



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Fausto Capuano Neto

Biopolímero de fibrina como *scaffold* para células-tronco e secretomas na formação de novo osso

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais

Orientador: Prof. Adj. Rui Seabra Ferreira Júnior

2019

Fausto Capuano Neto

**Biopolímero de fibrina como *scaffold* para
células–tronco e secretomas na formação de
*novos ossos***

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina, Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de Botucatu, para
obtenção do título de Doutor em
Doenças Tropicais

Orientador: **Prof. Adj. Rui Seabra Ferreira Júnior**

Botucatu
2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Capuano Neto, Fausto.

Biopolímero de fibrina como *scaffold* para células-tronco e secretomas na formação de novo osso / Fausto Capuano Neto. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior
Capes: 20603002

1. Adesivo tecidual de fibrina. 2. Osso e ossos. 3. Bioengenharia. 4. Células-tronco. 5. Células-tronco embrionárias.

Palavras-chave: Gel de fibrina ; bioengenharia de tecido ósseo ; células-tronco embrionarias; células-tronco mesenquimais .

Comissão examinadora

Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Junior
Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Juliana Ferreira Floriano
Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Noeme Sousa Rocha
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Rogerio Leone Buchaim
Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Universidade de Campinas

Botucatu, 21 de Fevereiro de 2019.

Quem não sabe agradecer, não sabe receber e muito

menos, pedir

André Luiz

Agradecimentos

Agradeço a Deus por estar vivo e pelas oportunidades de crescimento e aprendizado.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, FMB-UNESP, pela oportunidade e acolhimento durante estes longos anos de jornada acadêmica.

À pós graduação de doenças tropicais pela oportunidade e pelo acolhimento.

Ao CEVAP por ter sido meu ambiente de trabalho nestes anos de jornada.

À UNIPEX e seus funcionários que permitiram a realização deste projeto.

Ao Professor Rui Seabra Ferreira Jr, meu orientador, pelos seus ensinamentos, pela contribuição inestimável para realização deste trabalho, pelo seus ensinamentos que extrapolam a área acadêmica ficando para a vida toda e por ter me acolhido como aluno no programa de pós-graduação desta instituição.

Ao Professor Benedito Barraviera pela sua dedicação ao CEVAP que tornou tudo possível.

Aos meus pais, que apoiaram e permitiram que a conclusão deste curso fosse possível

À Eunice de Souza Ganga e Aparecida Sartori em memória, que me cuidaram em tenra idade e ainda cuida de algum lugar

À minha esposa Ângela Menini, pela sua paciência e seu carinho nos momentos difíceis.

À Dra. Profa. Juliana Floriano, pela nossa parceria de longa data, sempre pronta a trabalhar e criar novas oportunidades.

Ao Prof. Dr. Alexandre de Oliveira, cuja ajuda permitiu o uso das células embrionárias e tornou este trabalho especial.

À colega Patrícia Lima , pelo apóio tanto pessoal como profissional, foi fundamental para a realização deste trabalho.

Ao colega Mateus Vidigal, pela sua colaboração e atenção, seu perfeccionismo que enriquece.

A Dra. Denise Perone , por toda parte histológica e pela dedicação dada a este trabalho

À TOP radiologia por abrir as portas e permitir a realização das radiografias.

À Eloisa Paschoalinotte pela contribuição a este trabalho na parte da estatística.

Ao Leandro Alves Santos, pela amizade e contribuição com seus conhecimentos histológicos e farmacêuticos.

À Elenieze pelo companheirismo e pelo trabalho no CEVAP

À Luciana Barros pela sua dedicação ao Cevap que permite o trabalho de todos os pós graduandos.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação pelos ensinamentos.

Ao bioterista, PC, por sua incansável dedicação com os animais e para comigo.

Aos funcionários da Secretária de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina, Bruna e Lilian pelo auxílio.

À equipe de microscopia eletrônica do IB.

À toda equipe de funcionarios da FMB, UNIPEX, CEVAP, IB. Muitas pessoas com as quais não tive contato mas são fundamentais para o funcionamento de toda a estrutura.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de força atômica
ALP	Fosfatase alcalina
BF	Biopolímero de fibrina
MEC	Matriz extracelular
BMP	Proteína morfogenética óssea
BMSC	Célula tronco diferenciada na linhagem osteogênica
BSP	Sialoproteína óssea
°C	Graus Célsius
Ca ⁺	Cálcio
CEVAP	Centro de estudos de venenos e animais peçonhentos
Col-1	Colágeno tipo 1 (
CM	Meio Condicionado
dpi	Dias após intervenção
D-MEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ESC	Célula tronco embrionária
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
G	Força G
g	Gramma
GDF	Fatores de crescimento para diferenciação
h	Horas
HE	hematoxilina eosina
HU	Escala de Hounsfield
iPS	Células tronco pluripotentes induzidas
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
M	Molar
M BMSC	Meio de cultura condicionado originado das células MSC diferenciadas

M ESC	Meio de cultura condicionado originado das células ESC
MEC	Matriz extracelular
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mL/g	Microlitro por grama
MSC	Células tronco mesenquimais
NGF	Fator de crescimento neural
nm	Nanômetro
OCN	Osteocalcina
OPN	Osteopontina
OSX	Osterix
mPa	Mega pascal
PDGF	Fator de crescimento derivado das plaquetas
TGF	Fator de transformação do crescimento
TNF	Fator de necrose tumoral
TCP	Fosfato de cálcio bifásico
μL/mL	Microlitro por mililitro
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

Atualmente são muitos casos de pacientes que perdem estrutura óssea em acidentes ou reabsorção patológica. A bioengenharia óssea é um tratamento promissor que visa reconstruir estas estruturas sem a morbidade do enxerto autógeno. O tecido ósseo é um conjuntivo especializado com a função principal de proteção e sustentação dos tecidos moles, mas também é responsável pela produção de tipos celulares e homeostase de minerais. Sua reparação é complexa com diferentes tipos celulares e agentes quimiotáticos que funcionam de forma orquestrada até a reparação. As terapias celulares vêm sendo estudadas para promover a reparação de defeitos que o organismo por si não consegue resolver. Células menos especializadas como as células-tronco embrionárias (ESCs) possuem grande potencial terapêutico, mas são complicadas eticamente. Já as células-tronco mesenquimais (MSC) podem ser autólogas, o que minimiza o risco de imunogenicidade mas necessitam área doadora do paciente. Atualmente ainda não há consenso quanto ao uso de células tronco na terapia regenerativa pois há grandes variáveis como a melhor forma de aplicação, a quantidade correta e o melhor tipo celular para a regeneração óssea. As células produzem mediadores químicos no local enxertado, que segundo pesquisas recentes é o principal mecanismo de reparação tecidual. Estes mediadores são depositados em abundância no meio de cultura durante a cultura celular e usados na bioengenharia com a ajuda de *scaffolds*. Os biopolímeros de fibrina (BF) são biomateriais naturais ao corpo e podem funcionar como sistemas de entrega *para* fatores de crescimento, células e quimioterápicos entre outros. No Capítulo II apresentamos um artigo científico cujo objetivo foi estudar o BF oriundo de veneno de serpente associado a

diferentes tipos celulares e como *drug delivery* de meios de cultura condicionado das células ESC e MSC diferenciadas na linhagem osteogênica, observando a formação óssea pela microscopia convencional e a ultraestrutura pela microscopia eletrônica de transmissão e varredura.). Os resultados foram avaliados por tomografia computadorizada, análise histomorfométrica e microscopia eletrônica. A tomografia demonstrou pouca mineralização e adelgaçamento das amostras aos 54 dias. A morfometria demonstrou que o grupo com células embrionárias proporcionou melhor formação óssea (46,36%), seguido pelos grupos com MSC (37,64%) e meio das células diferenciadas (37,82%) sem diferença estatística. O grupo com meio das células embionarias também demonstrou bons resultados (28,58%) e potencial terapêutico comparado com o controle (16,62%). A microscopia eletrônica demonstrou as MSC com aspecto de vitalidade e interação com o BF aos 14 dias pós operatório. Foi observado que a melhor formação óssea ocorreu no grupo das células embrionárias, mas sem diferenças estatísticas dos grupos das MSC e do meio das MSC diferenciadas na linhagem osteogênica. Este estudo incentiva mais pesquisas com a utilização do BF como carreador de secretoma. Os secretomas são terapias mais baratas e potencialmente com menor risco e morbidade ao paciente. O BF derivado de veneno do CEVAP foi eficaz como sistema de liberação do CM e apresentou interação favorável com diferentes tipos celulares, acelerando a formação óssea em defeitos críticos em crânios de ratos.

Palavras-chave: Secretoma, Géis de fibrina, Células tronco embrionárias, células-tronco mesenquimais, bioengenharia óssea.

ABSTRACT

Chapter I present a review about bone repair and its biological events, bioengineering, cells, fibrin biopolymer as scaffold and the secretoma derived from cell culture. Many patients nowadays lose bone structure in accidents or pathological reabsorption. Bone bioengineering is a promising treatment that aims to reconstruct these structures without autogenous graft morbidity. Bone tissue is a specialized connective tissue specialized in protecting and supporting soft tissues, but it is also responsible for the production of cell types and mineral homeostasis. The bone healing is a complex process where different cell types and chemotactic agents work in an orchestrated way. The cell therapies can promote the repair of defects that the body cannot solve. Less specialized cells like embryonic stem cells (ESCs) have great therapeutic potential, but are ethically complicated. In contrast, mesenchymal stem cells (MSCs) may be autologous, which minimizes the risk of immunogenicity but requires a patient's donor area. Currently there is still no consensus regarding the use of stem cells in regenerative therapy, studies uses different methods, cells and biomaterials for bone regeneration. Recent researches advocate that paracrine secretions by cells are main mechanism of tissue repair. These mediators are deposited in abundance in the culture medium during cell culture. Fibrin biopolymers (BF) are natural biomaterials to the body and can function as drug delivery of growth factors, cells and chemotherapeutics among others. Chapter II is a scientific article to evaluate the BF from snake venom associated with different cell types and as drug delivery of conditioned culture media of differentiated ESC and MSC in differentiated into osteogenic lineage. The results were measured by the bone formation in light microscopy and transmission and scanning electron

microscopy. After 54 days in critical size 8 mm defects in rats, the best bone formation was found in the embryonic cell group, but without statistical differences between the MSC groups and the medium of differentiated MSCs in the osteogenic lineage. This study encourages further research with BF as carrier of conditioned media. Secretomes are cheaper, potentially lower risk and lower morbidity than the cell therapies. The venom-derived BF of CEVAP has a heterologous origin, so it can be done in high concentrations, leaving the fibrin mesh dense, ideal situation for drug delivery.

