seguinte fórmula $indel \% = 100x (1 - \sqrt{(1 - f_{cut})})$.

I.4. Resultados

4.1. Reprogramação de fibroblastos humanos em iPSCs

Após a nucleofecção, os fibroblastos humanos continuaram viáveis, aderidos à superfície plástica de cultura e com morfologia fibroblastóide. A eficiência de nucleofecção, mensurada pela expressão de GFP, 24 horas após o procedimento, foi de aproximadamente 12,71%. No 9º dia após a nucleofecção, pôde-se observar, em microscópio óptico, algumas colônias tipo iPSCs aderidas. E no 18º dia, foram observadas mais colônias tipo iPSCs, além disso, as colônias observadas haviam crescido (**Figura I. 2**).

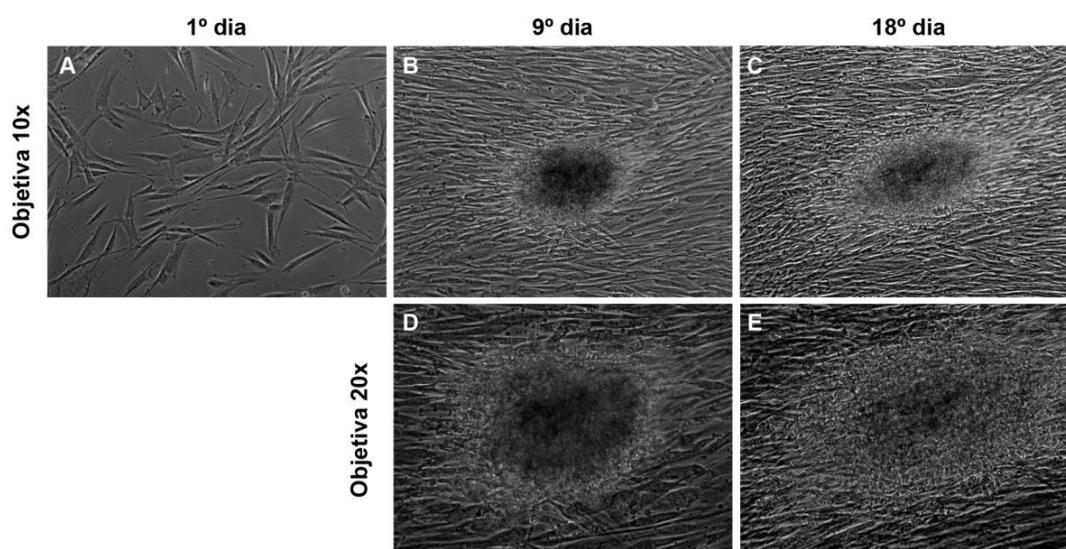


Figura I. 2. Reprogramação de fibroblastos humanos em iPSCs. (A) Fibroblastos aderidos e com morfologia fibroblastóide após 1 dia de nucleofecção. (B) Colônia tipo iPSCs observada após 9 dias de nucleofecção. (C) Crescimento da colônia no 18º dia. (D-E) Imagens em maior aumento (20X) das colônias.

A caracterização das colônias tipo iPSCs, geradas a partir de fibroblastos humanos adultos, por imunofluorescência de células vivas após 18 dias de nucleofecção revelou que estas expressavam o marcador de iPSCs TRA-1-60 (**Figura I. 3**) revelando o *status* de pluripotência adquirido pelos fibroblastos reprogramados.

4.2. Reprogramação de linfócitos B-EBV em iPSCs

Os linfócitos B-EBV apresentaram uma viabilidade celular de aproximadamente 88,88%, após a nucleofecção, com uma morfologia

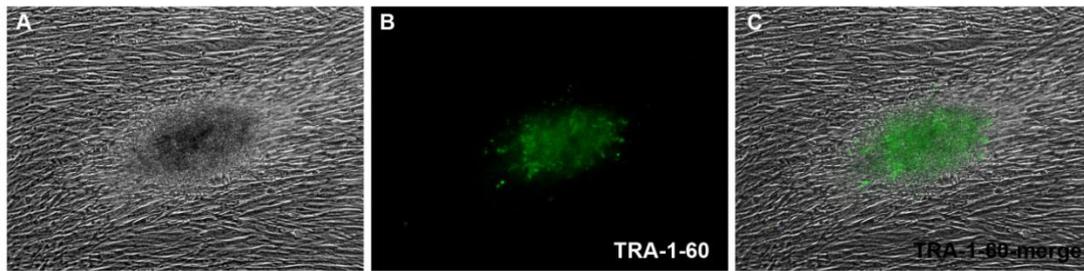
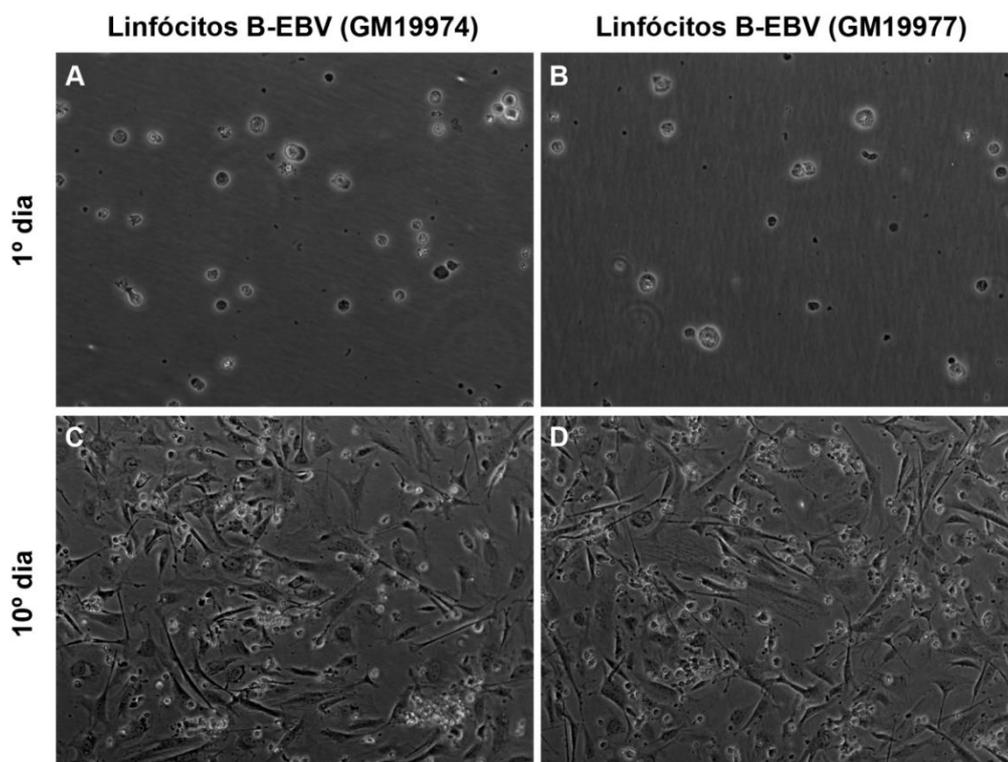


