

São Paulo, 01 de julho de 2014

À

CAPES

**Ref.: RELATÓRIO TÉCNICO CIENTÍFICO FINAL - PROGRAMA NACIONAL DE
POS-DOUTORADO (PNPD) -2011**

Aluno: Antonio Carlos Aloise

Supervisora: Lydia Masako Ferreira

Título do Projeto: Expressão do ativador receptor do NF-kB ligante (RANKL), fosfatase alcalina (FAL) e osteocalcina (OC) em fibroblastos dérmicos e pré-adipócitos humanos cultivados em meio de cultura osteogênico

1. INTRODUÇÃO

O presente relatório descreverá os resultados finais compreendidos no período de dezembro de 2011 a julho de 2014. O projeto envolvendo o estudo de fibroblastos dérmicos e pré-adipócitos humanos e sua diferenciação osteogênica, foi desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Cirurgia Translacional da Escola Paulista de Medicina- Universidade Federal de São Paulo na área de concentração “Regeneração Tecidual Ecto e Mesodérmica, linha de pesquisa “Cultura de Fibroblastos”.

Foi objetivo deste projeto a aquisição de conhecimento científico, integração das atividades de ensino, pesquisa e extensão, com o objetivo de aprender e contribuir na formação de novos pesquisadores e alunos de iniciação científica, aperfeiçoamento, mestrado e doutorado)

O relatório descreverá as atividades desenvolvidas durante o referido período, de forma mensal:

MÊS	ATIVIDADE DESENVOLVIDA
DEZEMBRO 2011	Preparo de soluções para coleta e armazenamento de amostras
JANEIRO 2012	Preparo de soluções de estoque
FEVEREIRO 2012	Coleta de tecidos humanos para o cultivo primário de fibroblastos e pré-adipócitos
MARCO 2012	Cultivo e Expansão de Fibroblastos e pré-adipócitos para formação do banco de células
ABRIL 2012	Coleta de tecidos humanos para o cultivo primário de fibroblastos e pré-adipócitos
MAIO 2012	Cultivo e Expansão de Fibroblastos e pré-adipócitos para formação do banco de células
JUNHO 2012	Treinamento de cultivo de células primárias (fibroblastos e pré-adipócitos) dos alunos de iniciação científica, Mestrado e Doutorado
JULHO 2012	Treinamento de cultivo de células primárias (fibroblastos e pré-adipócitos) dos alunos de iniciação científica, Mestrado e Doutorado
AGOSTO 2012	Padronização do método de diferenciação (adipogênica, condrogênica e osteogênica) dos pré-adipócitos e fibroblastos e análise por citoquímica

SETEMBRO 2012	Coleta de tecidos humanos para o cultivo primário de fibroblastos e pré-adipócitos (necessidade de aumento do n de amostras coletadas por orientação estatística)
OUTUBRO 2012	Cultivo e Expansão de Fibroblastos e pré-adipócitos para formação do banco de células (necessidade de aumento do n de amostras coletadas por orientação estatística)
NOVEMBRO 2012	Padronização do cultivo com meio osteogênico por 7 e 21 dias nos grupos experimentais descritos no projeto original
DEZEMBRO 2012	Padronização da Imunofenotipagem (Citometria de Fluxo) das células primárias de fibroblastos e pré-adipócitos cultivadas por 7 e 21 dias.
JANEIRO 2013	Padronização do método de identificação da Fosfatase Alcalina (FAL) por ELISA (Kit BioAssay Systems, CA, USA)
FEVEREIRO 2013	Padronização do método de identificação de Osteocalcina (OC) por ELISA (Kit Invitrogen, CA, USA)
MARCO 2013	Padronização dos métodos de identificação dos nódulos de fosfato de cálcio utilizando a coloração Alizarina Vermelha
ABRIL 2013	Padronização do método de análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo
MAIO 2013	Resultados obtidos após padronização da Imunofenotipagem (Citometria de Fluxo) das células primárias de fibroblastos e pré-

	adipócitos cultivadas por 7 e 21 dias.
JUNHO 2013	Análise Estatística
JULHO 2013	Resultados obtidos após padronização do método de identificação da Fosfatase Alcalina (FAL) por ELISA (Kit BioAssay Systems, CA, USA)
AGOSTO 2013	Análise estatística
SETEMBRO 2013	Resultados obtidos após padronização do método de identificação de Osteocalcina (OC) por ELISA (Kit Invitrogen, CA, USA)
OUTUBRO 2013	Análise Estatística
NOVEMBRO 2013	Resultados obtidos após padronização dos métodos de identificação dos nódulos de fosfato de cálcio utilizando a coloração Alizarina Vermelha
DEZEMBRO 2013	Análise Estatística
JANEIRO 2014	Resultados obtidos após padronização do método de análise da expressão gênica por RT-PCR quantitativo
FEVEREIRO 2014	Análise Estatística
MARÇO 2014	Redação final incluindo os resultados
ABRIL 2014	Elaboração do Relatório Final e do Artigo Científico
MAIO 2014	Elaboração do Relatório Final e do Artigo Científico
JUNHO 2014	Elaboração do Artigo e do Artigo Científico

JULHO 2014	Envio do Artigo para Publicação e do Relatório Final
------------	--

Até dezembro de 2012 foram realizadas as coletas de tecidos humanos, cultivo e expansão das células com armazenamento das amostras para formação de um banco de células, assim como a padronização da metodologia e treinamento dos alunos participantes do projeto. Nas etapas experimentais descritas, foram utilizados materiais disponíveis no laboratório de cultura de células da disciplina de cirurgia plástica utilizados nas atividades de rotina. Portanto nesta etapa não foi necessário adquirir o material descrito no projeto original, o que justifica o fato de não termos utilizado a verba disponível na conta pesquisador.

Após este período foram adquiridos os materiais de consumo para o desenvolvimento do projeto conforme consta na prestação de contas do projeto.

1.Apresentação Científica

O tratamento para as perdas críticas de tecido ósseo, ou seja, perdas que levam a um comprometimento da forma ou função do osso afetado, vem sendo realizado com a utilização de enxertos autógenos, alógenos ou xenógenos, com a utilização de metais inertes e mais recentemente com a Engenharia Tecidual (ET). A Engenharia Tecidual pode ser definida como sendo uma estratégia tecnológica para a regeneração tecidual, utilizando uma abordagem multidisciplinar que aplica os princípios da biologia e engenharia para o desenvolvimento de substitutos viáveis que restaurem, mantenham ou melhorem a função de tecidos humanos (VACANTI *et al.*, 1993; LANGER & VACANTI, 1993).

Um novo tecido por meio da bioengenharia, tem por base a interação de três fatores básicos: célula, fator de crescimento e arcabouço. As células mais indicadas para este procedimento são as células com maior potencial de diferenciação em outras linhagens celulares, como as células-tronco da medula óssea ou as células de linhagem hematopoiética. Mas, no entanto, outros tipos celulares foram pesquisadas quanto a sua capacidade de diferenciação como os adipócitos, fibroblastos, queratinócitos e condrócitos (HEE, JONIKAS, NICOLI, 2006).

Fibroblasto é um tipo de célula predominante no tecido conjuntivo e é responsável pela maior parte da produção de MEC e fatores de crescimento neste tecido. Estudos *in*

vitro demonstraram que fibroblastos sub-epiteliais podem estimular a proliferação de queratinócitos via fatores de difusão e que queratinócitos podem induzir a expressão genética de fibroblastos (WANG et al., 2004).

Fibroblastos proliferativos apresentam uma porcentagem da sua população que são células tronco adultas, as quais poderiam por estímulos adequados, entre eles o meio osteogênico, transformar-se em osteoblastos, assim formando um tecido compatível para a reconstrução de perdas ósseas ou para reparação de junções ósseas nas fraturas produzidas cirurgicamente.

Isto é particularmente interessante, quando se sabe que a cultura de fibroblastos já é amplamente conhecida e suas fontes como a pele, podem ser obtidas de pequenas áreas doadoras, ou sobras provenientes de procedimentos cirúrgicos ambos sem morbidade da área doadora. Um desafio ainda é a incorporação de fatores osteoindutivos como os fatores de crescimento, utilizados conjuntamente com células osteogênicas (GOLDSTEIN et al., 2001). Dentre os fatores de crescimento e citocinas que influenciam o crescimento ósseo podemos destacar o fator de crescimento transformante (TGF) beta1, proteínas morfogenéticas do osso (BMP), plasma enriquecido por plaquetas (PRP-A), fator de crescimento de fibroblasto (bFGF) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF).

Atualmente, há um consenso de que os adipócitos são um tipo celular específico que deriva de células mesenquimatosas indiferenciadas, com capacidade de diferenciarem-se em células mesodérmicas como condrócitos, osteócitos, miócitos e adipócitos (GREGOIRE, SMAS, SUL, 1998). As células adiposas precursoras também são chamadas de pré-adipócitos ou lipoblastos e, segundo KERSHAW & FLIER (2004), nos primeiros estágios de diferenciação essas células são indistinguíveis dos fibroblastos, mesmo por microscopia eletrônica.

O receptor ativador do NF- κ B ligante (RANKL) é produzido por osteoblastos e regula a adesão ao seu receptor RANK localizado nos osteoclastos. A expressão de RANKL é estimulada por uma grande variedade de citocinas e hormônios incluindo os glicocorticóides, interleucina-1 (IL-1) paratohormônio e vitamina D3 e define a atividade osteoblástica por meio da detecção da presença de seu RNAm

A utilização de células produtoras de outros tecidos que não o tecido ósseo como os fibroblastos e adipócitos, pode ser explicada pela facilidade de proliferação *in*

in vitro destas células associado ao fato de não se causar pouca morbidade para o local doador. A diferenciação celular induzida de fibroblastos e pré-adipócitos já tem seu método descrito na literatura, mas sem ainda contudo, descrever de maneira ampla a expressão de fatores de transcrição gênica específicos como o ativador-receptor NF-κB (RANKL) conjuntamente com a detecção de proteínas ligadas diretamente a atividade osteoblástica, o que explica a importância do estudo destes fatores, na engenharia tecidual óssea.