Key words: Secretome, Fibrin Gels, Embryonic Stem Cell, Mesenchymal Stem cell, bone tissue engineering.

Sumário

CAPITULO 1 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	1
1)Introdução	2
1.1)Objetivos	6
2)Revisão bibliográfica	7
2.1)Tecido ósseo	7
2.1.1 Reparação do tecido ósseo	8
2.1.2 Fatores de crescimento associados com a reparação do tecido ósseo	10
2.1.3 Defeito crítico em crânios de ratos	13
2.2) Terapias celulares	17
2.2.1 Células-tronco Mesenquimais (MSC)	18
2.2.2 Células-tronco diferenciadas na linhagem osteogênica.	21
2.2.3 Células-tronco embrionárias (ESC)	22
2.2.4 Bioengenharia	24
2.2.5 Secretoma ou Meio Condicionado (CM)	27
2.3) Biopolímeros de fibrina (BF)	33
2.3.1 Fibrina e fibrinogênio	33
2.3.2 Características Estruturais do fibrinogênio	34
2.3.3 Características reológicas da fibrina	36
2.3.4 Biopolímero de fibrina (BF)	38
2.3.5 Biopolímero de fibrina na bioengenharia	41
2.3.6 Biopolímero de fibrina para “ <i>drug delivery</i> ”	44
2.3.7 Biopolímero de fibrina como arcabouço celular	49
3) REFERÊNCIAS	52
CAPITULO 2 Original article	72
Resumo	74
1)Introdução	76
2)Material e Métodos	79
2.1)Obtenção do Selante de Fibrina	79
2.2)Obtenção das células-tronco mesenquimais a partir da medula óssea de ratos	79
2.2.1)Coleta das MSC	79
2.2.2) Linhagem adipogênica	80
2.2.3) Linhagem osteogênica	80
2.2.4) Caracterização celular por citometria de fluxo	81
2.3) Cultura das Células embrionárias	82
2.4) Coleta do meio de cultivo condicionado (CM)	82
2.5) Delineamento experimental	83
2.5.1) Procedimento cirúrgico	85
2.5.2) Microscopia	86
2.5.3) Histomorfometria	87
2.5.4) Tomografia computadorizada	88
2.6) Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	88
2.7) Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	89
2.8) Avaliação estatística	89
3) RESULTADOS	90

3.1) Isolamento e caracterização das células-tronco mesenquimais	90
3.1.1) Citometria de fluxo	90
3.1.2) Diferenciação e marcação para linhagem osteogênica e adipogênica	91
3.1.3) Descongelamento e desenvolvimento das hESC	91
	92
3.2) Histologia	92
3.2.1) Pós operatório de 14 dias	95
3.2.2) Pós operatório de 54 dias	99
3.3) Morfometria	99
3.3.1) Morfometria do BF aos 14 dias	99
3.3.2) Morfometria do osso novo	99
3.4) Tomografia computadorizada	101
3.5) MEV	103
3.6) MET	106
4)DISCUSSÃO	110
5)CONCLUSÃO	115
5)REFERÊNCIAS	117
Anexos	124
Anexo A	125
Anexo B	126
Anexo C	128
Anexo D	135

CAPITULO 1
REVISÃO BIBLIOGRAFICA

1) INTRODUÇÃO

O reparo de defeitos ósseos extensos na região craniomaxilofacial provocados por trauma ou patologias, constitui ainda representa problema para os cirurgiões, uma vez que, mesmo a alta capacidade de regeneração do tecido ósseo, não é suficiente para promover a reparação completa de alguns defeitos ¹. O osso é um tipo de tecido conjuntivo altamente vascularizado e tem as funções de sustentação dos tecidos moles, proteção dos órgãos internos e locomoção ².

Atualmente cirurgias de enxerto ósseo são realizadas para substituir ou recuperar estrutura óssea perdida na ortopedia e odontologia. Nestes casos o substituto ósseo considerado de excelência é o osso autógeno por não ser imunogênico, ser osteocondutor, osteoindutor e possuir componentes celulares viáveis ³. Apesar destas vantagens necessita de área doadora, ocasionando morbidade local, quantidade de material limitado, restringindo seu uso clínico ⁴.

Visando contornar estes inconvenientes, as pesquisas nas últimas décadas vêm buscando produtos alternativos e desenvolvendo biomateriais ósseos ⁵. Estes substitutos não possuem a eficiência do enxerto autógeno, mas são capazes de propiciar o fechamento completo do defeito ósseo perene por crescimento do novo tecido que exhibe características morfofuncionais mais próximas possíveis do tecido normal ⁶. Idealmente os substitutos ósseos devem ser biocompatíveis e absorvíveis no mesmo passo que o novo osso é formado com capacidade mecânica para preencher defeitos ósseos ⁷.

Existem três possibilidades para viabilizar a formação óssea em determinada região: inserir células osteogênicas no local; estimular as células mesenquimais a se diferenciarem em células formadoras de osso, processo chamado de osteoindução, e a osteocondução, na qual inserimos um arcabouço que permita o crescimento ósseo⁸.

As células-tronco mesenquimais (MSCs) estão presentes em uma variedade de tecidos, sendo a medula óssea e o tecido adiposo um dos principais locais de coleta nos indivíduos adultos. O isolamento dessas células foi descrito em 1968, sendo um padrão utilizado até hoje⁹. Quando expostas ao estímulo apropriado, têm a capacidade de se diferenciar em outros fenótipos, incluindo cartilagem, músculo, estroma medular, tendão/ligamento, gordura e tecidos conjuntivos. Este potencial associado ao fácil isolamento, rápida expansão no cultivo gerou considerável interesse em aplicações clínicas¹⁰.

As células-tronco mesenquimais são consideradas somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, tecido adiposo, periósteo, tecido muscular e os órgãos parenquimatosos^{11,12}.

Uma grande vantagem das MSCs é que estas células podem ser obtidas diretamente de cada paciente, eliminando assim as complicações associadas com a rejeição imunológica ou mesmo doenças infecciosas. No entanto, estas células tem que ser cultivadas ou manipuladas para obter uma quantidade suficiente e serem utilizadas nos tratamentos¹³.

Dessa maneira, o isolamento das MSCs e sua capacidade de diferenciação permitem seu uso na engenharia de tecidos. Biomateriais

denominados arcabouços (*scaffolds*) estão sendo desenvolvidos e estudados para promover a regeneração tecidual enxertando células e fatores de crescimento ¹⁴.

As células-tronco podem ser removidas em diversos estágios na formação do tecido, as células embrionárias pluripotentes (ESC) são isoladas da massa interna do blastocisto, portanto podem potencialmente se diferenciar em qualquer tecido do corpo humano ^{15, 16, 17}. Possuem grande capacidade proliferativa e de auto renovação, podendo gerar uma quantidade muito grande de osteoblastos e são passíveis de modificações genéticas para produzir fatores de crescimento favoráveis a reparação ¹⁷. Estas características são de células ideais para terapia celular ¹⁸. Entretanto devido à sua origem, o seu uso muito provavelmente não será viável no futuro próximo, pois confronta problemas éticos, além do seu risco de formação de teratomas ^{17, 19}.

As células necessitam estar em grande quantidade para uma efetividade terapêutica e mesmo quando temos um bom resultado ainda se esbarra no alto custo e risco de formação de tumores ²⁰. Estudos demonstram que durante o cultivo as células secretam vários fatores de crescimento e quimiotáticos, capazes de recrutar e diferenciar células-tronco do próprio hospedeiro em tecidos lesados ^{21, 22}. Este meio condicionado (CM) retirado das células durante o cultivo, possui baixo custo, preparo simples, aplicação flexível, ausência de risco imunogênico e tumorigênicos ²³.

A engenharia de tecidos necessita de biomateriais que funcionem como estrutura de suporte artificial para o implante de células e fatores de crescimento no organismo. O arcabouço deve promover indução dos tecidos

circunvizinhos, permitir a presença de células e proteínas e induzir a formação óssea após a implantação. Deve ser biocompatível e possuir resistência mecânica similar ao osso, ser biodegradável e esterilizável sem perder suas propriedades ²⁴.

O Biopolímeros de Fibrina (BF) é similar à fibrina do organismo, portanto é considerado um arcabouço promissor para as MSCs e quimiotáticos, pois formam uma matriz que permite a adesão de células. Sua porosidade permite a nutrição celular e a sinalização dos seus subprodutos para o organismo ²⁵. O BF possui componentes biológicos que aceleram o processo de reparação e se mostra eficiente em modelos experimentais de pele e músculo de rato ²⁶.

Durante nossa pesquisa, não encontramos artigos que tenham estudado a fibrina como *drug delivery* de secretomas. Os BFs são produtos naturais ao corpo e auxiliam a cicatrização, induzem angiogênese, promove adesão e proliferação celular proporcionando ambiente favorável a reparação óssea ^{27, 28}. Os BFs tem sido amplamente estudados como carreadores de células, fatores de crescimento, quimioterápicos e até terapia gênica ^{29, 30}.

Em 1989, foi proposta a produção de um bioproduto à base de fibrina por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP), da Universidade Estadual Paulista – Botucatu, Brasil, inicialmente denominado “cola de fibrina” ³¹. O termo cola de fibrina foi substituído por selante de fibrina pois cola tecidual se aplica a apenas uma de suas funções. Atualmente, denominado de Biopolímero de Fibrina referindo a sua característica química, pode ser utilizado como selante, cola tecidual, *drug delivery*, hemostático, biocurativo, etc ^{32, 33, 34}.

