

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA

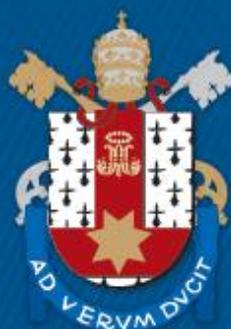
CARINA LANTMANN CABREIRA

**ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NOS  
MECANISMOS PARÁCRINOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS  
ADIPO-DERIVADAS *PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA***

PORTO ALEGRE

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM PRÓTESE DENTÁRIA

CARINA LANTMANN CABREIRA

**ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NOS  
MECANISMOS PARÁCRINOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS  
ADIPO-DERIVADAS *PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA***

PORTO ALEGRE

2019

**CARINA LANTMANN CABREIRA**

**ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NOS  
MECANISMOS PARÁCRINOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS  
ADIPO-DERIVADAS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária, pelo programa de Pós-Graduação da Escola de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

**Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira**

**Co-orientadora: Dra. Patrícia Sesterheim**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). *Código de Financiamento 001.*

PORTO ALEGRE  
2019

## Ficha Catalográfica

C117a Cabreira, Carina Lantmann

Análise in vitro do efeito do ácido hialurônico nos mecanismos parácrinos das células estromais mesenquimais adipo-derivadas para regeneração óssea / Carina Lantmann Cabreira . – 2019.

61 f.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira.

Co-orientadora: Profa. Dra. Patrícia Sesterheim.

1. Engenharia Tecidual. 2. Células Mesenquimais Estromais. 3. Ácido Hialurônico. 4. Comunicação Parácrina. 5. Regeneração Óssea. I. Teixeira, Eduardo Rolim. II. Sesterheim, Patrícia. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Salete Maria Sartori CRB-10/1363

**CARINA LANTMANN CABREIRA**

**ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NOS  
MECANISMOS PARÁCRINOS DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS  
ADIPO-DERIVADAS DIFERENCIADAS EM OSTEÓBLASTOS PARA  
REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Prótese Dentária, pelo programa de Pós-Graduação da Escola de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA:

---

Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira (Orientador) - PUCRS

---

Prof. Dra. Maria Martha Campos - PUCRS

---

Prof. Dra. Adriana Corsetti - UFRGS

PORTO ALEGRE  
2019

Aos meus pais e a Bella,  
com o amor de vocês tudo  
fica mais fácil.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por iluminar meu caminho durante esta caminhada e me permitir alcançar os meus sonhos.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Eduardo Rolim Teixeira**, professor titular de odontologia da PUCRS, pelas prestigiosas orientações recebidas nesta pesquisa, pela confiança, pelo carinho comigo e por tanto contribuir na minha formação acadêmica.

A minha co-orientadora, **Dra. Patrícia Sesterheim**, coordenadora do Centro de Cardiologia Experimental, por toda orientação recebida, por toda sua dedicação e empenho para realização desta pesquisa, pela amizade, pela paciência e pelos ensinamentos. Admiro você pela incrível profissional, pesquisadora e mãe que é.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul**, pela oportunidade de realizar a minha pós-graduação nesta casa.

A **CAPES** *por* me conceder uma bolsa estudos durante estes anos de mestrado, possibilitando a realização desta pesquisa.

A minha amiga, **Roberta Limeira Fulginiti**, por toda colaboração desde o início do trabalho, pela amizade, pelo apoio e incentivo.

Ao meus amados pais, **Sérgio e Marta**, por todo suporte emocional necessário, por todo amor, por nunca medirem esforços em me ajudarem durante todos estes anos de estudo. Mãe obrigada pela sua dedicação e carinho diários comigo. Pai obrigada pelo seu apoio, paciência e compreensão. Amo vocês.

Ao meu noivo, **Eduardo Boero Daudt**, que mesmo a distância durante estes dois anos, esteve sempre disposto a me ajudar no que fosse preciso. Obrigada por sempre me estimular a ser uma profissional de qualidade.

Aos profissionais do **Centro de Cardiologia Experimental e Laboratório 33 do Departamento de Bioquímica da UFRGS**, onde as análises desta pesquisa foram realizadas, sem este apoio esse trabalho não teria acontecido.

Aos meus queridos colegas de trabalho da **UBS Esmeralda** que foram extremamente compreensivos durante esses dois anos de estudo.

As minhas queridas amigas, **Bárbara, Leticia e Gabriela** por estarem sempre dispostas a me escutar. Obrigada pelo carinho, amizade e companheirismo comigo.

Aos meus colegas de Pós-Graduação: **Lucas, Maurício, Fernanda, Renata, Douglas, Kim, Eduardo** obrigada pela parceria nesta caminhada, que todos tenhamos muito sucesso.

Ao **International Team for Implantology (ITI)** pelo apoio financeiro na realização desta pesquisa, por confiar neste estudo para o futuro da implantodontia.

**RESUMO**

A engenharia de tecidos é um campo em crescimento para a regeneração de defeitos ósseos, com potencial para superar as limitações das técnicas de enxertia óssea existente atualmente. As células estromais mesenquimais têm demonstrado grande potencial de uso neste campo devido a sua multipotência. Essas células secretam uma gama de citocinas e fatores de crescimento estimulando células vizinhas no crescimento e reparo dos tecidos. Diversos tipos de matrizes para sustentação das células estromais mesenquimais têm sido desenvolvidos, tendo o uso do ácido hialurônico apresentado resultados promissores.

Desta forma, a presente pesquisa tem por objetivo avaliar *in vitro* a influência da matriz de ácido hialurônico de baixo peso molecular (AH-BP) e de alto e baixo peso molecular (AH-ABP) combinados no mecanismo parácrino das células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo, diferenciadas ou não em osteoblastos.

As células estromais foram isoladas do tecido adiposo de ratos Lewis, expandidas e caracterizadas. Foi realizado o ensaio de citotoxicidade, através do teste MTT para avaliar a viabilidade celular na presença dos ácidos hialurônicos. Para avaliação da dosagem de fatores de crescimento foi realizado o ensaio ELISA. As células na 4ª passagem foram semeadas em placas de 6 poços, em triplicata, cultivadas por 30 dias em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> na atmosfera, e divididas em 6 grupos: (G1) ASC; (G2) ASC + AH-ABP; (G3) ASC + AH-BP; (G4) OSTEO; (G5) OSTEO + AH-ABP; (G6) OSTEO+ AH-BP. As ASCs foram cultivadas em meio completo por 27 dias, nos grupos 2 e 3 foi acrescentado o AH respectivo e mantidas por mais 3 dias. As células OSTEO foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 27 dias, nos grupos 5 e 6 foi acrescentado o AH e mantidas por mais 3 dias.

Os resultados obtidos demonstraram que os maiores valores de secreção de fatores de crescimento ocorreram no grupo das ASCs em meio completo e, destas, quando acrescentado o AH-ABP. Após 27 dias em meio osteogênico, as células diferenciadas em osteoblastos apresentaram valores baixos de secreção dos fatores de crescimento. O uso de AH-BP teve baixa expressão, em relação a osteoindução dos fatores, quando comparado com o uso de AH-ABP. De acordo com os resultados, as células diferenciadas secretaram menos fatores do que as ASCs, com diferença estatística significativa.

A expressão de VEGF, FGF e BMP-2 foram *significativamente* maiores nas ASCs e ASCs+AH-ABP. O fator de crescimento IGF-1 apresentou a sua maior expressão no grupo ASC+AH-BP, com diferença significativa dos demais grupos.

Verificou-se que pareceu ser mais favorável o uso de células indiferenciadas em um futuro composto celular do que o uso dessas células já diferenciadas em osteoblastos. Períodos avançados de diferenciação pareceram levar a redução da osteoindução. A partir deste estudo observamos que a matriz de AH-ABP juntamente com ASCs tem potencial para influenciar positivamente no reparo do tecido ósseo através de uma maior secreção de fatores de crescimento osteogênicos, comparado com o uso da outra matriz de AH-BP.

Palavras-chave: Engenharia Tecidual. Células Mesenquimais Estromais. Regeneração Óssea. Ácido Hialurônico. Comunicação Parácrina.

## ABSTRACT

Tissue engineering is a growing field for the regeneration of bone defects, with potential to overcome the limitations of bone grafting techniques currently available. Mesenchymal stromal cells have demonstrated great potential for use in this field because of their multipotency, these cells secrete a range of cytokines and growth factors stimulating

neighboring cells in tissue growth and repair. Several types of matrices for the support of the mesenchymal stromal cells have been developed, and the use of hyaluronic acid presented promising results.

The present research aimed to evaluate *in vitro* the influence of the matrix of low molecular weight hyaluronic acid (AH-BP) and high and low molecular weight (AH-ABP) combined in the paracrine mechanism of the mesenchymal stromal cells derived from adipose tissue, differentiated or not in osteoblasts.

Stromal cells were isolated from the adipose tissue of Lewis rats, expanded and characterized. The cytotoxicity assay was performed through the MTT test to evaluate cell viability in the presence of hyaluronic acids. For the evaluation of the dosage of growth factors, an ELISA assay was performed. The cells in the 4th passage were seeded in 6-well plates, in triplicate, grown for 30 days in a humidified oven at 37 ° C and 5% CO<sub>2</sub> in the atmosphere, and divided into 6 groups: (G1) ASC; (G2) ASC + AH-ABP; (G3) ASC + AH-BP; (G4) OSTEO; (G5) OSTEO + AH-ABP; (G6) OSTEO + AH-BP. The ASCs were cultured in complete medium for 27 days, in groups 2 and 3 the respective AH was added and maintained for a further 3 days. OSTEO cells were cultured in osteogenic differentiation medium for 27 days, in groups 5 and 6 the HA was added and maintained for a further 3 days.

The results showed that the highest values of growth factor secretion occurred in the group of ASCs in complete medium and of these, when AH-ABP was added. After 27 days in osteogenic medium, the cells differentiated into osteoblasts had low levels of secretion of growth factors. The use of AH-BP had low expression in relation to osteoinduction of the factors, when compared with the use of AH-ABP. According to the results, the differentiated cells secreted fewer factors than the ASCs, with significant statistical difference.

Expression of VEGF, FGF and BMP-2 was significantly higher in ASCs and ASCs + AH-ABP. The IGF-1 growth factor presented the highest expression in the ASC + AH-BP group, with a significant difference in the other groups. It was found that the use of undifferentiated cells in a future cell compound appeared to be more favorable than the use of these already differentiated cells in osteoblasts. Advanced periods of differentiation seemed to lead to reduced osteoinduction. From this study we observed that the AH-ABP matrix together with ASCs has the potential to positively influence bone tissue repair through increased secretion of osteogenic growth factors, compared to the use of the other AH-BP matrix.

Key-words: Tissue Engineering. Mesenchymal Stromal Cells. Bone Regeneration. Hyaluronic Acid. Paracrine Communication.

## LISTA DE TABELAS, GRÁFICOS E FIGURAS

Tabela 1 – Exposição das células em diferentes concentrações de AH-ABP (mg/ml).....	27
Tabela 2 – Distribuição dos grupos experimentais in vitro.....	28
Tabela 3 – Distribuição dos grupos experimentais e respectivo volume.....	34
Gráfico 1 - Gráfico de comparação da cinética de crescimento das ASCs.....	31
Gráfico 2 – Quantificação do fator de crescimento VEGF nos diferentes grupos experimentais.....	35
Gráfico 3 – Quantificação do fator de crescimento IGF-1 nos diferentes grupos experimentais.....	38
Gráfico 4 – Quantificação do fator de crescimento FGF nos diferentes grupos experimentais.....	41
Gráfico 5 – Quantificação do fator de crescimento BMP-2 nos diferentes grupos experimentais.....	42
Figura 1 - Microscopia de contraste de fase de ASCs.....	30
Figura 2 - Histogramas de expressão dos marcadores de superfície por citometria de fluxo de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo .....	32
Figura 3 – Viabilidade celular para linhagem de ASC expostas a diferentes concentrações de AH-ABP, pelo ensaio MTT.....	33
Figura 4 – Expressão de VEGF nos diferentes grupos experimentais.....	34
Figura 5 – Expressão de IGF nos diferentes grupos experimentais.....	39
Figura 6 - Expressão de BMP-2 nos diferentes grupos experimentais.....	42

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- MSC – Células estromais mesenquimais (Mesenchymal Stromal Cells)
- ASC – Células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo (Adipose-derived mesenchymal stromal cells)
- BMP – Proteína óssea morfogenética (Bone Morphogenetic Protein)
- FGF – Fator de crescimento semelhante a fibroblasto (Fibroblast Growth Factor)
- IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à *insulina* (Insulin-like Growth Factor 1)
- VEGF – Fator de crescimento vascular endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor)
- TGF- $\beta$  - Fator de crescimento transformador  $\beta$  (Transform Growth Factor)
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
- CCE – Centro de Cardiologia Experimental
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
- SFB – Soro fetal bovino
- AH – Ácido Hialurônico
- AH-BP – Ácido hialurônico de baixo peso molecular
- AH-AP – Ácido hialurônico de alto peso molecular
- AH-ABP- Ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular
- kDA – Quilo Daltons
- MTT – Teste de Desigrogenase Succinica ou Atividade Mitocondrial
- DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco
- MC – Meio completo (DMEM acrescido de soro fetal bovino)

## ANOVA – Análise de variância múltipla

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>11</b>
1.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR.....	11
1.2 ENGENHARIA TECIDUAL.....	12
1.3 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS .....	13
1.4 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO...	15
1.5 O EFEITO PARÁCRINO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS.....	16
1.6 O ÁCIDO HIALURÔNICO COMO MATRIZ .....	19
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
2.1 ANIMAIS.....	22
<b>2.1.1 Tamanho Amostral.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1.2 Eutanásia.....</b>	<b>23</b>
<b>2.1.3 Tratamento de Rejeitos.....</b>	<b>23</b>
2.2 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS.....	23
<b>2.2.1 Análise de viabilidade das ASCs através do teste de MTT na presença do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular (AH-ABP)- Prophilo®.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.2 Dosagem dos fatores de crescimento.....</b>	<b>28</b>
<b>3 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>29</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MURINAS.....	30
<b>4.1.1 Análise morfológica e ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das ASCs in vitro.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.2 Análise da expansão in vitro das células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.3 Análise fenotípica das mMSCs por citometria de fluxo.....</b>	<b>32</b>
<b>4.1.4 Análise da viabilidade celular das ASCs através do teste de MTT na presença do Ácido Hialurônico de alto e baixo peso molecular.....</b>	<b>33</b>
4.2 DOSAGEM DOS FATORES DE CRESCIMENTO.....	34
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>51</b>
ANEXO – Carta de Aprovação da Comissão Científica da Escola de Ciências da Saúde da PUCRS.....	58