Figura I. 3. Imagem representativa de uma colônia de iPSCs derivada de fibroblastos humanos expressando TRA-1-60. (A) Imagem de luz transmitida. (B) Expressão de TRA-1-60 (fluorescência verde). (C) Imagem de sobreposição das imagens de luz transmitida e TRA-1-60.

arredondada e células em suspensão. A eficiência de nucleofecção, mensurada pela expressão de GFP, 24 horas após o procedimento, foi de aproximadamente 3,47%. Os linfócitos B-EBV (*wild type* e normais) foram transferidos para placas com MEF no 9º dia de cultivo e, após o 21º dia, inúmeras e pequenas colônias tipo iPSCs puderam ser visualizadas por microscopia óptica em ambos os tipos de linfócitos B-EBV reprogramados. Essas colônias eram arredondadas e aderidas à superfície plástica de cultura (**Figura I. 4**). Muitos linfócitos B-EBV ainda foram observados em suspensão nessas culturas.



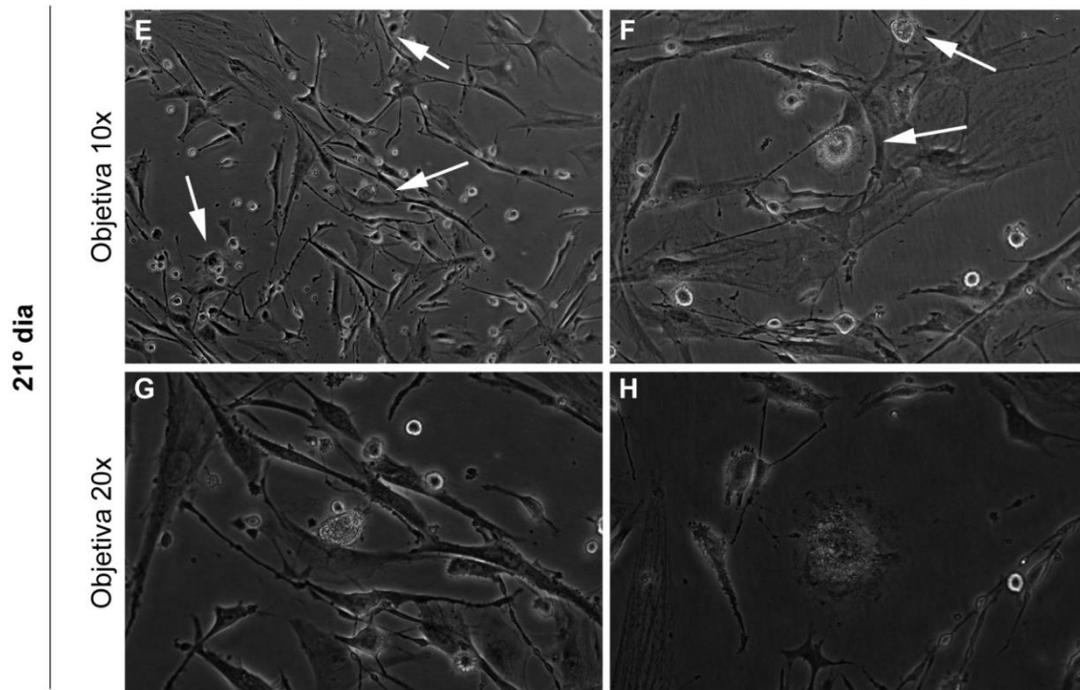


Figura I. 4. Reprogramação dos linfócitos B-EBV em iPSCs. (A-B) Linfócitos B-EBV (*wild type* – GM19974 e mutados – GM19977) em suspensão no meio de cultura após 1 dia de nucleofecção (Aumento 20x). (C-D) Linfócitos B-EBV cultivados em placas com MEFs, 10 dias após a nucleofecção (Aumento 10x). (E-F) Colônias tipo iPSCs crescendo em ambos os tipos de culturas reprogramadas, tanto linfócitos GM19974 quanto GM19977 (Objetiva 10x). (G-H) Imagens em maior aumento das colônias (Objetiva 20x).