Apresenta como grande diferencial a não utilização de sangue humano em sua constituição. Sendo assim, o crioprecipitado de animais de grande porte, neste caso búfalos, foi extraído e utilizado como substituto ao fibrinogênio humano. No caso da trombina, o outro componente dos produtos de fibrina, é utilizada uma trombina-símile extraída e purificada do veneno de serpentes cascavéis. O Biopolímero de Fibrina derivado de veneno de serpente (BFS) tem se apresentado como uma alternativa aos derivados de fibrina comerciais ³⁵. Recentemente Gasparoto *et al.* 2014³⁶ demonstraram que o Selante de Fibrina derivado de peçonha de serpente permitiu *in vitro* a diferenciação e a proliferação de células-tronco de origem óssea, mantendo mais de 80% das células vivas e viáveis, sendo um promissor arcabouço.

1.1) OBJETIVOS

O BF foi desenvolvido pelo CEVAP e extensamente pesquisados nas mais diversas áreas de aplicação ³⁵. O BF foi utilizado com diversos fatores de crescimento, entretanto o novo conceito do CM ainda não foi testado com BF. Esta tese pretende viabilizar com modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* a utilização destes dois biomateriais. Este estudo também utilizou o Biopolímero de Fibrina como arcabouço para o uso de diferentes tipos celulares para avaliar qual estágio celular promove a melhor formação óssea em calotas de ratos. Com a microscopia electrónica foi observado a interação das células com o BF *in vitro* e após 14 dias da implantação.

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1) O TECIDO ÓSSEO

O osso tem como principal função sustentar as atividades locomotoras do corpo sendo fundamental para proteger órgãos essenciais à sobrevivência como coração, pulmão e sistema nervoso central, mas realiza diversas outras funções biológicas importantes como abrigar tecidos responsáveis pela produção de alguns tipos celulares sanguíneos e manter a homeostase de minerais como cálcio e fosfato ³⁷.

O osso possui fundamentalmente três tipos celulares, o osteoblasto, o osteoclasto e o osteócito. Estas células mantem um equilíbrio de deposição e reabsorção óssea, mantendo assim o nível de cálcio na circulação sanguínea. A desregulação entre estas células pode causar doenças como a osteoporose e a osteopetrose ^{38, 39}.

O osteoblasto é a célula responsável pela deposição da matriz extracelular (MEC) constituída majoritariamente de colágeno tipo I, mas possui outras proteínas não colagênicas como a osteopontina e osteocalcina. Posteriormente depositam minerais de hidroxapatita que realizam a calcificação desta matriz formando o tecido ósseo. Estas células são derivadas das MSCs presentes na medula óssea ⁴⁰.

Os osteoclastos são as células multinucleadas que descendem dos macrófagos e monócitos presentes no sangue. Estes aderem na superfície do osso, formando uma lacuna na qual secretam ácidos e enzimas como catepsina K e as metaloproteinases que degradam o tecido ³⁹. Estas células

mantém um importante equilíbrio entre deposição e absorção remodelando o esqueleto durante a vida.

Na formação do esqueleto humano existem dois tipos de crescimento ósseo, a ossificação intramembranosa, na qual inicialmente um tecido conjuntivo é depositado no meio extracelular, então o osteoblasto produz o tecido ósseo primário que posteriormente é substituído pelo tecido ósseo secundário ou lamelar. Este tipo de ossificação está presente em ossos curtos, como por exemplo a calota craniana. Já a ossificação endocondral ocorre tipicamente em ossos longos. Uma cartilagem é formada por condrócitos, que permitem a colonização por osteoblastos e posterior ossificação da mesma ⁴¹.

2.1.1) Reparação do tecido ósseo

A reparação após uma injúria é um processo orquestrado, que resulta no reestabelecimento do tecido ósseo. Este processo envolve muitos tipos celulares e depende de diversos parâmetros como: fatores de crescimento, hormônios, nutrientes, pH, tensão de oxigênio e estabilidade mecânica ^{42, 43}.

Após a injúria, a reparação pode ocorrer de duas formas. Quando o osso é reduzido (aproximado os cotos) anatomicamente, é denominado primeira intenção, um pequeno calo ósseo é formado unindo os fragmentos. O tecido ósseo se torna maduro, com canais de Havers e não ocorre a fase remodeladora. Entretanto normalmente é necessário uma união cirúrgica e fixações rígidas para isto acontecer ⁴⁴.

Nos casos em que existe um espaço entre as bordas ósseas como: uma exodontia dentária, um defeito crítico em animal, ou uma redução óssea

funcional, a reparação é mais complexa e envolve a ossificação intramembranosa e endocondral ⁴⁵. A ferida cirúrgica necessita de uma série de eventos celulares e químicos até que haja a cicatrização ou a reparação da lesão. Estes eventos estão subdivididos em três estágios básicos que ocorrem em sequência ⁴⁴.

O primeiro é o estágio inflamatório, que começa na injúria do tecido e se estende por 3 a 5 dias nos humanos. Inicialmente ocorre uma vasoconstrição para estancar o sangramento. Neste momento a fibrina possui um papel fundamental para manter a homeostase. Após a formação da rede e cessado o sangramento, as prostaglandinas sinalizam para que ocorra a vasodilatação e migração de leucócitos na região. Este fenômeno resulta nos sinais cardeais da inflamação, vermelhidão, tumefação, calor, dor e perda de função. Apesar de não haver ganho de consistência na ferida as células de defesa e o sistema complemento fazem um papel fundamental de limpeza, removendo possíveis bactérias invasoras, tecido necrótico e outros agentes indesejáveis ³⁴.

O segundo momento é o estágio fibroblástico. A malha de fibrina serve de “apoio” para novos vasos sanguíneos e células fibroblásticas (ou osteoblásticas) que iniciam a secreção de colágeno. Esta fase se estende por aproximadamente 2 a 3 semanas. A última fase ou, da remodelação, se prolonga por período indeterminado, pois o colágeno depositado na fase anterior de forma rápida e desorganizada é substituído por um tecido maduro e organizado. Nesta fase pode ocorrer a contração da ferida que normalmente é vantajoso para diminuir a cicatriz ⁴⁶.

Na reparação óssea, a fase remodelatória substitui o osso imaturo desorganizado, sem lamelas e canais de Havers, por um tecido maduro.

2.1.2) Fatores de crescimento associados com a reparação do tecido ósseo

A reparação óssea depende de eventos celulares que são orquestrados por sinalizadores químicos. Entretanto a literatura está longe de entender por completo todos estes fatores e suas funções⁴⁴.

Estes sinalizadores para formação óssea podem ser divididos em três grupos: 1) citocinas pró-inflamatórias; 2) a superfamília dos TGF- β (fator de transformação do crescimento) e outros fatores de crescimento; 3) fatores angiogênicos⁴².

1) Citocinas pró-inflamatórias

As citocinas pró-inflamatórias são as primeiras a se apresentar na ferida, são representadas pela IL-1 (Interleucina-1), IL-6 (Interleucina-6) e o TNF- α (fator de necrose tumoral alfa). São produzidas pelos macrófagos e pelas células-tronco provenientes do periósteo. São responsáveis pela quimiotaxia de células inflamatórias, deposição extracelular de matriz, estimulam a angiogênese e recrutam células fibroblásticas para a área⁴⁷.

2) TGF- β

O TGF- β possui conhecidamente 5 isoformas e são primeiramente secretados pelas plaquetas na fase inflamatória e é responsável pela formação do calo ósseo. Tem por função estimular a produção de matriz extracelular como o colágeno tipo I e sinaliza para as células produzirem BMPs, além de inibirem ativação dos osteoclastos e sinalizar sua apoptose.

Tem o efeito de recrutar e promover a proliferação das MSCs, entretanto dependendo do contexto inibe a formação óssea ^{48, 49}.

A superfamília dos TGF- α engloba as BMPs (Proteínas morfogenéticas ósseas) as TGF- γ e as GDF (fator de diferenciação do crescimento) atualmente tem 34 membros identificadas no genoma humano ⁵⁰.

As BMPs são proteínas que ficam no interstício ósseo, produzidas por células osteoprogenitoras, mesenquimais e condrócitos, têm como função sinalizar a formação óssea. Iniciam uma cascata de eventos que induz a quimiotaxia, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, estimulam a angiogênese e secreção de matriz extracelular. As BMPs são reguladas por outro mediador, o noggin, quando inativado a formação óssea ocorre mais rapidamente ⁵¹. Devido a estas características foi sintetizada e comercializada nas isoformas BMP-2 e BMP-7. Vale ressaltar que este quimiotático não é o único à induzir formação óssea, por exemplo as PDGF, FGF e principalmente o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) promovem a produção de BMPs ⁵².

- TGF- β

Oriunda da degranulação das plaquetas e células inflamatórias é um potente mitogênico e quimiotático para células formadoras de osso, atingindo as MSCs, condrócitos e osteoblastos. Esta classe se apresenta em todos os estágios da reparação. Podem ser secretados pelos osteócitos, impedindo a osteoclastinogênese e a absorção óssea ^{52, 49}.

- PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas),

Oriundas de plaquetas e monócitos são potentes mitogênicos de células mesenquimais e osteoblastos, são quimiotáticos de células

inflamatórias nos primeiros momentos da lesão. Ativam as células osteogênicas via BMP-1 e BMP-5 na ossificação intramembranosa⁵⁴.

- FGFs (fatores de crescimento fibroblástico),

São sintetizadas por MSC macrófagos e monócitos, estão associada com a mitogênese e angiogênese nos primeiros estágios da lesão. Está associada com a formação de condrócitos⁴⁸.

- IGFs (fatores de crescimento insulínico)

São fatores de crescimento controlados por hormônios que estimulam a formação de matriz óssea colagenada e não colagenada pelo osteoblasto maduro⁵⁵. Também é mitogênica para osteoblasto e estimula sua migração pela via PI-3-Kinase^{56, 57}.

- BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas)

Produzidos pelas MSC, e linhagens osteoprogenitoras e age nas mesmas. São responsáveis pela diferenciação das MSCs em células osteoprogenitoras e condrogênicas⁵⁸.

3) Metaloproteinases e fatores angiogênicos.

Nos estágios finais da ossificação ou da remodelação as metaloproteinases são responsáveis pelo aporte sanguíneo. A vascularização possui duas possíveis vias, VEGF e a angiopontina. Ambas as vias acontecem simultaneamente e não se sabe a real contribuição de cada uma⁵⁹.

4) Sequência de eventos na fratura óssea

No osso as mesmas etapas da cicatrização descritas anteriormente ocorrem com algumas alterações. A fase inflamatória inicia a resposta imune, se instala o hematoma e a inflamação. As ocitocinas, plaquetas, BMPs e

MSC agem no intuito de limpar a região e promover a colonização por vasos e fibroblastos ⁶⁰.