# 1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

## 1.1 REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR

O osso alveolar é uma estrutura anatômica que cerca os dentes, formando os alvéolos dentários, sendo um dos três tecidos que suportam o órgão dental, juntamente do ligamento periodontal e do cimento.<sup>1</sup> A presença ou manutenção desta estrutura é dependente da presença dos dentes, logo, com a perda dos mesmos, a necessidade deste tecido é perdida, ocorrendo sua reabsorção progressiva com o tempo.<sup>2,3</sup> A altura e largura do rebordo alveolar é determinante para a estabilidade de próteses removíveis e também para a instalação de implantes dentários de titânio. A falta de volume ósseo vertical e horizontal restringe a instalação dos implantes, sendo imprescindível a manutenção de uma quantidade suficiente de osso alveolar para o sucesso do tratamento.<sup>2,4</sup> O tecido ósseo é bastante vascularizado e tem capacidade de crescimento, regeneração e remodelação, sendo considerado um tecido dinâmico e capaz de responder a uma multiplicidade de estímulos, podendo ser esses estímulos metabólicos, físicos ou endócrinos.<sup>5</sup> A correção de defeitos ósseos, principalmente defeitos críticos, permanece um desafio clínico atualmente, tendo sido desenvolvidos diversos procedimentos de enxertia óssea com intuito de reestabelecer o tecido perdido para reabilitação oral do paciente.<sup>6, 7, 8</sup> O rebordo alveolar pode ser reabilitado com procedimentos de enxertia de origem autógena (doador do tecido é o próprio paciente), alógena (doador é da mesma espécie, porém de carga genética diferente), xenógena (doador de espécie diferente) ou uso de materiais aloplásticos (materiais sintéticos).<sup>6</sup>

O enxerto ósseo autógeno é considerado o “padrão ouro” por ser o único a possuir as propriedades ideais de: osteogênese (presença de células osteoprogenitoras), osteoindução (através de fatores de crescimento) e osteocondução (possuir uma matriz porosa tridimensional). No entanto, sua utilização é limitada pois necessita de áreas doadoras (normalmente a crista ilíaca) o que causa grande morbidade e complicações do local, como: infecção, hematomas, dor e edema. Além de ser um procedimento de alto custo e com disponibilidade limitada de material, tendo, em alguns casos, possibilidade de não oferecer o resultado ideal esperado.<sup>9,5</sup> Os enxertos alógenos são doados por um indivíduo da mesma

espécie do doador, normalmente cadáveres. Estes enxertos são associados com o risco de desenvolver reações imunológicas e de transmitir infecções, já que são removidos de indivíduos com carga genética diferente e, para tal, deve-se realizar um procedimento de descontaminação do material, que por vezes acaba não sendo suficiente para remoção de bactérias e corpos estranhos. Esse tipo de enxerto ainda tem a propriedade de osteoindução reduzida e não apresenta nenhum componente celular, visto que as regiões doadas são desvitalizadas por irradiação.<sup>10</sup> Enxertos xenógenos e aloplásticos são apenas osteocondutores, possuem o inconveniente de requererem um maior tempo de cicatrização para uma formação óssea adequada e não apresentam células osteogênicas ou capacidade de osteoindução.<sup>5,8,11</sup>

O substituto ósseo ideal deveria ter um suprimento sanguíneo ilimitado, nenhuma morbidade no local doador, não causar resposta imunológica, não ter risco de transmissão de doenças, ser altamente eficaz na promoção da regeneração óssea, ter uma excelente propriedade de manipulação, vida útil adequada e ter um bom custo-benefício<sup>11</sup>.

## 1.2 ENGENHARIA TECIDUAL

O desenvolvimento de um método alternativo às técnicas de enxertia óssea tradicionais parece ser interessante atualmente, visando um material ideal com a capacidade de osteogênese dos enxertos autógenos, porém sem a morbidade associada aos mesmos. Neste sentido, uma alternativa promissora é a engenharia de tecidos, um campo em desenvolvimento que tem como objetivo regenerar tecidos lesionados ao invés de substituí-los, e desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham e melhorem a função tecidual.<sup>12</sup> Para tanto, como ferramentas essenciais *na* engenharia tecidual *emprega-se* a combinação de células progenitoras, fatores de crescimento e matrizes tridimensionais, sendo conhecidos como “tríade da engenharia de tecidos”.<sup>4,8,11</sup>

Para a regeneração de defeitos ósseos, estudos em engenharia tecidual combinam células em cultura com matrizes específicas e fatores de crescimento osteogênicos para estimular o reparo ósseo<sup>13</sup>. Outro fator para o sucesso, principalmente para regeneração de tecido ósseo, é a vascularização do tecido, a qual é essencial para a oxigenação, nutrição e,

consequentemente, eficácia das células implantadas.<sup>14,15</sup> O estudo na engenharia de tecidos ósseos foca em opções alternativas de tratamento que vão idealmente eliminar as desvantagens descritas dos tratamentos clínicos usados atualmente (morbidade do sítio doador, disponibilidade limitada, rejeição imunológica e transferência de patógenos).<sup>5</sup>

As estruturas tridimensionais chamadas de scaffolds, arcabouço ou matrizes fornecem suporte físico e um ambiente apropriado para a proliferação celular. As moléculas sinalizadoras, funcionam como fatores indutores do crescimento celular e compreendem uma diversidade de proteínas importantes na proliferação e diferenciação das células, auxiliando na regeneração tecidual.<sup>16</sup>

### 1.3 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

As células estromais mesenquimais ou células-tronco mesenquimais (MSCs - Mesenchymal Stem Cells) têm demonstrado grande potencial de uso na engenharia tecidual devido a sua multipotência, relativa facilidade de acesso e previsível isolamento *in vitro* e subsequente cultura nos tipos celulares desejados.<sup>17</sup> As MSCs são consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o perioste, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos<sup>18</sup>, sendo capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação como: osteoblastos, condroblastos, adipócitos, hepatócitos, neurônios, dentre outras células. Tais características de plasticidade sugerem que esse tipo celular é o responsável pelo turnover e pela manutenção de todos os tecidos do organismo. A medula óssea do osso ilíaco é a fonte celular mais documentada na literatura<sup>19</sup>, no entanto, outras fontes também são citadas, podendo ser obtidas do cordão umbilical, do tecido adiposo ou do tecido pulpar.<sup>20</sup>

O termo MSCs é normalmente aplicado a células com propriedades de serem plásticas-aderentes; isoladas a partir da medula óssea ou de outros tecidos; positivas para um painel de marcadores de membrana específicos (CD 105, CD 73 e CD90) e negativa para outros (CD45, CD 34, CD14 e C11b); e que sejam aptas a se diferenciar em diversos tipos celulares sob condições específicas, como em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e

condroblastos.<sup>21</sup> Atualmente 706 ensaios clínicos que testam MSCs estão listados no registro internacional disponível no site [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov). Enquanto diversos estudos demonstraram eficácia da terapica com MSCs, falta a elucidação dos mecanismos de ação das mesmas.

As MSCs secretam uma gama de moléculas bioativas, chamadas de citocinas ou fatores de crescimento que atuam por comunicação parácrina em outras células, as quais são tão imunorreguladores quanto servem para estruturar microambientes regenerativos em lesões teciduais.<sup>19</sup>

Uma recente revisão sistemática da literatura que procurou buscar as aplicações das MSCs para reconstrução de osso alveolar in vivo em humanos demonstrou que a regeneração óssea usando MSCs do próprio paciente, em combinação com substitutos ósseos utilizados como matrizes, pareceu ser um procedimento seguro, previsível e comparável às evidências atuais baseados nos métodos de enxertia em termos de eficácia clínica, além disso, a vantagem mais significativa dessa terapia com MSCs é evitar as desvantagens relacionadas aos enxertos autógenos.<sup>6</sup>

#### 1.4 CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

Embora, as MSCs derivadas da medula óssea sejam o tipo mais frequentemente utilizado nos estudos envolvendo engenharia tecidual, tem como desvantagem a necessidade de uma biópsia da medula óssea, o que causa uma maior morbidade aos tecidos, além da quantidade de células produzidas desta maneira serem limitadas.<sup>22,23</sup>

O uso das células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASC – Adipose-Derived Stromal Cells) iniciou na cirurgia plástica e são uma fonte atrativa de células para a engenharia de tecidos. As ASCs tem um método relativamente fácil de obtenção a partir de uma lipoaspiração do tecido adiposo, está amplamente disponível sendo uma fonte abundante

de células-tronco autógenas, tem capacidade de se renovarem e apresentam uma taxa de crescimento elevado, além de apresentar limitada morbidade do local doador. As ASCs também possuem multipotência em diversos tipos celulares como em linhagem osteogênica, adipogênica, condrogênica, miogênica e mesmo neurogênica.<sup>5,24,22</sup> Além do mais, existem grandes evidências de que as ASCs têm propriedades imunomodulatórias e anti-inflamatórias.<sup>25</sup>

As ASCs tem diversas vantagens em comparação com as MSCs obtidas da medula óssea, entre elas a quantidade de tecido obtido, e, conseqüentemente de células. Segundo Cowan et al. (2004), a técnica de coleta do tecido adiposo resulta em 800 mg de tecido, contra 0,6 mg de tecido obtido da medula óssea, apresentando, dessa maneira, um rendimento de células muito maior. Semelhantes dados são demonstrados por Amini et al. (2012) em que relata que a partir de uma lipoaspiração pode-se obter uma alta frequência de ASCs (1% de 5% das células isoladas) em comparação as MSCs obtidas da medula óssea (que representa 0,001% em 0,1% de células isoladas).<sup>22,5</sup> Além disso, a velocidade de proliferação das ASCs é substancialmente maior durante a expansão in vitro. Logo, a facilidade de obtenção, o maior número de células obtidas e a rápida expansão in vitro demonstra vantagens interessantes para as ASCs em relação as MSCs extraídas da medula óssea.<sup>22</sup>

O potencial osteogênico das ASCs foi demonstrado não apenas em estudos in vitro como in vivo. A diferenciação osteogênica in vitro pode ser conseguida por uma adição de suplementos no meio de cultura, que incluem:  $\beta$ -glicerofosfato, ácido ascórbico e dexametasona. A deposição de minerais e diferenciação celular foi observada quando as ASCs foram cultivadas neste meio, apresentando habilidade de se diferenciarem completamente em osteoblastos, demonstrando ser um potente indutor da diferenciação osteogênica.<sup>26,27,22,28</sup>

## 1.5 O EFEITO PARÁCRINO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS

Os fatores de crescimento são proteínas produzidas pelas células que funcionam como moléculas de sinalização, responsáveis por ativar as redes de comunicação celular e influenciar diversas funções no organismo como: proliferação celular, deposição de matriz

extracelular e diferenciação dos tecidos. Essas moléculas *têm* uma importante função no reparo ósseo especialmente na formação de osso e cartilagem, no processo de cicatrização e no reparo de tecido músculo-esqueléticos.<sup>29</sup> Há 3 tipos de *comunicação celular* que podem ser: autócrina, parácrina e endócrina. A sinalização autócrina é aquela em que os fatores de crescimento influenciam as células da sua própria origem, de mesmo fenótipo. A sinalização parácrina é aquela na qual as moléculas de sinalização vão atuar em uma célula vizinha que tem fenótipo diferente da célula de origem, em distância relativamente curtas, permitindo que células coordenem localmente a atividade com suas células vizinhas. O mecanismo endócrino refere-se a aquele em que um mensageiro químico age em locais distantes de onde são produzidos por meio de transporte sanguíneo.

Há um crescente número de evidências que sustentam a hipótese de que as MSCs tem um papel importante na regeneração dos tecidos, não apenas pelo seu poder de diferenciação, mas também na habilidade de secretar um repertório de fatores de crescimento que modulam a atividade das células vizinhas. Esses fatores aumentam a angiogênese, estimulam a remodelação da matriz extracelular, restringem a inflamação local, reduzem a apoptose e a fibrose e ajudam na resposta imune. Dessa maneira, as MSCs diretamente ou através da secreção parácrina induzem a regeneração de maneira a acelerar o processo de reparo.<sup>30,31</sup>

Esse efeito parácrino foi observado pela primeira vez em um estudo que avaliou doença cardíaca em ratos, nos quais se descobriu que as MSCs injetadas em corações infartados não se diferenciaram em cardiomiócitos sob condições fisiológicas *in vivo*. Observaram que após a injeção, a maioria das MSCs se alojou nos pulmões e no fígado, com uma minoria indo para o tecido da patologia, no entanto após 72 horas da injeção houve reestabelecimento da função cardíaca, levantando a hipótese de que os efeitos clínicos das MSCs não são devidos apenas à diferenciação celular, mas também ao efeito dos fatores e secreções de comunicação celular produzidas por elas.<sup>32</sup> O mesmo grupo de pesquisadores mostrou que o meio condicionado de MSCs, sem a presença das mesmas, melhorou a recuperação de cardiomiócitos, limitando o tamanho do tecido infartado e melhorando a função ventricular.