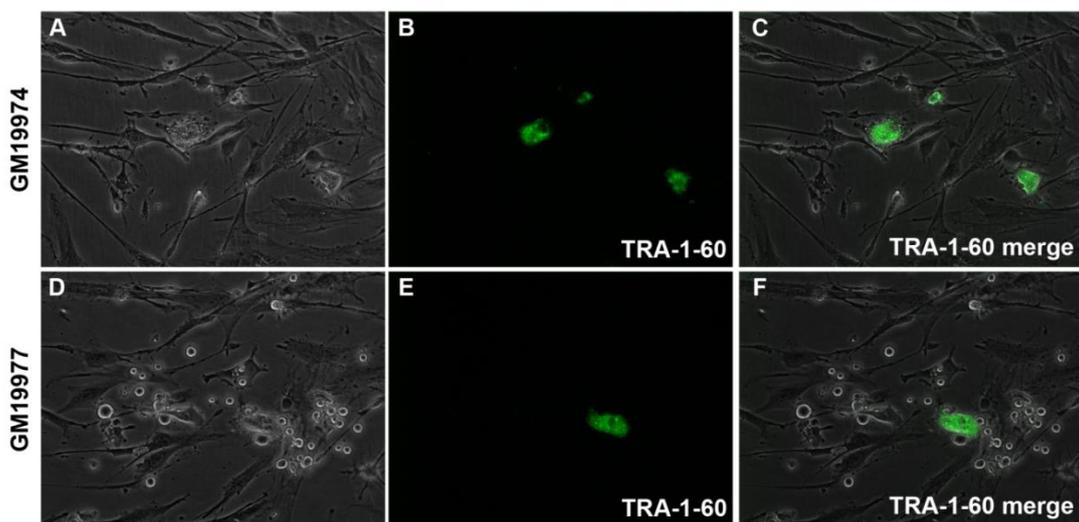


Figura I. 5. Imagem representativa de colônias de iPSCs derivadas de linfócitos B-EBV expressando TRA-1-60. (A) Imagem de luz transmitida de colônias de iPSCs derivada de linfócitos B-EBV *wild type* (GM19974). (B-E) Expressão de TRA-1-60 (fluorescência verde). (D) Imagem de luz transmitida de uma colônia de iPSCs derivada de linfócitos B-EBV mutados (GM19977). (C-F) Imagem de sobreposição das imagens de luz transmitida e TRA-1-60.

A caracterização das colônias tipo iPSCs, geradas a partir de linfócitos B-EBV *wild type* e mutados, por imunofluorescência de células vivas após 21

dias de nucleofecção revelou que elas expressavam o marcador de iPSCs TRA-1-60 (**Figura I. 5**) revelando o *status* de pluripotência adquirido pelos linfócitos B-EBV .

4.3. Introdução de mutações indel

As células HEK 293 FT apresentaram uma eficiência de transfecção maior que 90%, detectada pela expressão de GFP após 24 horas de transfecção.

A utilização da Cas9n juntamente com *EMX1_sgRNA1* e *EMX1_sgRNA9* introduziu mutações indel no *locus* do gene humano *EMX1* detectada em gel de poliacrilamida após tratamento com nuclease S (**Figura I. 6**). A nuclease S detectou a mutação introduzida, clivando o segmento de DNA neste ponto, o que resultou em bandas adicionais (duas entre 200-300 pb e a outra de aproximadamente 400 pb). A ocorrência de mutações indel foi de 20,7% ± 3,4%.

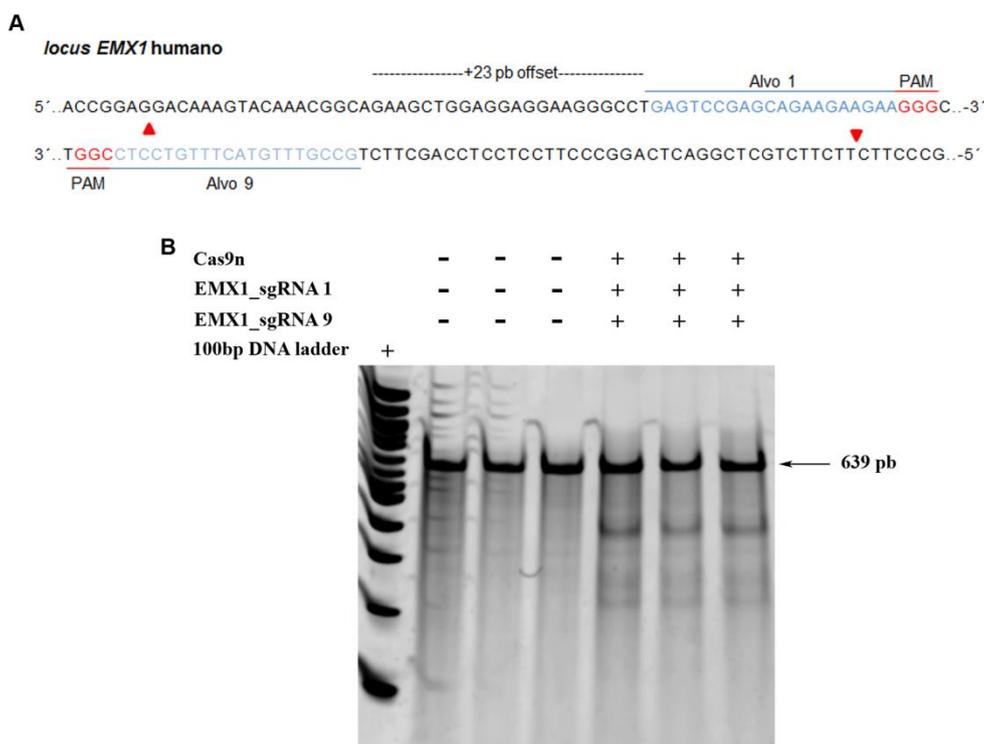


Figura I. 6. Edição do genoma de células humanas HEK 293 FT - gene *EMX1* alvo, como controle do sistema Cas9n-CRISPR. (A) Representação esquemática da dupla clivagem (setas vermelhas) do *locus* do gene *EMX1* pela Cas9n. (B) Gel representativo da ocorrência de mutações no gene alvo *EMX1* promovido pela Cas9n e o par de sgRNAs.

A utilização do mesmo sistema Cas9n juntamente com os *NSD1_6014_sgRNA1* e *NSD1_6014_sgRNA2* desenvolvidos foi capaz de introduzir aproximadamente $35,5\% \pm 0,8\%$ de mutações indel no *locus* do gene humano *NSD1_6014* detectada em gel de poliacrilamida após o tratamento com nuclease S. A mutação foi detectada e por clivagem do segmento de DNA neste ponto, gerou bandas adicionais (com tamanho entre 300 e 400 pb) (Figura I. 7).