As IL-1, IL-6 e TNF- α tem efeito quimiotático para células inflamatórias e MSCs, até o 3 dia, quando ficam indetectáveis. Neste momento a PDGF e a TGF- β iniciam o processo da reparação da fratura. As MSCs são recrutadas e se proliferam produzindo BMPs. Estas células respondem ao próprio estímulo e se diferenciam em linhagens condrogênicas e osteogênicas ⁴².

2.1.3) Defeito crítico em crânios de ratos

Animais de pequeno porte como os ratos são ideais para estudo da bioengenharia óssea, sua fisiologia é bem conhecida, são práticos, fáceis de manejar e se reproduzem rapidamente. Assim o modelo de regeneração mais aceito na literatura é a reconstrução de defeitos críticos criados nas calvárias de ratos ^{61,62}.

O defeito crítico é caracterizado por uma lesão intraóssea que não pode ser reparada espontaneamente em toda a vida do animal ^{63, 64}. A escolha da calvária como modelo para mimetizar grandes perdas craniofaciais deve-se ao fato dela ser composta por osso membranoso, com suplemento sanguíneo relativamente limitado, conferindo poucas propriedades para se regenerar espontaneamente ⁶³. Além disto é uma área anatomicamente livre de estresse mecânico e com estabilidade relativa das estruturas que circundam o defeito crítico ^{65, 66}.

Um bom modelo cirúrgico deve possuir algumas características: 1) O defeito deve ser crítico, não reparar sem auxílio de biomateriais; 2) o sítio de

implantação deve incluir preferencialmente osso cortical e medular; 3) o defeito deve ser estável; 4) o risco de fratura deve ser mínimo; 5) o modelo animal deve permitir fácil acesso às análises radiográfica e histológica⁶⁷.

Defeitos de 8 mm na calvária de ratos não se reparam sozinhos em ratos senis após 12 semanas. Apenas uma formação óssea nas regiões marginais do defeito e algumas ilhas próxima a dura-máter foi observado⁶⁸. Existe uma discordância na literatura quanto ao tamanho crítico dos defeitos em calvária de ratos. Alguns autores relatam que 6 mm já se trata de defeito crítico, outros defendem 8 mm^{68, 69}.

Períodos menores que 1 mês avaliam apenas a resposta inflamatória na cicatrização óssea. O período de um a dois meses demonstram o reparo ósseo inicial, já com três a nove meses a ossificação já se apresenta madura⁷⁰.

Defeitos de 5 mm em calotas de ratos tratados com BMSC, fosfato de cálcio bifásico (TCP) em diferentes concentrações de PDGF demonstrou que a associação das células, do osteocondutor e o agente indutor promoveram o melhor resultado após 8 semanas, perfazendo $32.17 \pm 5.87\%$ do defeito. O uso de apenas TCP resultou em $13.8 \pm 5.15\%$ e o TCP com BMSC, $24.6 \pm 3.21\%$. Os autores demonstram a importância da degradação do arcabouço, neste caso especificamente o TCP no período correto para permitir a substituição por tecido ósseo⁷¹.

O substitutos ósseos em enxertos são em sua maioria biomateriais condutores e para melhorar suas propriedades e promover a osteoindução, as MSC e o PRF foram testados em associação com o Bio-Oss[®] e o TCP. Observaram que a interação entre a MSC+TCP foi mais efetiva que o

MSC+Bio-Oss[®] e TCP+PRP e as MSC são mais indutoras ósseas que o PRP⁷².

As MSCs de origem da polpa dentária foram avaliadas em defeitos de 5 mm no crânio de ratos com hidrogéis à base de ácido hialurônico. O melhor resultado foi o complexo arcabouço e célula com $32.78 \pm 9.24\%$ comparado com $21.98 \pm 8.30\%$ no controle. Neste trabalho a permanência do arcabouço após a oitava semana atrasou a cicatrização⁷³.

O uso de células-tronco originárias da polpa foram comparadas com as MSCs em defeitos críticos de crânio de ratos. As MSCs resultaram em osso mais completo com presença de tecido hematopoiético maduro. As células possuem diferentes origem embriológicas, as MSCs vêm de ossos longos com origem mesodérmica e as células dentárias da região orofacial são provenientes do túbulo neural. Ambos os casos regeneraram um pouco mais que 30% do defeito ósseo⁷⁴.

Defeitos críticos também foram usados para comparar diferentes tipos celulares na diferenciação osteogênica. Células iPS (células-tronco pluripotentes induzidas), células do cordão umbilical e as BMSC com TCP. O TCP demonstrou afinidade com as células e nenhuma toxicidade. Não houve diferença entre os grupos e todas as células conseguiram se diferenciar em linhagem osteogênica. Entretanto, quanto maior capacidade de diferenciação e proliferação melhor a formação óssea (sem diferença estatística). Todas as células estudadas neste trabalho promoveram angiogênese local⁷⁵.

Osugi *et al.*, em 2012⁵⁶, demonstraram o potencial terapêutico do meio condicionado (CM) em defeitos críticos de calota de ratos. Após 8

semanas o CM com agarose quase ocluiu o defeito de 5 mm de diâmetro (64,4%–19,7%) enquanto as células tiveram um resultado inferior (51,0%±3,7%).

O mesmo modelo foi usado para avaliar se eletroestimulação das células durante o cultivo celular altera deposição de fatores de crescimento do CM. Não houve diferença entre os meios condicionados, mas ambos foram mais efetivos que as células até a quarta semana²².

2.2) TERAPIAS CELULARES

As células-tronco possuem a característica de se diferenciar em vários outros tipos celulares. Dependendo da exata fase ontogênica que se encontra, podem ser classificadas em três categorias; embrionárias, fetais e somáticas ou adultas. As células embrionárias podem gerar células de origem mesodérmica, endodérmica ou ectodérmica, ou seja, podem se diferenciar em mais de 200 tipos celulares do adulto ⁷⁶, já as células adultas geram apenas um tecido ou grupo celular ⁷⁷.

Visando especificamente a reposição óssea, Robey em 2011⁷⁸ discute as diferentes origens celulares, parafraseando a autora, “A boa, a má e a feia (mas promissora).

A “boa” representa as células-tronco de origem óssea. Estas células quando usadas com o arcabouço apropriado formam tecido ósseo maduro em praticamente qualquer tecido conjuntivo. O osso novo apresenta, osteoblastos, osteócitos e tecido de suporte ⁷⁹. As MSCs existem no interior da medula óssea, em meio a uma grande quantidade de células hematopoiéticas, num nicho com pouco oxigênio (varia de 1 a 6%) e são essenciais para a sobrevivência das células plasmáticas ⁸⁰. Podem ser obtidas para uso na bioengenharia através de aspiração na crista ilíaca ⁸¹.

As células “más”, são células-tronco de origem não óssea, como por exemplo, da polpa dentária, do ligamento periodontal, de adipócitos e de outros tecidos conjuntivos ⁷⁸. Os órgãos dentais não sofrem remodelação constante como é o caso do osso, desta forma as células dentais estão mais preparadas para reparar tecidos próximos a estrutura do que em outra parte do corpo ⁸². As células derivadas do tecido adiposo são mais abundantes,

mais fáceis e remover e com menor morbidade na obtenção. Estas células consideradas adultas normalmente são multipotentes⁸³ e para formar um tecido mineralizado normalmente necessitam de determinado estímulo (por exemplo as BMPs) e resultam no osso pobre em medular, afetando seu *turnover* e seu desenvolvimento com o passar do tempo^{84, 78}.

As feias (mas promissoras) são células pluripotentes, podem ser as células tronco pluripotentes induzidas (iPS) ou as células tronco embrionárias (ESC), ambas com grande capacidade proliferativa. Podem se diferenciar em células de qualquer uma das três camadas germinativas (endoderme, mesoderme e ectoderme)⁸⁵. As hESC possuem poucas linhagens a disposição e obviamente serão enxertos halogênicos pois necessitam da destruição de um embrião humano. As iPS são células adultas reprogramadas para serem pluripotentes, entretanto esta metodologia gera questionamentos quanto a segurança desta técnica. Ambas possuem risco de formação de teratomas^{17, 86}.

2.2.1) Células–tronco Mesenquimais

Em 1976, Friedensen e colaboradores⁸⁷ publicaram um trabalho demonstrando que a cultura da medula óssea gerava células aderentes ao plástico que ficavam inativas por 2 a 4 dias e depois se multiplicavam rapidamente. Neste estágio se assemelhavam a fibroblastos adultos e se diferenciavam em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem. Descobriu-se que estas células eram multipotentes e devido sua

habilidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares mesenquimais foram denominadas células-tronco mesenquimais ⁸⁸.

As MSC podem secretar potentes fatores bioativos que regulam a função de outros tipos celulares, conferindo a elas uma potencialidade terapêutica de promover a cura de feridas em tecidos isquêmicos ⁸⁹

A definição mínima para MSC é que elas são aderentes para plástico de cultura celular ⁹⁰. Uma longa lista de marcadores de membrana são usados para identificar as MSC. Elas são negativas para marcadores hematopoiéticos (CD34, CD45, CD14, CD11b) e endoteliais (CD31, CD62E), mas positivas para CD13 (aminopeptidase N), CD29 (b1 integrin subunit), CD44 (*hyaluronan receptor*), CD49a (*a1 integrin subunit* e VLA), CD63 (*lysosomal membrane-associated glycoprotein 3*), CD90 (Thy-1), CD105 (*endoglin*), CD106 (VCAM-1), CD146 (MCAM/MUC18), CD166 (*activated leukocyte cell adhesion molecule*), e Stro1. Dentre estes os que se destacam são, CD105 *endoglin* que transforma o TGF- β , CD106 e CD146 que regulam ação endotelial ⁷⁸.

As MSC representam apenas 0,01% das células mononucleadas no interior do osso ^{91, 92}. Com a idade avançada os pacientes apresentam menor quantidade de células para serem colhidas e durante a aspiração, quanto mais tecido se remove maior o risco de contaminação. Nestes pacientes a dificuldade é identificar e isolar uma quantidade aceitável de células para expansão ⁷⁸. Mas as MSC são imaturas e indiferenciadas, logo podem ser expandidas em múltiplas passagens sem perder suas características a não ser estimuladas biofisicamente ⁹³.