2.Descrição das Atividades Realizadas

O presente projeto previa a pesquisa científica avaliando o comportamento de dois tipos celulares quando estimulados para a atividade osteoblástica e atividade de ensino e treinamento de alunos de graduação e pós graduação envolvidos com o tema.

2.1 Atividades de Ensino e Treinamento

2.1.1 Aulas ministradas:

I.1. Tema: Tipos de modelo *in vitro* / Infraestrutura laboratorial / Cuidados operacionais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora

I.2. Tema: Desenvolvimento de Técnicas Minimamente Invasivas e Biomateriais Resistência de biomateriais / *Scaffolds* / Bioengenharia tecidual / Biocompatibilidade [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora

I.3 Tema: Análise crítica de artigos experimentais *in vitro* e *in vivo* [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora

I.4 Tema: Indicações dos modelos animais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora.

2.1.2 Treinamento dos Alunos na Cultura de Células:

II.1. Angélica Bueno Prado Gomes- Aluna do terceiro ano do curso de ciências biológicas

II.2 Tércia A. da Costa Barbosa de Carvalho- Aluna do quarto ano do curso de ciências biológicas

II.3 Renata Saito Midori- Graduada em 2009 no curso de ciências biológicas

II.4 Camila Russo de Sá- Aluna do quarto ano do curso de biomedicina

II.5 Flávia Regina Arantes Ferreira- Aluna do quarto ano do curso de ciências biológicas

II.6 Paulo de Tarso - Aluno do segundo ano do curso de medicina

II.7 Allan Zimmerman- Graduado em 1987 no curso de medicina

II.8 Marcelo Melo- Graduado em 1997 no curso de odontologia

II.9 Fábio Schemann Miguel- Graduado em 1988 no curso de odontologia

II.10 Delaini Miguel. Graduada em 1989 no curso de odontologia

II.11 Marco Mattar. Graduado em 1993 no curso de odontologia

II.12 Mateus Abreu. Graduado em 2002 no curso de odontologia

2.1.2 Trabalhos apresentados em congressos e outros eventos

III.1 Apresentação de tema livre no Congresso da Associação Brasileira de Ortodontia (2012) com o tema “Terapia Gênica e Celular na Movimentação Ortodôntica” Belo Horizonte.MG

III.2 Apresentação oral no evento Plastic Surgery Research Council 59th Annual Meeting com o tema “Repair Of Critical Size Bone Defects Using Bone Marrow Stromal Cells A Histomorphometric study in Rabbits Calvaria” na cidade de New York (USA) entre os dias 7 e 9 de março de 2014

2.1.3 Capítulos de Livro

IV.1 Título: Células Tronco. Capítulo 2 do livro “Células Tronco em Implantodontia” Ano: 2013;Ed. Napoleão São Paulo Brasil

IV.2 Título: Metodologia para obtenção da Fração Mononuclear da Medula Óssea, Cultura de Células da Medula e do Tecido Adiposo. Capítulo 3 do livro “Células Tronco em Implantodontia” Ano:2013; Ed. Napoleão São Paulo Brasil

2.1.4 Co-Orientações Concluídas de Alunos

V.1 Gabriela P. R. Prado. Título: Estabilidade transversal dental e esquelética após expansão rápida da maxila assistida cirurgicamente utilizando escâner a laser. Orientador: Prof. Max Domingues Pereira. Nível: Mestrado

2.1.5 Co-orientações em Andamento de Alunos

VI.1 Marcelo de Oliveira e Silva. Título da tese: Enxerto Ósseo Xenógeno Associado a medula óssea in natura na regeneração tecidual de calvaria de coelhos. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível: Mestrado

VI.2 Rafael de Mello e Oliveira. Título da tese: Uso de Bio-Oss integrado com concentrado de células da medula óssea em enxertos aposicionais na calvária de coelhos. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível: Mestrado

VI.3 Allan Zimmerman. Título da tese: Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo associadas a enxerto xenólogo na regeneração óssea da calvária de coelhos. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível: Doutorado

VI.4 Marcelo Soares de Melo. Título da tese: Células tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo na distração osteogênica de mandíbulas de coelhos pós radiação ionizante. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível: Doutorado

VI.5 Fábio Scheman Miguel. Título da tese: Células tronco derivadas do ligamento periodontal sob modelo de compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Doutorado

VI.5 Delaini Miguel. Título da tese: Modelo de Indução inflamatória em fibroblastos periodontias adultos submetidos a compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.6 Marco Mattar. Título da tese: Cultura tridimensional de fibroblastos periodontais adultos submetidos a uma compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

VI.7 Mateus Abreu. Título da tese: Sistema RANKL/RANK em fibroblastos periodontias adultos submetidos a compressão estática contínua. Orientadora: Profa Dra. Lydia Masako Ferreira. Nível Mestrado

2.1.5 Participações na Disciplina e Programa de Pós Graduação

VII.1 Coordenação e Organização das reuniões científicas do grupo de pesquisa do laboratório de cirurgia translacional da disciplina de Cirurgia Plástica Unifesp/EPM realizadas às segundas-feiras das 10:00h as 12:00h com periodicidade quinzenal no período de janeiro de 2011 até o presente momento.

VII.2 Participação das reuniões do programa de pós-graduação em Cirurgia Translacional Unifesp/EPM realizada às segundas-feiras das 15:30 as 17:30 com periodicidade semanal no período de janeiro de 2011 até o presente momento

VII.3 Elaboração do relatório final do projeto de graduação da disciplina de cirurgia plástica Unifesp/EPM durante o período de janeiro de 2011 até janeiro de 2014.

VII.4 Elaboração do manual de atendimentos ambulatoriais de pacientes da disciplina de cirurgia plástica da Unifesp/EPM durante o período de janeiro de 2011 até janeiro de 2014.

VII.5 Elaboração do manual de orientação da residência médica da disciplina de cirurgia plástica da Unifesp/EPM durante o período de janeiro de 2011 até janeiro de 2014.

2.2 Atividades de Pesquisa

2.2.1 Métodos

O isolamento e cultura de fibroblastos dérmicos humanos foi realizado a partir de fragmentos de pele descartados de procedimentos operatórios da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. O material coletado foi imediatamente imerso em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para o transporte até o laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica, e mantido à

temperatura de 4°C, sendo manipulado nas 6 horas subsequentes. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, umidificadas numa mistura gasosa de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono, por cerca de 15 dias, tempo esse para a migração dos fibroblastos provenientes dos fragmentos para a placa de cultura. Com a pré-confluência, serão realizadas novas passagens dos fibroblastos para novas garrafas. Ao atingir a quarta passagem, as células serão utilizadas nos procedimentos ou congeladas em nitrogênio líquido para utilização posterior. Apenas células entre a quarta e a nona passagem serão utilizadas nos experimentos. Para obtenção da cultura primária de adipócitos humanos a amostra de tecido foi transferida para um frasco estéril contendo solução salina balanceada Hank's (HBSS) com 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e levado imediatamente ao laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Foram utilizados dois tipos de meio de cultura, o primeiro tipo de meio será constituído do meio EAGLE modificado por DULBECCO (DMEM) (alta taxa de glicose [4,5 g/L], L-glutamina [584 mg/L], piruvato de sódio [110 mg/L]), com soro fetal bovino a 20% (suplementado com ferro), e Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml - 100µg/ml) e tamponado com bicarbonato de sódio (1N). O pH da solução é ajustado para 7,2, sendo denominado de meio básico.

O segundo tipo de meio foi constituído do meio básico (DMEM) com soro fetal bovino a 20% (suplementado com ferro), e Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml - 100µg/ml) e tamponado com bicarbonato de sódio (1N) acrescido de 0,5µg/ml de ácido ascórbico, 10 mmol/L β glicerofosfato e 10nmol/L Dexametasona, sendo denominado de meio osteogênico (BELOTI & ROSA 2005, COELHO & FERNANDES 2007a,b)

Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizadas placas de 12 poços e uma densidade de células por poço de 1×10^6 células e com 2ml de meio por poço, sendo assim formados os grupos distribuídos pelo tipo de meio e momento de avaliação :

As placas foram cultivadas por um total de 21 dias, sendo as avaliações realizadas no sétimo e vigésimo primeiro dia após a semeadura das células, e a troca do meio de cultura das células foi realizada a cada 48 horas.

AVALIAÇÃO CITOQUÍMICA DAS CÉLULAS

Em cada ponto do estudo, sétimo, décimo e vigésimo primeiro e dia, o meio foi removido das placas e congelado e as células fixadas em formaldeído a 4% para a avaliação citológica.

CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO ADULTAS

CITOMETRIA DE FLUXO

Fibroblastos e pré-adipócitos da terceira passagem foram utilizados para a caracterização imunofenotípica. As células foram tripsinizadas e a suspensão celular foi centrifugada (100 g, 6 min). As células foram coradas com anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofocianina (APC) ou ficoeritrina (PE): CD14-FITC, CD16-PE, CD31-FITC, CD34-APC, CD44-APC, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-APC, CD105 e CD117-PE-APC (BD Biosciences, EUA). Um total de 5×10^5 células foram ressuspendidas em 0,2 ml de PBS e incubadas com os anticorpos FITC-, PE-ou APC-conjugado, durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Goiaba easyCyte, Millipore), para identificação de determinados canais de fluorescência de cada um dos anticorpos.

ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO

Diferenciação adipogênica

Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP®) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 μ M insulina e 1 μ M de dexametasona (Sigma Aldrich®) por 15 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após será utilizado 2 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences). Após 30 minutos a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com o 0,5% de corante Oil Red O (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1 μ g/ml do corante (4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride (DAPI) (Sigma Aldrich®) em PBS (0,1% de BSA (Sigma Aldrich®) e 0,2 % de saponina, Calbiochem®) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, New York).

Diferenciação osteogênica

Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 50 μ M de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®), 0,1 μ M de dexametasona e 10⁻²M de β

glicerofosfato (BAKER ANALYZED™ Reagent) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 minutos a solução fixadora será removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de 40 mM de alizarina vermelha sódica (pH 4.1) (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1µg/ml do corante DAPI em PBS (0,1% de BSA e 0,2 % de saponina) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2.