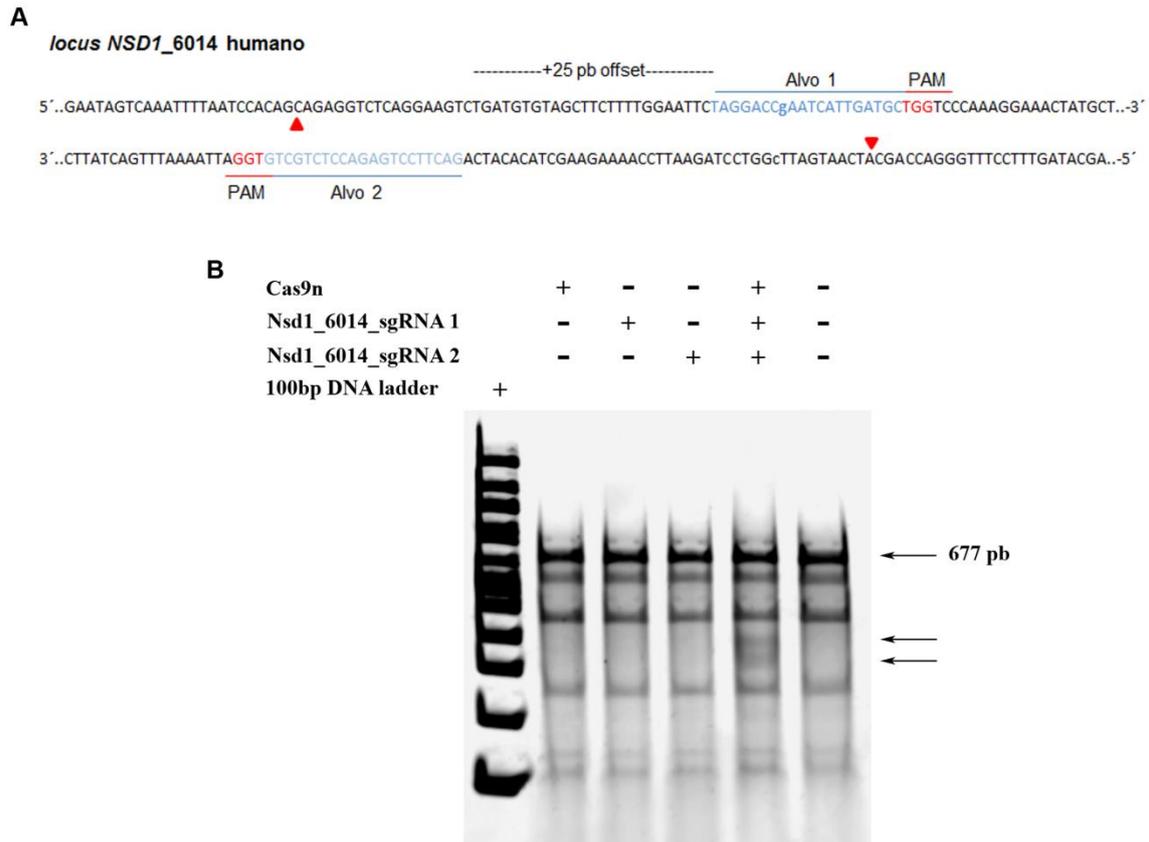


Figura I. 7. Edição do genoma de células humanas HEK 293 FT – gene *NSD1* alvo. (A) Representação esquemática da dupla clivagem (setas vermelhas) do *locus* do gene *NSD1* pela Cas9n. (B) Gel representativo da ocorrência de mutações no gene alvo *NSD1* promovido pela Cas9n e o par de sgRNAs direcionada para região da mutação 6014 G→A.

I.5. Discussão

A tecnologia de iPSCs tem grande potencial para permitir o estudo da síndrome de Sotos, pois fornece a oportunidade de gerar células afetadas pelas mutações do gene *NSD1* obtidas diretamente de pacientes acometidos pela doença.

Os fibroblastos humanos obtidos de pacientes normais foram reprogramados através de uma única nucleofecção com a combinação de vetores epissomais EBNA-1/OriP (Choi et al., 2011; Yu et al., 2009) dando origem a colônias tipo-iPSCs positivas para TRA-1-60 após 18 dias, confirmando a viabilidade de se utilizar tais vetores.

Os linfócitos B-EBV obtidos de pacientes clinicamente afetados pela síndrome de Sotos, devido a mutação *frameshift* no gene *NSD1* (6450-1insC) e pacientes normais foram reprogramados em iPSCs através de uma única nucleofecção com os vetores epissomais EBNA-1/OriP.

Inúmeras colônias tipo-iPSCs apareceram cerca de 21 dias após a nucleofecção em ambos os tipos de linfócitos B-EBV (*wild type* e mutados) utilizados. Uma caracterização preliminar, demonstrou que as colônias tipo-iPSCs obtidas eram positivas para TRA-1-60, confirmando o *status* de pluripotência adquirido por estas células.

A eficiência de reprogramação não foi calculada, porém outros trabalhos indicam uma eficiência de reprogramação de cerca de 0,002-0,1% para linfócitos B-EBV (Choi et al., 2011; Rajesh et al., 2011). Portanto, conseguimos derivar iPSCs paciente-específica, de grande utilidade para modelar a corticogênese e estudar os mecanismos desenvolvimentais envolvidos na síndrome de Sotos.

Para terapia gênica, estudos sobre o efeito de variantes genéticas em processos biológicos e fenótipo de doenças a engenharia genômica é bastante atraente.

A Cas9n-CRISPR foi escolhida devido a suas vantagens em relação às outras tecnologias (ZNFs e TALENs) como fácil customização, alta eficiência e habilidade para facilitar edição multiplex do genoma (Ran et al., 2013). Neste trabalho exploramos essa tecnologia de engenharia genômica, para introduzir mutações indel no exon 20 do gene *NSD1*, na mesma região envolvida com a

síndrome de Sotos devido à mutação *missense* 6014 G→A, no exon 20 (Tatton-Brown et al., 2005).

A estratégia de utilizar a Cas9n com par de 6014_sgRNAs para promover a clivagem dupla do DNA mediou NHEJ em alta eficiência (35,5% ± 0,8% mutações indel formadas *on-target*) comparado aos níveis observados para a mesma estratégia direcionada ao gene *EMX1* (20,7% ± 3,4% mutações indel formadas *on-target*) reproduzida de acordo com o estudo de *Ran et al.* (24,1% mutações indel formadas *on-target*) (Ran et al., 2013).

Portanto, o par de 6014_sgRNAs 1 e 2 desenvolvidos foram apropriados para promover DSB no *locus* do gene humano *NSD1*. Essa tecnologia é promissora para futuramente ser utilizada em ESCs humanas com intuito de inserir as mutações específicas da síndrome de Sotos assim como corrigir essas mutações nas iPSCs derivadas de pacientes acometidos, através da utilização de moldes de reparo durante a edição do genoma via HDR. Outros trabalhos já demonstraram a possibilidade de correção genética de linhagens celulares *in vitro* e até mesmo em modelo animal usando a edição de genoma (Long et al., 2014; Ousterout et al., 2013; Wu et al., 2013).