Como os fatores de crescimento são expressos em diferentes fases do processo de cicatrização, tem-se pensado que eles podem servir como um agente terapêutico potencial

para melhorar o processo de reparo ósseo. Inukai et al. (2013) relataram que as MSCs tem um grande potencial de regeneração óssea que é mediado devido aos efeitos cooperativos de diversos fatores de crescimento como: Proteína óssea morfogenética (Bone Morphogenetic Protein – BMP), Fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), Fator de Crescimento Semelhante a Fibroblasto (Fibroblast Growth Factor – FGF), Fator de Crescimento Semelhante a Insulina (Insulin-like growth factor – IGF) e Fator de Crescimento Vascular Endotelial (Vascular endothelial growth factor – VEGF), os quais regulam diversos eventos da osteogênese como angiogênese, migração celular, proliferação e diferenciação de osteoblastos.<sup>33</sup>

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são glicoproteínas responsáveis pelo recrutamento de células osteoprogenitoras para os locais de formação óssea.<sup>34</sup> São membros da superfamília TGF- $\beta$  (Fator de Crescimento Transformador Beta) devido a semelhanças na estrutura da proteína, sendo identificadas 15 isoformas diferentes, no entanto, dentre estas as BMP-2 a 7, 9 e 14 são conhecidas por terem propriedades osteoindutivas, por participarem do processo de reparo ósseo pela suas habilidades de estimular a diferenciação das MSCs em cartilagem e osso, além de participar no processo de crescimento celular. Além disso especificamente a BMP-2 foi relatada como sendo um iniciador essencial da cicatrização óssea.<sup>35 36</sup> Wozney et al. (1988) identificou a sequência genética das BMPs, permitindo a produção de diversas BMPs com o uso da tecnologia dos genes recombinantes. BMPs podem exercer múltiplas funções no desenvolvimento embriogênico e organogênico, incluindo esqueletogênese, desenvolvimento crânio facial e dos tecidos dentais.<sup>8</sup>

O fator de crescimento semelhante a fibroblasto (FGF) ativa a proliferação e diferenciação dos osteoblastos, reconhecido como um efetivo fator de crescimento na regeneração de tecidos ósseos. Canalis et al. (1988) avaliou in vitro o papel do FGF na formação óssea, observando que seu efeito mitogênico resulta em um aumento na população celular capaz de sintetizar colágeno tipo I, além de observar que FGF estimula a replicação de células osteoprogenitoras e diferenciação das mesmas.<sup>37</sup>

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) é um peptídeo que tem como função regular a proliferação e diferenciação celular, sendo relatado exercer efeitos anabólicos no tecido ósseo. Tem produção no fígado, tendo como principal regular fisiológico o hormônio do crescimento (GH). Indivíduos com deficiência de GH possuem

baixos níveis de IGF-1 sérico e menor massa óssea do que indivíduos normais, assim como quando ocorre a diminuição de IGF-1 parece estar associado à redução de massa óssea, apontando o importante papel do IGF na homeostase esquelética.<sup>38,39,40</sup> O IGF-1 é secretado na circulação e transportado por proteínas ligadoras de IGF, que transporta esse fator até seu tecido-alvo. O IGF-1 estimula a formação óssea por induzir a proliferação celular, diferenciação e biossíntese do colágeno<sup>41</sup>.

O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) é uma proteína natural que age como fator de crescimento para células endoteliais, sendo produzido por uma variedade de tecidos. Embora a função principal do VEGF seja relacionada a neoformação vascular, ele está envolvido no processo de reparo ósseo por estimular o recrutamento e diferenciação das células osteoprogenitoras e na regulação de vários fatores osteoindutivos, como TGF- $\beta$ , IGF e FGF.<sup>42</sup>

## 1.6 O ÁCIDO HIALURÔNICO COMO MATRIZ CELULAR

Além da presença dos fatores de sinalização celular, as células progenitoras necessitam de uma matriz de sustentação apropriada pois, de outra maneira, se forem transplantadas sem algum tipo de suporte, elas não ficariam no local desejado e seriam removidas por fluídos extracelulares e pela corrente sanguínea<sup>4</sup>. Uma matriz, além de representar uma estrutura tridimensional que vai funcionar como suporte para proliferação celular, será importante para a deposição de matriz extracelular e como reserva de água, nutrientes e fatores de crescimento<sup>29</sup>. Uma matriz, ou “scaffold”, como é comumente chamada em engenharia de tecidos, deve mimetizar as interações células-matriz extra celular e fornecer sinais adequados às células para induzir ou manter o estado desejado de diferenciação celular de forma a auxiliar na engenharia tecidual.<sup>43</sup>

Segundo a literatura, uma matriz ideal em engenharia tecidual deve ser biodegradável, biocompatível, não ser tóxica para os tecidos, ser um material indutor que suporte a colônia de células e promova a migração celular.<sup>11,44</sup> Tem sido relatado o uso de uma gama de materiais para confecção das matrizes como: cerâmicas, polímeros sintéticos, polímeros naturais e compósitos. Em relação aos polímeros naturais, estão os hidrogéis,

particularmente o ácido hialurônico (AH) sendo relatado na literatura efeitos promissores do uso do mesmo como carreador de MSCs na engenharia de tecidos.<sup>25</sup>

O AH, também conhecido como hialuronan ou hialuronato de sódio, é um polímero natural, da família das glicoaminoglicanas, formado pelo ácido glucorônico e a N-acetilglicosamina. AH é componente natural da matriz extracelular existente em diversos tecidos, apresentando um ótimo potencial para matriz em engenharia tecidual devido a suas propriedades viscoelásticas e seu envolvimento em processos biológicos como na morfogênese e no reparo de feridas.<sup>13,45,46</sup> Ele desempenha um papel importante em vários procedimentos biológicos, como sinalização celular, adesão, proliferação e diferenciação celular<sup>47,48,49</sup>, e tem uma ampla gama de aplicações com excelentes propriedades físico-químicas, sendo biodegradável, biocompatível, alta viscosidade e elasticidade, não apresenta toxicidade aos tecidos e serve como ferramenta para aplicações biomédicas como em cirurgia de osteoartrite, cirurgia ocular, cirurgia plástica e amplamente utilizado na dermatologia.<sup>50</sup>

Apresenta-se em pesos moleculares de diferentes formulações, podendo ser de baixo (de 50 a 1000 kD) ou de alto peso (>1000 kD). Os efeitos do AH dependem do seu peso molecular e essas características estruturais ajudam na estabilização do gel quando do seu uso in vivo contra a degradação do mesmo.<sup>51</sup> Existe a presença no corpo humano de enzimas, chamadas hialuronidases, que degradam o AH em fragmentos menores, os quais também podem estimular reações celulares.<sup>52</sup> Diversos estudos relataram os efeitos pró-inflamatórios do ácido hialurônico de baixo peso molecular (AH-BP), enquanto o ácido hialurônico de alto peso molecular (AH-AP) parece ter propriedades anti-inflamatórias.<sup>25,51</sup> A principal desvantagem dos AHs disponíveis atualmente tem sido a sua curta meia-vida in vivo, devido à rápida degradação pelo ataque enzimático das hialuronidases, ou mesmo pela presença de radicais livres ou por outros estímulos mecânicos como força compressiva e diluição. Diversas pesquisas foram realizadas de novas formulações de AH na engenharia tecidual ao longo dos anos, de maneira a criar um composto para aumentar a sua permanência in vivo, aumentando seu efeito a longo prazo.<sup>25,53,54</sup>

Logo, foi desenvolvida uma nova fórmula de AH que mistura o ácido de alto com o de baixo peso molecular, através de uma técnica patenteada *da marca IBSA, de nome comercial Profhilo®*. Essa nova formulação, relatada como “complexo cooperativo híbrido” leva a formação de um composto no qual o ácido hialurônico de alto peso molecular (AH-

AP) e o ácido hialurônico de baixo peso molecular (AH-BP) cooperam entre si diminuindo a sua viscosidade, permitindo dessa maneira que uma quantidade maior de AH seja utilizado. Essa formulação apresenta-se como um composto mais estável, com degradação lenta, sem modificações químicas do mesmo, disponível como formulações em géis injetáveis.<sup>25</sup>

A combinação de moléculas de AH de alto e baixo peso molecular (AH-ABP) em um mesmo composto caracteriza um novo tipo de estruturação química do AH disponível para utilização. No estudo de Stellavato et al. (2017) que avaliou a viabilidade de ASCs neste novo tipo de ácido, demonstrou que as ASCs mantêm o potencial de diferenciação independente da formulação do material, porém o AH-ABP aumentou a diferenciação celular quando comparado aos AH de outras formulações, mantendo a morfologia e a viabilidade das células.

Diante destas evidências, visto que a comunicação parácrina das MSCs é tão importante quanto a sua diferenciação, surge a necessidade de se explorar a ação desta nova formulação de AH. A presente pesquisa tem por objetivo avaliar o efeito da matriz de ácido hialurônico de baixo peso molecular e do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular combinados no mecanismo parácrino das células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo, diferenciadas ou não em osteoblastos.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 ANIMAIS**

Não havendo métodos alternativos validados para a metodologia descrita nesta dissertação (art.2º da Resolução Normativa Nº 18, de 24 de setembro de 2014 - CONCEA), não foi possível substituir o uso de animais para execução desta pesquisa científica.

Este estudo foi realizado, após aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, sob normas de ética para pesquisa em modelos animais, com cuidados especiais para a utilização do menor número destes e para manejo da dor e sofrimento.

Todos os procedimentos realizados estão de acordo com o preconizado pela Lei Arouca (lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), pelas diretrizes do CONCEA que dispõe sobre procedimentos e métodos de eutanásia em animais entre outras providências, e pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA, 2017).

A linhagem escolhida como modelo biológico deste estudo, ratos Lewis, foi criada e mantida em padrão sanitário convencional controlado no Centro de Cardiologia Experimental (CCE), com fotoperíodo de 12 horas claro/escuro (07:00/19:00) e temperatura controlada (21 a 24°C).

#### **2.1.1 Tamanho Amostral**

Para contemplar os objetivos propostos neste estudo, considerando a uniformidade genotípica destes animais (superior a 98,7 %), foram utilizados 3 ratos Lewis machos, com 60 dias de idade para isolamento de células estromais mesenquimais a partir do tecido adiposo epididimal.

### **2.1.2 Eutanásia**

Os animais utilizados para retirada de tecido adiposo epididimal, para isolamento de células-tronco, foram submetidos à eutanásia por anestésico inalatório na concentração de 5% (isoflurano). Este procedimento confere grau de severidade sem recuperação.

### **2.1.3 Tratamento de Rejeitos**

Os resíduos produzidos durante a experimentação foram manejados conforme as resoluções do CONAMA 283, de 12 de junho de 2001. Eles são classificados em grupos e conforme os tipos de componentes possuem diferentes formas de acondicionamento, manejo e descarte. Grupo A (potencialmente infectante, risco biológico), B (resíduos químicos), C (rejeitos radioativos) e D (resíduos comuns).

As carcaças dos animais utilizados nos experimentos foram armazenadas em sacos brancos identificados como de risco biológico, em câmara fria própria para tal e, posteriormente, recolhidas por empresa terceirizada de recolhimento de rejeitos biológicos.

## **2.2 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS**

Linhagens de células estromais derivadas de tecido adiposo (ASCs – do inglês, Adipose-derived mesenchymal stromal) foram estabelecidas a partir do tecido adiposo epididimal de ratos Lewis, conforme metodologia previamente estabelecida por Meirelles & Nardi.<sup>18</sup>

O protocolo foi baseado na dissociação dos tecidos para preparo de suspensões celulares para cultivo. Para tanto, ratos Lewis foram submetidos à eutanásia por anestésico inalatório (5% - isoflurano) e levados ao fluxo laminar embebidos em álcool 70 %.

O processo cirúrgico envolveu laparotomia do quadrante inferior direito, possibilitando acesso ao tecido de interesse. Frações de tecido adiposo epididimal foram lavados em solução de Hank, ligeiramente picotados e transferidos para tubos Falcon de 15

mL com 3 mL de solução estéril de 1,5 g/mL de colagenase tipo 1 (Gibco) dissolvida em DMEM acrescido de 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma) e 2,5 g/L de HEPES (Sigma) sem soro.

Os tubos com o tecido foram incubados em banho-maria a 37 °C entre 45 a 60 min. Após o período de digestão, os fragmentos foram dissociados mecanicamente e homogeneizados com auxílio de uma pipeta pasteur e foi acrescentado 10 mL de meio DMEM com 10% de soro fetal bovino (SFB), ou seja, meio completo (MC). Depois de centrifugar por 10 min a 400 x g, o sobrenadante foi removido e o material obtido foi ressuspenso em 4 mL de MC. Ao decantar, o sobrenadante foi transferido para placas de 6 poços, onde as culturas foram mantidas até atingirem confluência mínima de 80 %, em estufa umidificada a 37 °C e 5 % de CO<sub>2</sub> na atmosfera.

A taxa de repique (passagem) foi determinada pela cinética da cultura. Na primeira subcultura (passagem 1 - P1), atingindo confluência mínima de 80 %, as células foram tripsinizadas (0,25 - 0,5 % de tripsina/EDTA em HBSS sem Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) e transferidas para frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (TPP), com o triplo da área original (1:2), sendo repicadas conforme necessário e transferidas para frascos de cultura de 75 cm<sup>2</sup> (TPP) com taxas de repique superiores (1:3, 1:4, etc.).

#### Caracterização das células estromais mesenquimais

De acordo com a International Society for Cellular Therapy <sup>55</sup>, há no mínimo 3 características que devem ser comprovadas para que uma população celular seja classificada como célula estromal mesenquimal: proliferação com células aderentes à superfície plástica; imunofenótipo, devendo ser positivas para CD105, CD73 e CD90, e negativas em mais de 95 % das células em cultura para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 alfa ou CD19; e capacidade de diferenciação in vitro em osteoblastos, adipócitos e/ou condroblastos <sup>56</sup>.

Análise morfológica qualitativa das ASCs: as células foram rotineiramente observadas em microscopia de fase com microscópio invertido (Axiovert 25; Zeiss, Hallbergmoos, Alemanha) e fotografadas utilizando câmera digital (AxioCam MRc, Zeiss) e software AxioVision 3.1 (Zeiss).

Análise da expansão in vitro das ASCs: as células estromais mesenquimais foram quantificadas em hemocitômetro pelo método de exclusão do azul trypan, sendo determinado o número total de células viáveis. Após, foi aplicada a fórmula abaixo indicando a concentração de células na suspensão (número de células por mL):

$$\text{concentração celular} = n \times \text{fator de diluição} \times 10^4$$

Análise fenotípica das ASCs por citometria de fluxo: as células foram tripsinizadas, centrifugadas e incubadas por 30 minutos a 4°C, com anticorpos específicos para CD11b, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105 murinos, conjugados com ficoeritrina (PE) ou isotiocianato de fluoresceína (FITC) (BD Pharmingen, San Diego, CA). Foram coletados dados de pelo menos 10.000 eventos, utilizando o citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA), equipado com laser 488 nm e o programa CELLQuest (Becton Dickinson). Os dados obtidos foram analisados no programa WinMDI 2.8.

Ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das ASCs in vitro: as culturas celulares foram submetidas aos processos de diferenciação em adipócitos e osteoblastos na 4ª passagem.

Para induzir a diferenciação adipogênica, as células foram cultivadas por 4 semanas, em placas de 12 poços, em meio completo suplementado com  $10^{-8}$  M de dexametasona, 2,5 µg/mL de insulina de pâncreas bovino, 100 mM de indometacina e 5 mM de rosiglitazona. O fenótipo de adipócitos foi avaliado pelo corante Oil Red O, evidenciando os vacúolos de gordura.

Durante 4 semanas da indução da diferenciação osteogênica, as células foram mantidas, em placa de 12 poços, em meio completo composto por  $10^{-5}$  M de dexametasona, 100 µg de ácido ascórbico e 10 mM de β-glicerofosfato. Assim como na diferenciação adipogênica, o meio foi trocado 2 vezes por semana. A atividade osteoblástica foi avaliada por corante Alizarin Red S que colore a matriz extracelular rica em cálcio.