As MSCs possuem uma origem abundante, e podem gerar rapidamente uma colônia homogênea de células, além disso são ótimas para se diferenciarem em osteoblastos. Esta característica outorga excelente potencial para regeneração óssea em pesquisas *in vitro* e *in vivo*⁷¹.

As células-tronco tem a capacidade de sintetizar fatores bioativos como fatores de crescimento citocinas, secretomas, e exosomas que são vesículas nanométricas lançadas ao meio extracelular capazes de mediar comunicações intercelulares. Assim as MSC são atraídas para áreas de dano celular e iniciam a secreção de fatores que induzem a angiogênese, reparação de tecido, reduzindo a inflamação e a apoptose⁹⁴.

Alguns estudos demonstram que as MSC não são imunogênicas, ou seja não causam rejeição quando usadas de forma alógena⁹⁵. Entretanto as quando sofrem uma diferenciação osteogênica começam a expressar antígenos de superfície e aumenta a possibilidade de rejeição, portanto, para reparação de osso⁷⁸ recomenda-se o uso de células indiferenciadas.

As MSCs evitam a rejeição alógena por três mecanismos: As MSCs são hipoinmunogênicas e normalmente não possuem algumas moléculas na superfície; elas previnem a resposta das células T pela modulação de células dendríticas ou agindo diretamente nas células NK, CD8 e CD4; induzindo um microambiente local pela produção de prostaglandinas e interleucinas⁹⁶.

O grau de diferenciação das células que produz a melhor sobrevida é questionável para a maioria das células. Quando aplicadas diferenciadas no tecido o risco de formar um tumor é reduzido, mas a sobrevivência celular no enxerto diminui^{84,97}. Enxertos em tecido cardíaco demonstraram que as

células indiferenciadas se diferenciam nas células musculares cardíacas e tecidos acessórios melhorando assim a sobrevida do enxerto ⁸⁵.

Em 2010 estavam sendo realizados 79 estudos classe II e classe III em humanos com MSC. Entretanto vários deles foram abortados ou não chegaram ao seu objetivo. Um estudo em 2009 foi interrompido por não promover melhora no pulmão, mas diminuir a inflamação sistêmica do paciente pela proteína C reativa. Outros estudos aumentaram ligeiramente a incidência de óbitos no grupo com tratamento de MSC ⁹⁸.

2.2.2) Células–tronco diferenciadas na linhagem osteogênica.

As MSC podem se diferenciar em osteoblastos. Este fenômeno é crucial para a reparação de uma fratura, osteointegração é o processo natural de turnover ósseo. O processo é regulado por uma interação de diversos fatores, por exemplo, a proteína *RunX* responsável pela mineralização da matriz colágena e que pode ser encontrada nas primeiras fases da diferenciação osteogênica. Outro fator importante é o ALP (fosfatase alcalina) que induz a mineralização da matriz extracelular ⁹⁹.

A linhagem osteogênica inclui as células mesenquimais progenitoras, pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. A identidade de cada momento destas células não é bem definido, por exemplo, pré-osteoblastos é o grupo heterogêneo que se estende das células progenitoras até o osteoblasto adulto, expressam *RunX₂* e *OSX* (Osterix) ^{100, 101}.

A divisão das MSC durante a diferenciação é assimétrica e gera uma célula MSC (renovação) e uma célula osteoprogenitora. Os pré-osteoblastos

são uma fase intermediária que expressam STRO-1, ALP, PPR, e colágeno tipo I, esta fase possui alta capacidade proliferativa mas nenhuma auto regeneradora ¹⁰². Os osteoblastos maduros secretam ALP, osteopontina (OPN), e, BSP (Sialoproteína óssea), e osteocalcina (OCN), Colágeno tipo 1 (Col-1) e sempre estão próximos ao osteóide, com pouca capacidade proliferativa ¹⁰³.

A diferenciação celular na cultura bidimensional possui três fases distintas. Nos primeiros quatro dias após a indução pelo meio osteogênico observa-se um rápido aumento na quantidade de células. Nos dias seguintes as células iniciam a diferenciação e começam a expressar ALP até o décimo quarto dia, quando ocorre declínio deste marcador. Dos 14 aos 28 dias as células expressam OCN e OPN e iniciam a deposição de fosfato de cálcio no meio ^{104, 105}.

Ichida *et al.*, 2011¹⁰⁶, demonstraram que a diferenciação das MSC em linhagem osteogênica altera suas características morfológicas, migratórias e de adesividade. Após o estímulo, as células ganham mobilidade e perdem esta característica conforme a diferenciação amadurece. Nos estágios finais elas possuem baixa mobilidade e *turnover* celular, porém alta capacidade de adesão.

2.2.3) Células-tronco embrionárias humanas (ESC)

As células embrionárias pluripotentes (ESC) são células isoladas da massa interna do blastocisto ^{15, 107}, e representam uma fonte abundante de osteoblastos essenciais na formação óssea. As ESC tem a capacidade de se

auto renovar e se diferenciar em qualquer tecido do corpo humano, sendo assim potencialmente melhor que qualquer outro tipo celular ⁵⁴. Entretanto esta alta capacidade proliferativa aumenta o risco de formação de teratomas, o que levou a muitos autores a diferenciá-las na linhagem osteoblástica antes de sua implantação ¹⁰⁸.

As ESCs possuem diversas linhagens celulares, e cada uma pode possuir uma propensão a se diferenciar e diferentes tipos de células adultas. Estas mudanças ocorrem por uma série de fatores como tempo e tipo de cultura, variação gênica e variação metodológica ^{109, 110}.

Elas são a forma mais pura das células-tronco pluripotentes e não necessitam ser geneticamente alteradas (como as iPSS). Por outro lado, quando usadas na reparação de tecido ósseo a resultante foi um osso pouco vascularizado e com outros tipos celulares ⁷⁸.

As ESCs podem ser modificadas geneticamente para produzir fatores de crescimento específicos o que é ideal, na terapia celular ¹⁸. Araújo *et al.*, em 2017 ¹⁷ demonstraram que ESC modificadas para superexpressar FGF-2 tiveram ação neuroprotetiva e antiinflamatória resultando na melhor recuperação dos neurônios motores após a avulsão e preservando as comunicações sinápticas.

As ESCs, iPS (células tronco pluripotentes induzidas) e células do cordão umbilical foram testadas com biopolímeros de fibrina e TCP. Todas as células foram capazes de expressar genes comuns na formação óssea como ALP, OCN, COL I e produzir mineralização no meio de cultura. Todos os tipos celulares estudados neste artigo possuem capacidade de diferenciação osteogênica e tem alto potencial no uso na regeneração óssea ¹¹¹.

Liu *et al.* 2014¹¹², demonstraram o uso das ESC em conjunto com TCP em defeitos críticos de crânios de ratos. Observaram que as células promoveram uma formação óssea três vezes maior e com o dobro de vasos sanguíneos comparado com o controle. O TCP é um material condutor ósseo sem características indutoras, já as ESC são indutoras na formação óssea, a sinergia entre estes dois materiais pode ser benéfico para a bioengenharia¹¹².

Apesar do grande potencial terapêutico das ESC, a origem torna estas células complicadas eticamente e seu uso muito provavelmente não será viável no futuro próximo. Outra preocupação com o uso de ESC é a formação de tumores devido sua alta capacidade proliferativa^{19, 113}. Para contornar este problema os pesquisadores diferenciam estas células pluripotentes na linhagem desejada, como MSC ou células maduras para diminuir a capacidade de replicação¹¹⁴.

2.2.4) Bioengenharia

A bioengenharia é uma nova abordagem terapêutica para reparar e regenerar o tecido ósseo sem os inconvenientes de morbidade do enxerto autógeno ou risco de contaminação do aloenxerto. A construção ideal depende de três componentes essenciais: 1) uma fonte celular adequada, 2) fatores de crescimento e diferenciação e 3) suporte apropriado para apoiar a regeneração do tecido. Assim, os arcabouços desempenham um papel fundamental na engenharia do tecido ósseo e a seleção de um biomaterial apropriado é crucial¹¹⁵.

Um biomaterial ideal deverá apresentar as seguintes características: servir de suporte mecânico e biológico; os produtos de sua degradação não deverão ser tóxicos; sua taxa de reabsorção orgânica deve coincidir com o período de formação de novos tecidos; ser poroso para que as células tenham íntima ligação com o material; permitir que moléculas bioativas tenham acesso as células; ser mecanicamente adequado ao sítio de inclusão; integrar-se perfeitamente ao novo tecido e ser absorvido sem nenhuma rejeição ^{116, 117}.

As células têm sido estudadas como opção terapêutica em várias doenças e podem ser aplicadas sistemicamente, por via circulatória ou no local de interesse ¹¹⁸. Em doenças cardiovasculares, por exemplo, as drogas podem melhorar a condição e a sobrevida do paciente mas não podem reparar os danos ocasionados no tecido ¹¹⁹. Pacientes tiveram aplicações endovenosas de células-tronco mesenquimais tiveram tecido cardíaco reparado ¹²⁰. Entretanto, a retenção celular no local desejado é extremamente baixa ¹²¹, e estima-se que apenas 3% das células sobrevivam, creditando melhora a fatores tróficos por elas secretado ⁹².

Desta forma, tem se estudado biomateriais que possam criar um ambiente que proteja e dê suporte para as células. Inicialmente os materiais teriam de ter propriedades físicas (resistência) e químicas (degradar no momento correto, não ter imunogenicidade) ¹²². Atualmente, leva-se também em consideração o microambiente que facilita as comunicações celulares, troca de fluidos e nutrientes ¹²³. *In vivo*, existem ambientes com diversos estímulos físicos químicos sinérgicos e antagônicos que regulam a sobrevida das MSC ¹²⁴.

A vascularização do enxerto é um fator fundamental para a sua sobrevivência, as células transplantadas irão morrer rapidamente caso a angiogênese não ocorra de forma devida. Para este fim alguns pesquisadores têm adicionado fatores de crescimento como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o PDGF que auxiliam na maturação dos vasos ou transplantando conjuntamente células endoteliais¹¹¹.