I.6. Conclusões

Através deste pequeno projeto de 6 meses foi possível derivar iPSCs a partir de linfócitos-EBV que carregam uma mutação *frameshift* obtidos de pacientes acometidos pela síndrome de Sotos e de linfócitos-EBV normais. Assim como estabelecer sgRNAs apropriados para clivar o sítio específico do gene *NDS1* relacionado a uma mutação *missense* característica de pacientes acometidos pela síndrome de Sotos através da tecnologia de Cas9n-CRISPR, servindo como uma plataforma customizável para promover engenharia genômica. Os modelos estabelecidos constituem a base para realização dos futuros ensaios na tentativa de se entender e/ou identificar as causas patogênicas que levam aos fenótipos macrocefálicos usando o sistema de diferenciação cortical *in vitro*, além de sua utilidade no desenvolvimento de novos tratamentos e teste de drogas.

I.7. Perspectivas

Diante dos resultados obtidos, podem se traçar os futuros estudos:

- Caracterizar completamente as colônias iPSCs geradas, avaliando outros marcadores de pluripotência; análise de cariótipo e formação de teratoma.
- Avaliar genética e fenotipicamente a estabilidade das iPSCs a longo prazo.
- Derivar iPSCs a partir de linfócitos-EBV obtidos de outros pacientes, carreando diferentes mutações.
- Estabelecer sgRNAs específicos para outros *loci* do gene *NSD1* associadas a síndrome de Sotos.
- Introduzir mutações específicas da síndrome de Sotos, através de moldes de reparo em linhagens de hESCs já estabelecidas.
- Avaliar a estabilidade genética e fenotípica das hESCs após a edição do genoma.
- Reverter as mutações características da síndrome de Sotos.
- Promover a diferenciação cortical das iPSCs derivadas e hESCs, carreando mutações da síndrome de Sotos, para estudos do desenvolvimento do córtex humano e identificar os possíveis mecanismos associados ao fenótipo macrocefálico da síndrome de Sotos, desenvolvimento de novas terapias e teste de drogas.

I.8. Referências Bibliográficas

- Baujat, G., & Cormier-Daire, V. (2007). Sotos syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2(1), 36. <http://doi.org/10.1186/1750-1172-2-36>
- Bellin, M., Marchetto, M. C., Gage, F. H., & Mummery, C. L. (2012). Induced pluripotent stem cells: the new patient? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(11), 713–726. <http://doi.org/10.1038/nrm3448>
- Cheung, C., Bernardo, A. S., Trotter, M. W. B., Pedersen, R. a, & Sinha, S. (2012). Generation of human vascular smooth muscle subtypes provides insight into embryological origin–dependent disease susceptibility. *Nature Biotechnology*, 30(2), 165–173. <http://doi.org/10.1038/nbt.2107>
- Choi, S. M., Liu, H., Chaudhari, P., Kim, Y., Cheng, L., Feng, J., ... Jang, Y. Y. (2011). Reprogramming of EBV-immortalized B-lymphocyte cell lines into induced pluripotent Stem cells. *Blood*, 118(7), 1801–1805. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-03-340620>
- Cong, L., Ran, F., Cox, D., Lin, S., & Barretto, R. (2013). Multiplex Genome Engineering Using CRISPR / Cas Systems. *Science*, (January), 819–824. <http://doi.org/10.1038/nbt1319>
- Crawford, D. C., Acuña, J. M., & Sherman, S. L. (2001). FMR1 and the fragile X syndrome: human genome epidemiology review. *Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics*, 3(5), 359–371. <http://doi.org/10.1097/00125817-200109000-00006>
- Devine, M. J., Ryten, M., Vodicka, P., Thomson, A. J., Burdon, T., Houlden, H., ... Kunath, T. (2011). Parkinson's disease induced pluripotent stem cells with triplication of the α -synuclein locus. *Nature Communications*, 2, 440. <http://doi.org/10.1038/ncomms1453>
- Douglas, R. J., & Martin, K. a C. (2004). Neuronal circuits of the neocortex. *Annual Review of Neuroscience*, 27, 419–451. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.27.070203.144152>
- Fu, Y., Foden, J. a, Khayter, C., Maeder, M. L., Reyon, D., Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology*, 31(9), 822–6. <http://doi.org/10.1038/nbt.2623>
- Gooskens, R. H., Willemsse, J., Bijlsma, J. B., & Hanlo, P. W. (1988). Megalencephaly: definition and classification. *Brain & Development*, 10(1), 1–7. [http://doi.org/10.1016/S0387-7604\(88\)80037-8](http://doi.org/10.1016/S0387-7604(88)80037-8)
- Hardan, a Y., Minshew, N. J., Mallikarjuhn, M., & Keshavan, M. S. (2001). Brain volume in autism. *Journal of Child Neurology*, 16(6), 421–424. <http://doi.org/10.1177/088307380101600607>
- Kurotaki, N., Imaizumi, K., Harada, N., Masuno, M., Kondoh, T., Nagai, T., ... Matsumoto, N. (2002). Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. *Nature Genetics*, 30(4), 365–366. <http://doi.org/10.1038/ng863>
- Lee, G., Papapetrou, E. P., Kim, H., Chambers, S. M., Tomishima, M. J., Fasano, C. a, ... Studer, L. (2009). Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*, 461(7262), 402–406. <http://doi.org/10.1038/nature08320>
- Long, C., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Mireault, A. a, Bassel-Duby, R., & Olson, E. N. (2014). Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA. *Science (New York, N.Y.)*, (August), 1–34. <http://doi.org/10.1126/science.1254445>