### **2.2.1 Análise de viabilidade celular das ASCs através do teste de MTT na presença do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular (AH-ABP)–Profhilo® (IBSA).**

Pesquisas anteriores, realizadas pelo nosso grupo, avaliaram, in vivo, a utilização de células estromais mesenquimais adiposas e o ácido hialurônico de baixo peso molecular (Hyaloss® - HYAFF™) como veículo celular em engenharia tecidual óssea. Para tanto, a citotoxicidade deste ácido de baixo peso molecular (AH-BP), na forma de fibras HYAFF que, em contato ao meio aquoso, torna-se um hidrogel, foi avaliada. Os resultados observados apresentaram ausência de citotoxicidade após 72 horas na concentração de 75%.<sup>57</sup>

Assim como Boeckel, o método de MTT (brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico) foi utilizado para a avaliação de citotoxicidade do AH-ABP, de nome comercial Profhilo® (IBSA, Itália). Esta técnica baseia-se na medida do dano induzido, pelo composto/extrato em estudo, no metabolismo celular de glicídeos através da avaliação da atividade de desidrogenases mitocondriais. A viabilidade mitocondrial, e consequentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico (Sigma, St Louis, MO, EUA), formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose, mecanismo fundamental das células vivas.<sup>58</sup>

Foram diluídos 256 mg de ácido AH-ABP em 4 ml (64mg/ml - 100%) Dulbecco's Modified Eagle Medium/low glucose (DMEM) (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) e gentamicina 10µg/ml (GIBCO, Grand Island, NY, EUA) sob uma temperatura de 37°C. A partir da concentração máxima, foram realizadas diluições de 75%, 50%, 25%, 15% e um grupo controle positivo (+) com apenas DMEM e um grupo negativo (-) com hipoclorito de sódio à 1%. O experimento foi realizado em triplicatas e repetido por 3 vezes sob as mesmas condições.

As ASCs, na quarta passagem, foram semeadas, em meio completo e condições ideais, em placa de 96 poços na densidade de  $4 \times 10^4$  células/poço. Após 24 horas na estufa, o meio de cultura completo foi removido e adicionado produto, volume e diluições como segue:

*Tabela 1 – Exposição das células em diferentes concentrações de AH-ABP (mg/mL).*

<u>%</u>	<u>Células</u>	<u>[ ] mg/mL</u>	<u>DMEM+</u>	<u>DMEM</u>	<u>Volume total/poço</u>
----------	----------------	------------------	--------------	-------------	--------------------------

			AH-ABP μL/poço	μL/poço	
<b>100</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	64	100	100	200
<b>75</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	48	75	125	200
<b>50</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	32	50	150	200
<b>25</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	16	25	175	200
<b>15</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	14,1	15	185	200
<b>Controle+</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	-	-	200	200
<b>Controle-</b>	4 x 10 <sup>4</sup>	-	-	200	200

Após o tratamento com ácido hialurônico (AH-ABP) e controles positivo e negativo, em triplicata, o meio de cultura foi removido e 10% de uma solução de MTT (5mg/mL) em PBS foi adicionado a cada poço. Em seguida, as culturas foram incubadas a 37°C, ao abrigo da luz, até a observação da presença dos cristais violetas de formazan. Para a solubilização dos cristais de formazan, 100μL de dimetilssulfóxido (DMSO) foi adicionado a cada poço e a absorbância das amostras a 570nm foi determinada em leitor ELISA (Bio-Rad Microplate Reader Benchmark, Inc. USA) nos tempos 24, 48 e 72 horas.

O grupo de células que apresentou maior viabilidade celular determinou a concentração do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular (AH-ABP) a ser utilizado no experimento in vitro.

### 2.2.2 Dosagem dos fatores de crescimento

As citocinas IGF-1, VEGF, FGF-2 e BMP-2 foram quantificadas através do Ensaio de Imunoabsorção Enzimática do tipo sanduiche, conforme instruções do fabricante (Quantikine® ELISA Kits). O anticorpo de interesse é inicialmente adsorvido no poço (placa de 96 poços). Após, o antígeno presente no sobrenadante das ASCs é adicionado e se liga ao anticorpo. Finalmente, um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado. Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente. Logo, permite mensurar até pequenas quantidades de antígeno.

Para tanto, as células na 4ª passagem foram semeadas em placas de 96 poços, em triplicata, cultivadas por 30 dias em estufa umidificada a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> na atmosfera, e divididas em 6 grupos (Tabela 2). As células foram expostas aos referidos ácidos na melhor

concentração definida pela técnica de MTT e quantificados os fatores de crescimento presentes no sobrenadante.

**Tabela 2 – Distribuição dos grupos experimentais *in vitro***

Grupo 1: ASCs	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas em meio completo (P4);
Grupo 2: ASCs+AH-ABP	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas em meio completo por 27 dias. Após este período, foi acrescido ácido hialurônico de alto e <i>baixo</i> peso molecular e mantidas por mais 3 dias;
Grupo 3: ASCs+AH-BP	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo cultivadas em meio completo por 27 dias. Após este período, foi acrescido ácido hialurônico de baixo peso molecular e mantidas por mais 3 dias;
Grupo 4: OSTEO	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo diferenciadas em osteoblastos cultivadas em meio osteogênico;
Grupo 5: OSTEO+AH-ABP	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo diferenciadas em osteoblastos cultivadas em meio osteogênico por 27 dias. Após este período, foi acrescido ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular e mantidas por mais 3 dias;
Grupo 6: OSTEO+AH-BP	Células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo diferenciadas em osteoblastos cultivadas em meio por 27 dias. Após este período, foi acrescido ácido hialurônico de baixo peso molecular e mantidas por mais 3 dias.

### 3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Neste trabalho, os resultados são apresentados como médias± erro padrão da média (SEM). A significância das diferenças entre dois grupos de valores foi calculada pelo teste t de Student emparelhado. Quando um grupo de valores foi comparado com dois ou mais grupos, a significância das diferenças foi analisada pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey. Os valores de p inferiores a 0,05 ( $p < 0,05$ ) foram considerados como representando diferenças significativas.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 ISOLAMENTO, EXPANSÃO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS ESTROMAIS MESENQUIMAIS MURINAS**

#### **4.1.1 Análise morfológica e ensaio de diferenciação adipogênica e osteogênica das ASCs in vitro**

Conforme esperado, as ASCs exibiram morfologia fibroblastóide alongada e fusiforme, com núcleo central e prolongamentos. Fenotipicamente estáveis, apresentaram alta aderência ao plástico e taxas replicativas. Quando submetidas a sinais de indução específicos, elas foram capazes de diferenciar-se em linhagens osteogênica e adipogênica (Figura 1).

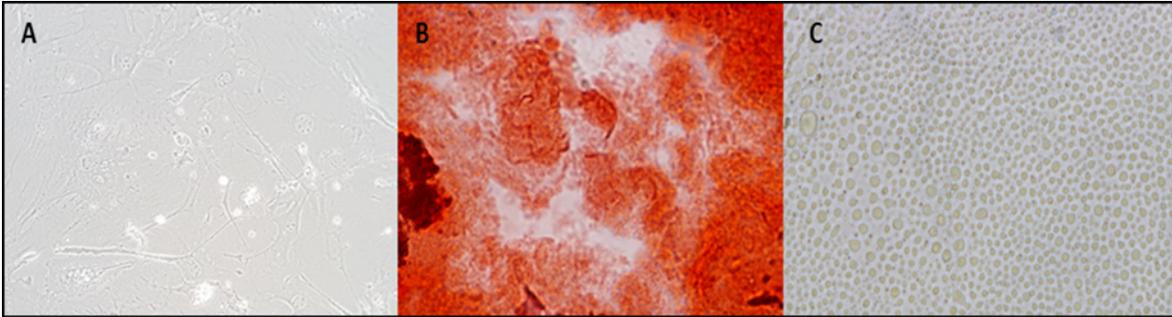


Figura 1 - Microscopia de contraste de fase de ASCs: indiferenciadas, cultivadas em meio completo mantêm o aspecto convencional após a 4ª passagem (A); diferenciadas em osteoblastos, com depósitos de cálcio na matriz extracelular corados com Alizarin Red S (B) e; diferenciadas em adipócitos com vacúolos de gordura corados com Oil Red O (C). Aumento de 100X (A e C) e 200X (B).

#### 4.1.2 Análise da expansão in vitro das células estromais derivadas do tecido adiposo

Estimou-se a expansão das células com base na área ocupada pelas ASCs. À área de crescimento ocupada pela cultura primária foi arbitrariamente dado o valor 1. Ao ocorrer a segunda passagem, a taxa de repique (1:3) foi multiplicada pelo número inicial resultando no valor 3 da área de crescimento acumulada. Este processo foi repetido a cada passagem, fornecendo uma curva de crescimento (gráfico 1) que é diretamente proporcional ao número de células.

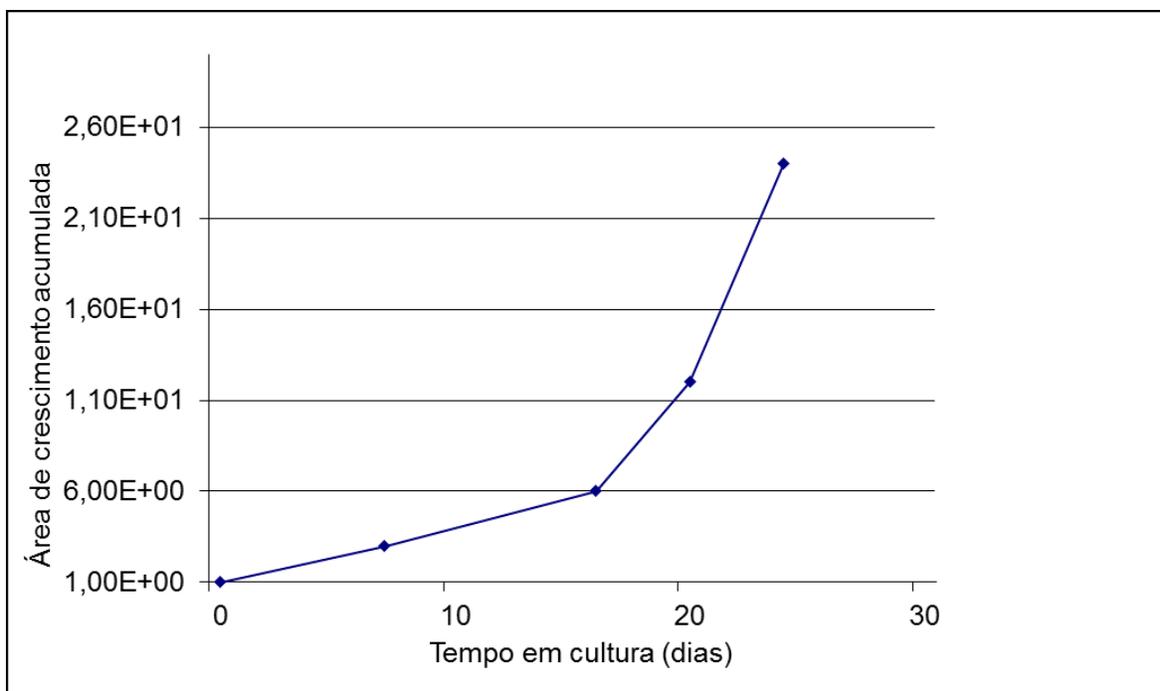


Gráfico 1 - Comparação da cinética de crescimento das ASCs.

Observou-se por 30 dias o potencial de crescimento das ASCs. Durante a fase de isolamento, a adesão das ASCs foi observada às 24 horas do cultivo, *sendo que* apresentaram um crescimento exponencial nas primeiras 96 horas. Após a aderência, as células atingiram 80% de confluência aos sete dias de cultivo. A partir do 14º dia, as passagens foram realizadas em média a cada 3 dias.

#### 4.1.3 Análise fenotípica das mMSCs por citometria de fluxo

As células da quarta passagem foram analisadas por citometria de fluxo com os anticorpos positivos para CD73, CD90 e CD105, e negativos para CD11b, CD34 e CD45. As referidas características permitiram inferir que a população celular isolada e cultivada era homogênea, claramente distinta da linhagem hematopoiética.

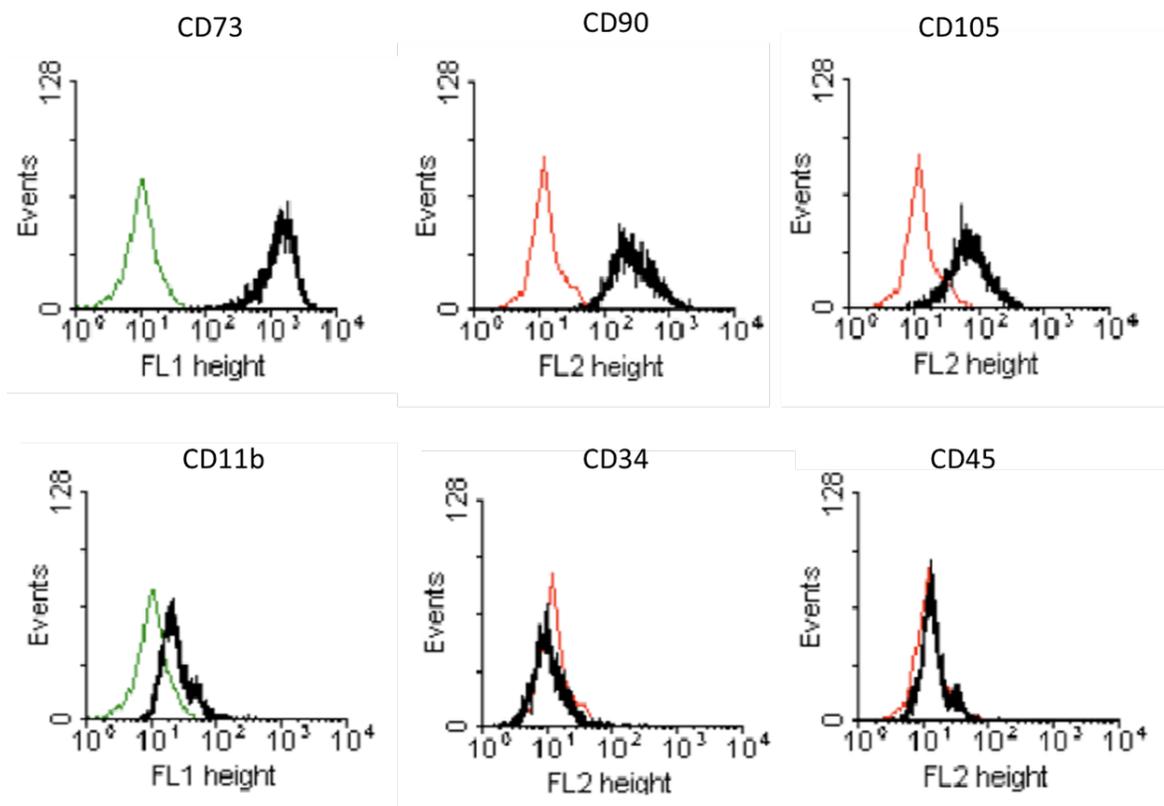


Figura 2 - Histogramas de expressão de CD11b, CD34, CD45, CD73, CD90 e CD105 por citometria de fluxo de células estromais mesenquimais derivadas de tecido adiposo em meio completo após o quarto repique e confluência >80%.