Existem três formas que as células agem na reparação tecidual; a primeira é pela diferenciação celular em células alvo, a segunda é pela liberação de fatores de crescimento e citocinas que estimulam a vascularização, a inflamação e a formação óssea e a terceira é ambas ocorrendo sinergicamente. Dependente da forma de ação a célula deve ficar mais ou menos tempo na região¹²².

Os biomateriais candidatos devem promover uma estrutura tridimensional para as células se desenvolverem e serem implantadas no tecido. Atualmente, muitos biomateriais naturais e sintéticos têm sido estudados para a regeneração óssea mas poucos estão disponíveis para uso na clínica médica^{125, 126}. Uma propriedade interessante para o arcabouço seria a capacidade de se moldar ou polimerizar no sítio, ser reabsorvível, fornecer células para pacientes mais idosos, não dependendo assim do recrutamento das células do hospedeiro¹²⁷.

O Biomaterial ideal deve ter uma estrutura interna e externa favorável ao crescimento celular, com propriedades mecânicas e biológicas que mimetizem as características de cada tecido, permita a proliferação, diferenciação e formação de matriz extracelular¹²⁸.

O BF é um biomaterial candidato para a regeneração óssea. Trata-se de um produto natural ao organismo, que ajuda na cicatrização, induz angiogênese, promove adesão e proliferação celular ^{27, 28}, assim proporciona um ambiente favorável a reparação óssea ⁵⁶.

Karp *et al.*, em 2004 ¹²⁹, demonstraram que alterando as propriedades ou mesclando com outros biomateriais, os Biopolímeros de Fibrina (BF) podem melhorar sua eficácia, por exemplo, aumentando sua resistência mecânica e facilitando a invasão do tecido vascular na cicatrização ¹²⁹. Neste quesito as biocerâmicas (hidroxiapatita e fosfato Tricálcio bifásico) melhoram as propriedades mecânicas sem interferir no desenvolvimento das células ¹³⁰.

A quantidade de células a serem entregues na região afetada é um fator fundamental para terapêutica, embora ainda não se tenha este valor bem estabelecido. Estudos demonstram o uso de 1×10^6 células por mL de BF para evitar a confluência no arcabouço ⁹⁰.

2.2.5) Secretoma ou meio condicionado

As células possuem grandes possibilidades terapêuticas no tratamento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer ¹³¹. As secreções celulares podem interagir com outras células e influenciar os tecidos adjacente. Assim evidências suportam o uso destas secreções para melhorar as interações celulares desejadas como, crescimento, proliferação e migração ¹³².

Entretanto, seu uso enfrenta uma série de problemas incluindo, alto custo, segurança, necessidade de expertise para manejo e procedimentos

invasivos para sua coleta. Além disso a sobrevivência celular dependendo do arcabouço é limitada em apenas algumas semanas ¹³³.

A curta sobrevivência das células após uma semana (menos que 1%) após administração endovenosa sugere que seus efeitos reparadores são decorrentes da liberação de fatores químicos que regulam inúmeros processos ¹³⁴. Sabe-se que muitos fatores de crescimento são secretados no meio de cultura durante o cultivo celular. Assim criou-se o conceito da aplicação do CM diminuindo custos e tempo na terapia ^{135, 136}.

O secretoma é definido por uma série de fatores e moléculas que são secretadas no espaço extracelular. Esses fatores incluem, entre outros, proteínas solúveis, ácidos nucleicos livres, lipídios e vesículas extracelulares. Este último pode ser subdividido em corpos apoptóticos, micropartículas e exossomos. Os secretomas de cada célula ou tecido são específicos e podem alterar conforme o organismo está em estado fisiológico ou patológico ¹³⁷.

As vesículas extracelulares além de comunicarem células alvo, têm a finalidade de alterar a composição da MEC de forma direta ou indireta, regulando algumas células a sintetizarem ou degradarem moléculas da matriz. Estudos recentes demonstram a função das vesículas determinando as propriedades de tecidos como o conjuntivo frouxo, osso cartilagem e dentina ¹³⁸.

Osugi *et al.*, em 2012 ⁵⁶, realizaram a comparação entre o CM e as MSC utilizando-se da agarose como arcabouço em defeitos críticos em crânios de ratos. O meio de cultivo induzido foi mais efetivo na formação óssea que a aplicação da própria célula. Para entender o ocorrido realizaram

o imageamento *in vivo* e observaram a migração de células-tronco do organismo do rato para a ferida. Os autores usaram o meio de cultivo originário das MSC indiferenciadas, pois supuseram que a formação óssea oriunda das VEGF e IGF-1, seriam eficientes na formação óssea.

Xu *et al.*, em 2016 compararam os secretomas de diferentes tipos celulares em distração osteogênica de ratos. Demonstraram que o secretoma das células fetais foram as melhores para formar osso e produziram menor imunogênese que os subprodutos das MSC e as MSC adultas. Apesar das células fetais serem complexas e de difícil manipulação, o seu secretoma é de fácil acesso, tem baixo custo benefício e possui vários fatores trópicos que ajudam na reparação óssea ¹³⁹.

O processo inflamatório é um modulador da perda óssea. O meio condicionado oriundo das células-tronco adipogênicas foram capazes de diminuir a expressão de genes TNF- α , IL-1 e IL-6 inibindo assim a perda óssea por via dos lipopolissacarídeos ¹⁴⁰.

Presentes no meio de cultivo estão alguns fatores quimiotáticos inflamatórios, como o IL-8 que recruta células inflamatórias e células endoteliais, MCP-1 e RANTES que atrai macrófagos e monócitos ¹⁴¹. Embora o recrutamento de células inflamatórias possa ser associado a diversas doenças, esta etapa é fundamental para a remoção de patógenos e detritos permitindo a cicatrização da ferida ²².

Um estudo *in vitro* utilizou meio osteogênico para promover a osteocondução em enxertos ósseos desproteínados. O CM aumentou a migração de células osteogênicas e a adesão celular dobrou em relação ao controle. O CM também resultou em melhores expressões gênicas como

ALP, OCN e COL-1. Apesar de não haver estudo clínico, é crível que embeber partículas de enxertos ósseos com CM promova indução em biomateriais osteocondutores ¹⁴².

O CM derivado de células ósseas em 15 dias sinalizou o ligamento periodontal a formar tecido duro. Os autores acreditam que as MSC diferenciadas em células óssea expressariam maior quantidades de quimiotáticos para proliferação como VEGF e PEDF que as células indiferenciadas. Este achado mostra o potencial do CM em melhorar o tratamento de bolsas periodontais ¹⁴³.

Katagiri *et al.*, 2016, relataram o primeiros casos clínicos em humanos utilizando o CM, que foi aplicado em alvéolos dentários e não observaram nenhum efeito adverso local ou sistêmico ¹⁴⁴.

Algumas técnicas podem melhorar ainda a produção de mediadores químicos pelas MSC, por exemplo, a estimulação elétrica. Embora não tenha havido diferença na formação óssea em calotas de ratos o meio condicionado com ou sem estimulação elétrica, resultou em menor perda óssea mediada pela IL-1²². Existem outras alternativas para melhorar as propriedades do secretoma, por exemplo, variando o tempo de cultivo de 16 horas a 5 dias observou-se que períodos curtos de tempo permitem a presença de fatores residuais no meio não degradado pelas células ¹⁴⁵.

A passagem em que a célula se encontra não variou o resultado clínico do secretoma derivado de células derivadas da gordura humana em células progenitoras neurais humanas. O secretoma também foi avaliado pela proteômica revelando similaridade entre as proteínas presentes em diferentes passagens celulares ¹⁴⁶.

O uso do CM possui várias vantagens: simplificação da preparação; aplicação flexível; evita problemas imunogênicos, tumorigênicos e infecciosos¹⁰⁹; pode ser avaliado segundo a dosagem com agente farmacêutico; pode ser armazenado por longo período sem necessidade de drogas; é passível de ser produzido em massa por uma linhagem celular; mais econômico sem necessidade de intervenção para remoção⁵⁶; não precisa de tempo para expansão como as células as células; o efeito terapêutico pode ser modificando usando o tipo celular mais desejável¹³⁷.

A maioria dos estudos com CM mostraram efeitos benéficos, promovem efeitos quimiotático, pró-angiogênico e protetor, sendo assim, tem sido usado na regeneração neuronal, reparação de pele, osso e vasos sanguíneos¹⁴⁷.

Atualmente, existe um esforço da proteômica em desvendar a secreção de proteínas ósseas pelas células-tronco e caracterizar moléculas responsáveis pelos mecanismos imunomodulatórios, anti-inflamatório angiogênico etc¹³². Uma grande variedade de citocinas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas extracelulares e enzimas têm sido encontradas. A investigação do secretoma e as vesículas das MSC pode ajudar no tratamento de grande número de doenças e este pode ser o caminho do futuro das pesquisas devido a seu enorme potencial terapêutico¹⁴⁸. Em cada estágio e em cada tipo celular há alteração das proteínas encontradas no secretoma¹⁰⁰.

No secretoma das MSC grande parte das citocinas presentes no meio são moduladores da resposta inflamatória e angiogênese. A secreção das MSCs oriunda de rato e a MSC de humanos obtiveram semelhança de 62%

demonstrando uma assinatura comum entre estes dois CM. As MSCs humana foram mais eficazes em induzir a diferenciação de macrófagos. A presença de muitos componentes torna difícil a caracterização funcional de cada qual e sugere o efeito auto regulatório deles. As metaloproteinases, por exemplo possuem efeito anti-angiogênico e estão presente em maior quantidade no meio das hMSC ¹⁴⁹.

Os CM possuem um pool de proteínas moduladoras e muitas delas estão em pequenas quantidades que torna difícil seu isolamento e análise, possivelmente descobrindo novos fatores podemos desenvolver novas terapêuticas ¹⁵⁰.

Assim, a sua utilização se torna muito mais atrativa que proteínas isoladas como as BMPs pois atendem melhor a complexidade da biologia do osso. No entanto, é sabido que diferentes estágios de diferenciação das MSCs geram diferentes MC, cada qual pode possuir potencial terapêutico diferentes para cada tecido do organismo ¹³⁷.