- Migdalska, A. M., Van Der Weyden, L., Ismail, O., Rust, A. G., Rashid, M., White, J. K., ... Adams, D. J. (2012). Generation of the Sotos syndrome deletion in mice. *Mammalian Genome*, 23(11-12), 749–757. <http://doi.org/10.1007/s00335-012-9416-0>
- Mountcastle, V. (1998). *The Cerebral Cortex*. Cambridge: Harvard University Press.
- Mountford, J. C. (2008). Human embryonic stem cells: Origins, characteristics and potential for regenerative therapy. *Transfusion Medicine*, 18(1), 1–12. <http://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2007.00807.x>
- Nguyen, K., & Thomson, A. (2015). The child with the large head. *Paediatrics and Child Health*, 25(5), 239–242. <http://doi.org/10.1016/j.paed.2015.02.012>
- Ousterout, D. G., Perez-Pinera, P., Thakore, P. I., Kabadi, A. M., Brown, M. T., Qin, X., ... Gersbach, C. a. (2013). Reading frame correction by targeted genome editing restores dystrophin expression in cells from Duchenne muscular dystrophy patients. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 21(9), 1718–26. <http://doi.org/10.1038/mt.2013.111>
- Qiu, P., Shandilya, H., D'Alessio, J. M., O'Connor, K., Durocher, J., & Gerard, G. F. (2004). Mutation detection using SurveyorTM nuclease. *BioTechniques*.
- Rajesh, D., Dickerson, S. J., Yu, J., Brown, M. E., Thomson, J. a, & Seay, N. J. (2011). Human lymphoblastoid B-cell lines reprogrammed to EBV-free induced pluripotent stem cells. *Blood*, 118(7), 1797–1800. <http://doi.org/10.1182/blood-2011-01-332064>
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380–1389. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>
- Ran, F., Hsu, P., Wright, J., & Agarwala, V. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8(11), 2281–308. <http://doi.org/10.1038/nprot.2013.143>
- Rayasam, G. V., Wendling, O., Angrand, P. O., Mark, M., Niederreither, K., Song, L., ... Losson, R. (2003). NSD1 is essential for early post-implantation development and has a catalytically active SET domain. *EMBO Journal*, 22(12), 3153–3163. <http://doi.org/10.1093/emboj/cdg288>
- Robinton, D. a., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305. <http://doi.org/10.1038/nature10761>
- Shi, Y., Kirwan, P., Smith, J., Robinson, H. P. C., & Livesey, F. J. (2012). Human cerebral cortex development from pluripotent stem cells to functional excitatory synapses. *Nature Neuroscience*, 15(3), 477–486. <http://doi.org/10.1038/nn.3041>
- SOTOS, J. F., DODGE, P. R., MUIRHEAD, D., CRAWFORD, J. D., & TALBOT, N. B. (1964). CEREBRAL GIGANTISM IN CHILDHOOD. A SYNDROME OF EXCESSIVELY RAPID GROWTH AND ACROMEGALIC FEATURES AND A NONPROGRESSIVE NEUROLOGIC DISORDER. *The New England Journal of Medicine*, 271, 109–116. <http://doi.org/10.1056/NEJM196407162710301>
- Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. a. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507(7490), 62–7. <http://doi.org/10.1038/nature13011>

- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Tatton-Brown, K., Douglas, J., Coleman, K., Baujat, G., Cole, T. R. P., Das, S., ... Rahman, N. (2005). Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. *American Journal of Human Genetics*, 77(2), 193–204. <http://doi.org/10.1086/432082>
- Urbach, A., Bar-Nur, O., Daley, G. Q., & Benvenisty, N. (2010). Differential modeling of fragile X syndrome by human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 6(5), 407–411. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2010.04.005>
- Wagner, E. J., & Carpenter, P. B. (2012). Understanding the language of Lys36 methylation at histone H3. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 13(2), 115–126. <http://doi.org/10.1038/nrm3274>
- Wang, X., Tsai, J.-W., LaMonica, B., & Kriegstein, A. R. (2011). A new subtype of progenitor cell in the mouse embryonic neocortex. *Nature Neuroscience*, 14(5), 555–561. <http://doi.org/10.1038/nn.2807>
- Williams, C. A., Dagli, A., & Battaglia, A. (2008). Genetic disorders associated with macrocephaly. *American Journal of Medical Genetics, Part A*. <http://doi.org/10.1002/ajmg.a.32434>
- Wonders, C. P., & Anderson, S. a. (2006). The origin and specification of cortical interneurons. *Nature Reviews. Neuroscience*, 7(9), 687–696. <http://doi.org/10.1038/nrn1954>
- Wood, A. J., Lo, T.-W., Zeitler, B., Pickle, C. S., Ralston, E. J., Lee, A. H., ... Meyer, B. J. (2011). Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs. *Science (New York, N.Y.)*, 333(6040), 307. <http://doi.org/10.1126/science.1207773>
- Wu, Y., Liang, D., Wang, Y., Bai, M., Tang, W., Bao, S., ... Li, J. (2013). Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 13(6), 659–662. <http://doi.org/10.1016/j.stem.2013.10.016>
- Yagi, T., Ito, D., Okada, Y., Akamatsu, W., Nihei, Y., Yoshizaki, T., ... Suzuki, N. (2011). Modeling familial Alzheimer's disease with induced pluripotent stem cells. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4530–4539. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddr394>
- Yu, J., Hu, K., Smuga-Otto, K., Tian, S., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson, J. A. (2009). Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5928), 797–801. <http://doi.org/10.1126/science.1172482>

II. Publicações

II.1 Artigos referentes aos resultados apresentados nesta tese

1. **Paula AC**, Martins TM, Zonari A, Frade SP, Angelo PC, Gomes DA, Goes AM. Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation. *Stem Cell Res Ther.* 6:76, 2015.

2. **Paula AC**, Zonari A, Martins TM, Novikoff S, Silva AR, Correlo VM, Reis RL, Gomes DA, Goes AM. Human serum is a suitable supplement for osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds. *Tissue Eng Part A.* 19(1-2):277-89, 2013.

II.2 Artigos adicionais publicados durante o desenvolvimento da tese

1. **Paula AC**, Safar GA, Goes AM, Bemquerer MP, Ribeiro MA, Stumpf HO. Dragging human mesenchymal stem cells with the aid of supramolecular assemblies of single-walled carbon nanotubes, molecular magnets, and peptides in magnetic field. *Biomed Res Int.* 2015:143504, 2015.