#### 4.1.4 Análise de viabilidade celular das ASCs através do teste de MTT na presença do ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular (AH-ABP).

Os resultados de absorvância de cada grupo com variação de concentração de 15, 25, 50, 75 e 100%, nos três tempos (24, 48 e 72 horas), foram transformados em dados de porcentagem de viabilidade celular, sendo que a absorvância do grupo controle (DMEM) foi considerada 100% de viabilidade.

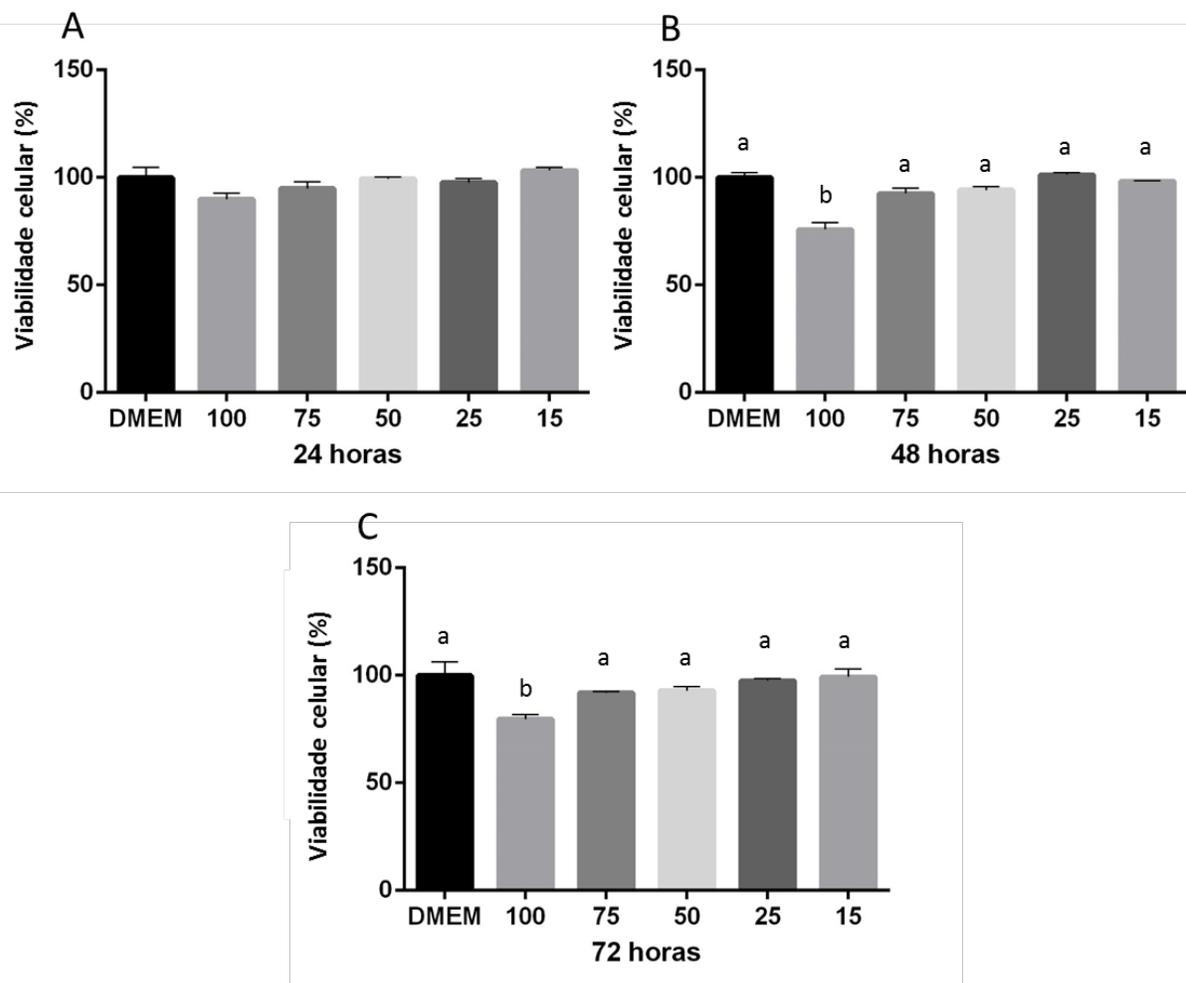


Figura 3 - Viabilidade celular para a linhagem ASC exposta às diferentes concentrações de ácido hialurônico de alto e baixo peso molecular (AH-ABP), durante 24h (A), 48h (B) e 72h (C), verificada através do ensaio de MTT. Barras sem uma letra comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

Não houve diferença estatística entre as distintas concentrações nas primeiras 24h. Apenas nos tempos 48h e 72h houve uma diminuição na viabilidade, com diferença estatística, na concentração de 100% em relação às demais concentrações. Desta forma, o AH-ABP pode ser considerado não citotóxico para as ASCs dentro da faixa de segurança (75%).

#### 4.2 – DOSAGEM DOS FATORES DE CRESCIMENTO

As ASCs, na 4ª passagem, foram semeadas em placas de 96 poços (6 poços/grupo), cultivadas por 30 dias em estufa umidificada a 37°C e 5 % de CO<sub>2</sub> na atmosfera. As células foram expostas aos ácidos, conforme os grupos experimentais (tabela 2), 3 dias antes da análise, na concentração definida pela técnica de MTT (75%) e quantificados os fatores de crescimento presentes no sobrenadante pelo teste ELISA, conforme instruções do fabricante (Quantikine® ELISA Kits).

**Tabela 3 – Distribuição dos grupos experimentais e respectivos volumes.**

Grupo	Células	MC* μL/poço	MDO** μL/poço	HA-ABP*** μL/poço	HA- BP**** μL/poço	Volume total/poço
Grupo 1: ASCs	4 x 10 <sup>4</sup>	200	-	-	-	200
Grupo 2: ASCs+ AH-ABP	4 x 10 <sup>4</sup>	125	-	75	-	200
Grupo 3: ASCs+ AH-BP	4 x 10 <sup>4</sup>	125	-	-	75	200
Grupo 4: OSTEO	4 x 10 <sup>4</sup>	-	200	-	-	200
Grupo 5: OSTEO+ AH-ABP	4 x 10 <sup>4</sup>	-	125	75	-	200
Grupo 6: OSTEO+ AH-BP	4 x 10 <sup>4</sup>	-	125	-	75	200

\* Meio completo: meio de Eagle modificado por Dulbecco, acrescido 10% de soro fetal bovino; \*\* Meio de diferenciação osteoblástica; \*\*\* ácido hialurônico de alto/baixo peso molecular; \*\*\*\* ácido hialurônico de baixo peso molecular.

Após a leitura espectrofotométrica dos resultados de absorvância de cada grupo de fatores de crescimento estudados (VEGF, IGF-1, FGF e BMP-2), a análise estatística dos dados coletados foi realizada pelo programa GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), os quais possuíam uma curva de distribuição normal, sendo então aplicado

o teste estatístico ANOVA de uma via, seguido pelo teste de Tukey, assumindo o valor de  $p < 0,05$ , sendo encontrados os seguintes resultados:

## VEGF

De acordo com o observado (gráfico 2), a secreção de VEGF foi significativamente maior no grupo das ASC e das ASC com adição do AH-ABP, sem diferença estatística dentre estes dois grupos, porém com significância estatística dos demais. Já a adição do AH-BP nas ASCs induziu a redução da expressão de VEGF significativamente ( $p < 0,05$ ).

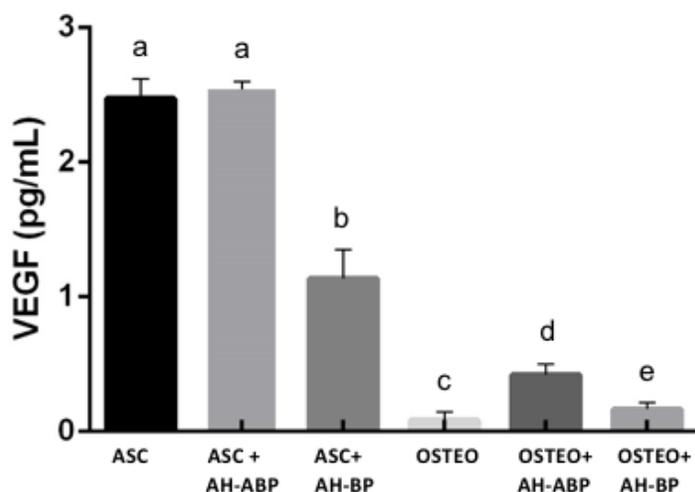


Gráfico 2 – Quantificação do fator de crescimento VEGF no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão, de seis poços por grupo. Barras sem uma letra comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

O grupo OSTEO, obteve a menor expressão de VEGF, com significância estatística entre os demais grupos. Contudo, quando ocorre a adição dos ácidos nas células diferenciadas em osteoblastos (grupos OSTEO+AH-BP e OSTEO+AH-ABP), a expressão de VEGF aumenta significativamente, quando comparados ao grupo controle (OSTEO).

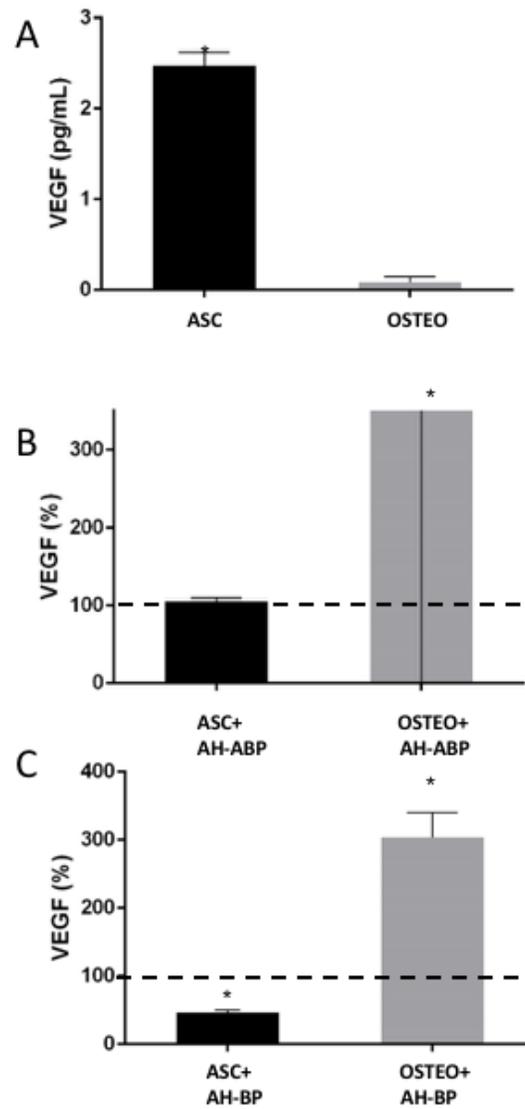


Figura 4 – Gráficos de expressão de VEGF no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os dados dos gráficos B e C são expressos em porcentagens em relação à condição basal (A) e os valores representam média  $\pm$  erro padrão, de seis poços por grupo. O dados foram analisados pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Na figura 4, o gráfico A apresenta a condição basal das células, comparando a expressão de VEGF (pg/mL) entre células indiferenciadas (ASCs) e diferenciadas em osteoblastos (OSTEO). Notoriamente, a quantidade de VEGF no sobrenadante das ASCs

( $2,474 \pm 0,054$ ) é significativamente superior ao sobrenadante das OSTEON (  $0,083 \pm 0,024$ ) ( $p < 0,05$ ).

Nos gráficos B e C, os valores basais foram convertidos em porcentagem considerando 100% (linha pontilhada). Assim, podemos observar, no gráfico B, que a adição do AH-ABP não apresentou diferença na expressão de VEGF quando comparado com o grupo as células-indiferenciadas sem a presença do ácido (ASC). No entanto, no grupo das células OSTEON, pode-se verificar o aumento significativo de VEGF, secretado no sobrenadante, na presença do ácido hialurônico tanto AH-ABP (gráfico B), quanto do AH-BP (gráfico C), quando comparado à sua condição basal.

Contudo no gráfico C, é possível verificar que o uso do ácido AH-BP induziu a diminuição da secreção celular deste fator, com diferença estatística em relação ao grupo das ASCs.

## **IGF-1**

De acordo com o gráfico 3, somente o grupo ASC + AH-BP apresentou aumento significativo da secreção de IGF-1 quando comparado aos demais ( $p < 0,05$ ).