Diferenciação condrogênica

Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 µM insulina, 0,1 µM de dexametasona, 50µM de ácido ascórbico e 10ng/ml TGF-β1 (Cell Signaling Technology®) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após será utilizado 2 ml de uma solução fixadora formalina 0,4% em PBS paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução 0,1% de azul de Toluidina (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements -

Atividade de Fosfatase Alcalina (FAL)

O meio de cultura foi removido das placas de cultura e submetidas a leituras da atividade de fosfatase alcalina, com o Kit QuantiChrom® de Ensaio de Fosfatase Alcalina

(DALP-250) (Bioassay Systems, CA, EUA). Uma medição direta da atividade da fosfatase alcalina no sobrenadante foi realizada utilizando fosfato de p-nitrofenil, o qual é hidrolisado pela fosfatase alcalina, a produção de uma substância amarela, com um máximo de absorção de 405 nm, em que a intensidade da reação é proporcional à atividade de a enzima. Para isto, 200 microlitros de água destilada e 200 mL (Kit) foram transferidos para uma placa de 96 poços, 50 mL do meio a ser analisado foi transferido para outros poços, e 150 microlitros da solução de trabalho (Kit) foi transferida para os poços que contêm o meio. O montante final da solução em cada poço foi de 200 mL. Depois de fechar suavemente a tampa da placa, sem misturar, a solução foi lida por um espectrofotômetro (Multiskan, CA, EUA) a 405 nm. Quatro minutos mais tarde, a placa foi novamente lida para obter uma curva da atividade de fosfatase alcalina

Quantidade de Osteocalcina (OC)

Em cada ponto de avaliação do presente estudo, o meio de cultura foi removido e submetido a um teste ELISA para uma avaliação quantitativa de osteocalcina. O Kit ELISA para osteocalcina (ZYMED LAB, Inc., CA, EUA) foi utilizado como da seguinte forma: solução 1 continha peroxidase conjugada com anticorpo (HRP-anticorpo). Frasco 2 foi reconstituído com 11 ml de água destilada, misturou-se suavemente durante 10 minutos, com alguns intervalos, evitando a formação de espuma. Solução 2 foi preparada com a solução padrão contendo 16 ng Gla-OC/ml. Frasco 3 foi reconstituído com 1 ml de água destilada. Em seguida, 100 ul da amostra do meio e 100 uL de solução de 2, foram transferidos para uma placa de 96 poços a partir do kit. Após misturar suavemente a solução, a placa foi coberta e mantida à temperatura ambiente durante duas horas. O meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes com 400 ul de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Entre cada lavagem, a placa foi colocada em papel estéril para remover completamente o líquido. Em seguida, 100 ul de solução 1 foi adicionada com uma pipeta e incubou-se 1 hora. Após este tempo, a solução foi removida, e os poços foram lavados quatro vezes com PBS. Em seguida, 100 ul de solução de substrato foi adicionada (frasco de 5) e deixada durante 5 minutos. Subsequentemente, 100 mL de solução de interrupção foi adicionado, seguido por agitação suave. A solução foi imediatamente lida por espectrofotometria a 450 nm. A unidade de leitura foi ng/ml.

Expressão Gênica do RANKL

O RNA foi extraído a partir das células usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Foster City, CA) seguindo as instruções do fabricante. O ARN precipitou a partir da fase aquosa foi lavada com etanol a 75%. O RNA foi seco e dissolvido em água isenta de RNase. O RNA total foi em seguida purificado com Qiagen RNeasy MiniKit (Qiagen,

Valencia, CA) e submetido a um tratamento com DNase. A quantidade e qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria utilizando NanoDrop v3.3.0 (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE).

2.6.2 O cDNA complementar de DNA (DNAc) foi sintetizado a partir das amostras de RNA através de transcrição reversa, utilizando o Kit de RT2 First Strand (SA Bioscience). A solução de RNA foi misturada com o cocktail RT para a reação de transcrição inversa contendo tampão 4 microlitros BC3 (5XRT tampão 3), 1 microlitro P2 (Primer e controle externo), 2H de RE3 (RT mistura de enzima 3) e 3 ul de RNAase isenta de água. A amostra foi carregada num termociclador durante 15 minutos a 42 ° C durante 5 minutos e 95 ° C. No final da reação de cDNA, diluiu-se com 91 mL de água e armazenado a -20 ° C.

2.6.3 análise de reação qPCR de PCR foram realizadas utilizando um termociclador ABI 7500 FastPCR (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Todas as reações foram otimizadas para cada par de "primers", testando a temperatura de recozimento e número de ciclos adequados. A especificidade das reações de fusão foi confirmada por análise da curva. Para a reação, foram utilizados os seguintes componentes: 12,5 ml de SYBR Green I Quantitect (QIAGEN GmbH), 40 nM de iniciadores (sentido e anti-sentido) e 9,5 mL de água. Nós adicionamos 1 mL de cDNA. Para cada gene foi avaliada uma amostra de água em substituição da solução de cDNA que serve como um controlo negativo (NTC) para impedir a contaminação exógena. Nós carregamos um volume total de 25 mL em cada placa qPCR bem. As condições dos ciclos térmicos foram os seguintes: 10 min a 95 ° C, e 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94 ° C, 60 de recozimento a 60 ° C e extensão de 30 a 72 ° C. Valores ciclos de quantificação (CQ) foram utilizadas como ponto final definido como o número de ciclos de PCR, em que a fluorescência gerada pela amplificação atravessa o limiar. Três reações de replicados por amostra foram corridos para assegurar a significância estatística. Para análise dos dados, foi utilizado o método comparativo qC (também conhecido como o método 2- $\Delta\Delta$ Ct) para calcular as quantidades relativas (QR) de expressão gênica entre as amostras. Sempre que os valores QC excedeu 36 rounds de amplificação (CT), as quantidades foram consideradas indetectáveis ou muito baixas e as medidas foram tomadas como inválidas. A significância estatística foi avaliada através do test-t.

Os resultados da diferenciação adipogênica foram avaliados utilizando-se Oil Red O. Após 2 semanas de indução adipogênica as culturas de FB e PA adotaram uma forma mais arredondada e exibiram gotículas intracelulares. Essas gotículas acumuladas, produzem uma mancha de óleo e exibem uma marcação em vermelho. A cor vermelha indica a presença de lipídios.

A diferenciação condrogênica foi avaliada por meio da coloração azul de Alcian. Após 2 semanas de indução as culturas de FBs e PAs exibiram uma mudança radical no padrão de crescimento e formação de nódulos e sulcos com uma alta densidade de células e matriz extracelular. Através da coloração com azul Alcian, a matriz extracelular mostrou ser composta por glicose-amino-glicanos sulfatados, indicando uma síntese contínua de tecido semelhante a cartilagem. FBs induzidas por fatores condrogênicos exibiram uma coloração mais intensa em comparação com PAs. Células controle não induzidas mantiveram seus fenótipos durante todo o experimento e não marcaram positivamente com azul alcian em todas as avaliações. A coloração azul alcian foi mais evidente em áreas com alta densidade celular.

Os resultados da diferenciação osteogênica após 2 semanas de cultura de FBS e PAs induzidos com meio de indução osteogênico exibiram aglomerados com elevada densidade celular e grandes quantidades de matriz extracelular com marcação positiva para alizarina vermelha.

A avaliação por citometria de fluxo das populações de fibroblastos e preadipócitos apresentaram expressão (> 95%) para os marcadores CD73 e CD105 e CD90 mostraram nenhuma expressão (<5%) para os marcadores CD14, CD34 e CD45.ALP

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada através de uma curva fotométrica com base em p-nitrofenol e indicou a presença de proteína no sobrenadante. A atividade da FAL foi estatisticamente significativa quando comparados os grupos controle (FBs e PAs) em relação aos grupos que receberam estímulo osteogênico (Fb Osteog e Preadp Osteog) em todos os pontos de avaliação e sendo que todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa da atividade entre o primeiro e o último ponto de avaliação. (*: P <0,05)

A quantidade de OC no sobrenadante foi medida por teste ELISA. A quantidade de OC foi avaliada em meio de cultura de FBs e PAs após 7, 14 e 21. Quantidade significativa foi representada para Fb Fb Osteog vs Controle e Preadp OsteoG. Vs Preadp grupos de controle em todos os pontos de avaliação e aumento significativo da quantidade era representada para Fb OsteoG e grupos Preadp OsteoG entre o primeiro e o último ponto de avaliação. (*: P <0,05)

A expressão RANKL O gene alvo aqui estudados tinham valores de expressão , com os valores de amplificação detectáveis (QC) apenas quando as células foram cultivadas em meios osteogênicos, em todos os pontos. Reações de genes normalizadora produziram valores mais baixos de QC. As amostras de controle negativo não

amplificaram. Células não tratadas exibiram valores indetectáveis ou muito baixos de expressão RNAm RANKL. As células tratadas sobre expressaram RANKL.

Resultados

Diferenciação Adipogênica

Diferenciação adipogênica foi avaliada utilizando Oil Red O. Após 2 semanas de indução adipogênica as células nas culturas FB e PA adotaram uma forma mais arredondada e exibido gotículas intracelulares. Estas gotículas foram marcadas pelo Oil Red O indicando ser de origem lipídica .

Diferenciação Condrogênica

Diferenciação condrogênica foi avaliada por meio da coloração azul de Alcian. Após 2 semanas de indução em FBs e PAs exibiram uma mudança radical no padrão de crescimento e formação de nódulos e sulcos com uma alta densidade de células e matriz extracelular. Através da coloração com azul de Alcian, a matriz extracelular mostrou ser composta por sulfatados glicaminoglicanos, indicando uma síntese contínua de tecido de cartilagem semelhante. FBs induzidos por meio de cultura condrogênica exibiram uma coloração mais intensa em comparação com PAs. Células controle não induzidas mantiveram seus fenótipos durante todo o experimento e não marcaram positivamente com azul de Alcian em todas as avaliações.

Diferenciação Osteogênica

Após 2 semanas de cultura, FBS e PAs induzidas com meio de indução osteogênica exibiram agrupamentos com alta densidade celular e grandes quantidades de matriz extracelular. Sendo marcadas positivamente pela Alizarina Vermelha.

Análise por citometria de fluxo

As populações de fibroblastos e adipócitos avaliados apresentaram expressão (> 95%) para o CD73 e os marcadores CD105 e CD90 e não mostraram expressão (<5%) para os marcadores CD14, CD34 e CD45.