2. Neto WR, **Paula AC**, Martins TM, Goes AM, Averous L, Schlatter G, Bretas RE. Poly (butylene adipate-co-terephthalate)/hydroxyapatite composite structures for bone tissue recovery. *Polym Degrad Stabil.* 120:61-69, 2015.

3. Zonari A, Martins TM, **Paula AC**, Boeloni JN, Novikoff S, Marques AP, Correlo VM, Reis RL, Goes AM. Polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate structures loaded with adipose stem cells promote skin healing with reduced scarring. *Acta Biomater.* 17:170-81, 2015.

4. Carvalho JL, Zonari A, **Paula AC**, Martins TM, Gomes DA, Goes AM. Production of human endothelial cells free from soluble xenogeneic antigens for bioartificial small diameter vascular graft endothelization. *Biomed Res Int.* 2015:652474, 2015.

5. Martins TM, **Paula AC**, Gomes DA, Goes AM. Alkaline phosphatase expression/activity and multilineage differentiation potential are the differences between fibroblasts and orbital fat-derived stem cells-a study in animal serum-free culture conditions. *Stem Cell Rev.* 10(5):697-711, 2014.

6. Pereira IH, Ayres E, Averous L, Schlatter G, Hebraud A, **Paula AC**, Viana PH, Goes AM, Orefice RL. Differentiation of human adipose-derived stem cells seeded on mineralized electrospun co-axial poly(ϵ -caprolactone) (PCL)/gelatin nanofibers. *J Mater Sci Mater Med.* 25(4):1137-48, 2014.

7. Silva AR, **Paula AC**, Martins TM, Goes AM, Pereira MM. Synergistic effect between bioactive glass foam and perfusion bioreactor on osteogenic differentiation of human adipose stem cells. *J Biomed Mat Res A*. 102(3):818-27, 2014.
8. Silva AR, **Paula AC**, Zonari A, Martins TM, Goes AM, Pereira MM. Development of a protocol for human adipose stem cell culture in CO₂ independent medium and perfusion bioreactor. *J Tissue Sci Eng.* 11: 1-9, 2013.
9. Neto WA, Pereira IH, Ayres E, **Paula AC**, Averous L, Goes AM, Orefice RL, Bretas RE. Influence of the microstructure and mechanical strength of nanofibers of biodegradable polymers with hydroxyapatite in stem cells growth electrospinning, characterization and cell viability. *Polym Degrad Stabil.* 97:2037-51, 2012.

III. Apresentações em Congressos

1. Apresentação de vídeo-conferência na 3rd International Conference on Tissue Science & Regenerative Medicine do Omics Group. Valencia, Espanha. 24/09/14-26/09/14. Paula AC, Martins TM, Zonari A, Frade SP, Angelo PC, Goes AM. Human serum as an alternative to fetal bovine serum in adipose tissue-derived stromal cells cultures. 2014.
2. Apresentação de pôster no XII Simpósio Brasileiro de Matriz Extracelular e VII International Symposium on Extracellular Matrix. Búzios, Brasil. 29/10/13-01/11/13. (A) Paula AC, Martins TM, Novikoff S, Goes AM. Polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds: biocompatible and promising matrix for bone tissue engineering application. 2013. (B) Paula AC, Carvalho JL, Martins TM, Zonari A, Gomes DA, Goes AM. Decellularized matrices as scaffolds for vascular grafting. 2013.
3. Apresentação de pôster no 11th World Congress on Inflammation da International Association of Inflammation Societies. Natal, Brasil. 21/09/13-25/09/13. Paula AC, Zonari A, Martins TM, Campos AC, Gomes DA, Goes AM. Fetal bovine serum x allogeneic human serum: choice of serum is determinant of reliable cell culture for transplantation. 2013.
4. Apresentação de pôster no VI Encontro de Pesquisa em Bioquímica e Imunologia-ENAPEBI 2012 da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, Brasil. 29/11/12-30/11/12. Paula AC, Martins TM, Silva AR, Novikoff S, Goes AM. Biocompatibility of polyhydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate scaffolds: *in vitro* and *in vivo* evaluation. 2012.
5. Apresentação de pôster na International Conference on Tissue Science and Engineering do Omics Group. Chicago, USA. 01/10/12-03/10/12. Paula AC, Silva AR, Zonari A, Martins TM, Correlo VM, Novikoff S, Goes AM. Human serum enhance proliferation of adipose-derived stem cells and supports osteogenic differentiation on PHB-HV scaffolds. 2012.
6. Apresentação de pôster no 10th International Congress on Cell Biology e XVI Meeting of Brazilian Society for Cell Biology da Sociedade Brasileira de Biologia

Celular. Rio de Janeiro, Brasil. 25/07/12-28/07/12. Paula AC, Silva AR, Zonari A, Martins TM, Novikoff S, Goes AM. New approach to culture human adipose stem cells seeded on PHB-HV scaffolds for bone tissue engineering application. 2012.

7. Apresentação de pôster no VI Congresso Brasileiro de Células-tronco e terapia celular da Associação Brasileira de Terapia Celular. Salvador, Brasil. 28/09/11-01/10/11. Paula AC, Novikoff S, Zonari A, Silva AR, Martins TM, Correlo VM, Reis RL, Goes AM. Optimization of *ex vivo* expansion of human adipose stem cells for bone tissue engineering approach. 2011.

IV. Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE -11668613.7.0000.5149

Interessado(a): Prof. Alfredo Miranda de Goes
Departamento de Bioquímica e Imunologia
Instituto de Ciências Biológicas- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 08 de maio de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Utilização de células-tronco humanas do tecido adiposo cultivadas em matriz tridimensional de Polihidroxitirato para regeneração de tecido ósseo**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

V. Certificado de aprovação da Comissão de Ética no uso de animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Alfredo Miranda Góes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Cultivo de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano em matrizes poliméricas para engenharia de tecido ósseo, submetido a esta comissão pelo protocolo 373 / 2012, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 27/03/2013.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Belo Horizonte, 01/04/2013.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

VI. Artigos publicados

Paula et al. *Stem Cell Research & Therapy* (2015) 6:76
DOI 10.1186/s13287-015-0030-4



RESEARCH

Open Access

Human adipose tissue-derived stem cells cultured in xeno-free culture condition enhance c-MYC expression increasing proliferation but bypassing spontaneous cell transformation

Ana CC Paula¹, Thaís MM Martins¹, Alessandra Zonari¹, Soraia PPJ Frade², Patrícia C Angelo², Dawidson A Gomes¹ and Alfredo M Goes^{1*}

Abstract

Introduction: Human adipose tissue-derived stem cells (hASCs) are attractive cells for therapeutic applications and are currently being evaluated in multiple clinical trials. Prior to their clinical application, hASCs must be expanded *ex vivo* to obtain the required number of cells for transplantation. Fetal bovine serum is the supplement most widely used for cell culture, but it has disadvantages and it is not safe for cell therapy due to the risks of pathogen transmission and immune reaction. Furthermore, the cell expansion poses a risk of accumulating genetic abnormalities that could lead to malignant cell transformation. In this study, our aim was to evaluate the proliferation pattern as well as the resistance to spontaneous transformation of hASCs during expansion in a xeno-free culture condition.