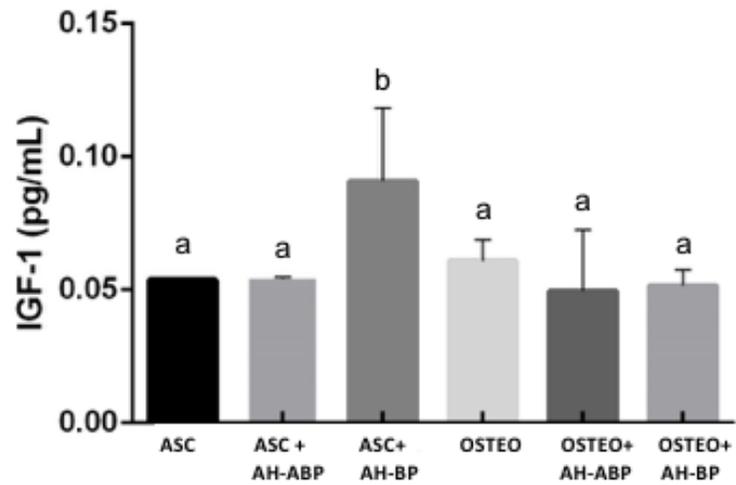


Gráfico 3 – Quantificação do fator de crescimento IGF-1 no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos em média  $\pm$  erro padrão, de seis poços por grupo. Barras sem uma letra comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

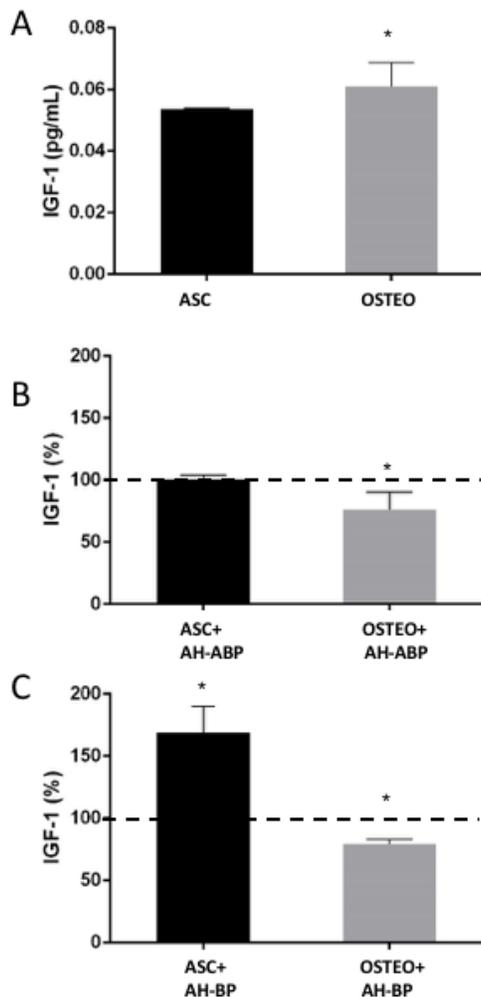


Figura 5 – Gráficos de expressão de IGF-1 no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os dados dos gráficos B e C são expressos em porcentagens em relação à condição basal (A) e os valores representam média  $\pm$  erro padrão, de seis poços por grupo. O dados foram analisados pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Na figura 5, o gráfico A apresenta a condição basal das células, comparando a expressão de IGF-1 (pg/mL) entre células indiferenciadas (ASCs) e diferenciadas em osteoblastos (OSTEO). Observa-se que a quantidade de IGF-1 no sobrenadante das ASCs (0,054±0,001) é significativamente menor ao sobrenadante das OSTEO (0,065±0,002) ( $p < 0,05$ ).

Nos gráfico B e C (Figura 5), os valores basais foram convertidos em porcentagem considerando 100% (linha pontilhada). Assim, podemos observar, no gráfico B, que a adição

do AH-ABP não apresentou diferença na expressão de IGF-1 quando comparado com o grupo as células-indiferenciadas sem a presença do ácido (ASC). No entanto, no grupo das células OSTEO, pode-se verificar uma diminuição significativo de IGF-1, secretado no sobrenadante, na presença do ácido hialurônico tanto AH-ABP (gráfico B), quanto do AH-BP (gráfico C – Figura 5), quando comparado à sua condição basal.

Contudo no gráfico C, é possível verificar que o uso do ácido AH-BP induziu aumento da secreção celular deste fator, com diferença estatística em relação ao grupo das ASCs.

## **FGF**

Avaliando a secreção de FGF no sobrenadante das células, apenas nos grupos ASC e ASC + AH-ABP pode ser detectada pelo teste ELISA. Dentre estes, pode-se observar que a

presença do ácido de alto/baixo peso molecular induziu um aumento significativo do referido fator

Comparando os dois grupos em que os resultados foram positivos, observa-se que a expressão de FGF foi maior na presença do ácido AH-ABP, com diferença estatística significativa.

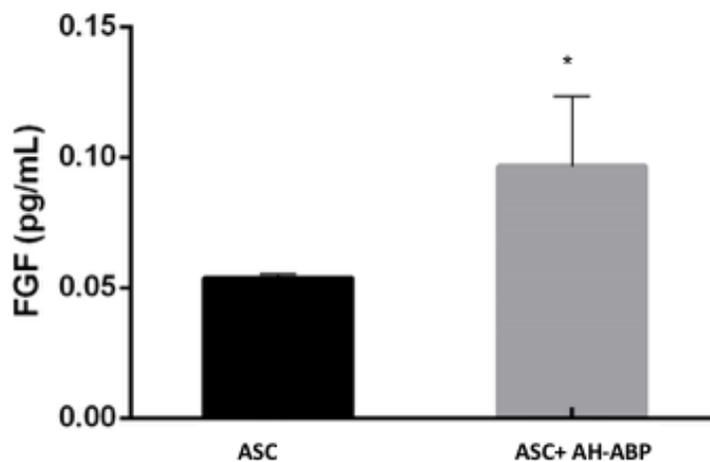


Gráfico 4 – Quantificação do fator de crescimento FGF no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos em média + erro padrão ( $p < 0,05$ ).

## BMP-2

Em relação à secreção de BMP-2, os grupos ASC e ASC+AH-ABP apresentaram maior secreção, diferindo estatisticamente dos demais. Ainda, os grupos ASC+AH-BP, OSTEOP, OSTEOP+AH-ABP, tiveram expressão muito baixa de BMP-2, sem diferença estatística significativa entre si.

A menor secreção de BMP-2 ocorreu no grupo OSTEOP+BP, com diferença estatística significativa dos demais grupos

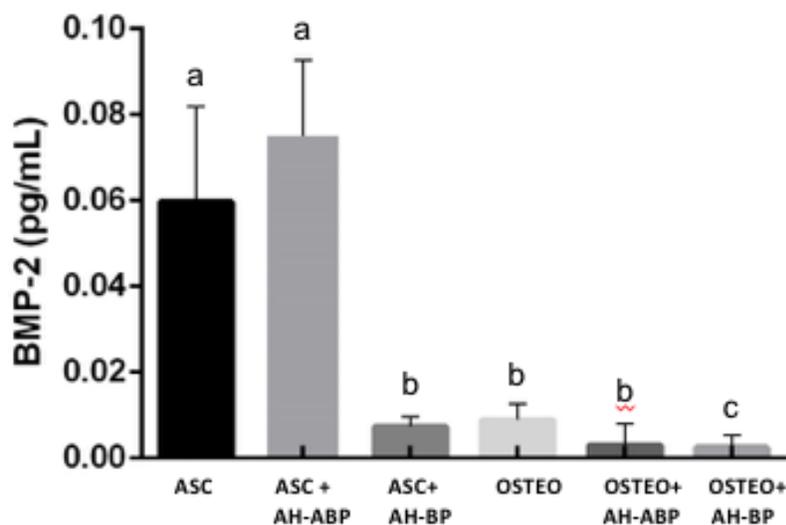


Gráfico 5 – Quantificação do fator de crescimento BMP-2 no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os valores são expressos em média + erro padrão, de seis poços por grupo. Barras sem uma letra comum diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

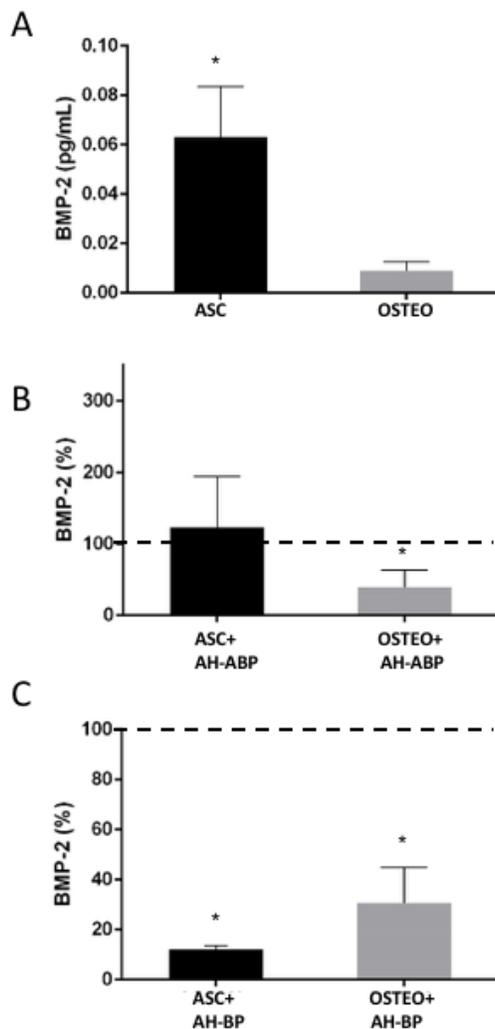


Figura 6 – Gráficos de expressão de BMP-2 no sobrenadante celular nos diferentes grupos experimentais. Os dados dos gráficos B e C são expressos em porcentagens em relação à condição basal (A) e os valores representam média + erro padrão, de seis poços por grupo. O dados foram analisados pelo teste t ( $p < 0,05$ ).

Observando os gráficos da figura 6, a adição do AH-ABP às ASCs aumentou a secreção de BMP-2 (Gráfico B), porém sem diferença estatística do grupo basal. Já a ASC associada ao AH-BP reduziu a secreção de BMP-2, comparada à sua condição basal ( $0,061 \pm 0,007$ pg/mL).

A secreção de BMP-2 no grupo OSTEO foi baixa ( $0,008 \pm 0,001$ pg/mL), e, quando foram adicionados os ácidos hialurônicos (OSTEO+AH-ABP ou OSTEO-AH-BP), a secreção de BMP-2 reduziu ainda mais, com diferença significativa em relação ao grupo OSTEO.

## 5 DISCUSSÃO

Primeiramente foi realizado o isolamento das células estromais mesenquimais derivadas do tecido adiposo murino (mASCs), a caracterização das mesmas, de acordo com o preconizado pela International Society for Cellular Therapy <sup>56</sup>, quanto a capacidade de proliferação com células aderentes à superfície plástica, perfil fenotípico e diferenciação *in vitro* em osteoblastos e adipócitos, apresentando-se como células estromais genuínas de acordo com nossos resultados.

Os resultados da análise fenotípica por citometria de fluxo de nosso estudo demonstraram que as ASCs foram positivas para CD73, CD90 e CD105 e negativas para CD11b, CD34 e CD45. Semelhantes achados foram encontrados no trabalho de Dietrich et al. (2012) *que* relatou que as ASC não expressaram marcadores de membrana específicos pra linhagens hematopoiéticas, ou seja, negativas para CD34 e CD45, apresentando-se positivas para CD90, CD13, CD29 e CD49. Os marcadores de membrana CD90 são uma glicoproteína de superfície celular que pode ser usada como *marcadores* para uma variedade de células estromais, enquanto CD34 é um marcador de membrana para células hematopoiéticas, não podendo ser expressas em células estromais mesenquimais, e CD45 também é um marcador para linhagens hematopoiéticas. <sup>24</sup>

Diversos estudos demonstraram que o AH é uma matriz ideal para mimetizar o ambiente natural tridimensional para as células estromais mesenquimais, tendo sido utilizado para regeneração de osso, tecido cardíaco e de tecido neural <sup>63</sup>. AH tem um papel importante na regulação de comportamentos celulares, como adesão, migração, diferenciação celular <sup>47</sup>, <sup>48</sup>. Sua habilidade para auxiliar no reparo tecidual depende do seu peso molecular e da interação com células específicas. Enquanto o AH-BP é relatado na literatura tendo efeitos pró-angiogênicos, imunoestimulatório, pró-inflamatórios e de estimular a proliferação e diferenciação celular <sup>64,48</sup>, o AH-AP apresenta efeitos opostos, tendo propriedades *anti*-inflamatórias, anti-angiogênico, imunossupressivos e inibe a proliferação celular <sup>65 66</sup>.

O AH-ABP é um novo composto é baseado em cadeias de alto e baixo peso molecular combinados, interagindo cooperativamente e que apresenta uma viscosidade menor, permitindo desta maneira aumentar a concentração do ácido na fórmula sem exceder sua viscosidade e causar desconforto aos tecidos. Além disso não apresenta modificações

químicas e nem contém produtos químicos.<sup>53</sup> O novo composto de AH-ABP foi estudado na pesquisa de D'agostino et al. (2015), onde observaram ter uma performance tecidual melhor deste do que os outros AH, apresentando uma melhor estabilidade ao efeito das hialuronidases, prolongando seu efeito in vivo. Foi relatado que a combinação de AH de alto e baixo peso molecular melhora a eficiência de ligações cruzadas entre as cadeias de AH, proporcionando um gel com melhor consistência para uso in vivo. Stellavato et al. (2017) também avaliaram os efeitos deste novo composto de AH-ABP, comparando-o com AH-AP e AH-BP, na proliferação e diferenciação adipogênica de ASC. Foi relatado que formulações à base de AH-ABP claramente aumentou a taxa de proliferação das ASCs comparada com o uso dos ácidos de outros pesos moleculares, bem como melhorou a diferenciação dessas células em adipócitos.

Nossos resultados mostraram que o efeito do AH-ABP demonstrou ser positivo para uso como matriz para ASC, visto que, quando utilizado, os níveis de secreção dos fatores de crescimento foram mais elevados. Na secreção de FGF, AH-ABP apresentou a maior expressão deste fator, com diferença estatística significativa do grupo de ASC. Na secreção de VEGF os valores de expressão em ASC e ASC+AH-ABP foram os mais elevados deste fator e sem diferença estatística entre eles. Na expressão de BMP-2 ocorreu semelhante resultado, com os maiores valores de expressão de BMP-2 para ASC e ASC+AH-ABP. Ainda a matriz de AH-ABP aumentou a secreção de VEGF no grupo das OSTEIO+AH-ABP, comparado com o grupo OSTEIO em meio de cultura. Ou seja, mesmo quando AH-ABP não aumentou a secreção como observado nos fatores VEGF e BMP-2, se manteve no mesmo nível elevado sem diferença significativa dos grupos das ASCs, demonstrando que não influencia negativamente como matriz.

No geral o uso de AH-BP, nesse estudo, em combinação com ASC ou com OST apresentou níveis de secreção dos fatores de crescimento VEGF, BMP-2 e FGF bem menores do que os apresentados pelo AH-ABP. O único grupo em que auxiliou em uma maior secreção de fator foi o IGF-1 (Grupo: ASC+AH-BP).