Atividade da Fosfatase Alcalina (FAL)

A atividade da FAL foi avaliada através de uma curva fotométrica baseada em p-nitrofenol e indicou a presença da proteína no sobrenadante.

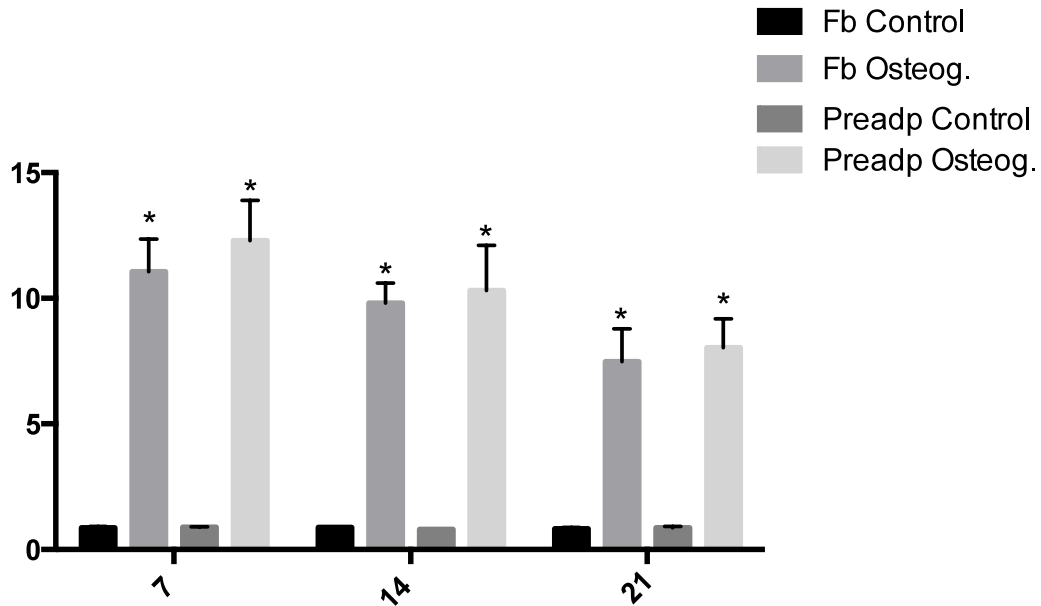


Figura1. Atividade de ALP em meio de cultura de FBS e PAs após 7, 14 e 21 dias. Cada barra representa a média \pm DP das células em triplicata.

Quantidade de Osteocalcina

A quantidade de osteocalcina foi mensurada por um teste ELISA

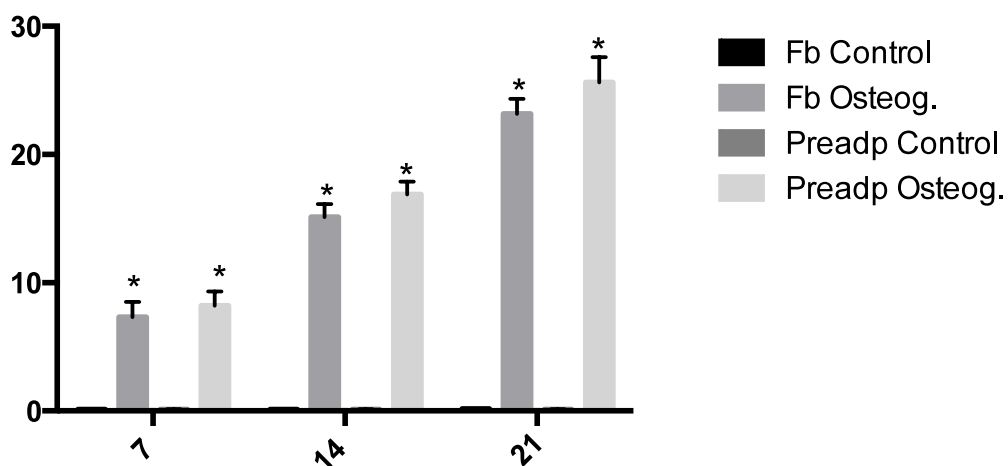


Figura 2. Quantidade de OC em meio de cultura de FBS e PAs após 7, 14 e 21 dias. Cada barra representa a média \pm DP das células em triplicata.

Expressão RANKL

O gene alvo aqui estudados tinham valores de expressão, com valores de amplificação detectáveis (QC) apenas quando as células foram cultivadas em meios osteogénicos, em todos os pontos. Reações normalizadoras de genes produziram valores mais baixos de QC. As amostras de controle negativo não amplificaram.

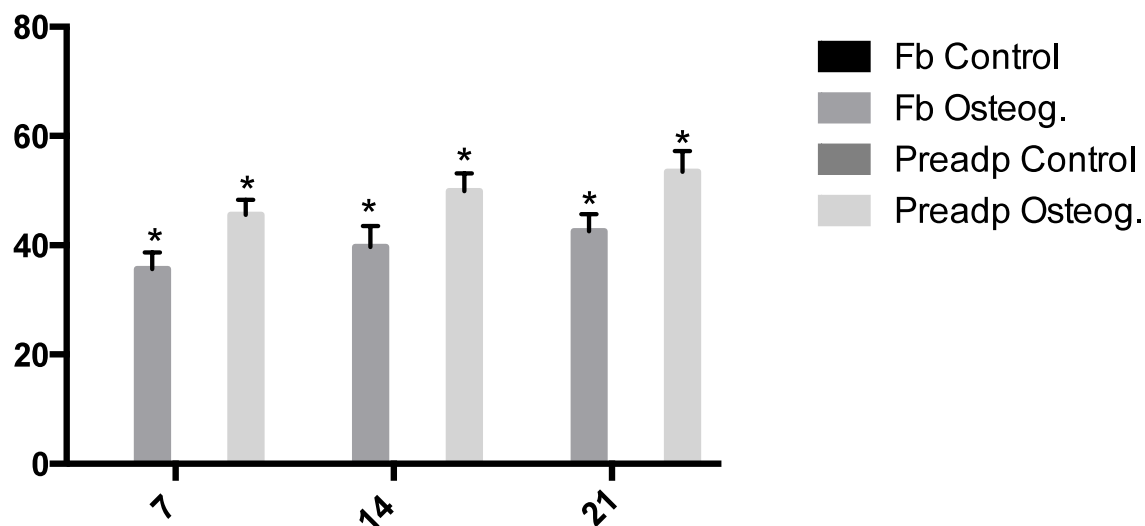


Figura 3. Cada barra representa a média \pm DP das células em cada poço em triplicata..

Análise Estatística

Os dados foram expressos em média \pm DP. A significância estatística foi determinada pelo teste de ANOVA one-way com comparações múltiplas de Turkey, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo

Discussão

Uma fonte apropriada de células, embora melhorado com a utilização de suportes biocompatíveis é muitas vezes um fator limitante na reconstrução de tecidos. Uma alternativa interessante, é a utilização de células mesenquimais adultas a partir de tecidos autólogos obtidos por meio de técnicas específicas envolvendo diferenciação celular (O'Brien 2010 MOSTAFA et al. 2011). A ideia é a se conseguir o fornecimento necessário, evitando os problemas associados com a rejeição dos procedimentos de enxertia e tratamento imunossupressor subsequente. Atualmente, esses métodos só foram aplicados em pesquisa e ainda são muito limitados, envolvendo apenas alguns

tipos de células e com diferentes graus de sucesso (Lázaro et al, 1995;. HORWITZ et al, 1999; KRAMPERA et al, 2007). Entre os problemas mais comuns que envolvem a cultura de células estão as dificuldades inerentes da cultura de células, a validação dos fenótipos de células diferenciadas, bem como o controle de qualidade de diferenciação.

Os fibroblastos (FBs) podem ser obtidos através de pequenas biópsias de pele, com fácil expansão, utilizando procedimentos padrão, e rotineiramente usados em laboratório. Fibroblastos dérmicos podem ser induzidos a se diferenciar para adipócitos (ADP), osteoblastos (OB) e condrócitos (CO), utilizando meios de indução definidos (TOMA et al, 2001; BARSCHT et al, 2005; LORENZ et al, 2008;. JUNKER et al, 2010; Sommar et al, 2010, Rakar et al 2012), mas até então, não existe nenhuma informação se estas células diferenciadas podem produzir fatores de transcrição como RUNX-2 ou RANKL. Estas características tornam os FB candidatos para uso em aplicações de engenharia de tecidos. No entanto, a classificação biológica atual do FB ainda é ambígua (SORREL & Caplan, 2009).

Fenótipos celulares são indiretamente definidos pelo seu padrão específico de expressão de genes que regulam a diferenciação e envolvem a passagem de um padrão de expressão gênica para outro (BEN-tabou de-LEON e DAVIDSON, 2007). Alguns fatores de transcrição incluídos em nossa análise, são necessários para o desenvolvimento de tecidos específicos e controlam o fenótipo. (LANDER et al, 2001;. PEI, 2009).

Nos últimos anos, pré-adipócitos (PAs) tem sido propostos como uma nova fonte de células mesenquimais adultas autólogas (ZUK et al, 2001,2002,... HEYDARKHAN-HAGVALL et al, 2008) O potencial de diferenciação de fibroblastos (FBS) parece ser tão potente quanto PAs, pelo menos no caso da indução condrogênica e osteogênica. No caso de diferenciação adipogênica, PAs estimulados com fatores adipogênicos apresentaram maior número de células marcadas positivamente ao usar o Oil Red O. Estes resultados podem ser explicados pelo evidente predisposição primária dos PAs.

Durante os últimos anos, tem havido um intenso debate sobre os mecanismos por trás do fenômeno da plasticidade das células-tronco e há uma variedade de diferentes hipóteses sobre o assunto (EISENBERG & Eisenberg, 2003; JIN & Greenberg, 2003; CAMARGO et al. , 2004).

Em nosso estudo, pudemos demonstrar de que existe uma subpopulação de células multipotentes nos tecidos coletados, observando-se três características básicas de acordo com o recomendado pela Society for Cellular Therapy: adesão celular; marcação de superfície e análise da diferenciação celular em três linhagens diferentes de células.