Methods: hASCs were expanded in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with pooled allogeneic human serum or fetal bovine serum to enable a side-by-side comparison. Cell viability and differentiation capacity toward the mesenchymal lineages were assessed, along with immunophenotype. Ki-67 expression and the proliferation kinetics were investigated. The expression of the transcription factors c-FOS and c-MYC was examined with Western blot, and *MYC*, *CDKN2A*, *ERBB2* and *TERT* gene expression was assessed with quantitative PCR. Senescence was evaluated by β -gal staining. Karyotype analysis was performed and tumorigenesis assay *in vivo* was also evaluated.

Results: The hASCs expanded in medium with pooled allogeneic human serum did not show remarkable differences in morphology, viability, differentiation capacity or immunophenotype. The main difference observed was a significantly higher proliferative effect on hASCs cultured in pooled allogeneic human serum. There was no significant difference in C-FOS expression; however, C-MYC protein expression was enhanced in pooled allogeneic human serum cultures compared to fetal bovine serum cultures. No difference was observed in *MYC* and *TERT* mRNA levels. Moreover, the hASCs presented normal karyotype undergoing senescence, and did not form *in vivo* tumors, eliminating the possibility that spontaneous immortalization of hASCs had occurred with pooled allogeneic human serum.

Conclusions: This complete characterization of hASCs cultivated in pooled allogeneic human serum, a suitable xeno-free approach, shows that pooled allogeneic human serum provides a high proliferation rate, which can be attributed for the first time to C-MYC protein expression, and showed cell stability for safe clinical applications in compliance with good manufacturing practice.

* Correspondence: goes@icb.ufmg.br

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-910, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Paula et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Human Serum is a Suitable Supplement for the Osteogenic Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells Seeded on Poly-3-Hydroxybutyrate-Co-3-Hydroxyvalerate Scaffolds

Ana Cláudia Chagas de Paula, M.Sc.,¹ Alessandra Arcoverde Cavalcanti Zonari, M.Sc.,¹
Thaís Maria da Mata Martins, B.Sc.,¹ Silviene Novikoff, Ph.D.,¹ Alexandra Rodrigues Pereira da Silva, Ph.D.,¹
Vitor Manuel Correlo, Ph.D.,^{2,3} Rui L. Reis, Ph.D.,^{2,3} Dawidson Assis Gomes, Ph.D.,¹
and Alfredo Miranda Goes, Ph.D.¹

Human adipose-derived stem cells (hASCs) are currently a point of focus for bone tissue engineering applications. However, the *ex vivo* expansion of stem cells before clinical application remains a challenge. Fetal bovine serum (FBS) is largely used as a medium supplement and exposes the recipient to infections and immunological reactions. In this study, we evaluated the osteogenic differentiation process of hASCs in poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHB-HV) scaffolds with the osteogenic medium supplemented with pooled allogeneic human serum (aHS). The hASCs grown in the presence of FBS or aHS did not show remarkable differences in morphology or immunophenotype. The PHB-HV scaffolds, which were developed by the freeze-drying technique, showed an adequate porous structure and mechanical performance as observed by micro-computed tomography, scanning electron microscopy (SEM), and compression test. The three-dimensional structure was suitable for allowing cell colonization, which was revealed by SEM micrographs. Moreover, these scaffolds were not toxic to cells as shown by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay. The differentiation capacity of hASCs seeded on scaffolds was confirmed by the reduction of the proliferation, the alkaline phosphatase (AP) activity, expression of osteogenic gene markers (AP, collagen type I, Runx2, and osteocalcin), and the expression of bone markers, such as osteopontin, osteocalcin, and collagen type I. The osteogenic capacity of hASCs seeded on PHB-HV scaffolds indicates that this scaffold is adequate for cell growth and differentiation and that aHS is a promising supplement for the *in vitro* expansion of hASCs. In conclusion, this strategy seems to be useful and safe for application in bone tissue engineering.

Introduction

THERE ARE A large number of clinical conditions, such as avascular necrosis, infection, skeletal abnormalities, osteoporosis, trauma, and tumor resection, that involve bone defects.¹ In most of these conditions, the intrinsic bone regeneration process is compromised and tissue reconstruction is necessary to improve the patient's quality of life. The gold standard treatment is autologous bone grafting.^{1,2} Although the autologous bone is histocompatible and nonimmunogenic, the process of harvesting the patient's own tissue has disadvantages, such as an additional surgical procedure,

discomfort, and pain. Furthermore, the quantity of tissue that can be harvested without morbidity to the donor site is limited and usually involves high costs.^{1,3}

Tissue engineering, a multidisciplinary field that combines cells, scaffolds, and growth and differentiation factors to develop biological substitutes for the restoration, maintenance, or improvement of tissue function,⁴ is an attractive science to bypass the limitations of autologous bone grafting. The scaffolds act as a temporary matrix for cell guidance and extracellular matrix deposition. Several materials, such as metals, ceramics, and polymers, have been used. Nevertheless, biodegradable polymers of natural or synthetic

¹Laboratory of Cellular and Molecular Immunology, Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

²3B's Research Group Biomaterials, Biodegradables, and Biomimetics, Department of Polymer Engineering, University of Minho, Braga, Portugal.

³ICVS/3B's Associate Laboratory, PT Government Associate Laboratory, Guimarães, Portugal.