Todos os fragmentos de AH têm uma função fisiológica, o que é importante para a regulação biológica dos tecidos, da síntese da matriz extracelular, na regulação dos comportamentos celulares, como adesão, migração, diferenciação e sinalização celular.<sup>47,48</sup> O AH nativo presente no corpo humano apresenta alto peso molecular, no entanto, quando

ocorre alguma lesão tecidual aguda, ele é fragmentado em moléculas menores, durante o processo de degradação da matriz extracelular, com objetivo de ativar a resposta imune do hospedeiro, pois o AH de baixo peso apresenta propriedade pró-inflamatórias.<sup>67</sup> O AH interage com receptores de membrana na superfície celular, no qual o CD44 é o principal receptor de AH, desencadeando diferentes respostas biológicas. CD 44 é uma glicoproteína de superfície celular, sendo expresso por células estromais mesenquimais, estando a interação AH-CD44 envolvida em múltiplas funções celulares como proliferação, diferenciação e sinalização celular.<sup>48</sup>

Conforme relatado na literatura, o CD44 tem uma maior ativação pelo AH de alto peso molecular<sup>68</sup>, de fato, quanto maior o peso molecular do AH, mais sítios de ligação terão para CD44.<sup>48</sup> De acordo com Misra et al. (2015) em sua pesquisa todos os AH analisados ativaram o CD44, porém as maiores respostas foram encontradas na presença a AH de alto peso molecular.<sup>69</sup> Portanto, um possível mecanismo da ocorrência de uma maior expressão de fatores de crescimento nas ASCs quando usado AH-ABP, e menor efeito significativo quando utilizado o AH-BP, pode ser devido ao fato de que as moléculas de AH de diferentes pesos ativam diferentemente estes receptores de membrana, o que acaba afetando nas ações e na comunicação celular destas células, bem como afeta a sua proliferação e diferenciação. O AH-AP se liga mais facilmente ao CD 44, o qual é expresso pelas ASCs como relatado anteriormente, ativando mais eficientemente diversos mecanismos celulares, dos quais, também a secreção dos fatores de crescimento.<sup>25</sup> Já o AH-BP foi relatado ter uma fraca ligação a esse receptor de membrana, CD 44, não ativando da mesma maneira seus mecanismos celulares.<sup>67</sup> Como no AH-ABP há a combinação dos dois tipos de ácidos, tem maior ligação aos receptores de membrana das ASC do que o AH-BP sozinho e parece, desta maneira, afetar a sinalização celular destas células de acordo com nossa pesquisa. D'Agostino et al. (2017) avaliou a ativação de receptores de AH, como CD44 e TLR4 em relação ao tamanho do AH, mostrando que o os AH de maiores pesos moleculares tiveram uma maior ativação do CD44, enquanto AH-BP ativam mais os receptores TLR4. Zhao et al. (2015) relata que esse possível mecanismo é devido ao AH de diferentes pesos moleculares afetar os eventos celulares em diferentes estágios.

Os resultados deste estudo mostraram que os fatores de crescimento (VEGF, BMP-2, FGF e IGF-1) tiveram maior expressão no grupo das células estromais indiferenciadas

(ASC), enquanto as células diferenciadas em osteoblastos (OSTEO) expressaram baixos valores em VEGF e BMP-2 e nenhuma secreção em FGF, demonstrando aparentemente que quanto menor o estágio de diferenciação celular, mais influência terá o efeito parácrino de secreção celular.

Os achados desta pesquisa vão ao encontro dos relatados por Castano-Izquierdo et al. (2007), *onde foi avaliado* o potencial da regeneração óssea in vivo das MSCs pré-cultivadas em meio osteogênico por diferentes períodos de tempo (4, 10 e 16 dias) que foram implantadas em defeitos críticos no crânio de ratos. O grupo controle foi composto de MSCs em meio não-condicionado. Estes autores observaram que as células que foram cultivadas em meio osteogênico por 4 dias revelaram uma maior formação óssea, enquanto as que foram cultivadas por 16 dias apresentaram a menor formação óssea. O ponto interessante é que as MSCs do grupo controle, que não estavam em meio condicionado, demonstraram uma neoformação óssea maior do que aquelas em que foram expostas ao meio osteogênico por 16 dias, corroborando os achados do nosso estudo.

Nossos resultados também estão de acordo com estudos anteriores in vivo e in vitro em que utilizaram matrizes semeadas com MSCs pré-cultivadas em meio osteogênico por curtos períodos de tempos demonstraram níveis elevados de osteoindutividade.<sup>70,71</sup> Van der Dolder et al. (2002) cultivou MSCs em meio osteogênico em 1, 4 e 8 dias e implantou em defeitos críticos no crânio de ratos, encontrando maiores valores formação óssea no menor período de cultivo (1 dia). Logo, parece ser um fator importante para a regeneração óssea, e também para o futuro das pesquisas com engenharia tecidual neste campo, a presença de células passando por diferenciação (pré-osteoblastos), e não completamente diferenciadas. Na nossa pesquisa as células estromais mesenquimais foram diferenciadas em osteoblastos por um período de 30 dias, parece que, de acordo com esses resultados, esse período deve ser tardio para a liberação de fatores de crescimento.

Semelhante resultado foi observado no estudo de Boeckel et al. (2016) em que foi avaliado a utilização de ASCs e AH como composto celular para engenharia tecidual óssea. Foram realizados defeitos ósseos críticos em fêmures de ratos e realizaram 5 tratamentos de enxertia: grupo 1 – controle (apenas o defeito), grupo 2 – matriz AH, grupo 3 – ASCs, grupos 4 – ASC+AH, grupo 5 – ASC osteoinduzidas + AH. Após 23 dias, analisaram as regiões por microtomografia computadorizada (microCT), histomorfometria e RT-PCR. Na análise de

microCT, a superfície de contato ósseo e a densidade de superfície óssea apresentaram as maiores médias para o grupo em que foi utilizado ASCs+AH, além disso maiores valores de tecido ósseo regenerado também foram vistos na histomorfometria neste mesmo grupo. Foi sugerido, neste estudo, que a combinação de AH como matriz para ASCs sem osteoindução prévia pode ser positivo para a regeneração óssea, favorecendo desta maneira a técnica de enxertia, visto que há uma menor manipulação celular *in vitro*, conseguindo com isso ganho de tempo e maior segurança.

Inukai et al. (2013) avaliou *in vitro* a secreção dos fatores de crescimento IGF-1, VEGF, FGF, TGF- $\beta$  e BMP-2 no meio de cultura de MSCs removidas da medula óssea apenas em meio de cultura completo, através do teste ELISA. Encontrou os valores de secreção de IGF-1 = 211.8 pg/ml e VEGF = 108.9 pg/ml, sendo que não observou secreção dos demais fatores. Em outra análise *in vitro* as MSCs também foram cultivadas em meio de cultura completo e foi feita análise da secreção dos fatores de crescimento IGF-1, VEGF, FGF-2, BMP-2 através também do teste Elisa, no qual também encontraram a expressão apenas dos fatores IGF-1 e VEGF, com valores de secreção de 465 pg/ml e 109 pg/ml.<sup>72</sup> Porém nestes dois estudos não houve a comparação das MSCs com células diferenciadas em osteoblastos. Em nossos achados, além da expressão dos fatores IGF-1, VEGF pelas células indiferenciadas, que foram de 55 pg/ml e 2437 pg/ml, respectivamente, ainda tivemos a expressão em FGF e BMP-2.

Em relação a secreção de IGF-1 pelos grupos estudados, observamos a sua maior expressão no grupo ASC+AH-BP, com diferença significativa dos demais grupos. Nosso resultado está de acordo com o estudo de Hsiao et al. (2012) em que foi comparado MSCs de diferentes fontes, incluindo células estromais removidas do tecido adiposo, derivadas da medula óssea e da papila dentária, demonstrando que o IGF-1 teve a maior expressão nas ASCs comparadas com as demais fontes.<sup>73</sup> No entanto, os resultados diferentes foram encontrados por Walsh et al. (2003) demonstraram que a expressão IGF-1 é dependente de diferenciação, ou seja, sendo mais expresso em células mais maduras da linhagem osteogênica, onde parecem funcionar na manutenção do fenótipo diferenciado e na supressão de apoptose.

Podemos observar que a expressão deste fator de crescimento nos demais grupos foi semelhante, sem diferença estatística significativa entre eles, o que pode ter ocorrido é que

provavelmente as culturas celulares foram afetadas pela concentração de insulina presente no meio de cultura DMEM.<sup>74</sup>

Dentre os vários fatores que podem influenciar na cicatrização óssea, a expressão da superfamília TGF- $\beta$  parece ter um papel importante, principalmente as BMPs. A baixa secreção do fator de crescimento BMP-2 no grupo OSTEO deve-se provavelmente ao estágio de diferenciação dos osteoblastos utilizados no estudo no momento em que foi avaliado, visto que, segundo Cho et al. (2002) a BMP-2 tem sua expressão máxima nos primeiros dias da cicatrização óssea, sugerindo seu papel precoce na cascata de eventos do reparo ósseo, logo, novamente, quanto menor o estado de diferenciação, maior a secreção parácrina. O mesmo fato é confirmado nos estudo de Einhorn (1998), em que também relata que as BMPs e os fatores que regulam a diferenciação das células ósseas são mais provavelmente expressas em estágios anteriores do desenvolvimento ósseo<sup>75</sup>. Marsell et al. (2009) trazem dados semelhantes, mostrando que a BMP-2 tem seu maior aumento da expressão nas 24 horas iniciais do processo de reparo ósseo. Devido a essa expressão precoce, o grupo sugere que a BMP-2 pode iniciar a produção de outras BMPs para que ocorra uma cicatrização funcional. Em contraste, as BMP-3, BMP-4, BMP-7 e BMP-8 mostraram uma expressão maior no período de 14 a 21 dias do processo de reparo ósseo<sup>75</sup>. Costello et al. (2010) também afirmam que BMP-2 é expressa durante a primeira fase de cicatrização, tendo como função atrair as MSCs para o local de cicatrização e depois induzir sua diferenciação.

Foi demonstrado que o VEGF está envolvido na cicatrização óssea por estimular a diferenciação dos osteoblastos, influenciando as MSCs a se diferenciarem.<sup>76</sup> A angiogênese ocupa um papel fundamental no processo de regeneração de tecido ósseo e na engenharia de tecidos, sendo necessário nutrientes e oxigênio para manter a viabilidade celular.<sup>15</sup> Em relação a secreção do VEGF, sua maior expressão ocorreu nos grupos ASC e ASC+AH-ABP, com diferença estatística significativa dos demais grupos. Embora a menor secreção de VEGF tenha ocorrido no grupo OSTEO, quando adicionado os ácidos hialurônicos às células diferenciadas em osteoblastos (grupos OSTEO+AH-ABP e OSTEO+AH-BP) ocorreu um aumento significativo da expressão de VEGF. Diversos estudos relatam as propriedades de cada um dos AH, portanto por o AH-BP ter característica de ser angiogênico, pode-se compreender porque sua adição OSTEO teve um efeito mais expressivo, já o AH-ABP tem

o efeito cooperativo do ácido de baixo peso com o de alto peso molecular, auxiliando com os efeitos pró-angiogênicos que estão presentes no AH-BP em sua formulação.

De acordo com Kempen et al. (2009) o estabelecimento do leito vascular é um evento precoce que precede a formação do osso e, durante a cicatrização óssea normal, a expressão de VEGF mostrou um pico durante os primeiros dias. Foi relatado também em outro estudo que VEGF tem um papel importante na cicatrização óssea pois tem efeito direto nas células osteoprogenitoras, promovendo a diferenciação delas, interferindo em estágios precoces na cascata de neoformação óssea.<sup>76</sup> Logo, a angiogênese precede a fase de secreção da matriz óssea, por também estimular que células osteoprogenitoras venham ao sítio de regeneração, sendo mais expresso esse fator quanto menor for o estado de diferenciação das células.

## 6 CONCLUSÕES

Em nosso estudo, avaliando a influência do ácido hialurônico de pesos moleculares distintos nos mecanismos parácrinos das células *estromais* mesenquimais derivadas do tecido adiposo, diferenciadas ou não em osteoblastos, verificou-se uma tendência de melhor resposta quando do emprego de células indiferenciadas em comparação às células já diferenciadas em osteoblastos, visto que expressaram mais vigorosamente fatores de crescimento relacionados ao metabolismo ósseo. Longos períodos de diferenciação pareceram levar a uma progressiva redução na capacidade local de osteoindução.

A presente pesquisa demonstrou que ácidos hialurônicos de pesos moleculares diferentes podem modular a secreção de fatores de crescimento de maneira distinta. Nossos achados sugerem que o uso do AH-ABP em engenharia tecidual demonstraram não causar prejuízo no efeito parácrino das mASCs e, por vezes ainda, favorecendo a expressão de certos fatores de crescimento. Resultados ainda sugerem ocorrer um efeito *positivo* do uso de ASCs e AH-ABP. Enquanto o uso de AH-BP nas ASCs e OSTEO foi inferior em termos de expressão de fatores de crescimento quando comparado com o uso de AH-ABP.

A partir deste estudo observamos que a matriz de AH-ABP juntamente com ASCs tem potencial para influenciar positivamente no reparo do tecido ósseo através de uma maior secreção desses fatores de crescimento osteogênicos, comparado com o uso da outra matriz

de AH-BP, no entanto, a aplicação deste achado necessita ser confirmada in vivo em modelos animais para testar a eficácia clínica desta estratégia e confirmar os resultados obtidos.