A análise por citometria de fluxo realizada nos FBs e PAs revelou um conjunto de marcadores CD expressos em ambos os tipos de células. CD14, CD34 e CD105 não foram expressos e os marcadores CD73, CD90 e CD105 foram expressos da mesma em mesmo grupo de células e esses marcadores têm sido utilizados em outros estudos com foco em células-tronco adultas a partir de vários tecidos (Pittenger et al., 1999; Young et al, 1999;. ZUK et al, 2002; BARTSCH et al, 2005, Bydlowski et al, 2009).

A adição de ácido ascórbico, β -glicerofosfato, e dexametasona parece ser necessária para a diferenciação dos osteoblastos de fibroblastos dérmicos humanos. HEE et al. (2006). demonstraram que estes três suplementos são mais eficazes na indução da expressão de marcadores osteogênicos quando utilizados simultaneamente. Embora o emprego de um meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB) proporciona um ambiente favorável para a diferenciação celular de células da linhagem óssea, em nossos experimentos, usamos 7% SFB e não afetou os resultados.

Neste estudo pelo nossos resultados observou-se que o comportamento da atividade de FAL, tanto no grupo e no grupo Fb OsteoG e Preadp OsteoG foi o mesmo, com um decréscimo gradual e significativo entre o sétimo e vigésimo primeiro dias da cultura, demonstrando que tanto fibroblastos quanto preadipocitos produziram FAL após 7 dias de cultura em meio osteogênico, como seria de esperar de uma diferenciação celular osteoblástica na primeira fase. Os grupos controle (sem estímulo) não produziram ou produziram níveis muito baixos de atividade de FAL, demonstrando que FBS e PAs sem estímulo do meio de cultura não assumiram características de osteoblastos.

Em relação à quantidade de OC os grupos Fb OsteoG e Preadp OsteoG tiveram um aumento significativo entre o sétimo e vigésimo primeiro dias da cultura, no entanto, não houve diferença entre esses grupos. Os grupos controles Fb Controle e Preadp Controle não exibiram quantidades significativas de OC. Este comportamento foi semelhante ao das células osteogênicas originais e a demonstração de que não foi produzida OC nas células sem estimulação.

Tem sido atribuído a vários tipos de células a expressão do RNAm do fator de transcrição RANKL esta lista de células inclui tanto os linfócitos T e B (Whoo et al. 1.997, Kanematsu et al. 2000), células epiteliais mamarias (Atfa et al. 2,000), queratinócitos, as células endoteliais vasculares (Collin-Osbody 2001), fibroblastos sinoviais (Gravallese et al. 2,000), as células no tecido periodontal (Han, Kawai & Taubman 2000), os condrócitos hipertróficos (Lacey et al. 1998), bem como células precursoras dos osteoblastos, osteoblastos maduros e osteócitos. As evidências circunstanciais extensas sugerem que as células da linhagem dos osteoblastos são uma importante fonte da RANKL a qual estimula a formação dos osteoclastos.

Em nosso estudo, houve uma expressão significativa do RNAm/RANKL nos grupos FB OsteoG e Preadp OsteoG maior entre os sétimo e vigésimo primeiro dia de cultura e não houve diferença nos valores expressos entre estes mesmos grupos e não houve expressão de RANKL nos grupos controle Preadp Controle e Fb Controle, isto parece corroborar o fato de que células em proliferação podem expressar fatores osteogênicos quando estimulado em meio de cultura específico.

Ainda há muito a ser aprendido sobre a capacidade dos fibroblastos normais da derme humana FBs para mudar seu fenótipo. A plasticidade celular inerente dos FBs humanos tem sido estudada por outros grupos e os nossos resultados fornecem mais uma prova para esta afirmação (Young et al, 1995;Toma et al, 2001;. Bartsch et al, 2005;. Chen et al, 2007; Takahashi et al, 2007; Lowry et al, 2008). Futuros estudos com foco em outras linhagens celulares podem mostrar quão extenso é o potencial de diferenciação dos FB. Estudos que incidem sobre a estabilidade da mudança fenotípica após a indução, tanto in vitro e in vivo, são necessários. No entanto, os resultados aqui apresentados, mostram que um dos tipos celulares mais básicos no corpo humano pode diferenciar-se em pelo menos outros três tipos de células diferentes.

Conclusão

FBS e PAs mostraram a presença, mas sem diferença estatística, de marcadores osteoblasticos e revelaram expressão de RANKL quando estimulados por fatores osteogênicos no meio de cultura. Não encontramos marcadores osteoblásticos ou expressão RANKL em ambos os grupos controle.

Literatura Citada

Vacanti CA, Kim W, Vacanti D, Mooney B, Vacanti JP. Tissue engineered growth of bone and cartilage. *Transplant Proc.* 1993;25(1):1019-21

Tholpady SS, Freyman TF, Debiie C, Ogle RC. Tensional Forces Influence Gene Expression and Sutural State of Rat calvariae In Vitro. *Plast Reconstr Surg.* 2007;120:601-11

Vlasselaer P, Borreman B, Gorp U. Interleukin 10 inhibits transforming growth factor- β synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol.* 1994;124(4):569-77

Reys JM, Fermanian S, Yang F, Zhou S, Herretes S, Murphy DB, Elisseff JH & Chuck RS. Metabolic changes in mesenchymal stem cells in osteogenic medium measured by autofluorescence spectroscopy. *Stem Cells.* 2006;24:1213-17

Chen G, Sato T, Ohgushi H, Ushida T, Tateishi T, Tanaka J. Culturing of skin fibroblasts in a thin PLGA-collagen hybrid mesh. *Biomaterials.* 2004;26:2559-66

Reddi AH & Huggins C. Biochemical sequences in the transformation of normal fibroblasts in adolescents rats. *PNAS.* 1972;69(6):1601-5

Junker JP, Sommar P, Skog M, Johnson H, Kratz G. Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of clonally derived human dermal fibroblasts. *Cells Tissues Organs.* 2010;191:105–118.

Rakar J, Lonquist S, Sommar P, Junker J and Kratz G. Interpreted gene expression of human dermal fibroblasts after adipo-chondro and osteogenic phenotypic shifts. *Differentiation.* 2012;84:305-13

Entenmann G & Hauner H. Relationship between replication and differentiation in cultured human adipocyte precursor cells. *Am J Physiol.* 1996;270:1011–6.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999;284:143–7.

O'Brien CA. Control of RANKL gene expression. *Bone*. 2010;46(1):911-19

Kutt H & Tsaltas TT. Staining properties of oil red O and a method of partial purification of the commercial product. *Clin Chem*. 1959;5: 149–160.

Mason RM. Observations on the glycosaminoglycans of aging bronchial cartilage studied with Alcian Blue. *Histochem J*. 1971;3:421–34.

Goldstein DJ & Horobin RW. Surface staining of cartilage by Alcian blue, with reference to the role of microscopic dye aggregates in histological staining. *Histochem J*. 1974; 6: 175–184.

Mostafa NZ, Vludag H, Varkey M, Dederich DN, Doschak MR and El-Bialy TH. In vitro osteogenic induction of human gingival fibroblasts for bone regeneration. *The Open Dentistry Journal*. 2011;139-45

Magnusson P & Farley JR. Differences in sialic acid residues among bone alkaline phosphatase isoforms: a physical, biochemical, and immunological characterization. *Calcif Tissue Int*. 2001; 71: 508–518.

Lazarus HM, Haynesworth SE, Gerson SL, Rosenthal NS, Caplan AI. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for the reparative use. *Bone Marrow Transpl*. 1995;16:557–64.

Krampera M, Franchini M, Pizzolo G, Aprili G. Mesenchymal stem cells: from biology to clinical use. *Blood Transf*. 2007;5:120–129.

Sommar P, Pettersson S, Ness C, Johnson H, Kratz G, Junker JP. Engineering three-dimensional cartilage- and bone-like tissues using human dermal fibroblasts and macroporous gelatin microcarriers. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2003;63:1036–46.

Bydlowski SP, Debes AA, Maselli LM and Janz FL. Características biológicas das células tronco mesenquimais. *Rev Bras Hematol e Hemater*. 2009;31(1):25-35

Toma, JG, Akhavan M, Fernandes KJ, Barnabe- Heider F, Sadikot A, Kaplan DR, Miller FD. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat Cell Biol.* 2001;3: 778–784.

Hee C, Jonokas MA & Nicoll SB. Influence of three dimensional scaffold on the expression of osteogenic markers by human dermal fibroblasts. *Biomaterials.* 2006;27:875-84

Bartsch G, Yoo JJ, De Coppi P, Siddiqui MM, Schuch G, Pohl HG, Fuhr J, Perin L, Soker S, Atala A. Propagation, expansion, and multilineage differentiation of human somatic stem cells from dermal progenitors. *Stem Cells and Dev.* 2005;14:337–348.

Lorenz K, Sicker M, Schmelzer E, Rupf T, Salvetter J, Schulz-Siegmund M, Bader A. Multilineage differentiation potential of human dermal skin-derived fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2008;17:925–32.

Sorrell, JM. & Caplan, AI. Fibroblasts—a diverse population at the center of it all. *International Rev Cell Mol Bio.* 2009;276:161–214.

Ben-Tabou de-Leon, S., Davidson, E.H. Gene regulation: gene control network in development. *Ann Rev Bio Biomol Struct.* 2007;36:191-202

Lander, E.S. et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature.* 2001; 409: 860–921.

Pei, D .Regulation of pluripotency and reprogramming by transcription factors. *J Biol Chem.* 2009;284:3365–69.

Zuk, PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13: 4279–4295.

Zuk, PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2007; 7: 211–228.

Heydarkhan-Hagvall, Schenke-Layland SK, Yang JQ, Heydarkhan S, Xu Y, Zuk PA, MacLellan WR, Beygui RE. Human adipose stem cells: a potential cell source for cardiovascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs*.2008; 187: 263–274.

Eisenberg LM & Eisenberg CA. Stem cell plasticity, cell fusion, and transdifferentiation. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003; 69: 209–218.

Jin K & Greenberg DA. Tales of transdifferentiation. *Exp Neurol*. 2003;183: 255–257.