2.3) BIOPOLÍMEROS DE FIBRINA (BF)

2.3.1) Fibrina e fibrinogênio

O fibrinogênio é uma glicoproteína alongada, com 45 nm de espessura, composta de três pares de cadeias polipeptídicas mantidas por 29 pontes dissulfeto ¹⁵¹. Está presente em maior quantidade no plasma sanguíneo mas também pode ser encontrada na linfa, plaquetas e líquido intersticial. O fígado é o órgão responsável pela produção secretando diariamente em condições normais 2 a 5 gramas de fibrinogênio por dia, outros órgãos do corpo também podem secretar a glicoproteína sugerindo que ainda há funções desconhecidas para a fibrina ¹⁵².

Após o trauma do tecido a protrombina presente no organismo é transformada em trombina ativa, que por sua vez irá catalisar o fibrinogênio presente no plasma e formar a fibrina. A função principal da fibrina é conter o sangramento, portanto assim que a rede é formada ela normalmente já está sob stress do fluido sanguíneo e inicia-se a colonização por macrófagos e outras células do sangue ¹⁵¹. Neste momento a contração da fibrina possui aspecto fundamental para estancar o sangramento ¹⁵³.

Diferente de outras proteínas estruturais presentes no corpo humano como o colágeno que gradativamente é depositado pelo fibroblasto, a fibrina necessita de uma formação rápida e eficiente permitindo após cessar o sangramento. A rede formada permite a colonização de células sanguíneas, entre elas as células-tronco que iniciam a reparação ou cicatrização do tecido injuriado. Portanto, a fibrina necessita de características reológicas

únicas para permitir a versatilidade das suas funções tornando-a atrativa para o uso como biomaterial¹⁵⁴.

2.3.2) Características estruturais do fibrinogênio

O fibrinogênio possui um par de três cadeias peptídicas formando uma molécula alongada com centro único e regiões distais simétricas. A região central é chamada de E, está inclusa no N-terminal dos dois pares de cadeias peptídicas e a região distal das cadeias, são denominadas D terminal. As cadeias peptídicas são representadas por $A\alpha$, $B\beta$, e γ , estando dispostas inversamente ao seu par, conectadas por pontes dissulfetos presentes na região central, três ligando os pares da molécula e duas pontes ligando as cadeias entre si. Na região N terminal, ou seja, a região central, está presente os fibrinopeptídeos A e B nas cadeias α e β respectivamente¹⁵⁵.

Os fibrinopeptídeos possuírem apenas uma pequena porcentagem da molécula são de extrema importância pois quando clivados expõem regiões de ligação (A e B) que complementam com áreas presentes nas extremidades (N-terminal) do fibrinogênio sempre expostas (a e b). Assim, como mostra a figura 1, quando a trombina age liberando as ligações A e B, estas reagem com a e b terminal e forma ligações A: a e B: b, unindo as regiões centrais de uma molécula com a distal de outra gerando a protofibrina dupla que se estende meia molécula de fibrina (ou seja 22,5 nm) permitindo nova agregação longitudinal. A protofibrina pode se estender até aproximadamente 600 a 800 nm quando inicia a agregação lateral formando

a fibra de fibrina. Tanto a fibra quanto a protofibrina se agregam de maneira contorcida (*twisted*)¹⁵⁶.

As fibras começam a se contorcer e formar ramificações que conferem uma estrutura tridimensional, esta característica é fundamental para ocupar o espaço tridimensionalmente e pode ser observada em concentrações muito baixas como 0,01 mg/mL e em grandes concentrações como 50 mg/ml ainda se observa o gel 95% liquefeito¹⁵⁷.

A polimerização da fibrina se inicia com a ação de uma enzima proteolítica, a trombina, que cliva os dois fibrinopeptídeos centrais, a clivagem de A é mais rápida que a clivagem de B. O veneno de serpentes possuem característica semelhantes a trombina mas podem remover apenas um fibrinopeptídeo. A clivagem do fibrinopeptídeo B resultou em uma rede apenas em baixas temperaturas, entretanto a clivagem do fibrinopeptídeo A gerou uma rede de fibrina similar a rede ocasionada pela trombina. Assim ambos os nós A e B geram uma rede de aparência normal, concluindo que nenhum fibrinopeptídeo está especificamente associado com a agregação lateral¹⁵⁸.

A rede de fibrina deve ser sempre temporária, pois sua permanência após a cicatrização gera problemas como a trombose, assim o organismo possui métodos naturais para dissolver a fibrina. A lise normalmente ocorre pela plasmina que possui afinidade por sítios da fibrina gerando fragmentos solúveis que por sua vez retro estimulam a ação da plasmina¹⁵⁹.

A observação pelo AFM (microscopia de força atômica) demonstrou que a quebra da fibrina se dá pela protofibrila e não por afinamento da rede, assim não importa a espessura da rede, o tempo de degradação será

semelhante, mas a presença de plaquetas em bioprodutos como o PRF (Plasma Rico em Fibrina) diminuiu a velocidade de degradação ¹⁶⁹.

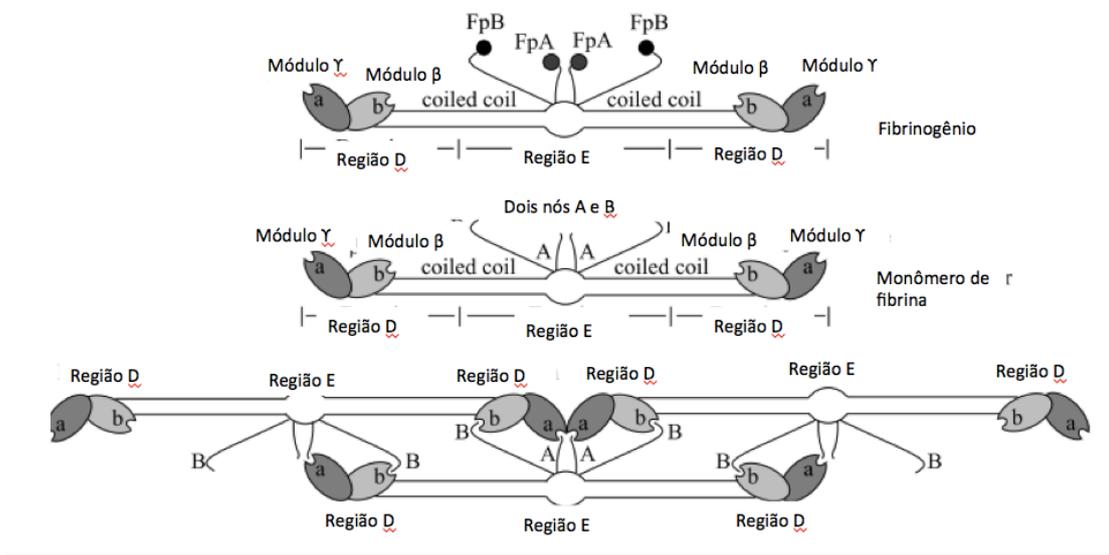


Figura 1. Esquema demonstrando o funcionamento do fibrinogênio para formar a fibra de fibrina. (a) demonstra o fibrinogênio intacto, com os nós na região central (b) A clivagem pela trombina os nós A e B formando o monômero de fibrina e (c) a ligação entre as regiões centrais e laterais formando a protofibrina ¹¹⁷. Adaptado de Weisel *et al.*, 2007.

2.3.3) Características reológicas da fibrina

A fibrina possui como principal função a hemostasia, entretanto a oclusão de sangramentos necessita de características reológicas importantes. Assim diversos trabalhos científicos foram e estão sendo realizados para entender esta propriedade ¹⁵⁷. Entender como a mecânica da fibrina está relacionada com a sua estrutura topográfica pode elucidar a biomecânica para produtos a base de fibrina ¹⁶¹.

A fibrina é uma proteína visco elásticas, ou seja, possui características elásticas e plásticas ao mesmo tempo, estas propriedades podem variar muito de acordo com a estrutura da fibra e a forma da sua polimerização ¹⁶².

A elasticidade é caracterizada pela capacidade do material se deformar de forma reversível, ou seja, cessada a tensão o material volta a seu estado de início. A viscosidade ou plasticidade refere a deformação irreversível que ocorre no material após determinada força ¹⁶³.

Quando exposto a forças tensionais a fibrina mostra mecânica não linear, em pequenas compressões, a força é diretamente proporcional a deformação, entretanto em maiores forças a curva cresce dramaticamente, então a elasticidade e a rigidez aumentam exponencialmente chegando a 20 vezes a força inicial, ou seja, quanto maior a força aplicada maior o módulo de elasticidade. Esta propriedade é fundamental para a biologia dos géis e o mecanismo deste fenômeno ainda é desconhecido ¹⁶⁴.

Kim *et al.*, em 2014 ¹⁶¹, utilizaram um reômetro associado ao microscópio confocal para observar o comportamento da rede sob pressão. Observaram que inicialmente a rede está flexível, com o aumento da tensão, as fibras ficam densas criando novas ligações químicas entre as protofibrilas, neste estado as fibras estão paralelas aumentando a resistência. Foi observado que as fibras possuem a uma tendência maior a se dobrarem que se alongarem. Quando o gel está alongado 10 vezes ocorre o alinhamento das fibras na direção da força ¹⁶⁵.

A proteína da fibrina possui capacidade de alongamento, embora a literatura ainda discuta como ela adquire esta condição, confere na rede a tendência de se alongar ao invés de quebrar. A fibra separadamente tem o módulo elástico de 14,5 Mpa e 400 x seu tamanho de alongamento sem romper nenhum monômero. Este valor, entretanto, decai para 1,7 MPa e 120% se a fibrina não tiver sofrido a ação do Fator XIIIa ¹⁶³.

Durante a formação da fibrina, inicialmente se formam as ramificações que conferem as características reológicas do biopolímero. Estas fibras se formam de tal maneira que raramente é possível observar fibra desconectada. Posteriormente as protofibrilas são agregadas lateralmente para conferir resistência à fibra ¹⁶².

Apesar dos extensos estudos das características da fibra de fibrina, muito pouco ainda se sabe como a microestrutura da fibrina afeta suas capacidades mecânicas em tecidos e culturas celulares ¹⁶⁶. Tendo em vista a bioengenharia como foco de estudo da fibrina e do colágeno, ambos os produtos são conhecidos por sua fragilidade, ou sua fraca resistência mecânica. Neste aspecto vários biomateriais são pesquisados para melhorar as características mecânicas e favorecer a colocação *in situ* ¹⁶⁷.