## REFERÊNCIAS

1. Hughes FJ. *Periodontium and Periodontal Disease*. Elsevier Inc.; 2015. doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00038-2
2. Misawa M, Lindhe J, Araújo MG. The alveolar process following single-tooth extraction: a study of maxillary incisor and premolar sites in man. *Clin Oral Implants Res*. 2016;27(7):884-889. doi:10.1111/clr.12710
3. Chappuis V, Araújo MG, Buser D. Clinical relevance of dimensional bone and soft tissue alterations post-extraction in esthetic sites. *Periodontol 2000*. 2017;73(1):73-83. doi:10.1111/prd.12167
4. Kaku M, Akiba Y, Akiyama K, Akita D, Nishimura M. Cell-based bone regeneration for alveolar ridge augmentation - Cell source, endogenous cell recruitment and immunomodulatory function. *J Prosthodont Res*. 2015;59(2):96-112. doi:10.1016/j.jpor.2015.02.001
5. Amini, A.R; Laurencin, C.T.; Nukavarapu SP. Bone tissue a engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2013;40(5):363-408. doi:10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10
6. Shanbhag S, Shanbhag V. Clinical Applications of Cell-Based Approaches in Alveolar Bone Augmentation: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2015;17(S1):e17-e34. doi:10.1111/cid.12103
7. Götz C, Warnke PH, Kolk A. Current and future options of regeneration methods and reconstructive surgery of the facial skeleton. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015;120(3):315-323. doi:10.1016/j.oooo.2015.05.022
8. Shanbhag S, Stavropoulos A, Suliman S, Hervig T, Mustafa K. Efficacy of Humanized Mesenchymal Stem Cell Cultures for Bone Tissue Engineering: A Systematic Review with a Focus on Platelet Derivatives. *Tissue Eng Part B Rev*. 2017;23(6):552-569. doi:10.1089/ten.teb.2017.0093
9. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis P V. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. *Injury*. 2011;42(SUPPL. 2):S3-S15. doi:10.1016/j.injury.2011.06.015

10. Delloye C, Cornu O, Druez V, Barbier O. Bone allografts: WHAT THEY CAN OFFER AND WHAT THEY CANNOT. *J Bone Jt Surg - Br Vol.* 2007;89-B(5):574-580. doi:10.1302/0301-620X.89B5.19039
11. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: A review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg.* 2005;16(6):981-989. doi:10.1097/01.scs.0000179662.38172.dd
12. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011;14(3):88-95. doi:10.1016/S1369-7021(11)70058-X
13. Kim J, Kim IS, Cho TH, et al. Bone regeneration using hyaluronic acid-based hydrogel with bone morphogenic protein-2 and human mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2007;28(10):1830-1837. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.050
14. Oppenheimer AJ, Mesa J, Buchman SR. Current and Emerging Basic Science Concepts in Bone Biology. *J Craniofac Surg.* 2012;23(1):30-36. doi:10.1097/SCS.0b013e318240c6d9
15. Bouhadir KH, Mooney DDJ. Promoting angiogenesis in engineered tissues. *J Drug Target.* 2001;9(6):397-406. doi:10.3109/10611860108998775
16. Collins MN, Birkinshaw C. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering - A review. *Carbohydr Polym.* 2013;92(2):1262-1279. doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.028
17. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry - Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res.* 2012;56(4):229-248. doi:10.1016/j.jpor.2012.10.001
18. Meirelles Lda S, Nardi NB. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol.* 2003;123(4):702-711.
19. Caplan AI. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007;213(2):341-347. doi:10.1002/jcp.21200
20. Khojasteh A, Behnia H, Dashti SG, Stevens M. Current trends in mesenchymal stem cell application in bone augmentation: A review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg.* 2012;70(4):972-982. doi:10.1016/j.joms.2011.02.133
21. Bieback K, Kern S, Klüter H, Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 2004;22(4):625-634. doi:10.1634/stemcells.22-4-625
22. Cowan CM, Shi YY, Aalami OO, et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol.* 2004;22(5):560-567. doi:10.1038/nbt958
23. Han DS, Chang HK, Kim KR, Woo SM. Consideration of Bone Regeneration Effect of Stem Cells. *J Craniofac Surg.* 2014;25(1):196-201. doi:10.1097/SCS.0000000000000378
24. Dietrich I, Cochet O, Villageois P, Rodrigues CJ. Engraftment of human adipose derived stem cells delivered in a hyaluronic acid preparation in mice. *Acta Cir Bras.* 2012;27(4):283-289. doi:10.1590/S0102-86502012000400001
25. Stellavato A, La Noce M, Corsuto L, et al. Hybrid Complexes of High and Low Molecular Weight Hyaluronans Highly Enhance HASCs Differentiation: Implication for Facial Bioremodelling. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(3):1078-1092. doi:10.1159/000485414
26. Buttery LDK, Bourne S, Xynos JD, et al. Differentiation of Osteoblasts and in Vitro

- Bone Formation from Murine Embryonic Stem Cells. *Tissue Eng.* 2001;7(1):89-99. doi:10.1089/107632700300003323
27. Jeon O, Rhie JW, Kwon I-K, Kim J-H, Kim B-S, Lee S-H. In Vivo Bone Formation Following Transplantation of Human Adipose-Derived Stromal Cells That Are Not Differentiated Osteogenically. *Tissue Eng Part A.* 2008;14(8):1285-1294. doi:10.1089/ten.tea.2007.0253
  28. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, et al. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117(3):857-863. doi:10.1097/01.prs.0000204566.13979.c1
  29. Costello BJ, Shah G, Kumta P, Sfeir CS. Regenerative Medicine for Craniomaxillofacial Surgery. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2010;22(1):33-42. doi:10.1016/j.coms.2009.10.009
  30. Keshtkar S, Azarpira N, Ghahremani MH. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Novel frontiers in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):1-9. doi:10.1186/s13287-018-0791-7
  31. Madrigal M, Rao KS, Riordan NH. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J Transl Med.* 2014;12(1):1-14. doi:10.1186/s12967-014-0260-8
  32. Gnecci M. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006;20(6):661-669. doi:10.1096/fj.05-5211com
  33. Inukai T, Katagiri W, Yoshimi R, et al. Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(2):763-768. doi:10.1016/j.bbrc.2012.11.074
  34. Role THE, Bone OF, Protein M, Bone ON, Repair T. O PAPEL DA PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA NA. 2005;13(4):194-195.
  35. Rosen V. Bone morphogenetic proteins (BMPs) and fracture repair. *Bone.* 2009;44(2009):S23. doi:10.1016/j.bone.2009.01.051
  36. Marsell R, Einhorn TA. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury.* 2009;40:S4-S7. doi:10.1016/S0020-1383(09)70003-8
  37. Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of Basic Fibroblast Growth-Factor on Bone-Formation In vitro. *J Clin Invest.* 1988;81(5):1572-1577.
  38. Koch H, Jadowiec JA, Campbell PG. Expression in Human Mesenchymal Stem Cells. 2005;631:621-631.
  39. Youssef A, Aboalola D, Han VKM. The roles of insulin-like growth factors in mesenchymal stem cell niche. *Stem Cells Int.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/9453108
  40. Locatelli V, Bianchi VE. Effect of GH/IGF-1 on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/235060
  41. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF $\beta$  and BMP. *Bone.* 1996;19(1 SUPPL.):S1-S12. doi:10.1016/S8756-3282(96)00138-X
  42. Haumer A, Bourguine PE, Occhetta P, Born G, Tasso R, Martin I. Delivery of cellular factors to regulate bone healing. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:285-294. doi:10.1016/j.addr.2018.01.010
  43. Mullen LM, Best SM, Brooks RA, et al. Binding and Release Characteristics of Insulin-Like Growth Factor-1 from a Collagen-Glycosaminoglycan Scaffold. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010;16(6):1439-1448. doi:10.1089/ten.tec.2009.0806

44. Torroni A. Engineered Bone Grafts and Bone Flaps for Maxillofacial Defects: State of the Art. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67(5):1121-1127. doi:10.1016/j.joms.2008.11.020
45. Schwartz Z, Goldstein M, Raviv E, Hirsch A, Ranly DM, Boyan BD. Clinical evaluation of demineralized bone allograft in a hyaluronic acid carrier for sinus lift augmentation in humans: A computed tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(2):204-211. doi:10.1111/j.1600-0501.2006.01303.x
46. Dicker KT, Gurski LA, Pradhan-Bhatt S, Witt RL, Farach-Carson MC, Jia X. Hyaluronan: A simple polysaccharide with diverse biological functions. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1558-1570. doi:10.1016/j.actbio.2013.12.019
47. Zhao N, Wang X, Qin L, Guo Z, Li D. Effect of molecular weight and concentration of hyaluronan on cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;465(3):569-574. doi:10.1016/j.bbrc.2015.08.061
48. Zhao N, Wang X, Qin L, et al. Effect of hyaluronic acid in bone formation and its applications in dentistry. *J Biomed Mater Res - Part A.* 2016;104(6):1560-1569. doi:10.1002/jbm.a.35681
49. Aya KL, Stern R. Hyaluronan in wound healing: Rediscovering a major player. *Wound Repair Regen.* 2014;22(5):579-593. doi:10.1111/wrr.12214
50. Guo J, Guo S, Wang Y, Yu Y. Adipose-derived stem cells and hyaluronic acid based gel compatibility, studied in vitro. *Mol Med Rep.* 2017;16(4):4095-4100. doi:10.3892/mmr.2017.7055
51. Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, et al. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng.* 2016;1(7):481-493. doi:10.1021/acsbiomaterials.5b00181.High
52. Baldini A, Zaffe D, Nicolini G. Bone-defects healing by high-molecular hyaluronic acid: preliminary results. *Ann Stomatol (Roma).* 2010;1(1):2-7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22238698%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3254375>.
53. Stellavato A, Corsuto L, D'Agostino A, et al. Hyaluronan hybrid cooperative complexes as a novel frontier for cellular bioprocesses re-activation. *PLoS One.* 2016;11(10):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0163510
54. D'Agostino A, Stellavato A, Busico T, et al. In vitro analysis of the effects on wound healing of high- and low-molecular weight chains of hyaluronan and their hybrid H-HA/L-HA complexes. *BMC Cell Biol.* 2015;16(1):1-15. doi:10.1186/s12860-015-0064-6
55. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905
56. Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-395. doi:10.1080/14653240500319234
57. Boeckel DG. A Utilização de Células-Tronco Mesenquimais Adipogênicas e Ácido Hialurônico como Composto Celular para Engenharia Tecidual Óssea: Estudo in vivo. Tese. 2016.
58. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Schubert D. Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) Reduction. *J Neurochem.* 1997;6(3). <http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1046/j.1471->

- 4159.1997.69020581.x/asset/j.1471-4159.1997.69020581.x.pdf?v=1&t=hqpyokbh&s=77517f60cf0558cc78196495d45fe80c9253aaf%5Cnpapers3://publication/uuid/05357E38-EE38-4189-AEB5-E322314D5811.
59. Tang D, Tare RS, Yang LY, Williams DF, Ou KL, Oreffo ROC. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. 2016;83. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.01.024
  60. Coutu DL, Galipeau J. Roles of FGF signaling in stem cell self-renewal, senescence and aging. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(10):920-933. doi:10.18632/aging.100369
  61. Kodama N, Nagata M, Tabata Y, Ozeki M, Ninomiya T, Takagi R. A local bone anabolic effect of rhFGF2-impregnated gelatin hydrogel by promoting cell proliferation and coordinating osteoblastic differentiation. *Bone*. 2009;44(4):699-707. doi:10.1016/j.bone.2008.12.017
  62. Mccubrey BJA, Steelman LS, Mayo MW, Algate PA, Dellow RA, Kaleko M. Growth-Promoting Effects of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1). 2018;1:921-930.
  63. Kim J, Kim IS, Cho TH, et al. In vivo evaluation of MMP sensitive high-molecular weight HA-based hydrogels for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2010;95(3 A):673-681. doi:10.1002/jbm.a.32884
  64. Shewale AR, Barnes CL, Fischbach LA, Ounpraseuth ST, Painter JT, Martin BC. Comparison of Low-, Moderate-, and High-Molecular-Weight Hyaluronic Acid Injections in Delaying Time to Knee Surgery. *J Arthroplasty*. 2017;32(10):2952-2957.e21. doi:10.1016/j.arth.2017.04.041
  65. Boeckel DG, Shinkai RSA, Grossi ML, Teixeira ER. In vitro evaluation of cytotoxicity of hyaluronic acid as an extracellular matrix on OFCOL II cells by the MTT assay. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014;117(6):e423-e428. doi:10.1016/j.oooo.2012.07.486
  66. Fuchs K, Hippe A, Schmaus A, Homey B, Sleeman JP, Orian-Rousseau V. Opposing effects of high-and low-molecular weight hyaluronan on CXCL12-induced CXCR4 signaling depend on CD44. *Cell Death Dis*. 2013;4(10):e819-11. doi:10.1038/cddis.2013.364
  67. D'Agostino A, Stellavato A, Corsuto L, et al. Is molecular size a discriminating factor in hyaluronan interaction with human cells? *Carbohydr Polym*. 2017;157:21-30. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.125
  68. Yang C, Cao M, Liu H, et al. Erratum: The high and low molecular weight forms of hyaluronan have distinct effects on CD44 clustering (*Journal of Biological Chemistry* (2012) 287 (43094-43107)). *J Biol Chem*. 2013;288(46):33323. doi:10.1074/jbc.A112.349209
  69. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer. *Front Immunol*. 2015;6(MAY). doi:10.3389/fimmu.2015.00201
  70. Sikavitsas VI, Van Den Dolder J, Bancroft GN, Jansen JA, Mikos AG. Influence of the in vitro culture period on the in vivo performance of cell/titanium bone tissue-engineered constructs using a rat cranial critical size defect model. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2003;67(3):944-951. doi:10.1002/jbm.a.10126
  71. Van Dolder J Den, Vehof JWM, Spauwen PHM, Jansen JA. Bone formation by rat bone marrow cells cultured on titanium fiber mesh: Effect of in vitro culture time. *J*

- Biomed Mater Res. 2002;62(3):350-358. doi:10.1002/jbm.10189
72. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration in Rat Calvarial Bone Defects. *Tissue Eng Part A*. 2012;18(13-14):1479-1489. doi:10.1089/ten.tea.2011.0325
  73. Hsiao ST-F, Asgari A, Lokmic Z, et al. Comparative Analysis of Paracrine Factor Expression in Human Adult Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow, Adipose, and Dermal Tissue. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2189-2203. doi:10.1089/scd.2011.0674
  74. Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts AT. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev*. 1995;16(2):143-163. doi:10.1210/edrv-16-2-143
  75. Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor  $\beta$  superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2002;17(3):513-520. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513
  76. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis P V. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008;39(SUPPL.2). doi:10.1016/S0020-1383(08)70015-9



# SIPESQ

Sistema de Pesquisas da PUCRS

---

Código SIPESQ: 8625

Porto Alegre, 9 de agosto de 2018.

Prezado(a) Pesquisador(a),

A Comissão Científica da ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE da PUCRS apreciou e aprovou o Subprojeto de Pesquisa "ANÁLISE IN VITRO DO EFEITO DO ÁCIDO HIALURÔNICO NOS MECANISMOS PARÁCRINOS DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS ADIPO-DERIVADAS DIFERENCIADAS EM OSTEÓBLASTOS PARA REGENERAÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR" vinculado ao Projeto Guarda-Chuva "7467 - APLICAÇÃO DE ÁCIDO HIALURÔNICO E HIDROXIAPATITA/ &#946;-TRICÁLCIO FOSFATO (Bone Ceramic®) EM ENGENHARIA TECIDUAL COM CULTURA CELULAR".

Este projeto necessita da apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Toda a documentação anexa deve ser idêntica à documentação enviada ao CEUA, juntamente com o Documento Unificado gerado pelo SIPESQ.

Atenciosamente,

Comissão Científica da ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

---



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)