Camargo, F.D., S.M. Chambers, M.A. Goodell. Stem cell plasticity: from transdifferentiation to macrophage fusion. *Cell Prolif*. 2004; 37: 55–65.

Stein GS and Lian JB. Molecular mechanisms mediating developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts: an integrated relationship of cell growth and differentiation. In: Noda M, editor. *Cellular and molecular biology of bone*. Tokyo: Academic Press. p 47–95, 1993.

Kasperk C, Wergedal J, Strong D, Farley J, Wangerin K, Gropp H, Ziegler R, Baylink DJ. Human bone cell phenotypes differ depending on their skeletal site of origin *J Clin Endocrinol Metab*. 1995;80(8): 2511-7

Kostenuik PJ, Halloran BP, Morey-Holton ER, Bikle DD..J. Skeletal unloading inhibits the in vitro proliferation and differentiation of rat osteoprogenitor cells. *Am J. Physiol*. 1997; 273:E1133

Kostenuik PJ, Harris J, Halloran BP, Turner RT, Morey-Holton ER, Bikle DD. Skeletal unloading causes resistance of osteoprogenitor cells to parathyroid hormone and to insulin-like growth factor-I. *J. Bone Miner. Res*. 1999;3:14,-21

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–76.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. PNAS. 1998;95:3597–602.

Woo BR, Rho J, Arron J, Robinson E, Orlinick J, Chao M, et al. TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. J Biol Chem 1997;272:25190–4

Kanematsu M, Sato T, Takai H, Watanabe K, Ikeda K, Yamada Y. Prostaglandin E-2 induces expression of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand/osteoprotegerin ligand on pre-B cells: Implications for accelerated osteoclastogenesis in estrogen deficiency. J Bone Miner Res 2000;15:1321–9

Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, Elliott R, Scully S, Voura EB, Lacey DL, Boyle WJ, Khokha R, Penninger JM., Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. Cell. 2000;103:4:1–50

Loser K, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S, Schwarz T, Penninger JM, Beissert S, Mehling A, Loeser S, Apelt J, Kuhn A, Grabbe S. Epidermal RANKL controls regulatory T-cell numbers via activation of dendritic cells. Nat Med 2006;12:1372–9.

Collin-Osdoby P, Rothe L, Anderson F, Nelson M, Maloney W, Osdoby P. Receptor activator of NFkappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. J Biol Chem 2001;276:20659–72.

Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. Arthritis & Rheum 2000;43:250–8.

Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontol.* 2007;45:76–94.

Kartsogiannis V, Zhou H, Horwood NJ, Thomas RJ, Hards DK, Quinn JMW, Localization of RANKL (Receptor activator of NF kappa B ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskelatal tissues. *Bone* 1999;25:525–34

Silvestrini G, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monnazzi P, Tremante E, Sardella D, Bonucci E, Ballanti P, Patacchioli F, Leopizzi M, Gualtieri N, Monnazzi P. Detection of osteoprotegerin (OPG) and its ligand (RANKL) mRNA and protein in femur and tibia of the rat. *J Mol Histol.* 2005;36:59–67.

Ikeda T, Utsuyama M, Hirokawa K. Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand, receptor activator of nuclear factor kappa B, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. *J Bone Miner Res* 2001;16:1416–25.

Guenther HL, Hofstetter W, Stutzer A, Muhlbauer R, Fleisch H. Evidence for heterogeneity of the osteoblastic phenotype determined with clonal rat bone cells established from transforming growth factor-beta-induced cell colonies grown anchorage independently in semisolid medium. *Endocrinol.* 1989;125:2092–102

Kalajzic I, Staal A, Yang WP, Wu Y, Johnson SE, Feyen JH, et al. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J Biol Chem* 2005;280:24618–26.

Corral DA, Amling M, Priemel M, Loyer E, Fuchs S, Ducky P, et al. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *PNAS* 1998;95:13835–40

Young, H.E., M.L. Mancini, R.P. Wright, J.C. Smith, A.C. Black, Jr., C.R. Reagan, P.A. Lucas. Mesenchymal stem cells reside within the connective tissues of many organs. *Dev Dyn.* 1995; 202: 137–144.

Chen, F.G., W.J. Zhang, D. Bi, W. Liu, X. Wei, F. F. Chen, L. Zhu, L. Cui, Y. Cao (2007) Clonal analysis of nestin(-) vimentin(+) multipotent fibroblasts isolated from human dermis. J Cell Sci. 2007; 120: 2875–83.

Takahashi, K., K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. Cell. 2007 131: 861–872.

Lowry, W.E., L. Richter, R. Yachechko, A.D. Pyle, J. Tchieu, R. Sridharan, A.T. Clark, K. Plath. Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts. PNAS. 2008: 105: 2883–8.

3. Produção Científica Vinculada

Paralelamente aos experimentos descritos acima foi possível desenvolver também um outro projeto: “Utilização de células tronco derivadas da medula óssea e do tecido adiposo associadas ao enxerto xenógeno na reparação de defeitos ósseo críticos na calvária de coelhos”. Este projeto tem como objetivo verificar a ação de células tronco da medula óssea e derivadas do tecido adiposo em um modelo de regeneração óssea já consagrado pela literatura o qual envolve o enxerto ósseo xenógeno com e sem cobertura de uma membrana de colágeno também xenógena. Os resultados esperados irão contribuir para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a utilização da terapia celular na regeneração óssea.

Descrição dos estudos sendo desenvolvidos neste projeto:

1. Uso de Bio-Oss integrado com concentrado de células da medula óssea em enxertos aposicionais na calvária de coelhos “Rafael de Mello e Oliveira” MESTRADO.
2. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo associadas a enxerto xenólogo na regeneração óssea da calvária de coelhos “Allan Zimmerman” DOUTORADO
3. Enxerto Ósseo Xenógeno Associado a medula óssea in natura na regeneração tecidual de calvaria de coelhos “Marcelo de Oliveira e Silva” MESTRADO

4. Células tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo na distração osteogênica de mandíbulas de coelhos pós radiação ionizante “Marcelo Melo” DOUTORADO

4. Publicações Relacionadas

VIII.1 Xenograft enriched with autologous bone marrow in inlay reconstructions: a tomographic and histomorphometric study in rabbit calvaria. de Oliveira E Silva M, Pelegriane AA, Alves Pinheiro da Silva A, Manhães Júnior LR, de Mello E Oliveira R, Gaiba França S, Aloise AC, Ferreira LM. Int J Biomater. 2012;2012:170520. doi: 10.1155/2012/170520. Epub 2012 Aug 29.

VIII.2 Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. Pelegriane AA, Aloise AC, Zimmermann A, de Mello E Oliveira R, Ferreira LM. Clin Oral Implants Res. 2014 May;25(5):567-72. doi: 10.1111/clr.12117. Epub 2013 Mar 6

VIII.3 Xenograft Impregnated with Bone Marrow Mononuclear Fraction for Appositional Bone Regeneration in Rabbit Calvaria: A Clinical and Histomorphometric Study . Oliveira RM, Pelegriane AA, Aloise AC e Ferreira LM. JOMI 2014;29(4): 190-7

5. Artigos enviados para publicação

IX.1 Comparison between human dermal fibroblasts and preadipocytes as a cell source for potential application in bone tissue engineering. Aloise AC, Gaiba S, França J, Ferreira LM

“Dear Dr. Antonio Aloise, Thank you for submitting your manuscript, "Comparison between human dermal fibroblasts and preadipocytes as a cell source for potential application in bone tissue engineering", to Calcified Tissue International and Musculoskeletal Research During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site: <http://ctin.edmgr.com/> Your username is: Aloise AC Your password is: XXXXXXXX With kind regards, Journals

Editorial Office CTIN Springer Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't have to do anything, we would like to let you know about your upcoming options

XI.2 Repair of critical size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Use of bone marrow stem cells or autogenous bone. Aloise AC, Oliveira RM, Pelegrine AA, Ferreira LM

Dear Prof. Aloise: Your manuscript entitled "Repair of critical size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria: Use of bone marrow stem cells or autogenous bone" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Clinical Oral Implants Research. Your manuscript ID is COIR-Mar-14-OR-4030. Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/coir> and edit your user information as appropriate. You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <http://mc.manuscriptcentral.com/coir>. Thank you for submitting your manuscript to Clinical Oral Implants Research. Sincerely, Clinical Oral Implants Research Editorial Office



ANEXO XI

Relatório de Cumprimento do Objeto

RELATÓRIO FINAL

RELATÓRIO PARCIAL

Nome do Beneficiário: Lydia Masako Ferreira	Período a que se refere o Relatório: De: 1/12/2011 a 1/7/2014
Auxílio nº: 007243/2011-16	
Instituição Vinculada: UNIFESP	

1. RESULTADOS ALCANÇADOS

1.1- Descrição dos resultados

O isolamento e cultura de fibroblastos dérmicos humanos foi realizado a partir de fragmentos de pele descartados de procedimentos operatórios da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. O material coletado foi imediatamente imerso em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY, EUA) para o transporte até o laboratório de cultura de células da Disciplina de Cirurgia Plástica, e mantido à temperatura de 4°C, sendo manipulado nas 6 horas subsequentes. As placas foram mantidas em incubadora a 37°C, umidificadas numa mistura gasosa de 95% de ar e 5% de dióxido de carbono, por cerca de 15 dias, tempo esse para a migração dos fibroblastos provenientes dos fragmentos para a placa de cultura. Com a pré-confluência, serão realizadas novas passagens dos fibroblastos para novas garrafas. Ao atingir a quarta passagem, as células serão utilizadas nos procedimentos ou congeladas em nitrogênio líquido para utilização posterior. Apenas células entre a quarta e a nona passagem serão utilizadas nos experimentos. Para obtenção da cultura primária de adipócitos humanos a amostra de tecido foi transferida para um frasco estéril contendo solução salina balanceada Hank's (HBSS) com 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e levado imediatamente ao laboratório de Cultura de Células da Disciplina de Cirurgia Plástica da UNIFESP. Foram utilizados dois tipos de meio de cultura, o primeiro tipo de meio será constituído do meio EAGLE modificado por DULBECCO (DMEM) (alta taxa de glicose [4,5 g/L], L-glutamina [584 mg/L], piruvato de sódio [110 mg/L]), com soro fetal bovino a 20% (suplementado com ferro), e Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml - 100µg/ml) e tamponado com bicarbonato de sódio (1N). O pH da solução é ajustado para 7,2, sendo denominado de meio básico. O segundo tipo de meio foi constituído do meio básico (DMEM) com soro fetal bovino a 20% (suplementado com ferro), e Penicilina/Estreptomicina (100 UI/ml - 100µg/ml) e tamponado com bicarbonato de sódio (1N) acrescido de 0,5µg/ml de ácido ascórbico, 10 mmol/L β glicerofosfato e 10nmol/L Dexametasona, sendo denominado de meio osteogênico (BELOTI & ROSA 2005, COELHO & FERNANDES 2007a,b) Os experimentos foram realizados em triplicata, sendo utilizadas placas de 12 poços e uma densidade de células por poço de 1,00x10⁶ células e com 2ml de meio por poço, sendo assim formados os grupos distribuídos pelo tipo de meio e momento de avaliação : As placas foram cultivadas por um total de 21 dias, sendo as avaliações realizadas no sétimo e vigésimo primeiro dia após a semeadura das células, e a troca do meio de cultura das células sfoi realizada a cada 48 horas.

AVALIAÇÃO CITOQUÍMICA DAS CÉLULAS Em cada ponto do estudo, sétimo, décimo e vigésimo primeiro e dia, o meio foi removido das placas e congelado e as células fixadas em formaldeído a 4% para a avaliação citológica.

CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO ADULTAS CITOMETRIA DE FLUXO Fibroblastos e pré-adipócitos da terceira passagem foram utilizados para a caracterização imunofenotípica. As células foram tripsinizadas e a suspensão celular



foi centrifugada (100 g, 6 min). As células foram coradas com anticorpos conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofococianina (APC) ou ficoeritrina (PE): CD14-FITC, CD16-PE, CD31-FITC, CD34-APC, CD44-APC, CD45-FITC, CD73-PE, CD90-APC, CD105 e CD117-PE-APC (BD Biosciences, EUA). Um total de 5×10^5 células foram ressuspensas em 0,2 ml de PBS e incubadas com os anticorpos FITC-, PE-ou APC-conjugado, durante 20 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Goiaba easyCyte, Millipore), para identificação de determinados canais de fluorescência de cada um dos anticorpos.

ENSAIOS DE DIFERENCIAÇÃO

Diferenciação adipogênica Para a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP®) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 μ M insulina e 1 μ M de dexametasona (Sigma Aldrich®) por 15 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após será utilizado 2 ml de uma solução fixadora de paraformaldeído 0,4% em PBS (Electron Microscopy Sciences). Após 30 minutos a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com 0,5% de corante Oil Red O (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 min. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1 μ g/ml do corante (4',6-diamidino-2 fenilindole), dihidrocloride (DAPI) (Sigma Aldrich®) em PBS (0,1% de BSA (Sigma Aldrich®) e 0,2 % de saponina, Calbiochem®) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2 (Nikon Instruments INC, New York).

Diferenciação osteogênica Para diferenciação osteogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 50 μ M de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®), 0,1 μ M de dexametasona e 10-2M de β glicerofosfato (BAKER ANALYZED™ Reagent) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após foi utilizado 2 ml de uma solução fixadora paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 minutos a solução fixadora será removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 min e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de 40 mM de alizarina vermelha sódica (pH 4.1) (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A seguir, as células foram incubadas com 1 μ g/ml do corante DAPI em PBS (0,1% de BSA e 0,2 % de saponina) por 2 minutos e as células foram novamente lavadas três vezes em PBS. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - 3.2.

Diferenciação condrogênica Para diferenciação condrogênica, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (TPP) contendo 2 ml de meio de cultura DMEM/F12 completo suplementado com 10 μ M insulina, 0,1 μ M de dexametasona, 50 μ M de ácido ascórbico e 10ng/ml TGF- β 1 (Cell Signaling Technology®) por 21 dias, sendo então mantidas em incubadora úmida a 37° C e 5% de CO₂ e o meio de cultura trocado a



cada 3 dias. Após esse período, o meio foi removido por sucção e as células lavadas duas vezes com PBS. Imediatamente após será utilizado 2 ml de uma solução fixadora formalina 0,4% em PBS paraformaldeído 0,4% em PBS. Após 30 min a solução fixadora foi removida por sucção e as células lavadas três vezes com PBS como descrito a seguir: uma vez em PBS contendo 0,1 M de glicina por 10 minutos e duas vezes apenas em PBS por 2 minutos. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução 0,1% de azul de Toluidina (Sigma Aldrich®) a temperatura ambiente por 30 minutos. A solução corante foi removida cuidadosamente com auxílio de uma pipeta descartável de 2 ml e lavada 5 vezes com 2 ml de água corrente para retirar o excesso de corante. A placa com as células fixadas e coradas foram observadas no microscópio de epifluorescência Nikon Ti-U e fotografadas utilizando o Software NIS-Elements - Atividade de Fosfatase Alcalina (FAL) O meio de cultura foi removido das placas de cultura e submetidas a leituras da atividade de fosfatase alcalina, com o Kit QuantiChrom® de Ensaio de Fosfatase Alcalina (DALP-250) (Bioassay Systems, CA, EUA). Uma medição direta da atividade da fosfatase alcalina no sobrenadante foi realizada utilizando fosfato de p-nitrofenil, o qual é hidrolisado pela fosfatase alcalina, a produção de uma substância amarela, com um máximo de absorção de 405 nm, em que a intensidade da reação é proporcional à atividade de a enzima. Para isto, 200 microlitros de água destilada e 200 mL (Kit) foram transferidos para uma placa de 96 poços, 50 mL do meio a ser analisado foi transferido para outros poços, e 150 microlitros da solução de trabalho (Kit) foi transferida para os poços que contêm o meio. O montante final da solução em cada poço foi de 200 mL. Depois de fechar suavemente a tampa da placa, sem misturar, a solução foi lida por um espectrofotômetro (Multiskan, CA, EUA) a 405 nm. Quatro minutos mais tarde, a placa foi novamente lida para obter uma curva da atividade de fosfatase alcalina Quantidade de Osteocalcina (OC) Em cada ponto de avaliação do presente estudo, o meio de cultura foi removido e submetido a um teste ELISA para uma avaliação quantitativa de osteocalcina. O Kit ELISA para osteocalcina (ZYMED LAB, Inc., CA, EUA) foi utilizado como da seguinte forma: solução 1 continha peroxidase conjugada com anticorpo (HRP-anticorpo). Frasco 2 foi reconstituído com 11 ml de água destilada, misturou-se suavemente durante 10 minutos, com alguns intervalos, evitando a formação de espuma. Solução 2 foi preparada com a solução padrão contendo 16 ng Gla-OC/ml. Frasco 3 foi reconstituído com 1 ml de água destilada. Em seguida, 100 ul da amostra do meio e 100 uL de solução de 2, foram transferidos para uma placa de 96 poços a partir do kit. Após misturar suavemente a solução, a placa foi coberta e mantida à temperatura ambiente durante duas horas. O meio de cultura foi removido e os poços lavados três vezes com 400 ul de solução salina tamponada com fosfato (PBS). Entre cada lavagem, a placa foi colocada em papel estéril para remover completamente o líquido. Em seguida, 100 ul de solução 1 foi adicionada com uma pipeta e incubou-se 1 hora. Após este tempo, a solução foi removida, e os poços foram lavados quatro vezes com PBS. Em seguida, 100 ul de solução de substrato foi adicionada (frasco de 5) e deixada durante 5 minutos. Subsequentemente, 100 mL de solução de interrupção foi adicionado, seguido por agitação suave. A solução foi imediatamente lida por espectrofotometria a 450 nm. A unidade de leitura foi ng/ml. Expressão Gênica do RANKL O RNA foi extraído a partir das células usando o reagente TRIzol (Invitrogen, Foster City, CA) seguindo as instruções do fabricante. O ARN precipitou a partir da fase aquosa foi lavada com etanol a 75%. O RNA foi seco e dissolvido em água isenta de RNase. O RNA total foi em seguida purificado com Qiagen RNeasy MiniKit (Qiagen, Valencia, CA) e submetido a um tratamento com DNase. A quantidade e qualidade do RNA extraído foi avaliada por espectrofotometria utilizando NanoDrop v3.3.0 (NanoDrop Technologies Inc., Rockland, DE). 2.6.2 O cDNA complementar de



DNA (DNAC) foi sintetizado a partir das amostras de RNA através de transcrição reversa, utilizando o Kit de RT2 First Strand (SA Bioscience). A solução de RNA foi misturado com o cocktail RT para a reação de transcrição inversa contendo tampão 4 microlitros BC3 (5XRT tampão 3), 1 microlitro P2 (Primer e controle externo), 2H de RE3 (RT mistura de enzima 3) e 3 ul de RNAase isenta de água. A amostra foi carregada num termociclador durante 15 minutos a 42 ° C durante 5 minutos e 95 ° C. No final da reação de cDNA, diluiu-se com 91 mL de água e armazenado a -20 ° C. 2.6.3 análise de reação qPCR de PCR foram realizadas utilizando um termociclador ABI 7500 FastPCR (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Todas as reações foram otimizadas para cada par de "primers", testando a temperatura de recozimento e número de ciclos adequados. A especificidade das reações de fusão foi confirmada por análise da curva. Para a reação, foram utilizados os seguintes componentes: 12,5 ml de SYBR Green I Quantitect (QIAGEN GmbH), 40 nM de iniciadores (sentido e anti-sentido) e 9,5 mL de água. Nós adicionamos 1 mL de cDNA. Para cada gene foi avaliada uma amostra de água em substituição da solução de cDNA que serve como um controle negativo (NTC) para impedir a contaminação exógena. Nós carregamos um volume total de 25 mL em cada placa qPCR bem. As condições dos ciclos térmicos foram os seguintes: 10 min a 95 ° C, e 40 ciclos de 15 segundos de desnaturação a 94 ° C, 60 de recozimento a 60 ° C e extensão de 30 a 72 ° C. Valores ciclos de quantificação (CQ) foram utilizadas como ponto final definido como o número de ciclos de PCR, em que a fluorescência gerada pela amplificação atravessa o limiar. Três reações de replicados por amostra foram corridos para assegurar a significância estatística. Para análise dos dados, foi utilizado o método comparativo qC (também conhecido como o método 2- $\Delta\Delta C_t$) para calcular as quantidades relativas (QR) de expressão gênica entre as amostras. Sempre que os valores QC excedeu 36 rounds de amplificação (CT), as quantidades foram consideradas indetectáveis ou muito baixas e as medidas foram tomadas como inválidas. A significância estatística foi avaliada através do test-t. Os resultados da diferenciação adipogênica foram avaliados utilizando-se Oil Red O. Após 2 semanas de indução adipogênica as culturas de FB e PA adotaram uma forma mais arredondada e exibiram gotículas intracelulares. Essas gotículas acumuladas, produzem uma mancha de óleo e exibem uma marcação em vermelho. A cor vermelha indica a presença de lipídios. A diferenciação condrogênica foi avaliada por meio da coloração azul de Alcian. Após 2 semanas de indução as culturas de FBs e PAs exibiram uma mudança radical no padrão de crescimento e formação de nódulos e sulcos com uma alta densidade de células e matriz extracelular. Através da coloração com azul Alcian, a matriz extracelular mostrou ser composta por glicose-amino-glicanos sulfatados, indicando uma síntese contínua de tecido semelhante a cartilagem. FBs induzidas por fatores condrogênicos exibiram uma coloração mais intensa em comparação com PAs. Células controle não induzidas mantiveram seus fenótipos durante todo o experimento e não marcaram positivamente com azul alcian em todas as avaliações. A coloração azul alcian foi mais evidente em áreas com alta densidade celular. Os resultados da diferenciação osteogênica após 2 semanas de cultura de FBS e PAs induzidos com meio de indução osteogênico exibiram aglomerados com elevada densidade celular e grandes quantidades de matriz extracelular com marcação positiva para alizarina vermelha. A avaliação por citometria de fluxo das populações de fibroblastos e preadipócitos apresentaram expressão (> 95%) para os marcadores CD73 e CD105 e CD90 mostraram nenhuma expressão (<5%) para os marcadores CD14, CD34 e CD45. ALP A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada através de uma curva fotométrica com base em p-nitrofenol e indicou a presença de proteína no sobrenadante. A atividade da FAL foi estatisticamente significativa quando comparados os grupos controle (FBs e PAs) em relação aos grupos que receberam estímulo



osteogenico (Fb Osteog e Preadp Osteog) em todos os pontos de avaliação e sendo que todos os grupos apresentaram uma diminuição significativa da atividade entre o primeiro e o último ponto de avaliação. (*: $P < 0,05$) A quantidade de OC no sobrenadante foi medida por teste ELISA. A quantidade de OC foi avaliada em meio de cultura de FBs e PAs após 7, 14 e 21. Quantidade significativa foi representar para Fb Fb Osteg.vs Controle e Preadp OsteoG. Vs Preadp grupos de controle em todos os pontos de avaliação e aumento significativo da quantidade era representar para Fb OsteoG e grupos Preadp OsteoG entre o primeiro eo último ponto de avaliação. (*: $P < 0,05$) A expressão RANKL O gene alvo aqui estudados tinham valores de expressão , com os valores de amplificação detectáveis (QC) apenas quando as células foram cultivadas em meios osteogénicas, em todos os pontos. Reações de genes Normalizing produzido valores mais baixos de CQ. As amostras de controlo negativo não amplificar. Células não tratadas exibido valores indetectáveis ou muito baixos de expressão RANKL mRNA. -As células tratadas claramente sobre-regulada expressão RANKL. Não alterar valores vezes pode ser exibido para esse gene, porque o grupo de células tratadas fornece valores QC indeterminadas ou imprecisas. Figura 3. Cada barra representa a média \pm DP de poços em triplicado. Quantidade significativa foi representar para Fb Fb Osteg.vs Controle e Preadp OsteoG. Vs Preadp grupos de controle foi encontrada em todos os pontos de avaliação e não houve diferença significativa entre os grupos Fb OsteoG e Preadp OsteoG durante o período experimental (*: $p < 0,05$).

2- Comentários adicionais: (publicações, teses, dissertações, artigos científicos, citações, congressos, patentes, outros):



Atividades de Ensino e Treinamento: Aulas ministradas: I.1. Tema: Tipos de modelo in vitro / Infraestrutura laboratorial / Cuidados operacionais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora I.2. Tema: Desenvolvimento de Técnicas Minimamente Invasivas e Biomateriais Resistência de biomateriais / Scaffolds / Bioengenharia tecidual / Biocompatibilidade [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora I.3 Tema: Análise crítica de artigos experimentais in vitro e in vivo [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora I.4 Tema: Indicações dos modelos animais. [Curso de Aperfeiçoamento Pesquisa Científica em Cirurgia realizado pela Disciplina de Cirurgia Plástica EPM-Unifesp] Carga Horária: 1 hora. 2.1.2 Treinamento dos Alunos na Cultura de Células: II.1. Angélica Bueno Prado Gomes- Aluna do terceiro ano do curso de ciências biológicas II.2 Tércia A. da Costa Barbosa de Carvalho- Aluna do quarto ano do curso de ciências biológicas II.3 Renata Saito Midori- Graduada em 2009 no curso de ciências biológicas II.4 Camila Russo de Sá- Aluna do quarto ano do curso de biomedicina II.5 Flávia Regina Arantes Ferreira- Aluna do quarto ano do curso de ciências biológicas II.6 Paulo de Tarso - Aluno do segundo ano do curso de medicina II.7 Allan Zimmerman- Graduado em 1987 no curso de medicina II.8 Marcelo Melo- Graduado em 1997 no curso de odontologia II.9 Fábio Schemann Miguel- Graduado em 1988 no curso de odontologia II.10 Delaini Miguel. Graduada em 1989 no curso de odontologia II.11 Marco Mattar. Graduado em 1993 no curso de odontologia II.12 Mateus Abreu. Graduado em 2002 no curso de odontologia 2.1.2 Trabalhos apresentados em congressos e outros eventos III.1 Apresentação de tema livre no Congresso da Associação Brasileira de Ortodontia (2012) com o tema “Terapia Gênica e Celular na Movimentação Ortodôntica” Belo Horizonte.MG III.2 Apresentação oral no evento Plastic Surgery Research Council 59th Annual Meeting com o tema “Repair Of Critical Size Bone Defects Using Bone Marrow Stromal Cells A Histomorphometric study in Rabbits Calvaria” na cidade de New York (USA) entre os dias 7 e 9 de março de 2014 Capítulos de Livro: IV.1 Título: Células Tronco. Capítulo 2 do livro “Células Tronco em Implantodontia” Ano: 2013;Ed. Napoleão São Paulo Brasil IV.2 Título: Metodologia para obtenção da Fração Mononuclear da Medula Óssea, Cultura de Células da Medula e do Tecido Adiposo. Capítulo 3 do livro “Células Tronco em Implantodontia” Ano:2013; Ed. Napoleão São Paulo Brasil Produção Científica Vinculada Paralelamente aos experimentos descritos acima foi possível desenvolver também um outro projeto: “Utilização de células tronco derivadas da medula óssea e do tecido adiposo associadas ao enxerto xenógeno na reparação de defeitos ósseo críticos na calvária de coelhos”. Este projeto tem como objetivo verificar a ação de células tronco da medula óssea e derivadas do tecido adiposo em um modelo de regeneração óssea já consagrado pela literatura o qual envolve o enxerto ósseo xenógeno com e sem cobertura de uma membrana de colágeno também xenógena. Os resultados esperados irão contribuir para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem a utilização da terapia celular na regeneração óssea. Descrição dos estudos sendo desenvolvidos neste projeto: 1. Uso de Bio-Oss integrado com concentrado de células da medula óssea em enxertos aposicionais na calvária de coelhos “Rafael de Mello e Oliveira” MESTRADO. 2. Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo associadas a enxerto xenólogo na regeneração óssea da calvária de coelhos “Allan Zimmerman” DOUTORADO 3. Enxerto Ósseo Xenógeno Associado a medula óssea in natura na regeneração tecidual de calvaria de coelhos “Marcelo de Oliveira e Silva” MESTRADO 4. Células tronco mesenquimais adultas derivadas do tecido adiposo na distração osteogênica de mandíbulas de coelhos pós radiação ionizante “Marcelo Melo” DOUTORADO .



CAPES – COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
CGC 00.889.834/0001-08
Endereço: SBN Quadra 02 Lote 06 Bloco L , CEP 70040-020, Brasília – DF
Anexo XI– Portaria nº 28, de 29 de janeiro de 2010

3- Justificativa:

No período avaliado neste relatório foram desenvolvidas e finalizadas todas as atividades propostas no projeto original.

Assinatura/Carimbo do Executor
(Reitor ou Pró-Reitor de Pós-Graduação ou equivalente)

O BENEFICIÁRIO PODERÁ UTILIZAR OUTROS FORMULÁRIOS OU TEXTOS DESCRITIVOS, DESDE QUE CONTENHAM AS INFORMAÇÕES BÁSICAS NECESSÁRIAS
CONSTANTES DESSE DOCUMENTO

Assunto: Submission Confirmation

De: "CTIN - Editorial Office" <priya.balaji@springer.com>

Data: 04/07/14 15:31

Para: "Antonio Carlos Aloise" <aca.orto@uol.com.br>

Dear Dr. Antonio Aloise,

Thank you for submitting your manuscript,

"Comparison between human dermal fibroblasts and preadipocytes as a cell source for potential application in bone tissue engineering", to Calcified Tissue International and Musculoskeletal Research

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<http://ctin.edmgr.com/>

Your username is: Aloise AC

Your password is: aloise454239

With kind regards,

Journals Editorial Office CTIN

Springer

Now that your article will undergo the editorial and peer review process, it is the right time to think about publishing your article as open access. With open access your article will become freely available to anyone worldwide and you will easily comply with open access mandates. Springer's open access offering for this journal is called Open Choice (find more information on www.springer.com/openchoice). Once your article is accepted, you will be offered the option to publish through open access. So you might want to talk to your institution and funder now to see how payment could be organized; for an overview of available open access funding please go to www.springer.com/oafunding. Although for now you don't