2.3.4) Biopolímero de fibrina

Os biopolímeros comerciais passam por tratamento para inativar vírus e evitar transmissão de doenças, como a pasteurização (Beriplast[®]), aquecimentos a vapor dois estágios (Tissel[®] e Tissucol[®]) e solventes-detergentes. O uso de solventes não desnatura proteínas importantes no BF, mas pode ser ineficaz contra algumas espécies de vírus ⁷. Além dos componentes básicos, os BF comerciais podem conter Fator XIII, aprotinina e, ácido tranexâmico, que em geral são fatores estabilizadores de fibrina ³⁴. Algumas marcas comerciais ainda podem apresentar glicoproteínas plasmáticas como a vitronectina, que possuem função de aderência e estabilização do coágulo ⁷.

Os BF possuem adesividade fraca, são totalmente absorvíveis e biocompatíveis, em comparação com os selantes à base de cianoacrilatos que são fortes adesivos, mas não são biodegradáveis e podem causar reação inflamatória por serem hidrofóbicos. Isto pode levar a formação de tecido de granulação, necroses e extensas fibroses ⁷.

O BF, em sua concepção é agente hemostático, usado em cirurgias vasculares como enxertos e reposição valvular, e é muito útil em pacientes com problemas de coagulação, diminuindo a perda sanguínea e minimizando a necessidade de reposição de fatores em cirurgias grandes ³⁴, entretanto a homeostasia não é sua única função. A fibrina produz uma matriz para aderir células como as células endoteliais e os fibroblastos, que levam a angiogênese e a remodelação tecidual. Os fibroblastos então remodelam a estrutura de fibrina e sintetizam colágeno, dando forma e estabilidade aos capilares *in vitro* ¹⁶⁸.

Na medicina, o uso do BF esta difundido na maioria das especialidades cirúrgicas: na cardiologia, auxilia a implantação de válvulas, correção de defeitos septais; na cirurgia torácica, evita vazamento de ar e fluido do parênquima pulmonar; na cirurgia gastrointestinal, em biopsias hepáticas; na traumatologia, evita sangramentos que a sutura não consegue controlar; na neurocirurgia, ancora a dura-máter; na oftalmologia, sela as lentes e repara o ducto lacrimal; na otorrinolaringologia, substitui a sutura na cartilagem traqueal e as membranas timpânicas; na cirurgia plástica, fixa enxertos de pele; na cirurgia cosmética, diminui cicatrizes causadas pela sutura; e na ortopedia, em tendões como complemento da sutura. Estes exemplos mostram que o BF possui grande diversidade de aplicações ¹⁶⁹.

O CEVAP (Centro de Estudos de Veneno e Animais Peçonhentos, UNESP-Botucatu) desenvolveu em 1989, um BF cujo fibrinogênio é derivado de animais de grande porte e uma proteína *trombina-like* derivada do veneno de cascavel em substituição a trombina bovina e humana ³⁵. Este novo produto é biocompatível, bioinerte, biodegradável com características de não conter sangue humano, não apresentar reações adversas, possuir uma boa capacidade adesiva ^{170, 171}. Não transmite doenças infecciosas humanas e pode ser usado como coadjuvante para suturas convencionais ¹⁷².

O selante de fibrina derivado de peçonha de serpente foi utilizado em tendões de cães devido a sua superfície macia, ausência de irregularidades e melhora na reparação. Foi observado resultados satisfatórios, sem promoveu adesão excessiva, facilitando assim a maturação da cicatrização do tendão ¹⁷².

O BF derivado de peçonha de serpente para enxerto de pele em cães eliminou o espaço morto, diminuiu o tempo cirúrgico, reduziu a quantidade de sutura, gerando conseqüentemente menor cicatriz. O BF demonstrou cicatrização mais rápida e menor formação de hematoma, provavelmente devido a sua característica hemostática ¹⁷³.

Gasparotto *et al.*, em 2014 ²⁹ demonstraram que o BF de origem animal permitiu as MSC se desenvolverem *in vitro*, interagindo com a rede de fibrina no interior e na superfície do material mantendo-as viáveis. O estudo valida o uso do BF como arcabouço biológico para carregar as MSC em diferentes modalidades cirúrgicas.

O BF derivado de peçonha de serpente demonstrou a ausência de citotoxicidade à células tronco observado na microscopia de transmissão. No

mesmo estudo o composto foi capaz de promover a formação óssea em defeitos críticos em fêmur de rato maior que o grupo controle ¹⁷⁰.

2.3.5) Biopolímero de fibrina na bioengenharia

A fibrina é um biomaterial com algumas características altamente desejáveis na bioengenharia que a torna o produto largamente estudado neste fim. Possui como característica inata a propriedade de adesão celular e pouca imunogenicidade além de ser totalmente absorvido liberando fatores que auxiliam na reparação ¹⁶⁵. Constitui material moldável, fácil de trabalhar e adequar a situações cirúrgicas ¹⁷⁴.

Ao contrário de outros materiais sintéticos a fibrina não é matriz passiva ao crescimento celular, possui áreas de ligação com fatores de crescimento e componentes da rede como fibronectina, ácido hialurônico e fator de Von Willebrand ¹⁵¹. As características que iniciam homeostase pós injúria facilitam as atividades celulares e a deposição da ECM ¹⁷⁵.

A matriz de fibrina promove um suporte mecânico para neutrófilos e fibroblastos que depositam matriz extracelular e permitem a formação de um novo tecido ¹⁵¹. A fibrina possui pontos de ligação celulares que facilitam a proliferação, migração, espalhamento celular ¹⁵², esta adesão confere as células enxertadas uma estabilidade primária na sua inserção ¹⁷⁶. Hoje o BF é usado para *drug delivery*, liberação celular de fatores de crescimento, e meio tridimensional para cultura e diferenciação celular.

Na bioengenharia óssea uma atenção especial deve ser dada a resistência compressiva do arcabouço, o material deve possuir força

semelhante ao osso para suportar as cargas evitando problemas com traumas ¹⁷⁷. A fibrina e o colágeno são arcabouços competentes na cultura celular, entretanto falham neste quesito. Para melhorar estas propriedades estudos cultivam as células no BF prévio a aplicação, adiciona linhagens celulares ^{177, 178} e associa a biomateriais como o TCP ¹⁷⁶.

O grande desafio na atualidade da bioengenharia é produzir arcabouços biológicos competentes para cada órgão que se deseja reparar ou construir. No tecido ósseo ele deve permitir a penetração de células dos tecidos adjacentes, induzir a formação óssea, ser biocompatível e mecanicamente similar ao osso nativo, biodegradável e esterilizável sem perder suas propriedades físico químicas. A geometria da micro e macro porosidades determinam a penetração de células, adesão e liberação de fatores de crescimento, vascularização e diferenciação celular ²⁴.

Os componentes presentes no BF também possuem atividades biológicas. Baixas concentrações de trombina (0,5 a 5 U / mL) aumentaram a expressão de marcadores osteoblásticos e desencadearam uma resposta angiogênica aumentada de osteoblastos pela expressão de VEGF ¹⁷⁹. O revestimento superficial de TCP com fibrinogênio aumentou a proliferação e adesão de células-tronco mesenquimais humanas, devido à rugosidade superficial criada pela adsorção de fibrinogênio e / ou pela função de uma região epitópica de β 15-42 contida no fibrinogênio ¹⁸⁰. A adição de fibrinogênio ao TCP também acelerou a consolidação óssea em calotas de coelhos. Associações de fibrinogênio com Xitosan demonstrou *in vitro* a presença de diversos fatores fundamentais na formação óssea como o PDGF, BMP-5, BMP-7, e FGF ¹⁸¹.

A estrutura mecânica e topológica associadas com a concentração de fibrinogênio no gel alteram as repostas clínicas ¹⁸². A pré cultura das MSC no BF por 7 dias melhoram sua capacidade de proliferação e capacidade osteogênica. Esta característica foi mais evidente em menores concentrações de fibrinogênio melhor mantendo a estrutura das MSC ¹⁸³. As estruturas mais fechadas da rede pode limitar o crescimento das células ¹²⁷. Outro estudo mostra que maiores concentrações promovem uma indução natural as MSC em se diferenciarem na linhagem osteogênica ⁸¹.

Entretanto os resultados podem variar do BF trabalhado apenas células e do BF com células e TCP. O crescimento celular foi menor em altas concentrações de fibrinogênio no composto BF/MSK mas foi o inverso que ocorreu no composto BF/MSK/TCP, obtendo melhores resultados em altas concentrações ⁸⁴. Outro estudo demonstrou a melhor expressão de marcadores ósseos com 80 mg/ml (maior concentração entre os grupos) entretanto com menor crescimento celular, provavelmente devido a baixa porosidade ⁸⁵.

A concentração de fibrinogênio também afeta o tempo de degradação ¹⁸⁴. A retenção do BF por longo tempo na ferida ocasionou formação óssea limitada em calotas de ratos com células-tronco derivadas da polpa dentaria. A presença do arcabouço é importante para a inserção de células no sitio desejado, entretanto após certo tempo deve ser degradado para permitir o crescimento ósseo no local e evitar que as MSC no centro do enxerto entrem em apoptose ⁷³. Em outro estudo com BF e TCP a degradação do mineral ósseo ocorreu na mesma velocidade da formação de

novo osso, permitindo uma boa reparação óssea auxiliada pela presença de células e fatores de crescimento ⁷³.

Os BFs devem permanecer no organismo após um tempo adequado para permitir a correta reparação. A degradação excessiva da fibrina antes das células secretarem matriz extracelular suficiente resulta na falha da estrutura, entretanto a inibição da fibrinólise por muito tempo também resulta em falha ¹⁸⁵.

2.3.6) Biopolímero de fibrina para “drug delivery”

A fibrina naturalmente age no organismo como um reservatório de fatores de crescimento e matriz provisória para a regeneração ¹⁸⁶. É esperado que estas propriedades sejam exploradas para incorporação de diversos fatores quimiotáticos potencialmente efetivos em qualquer modalidade terapêutica. Um grande número de estudos mostram a fibrina carreando diferentes tipos celulares, drogas, fatores de crescimento e atualmente terapias gênicas virais e não virais também estão sendo exploradas ¹⁸⁷ (**Figura 2**).

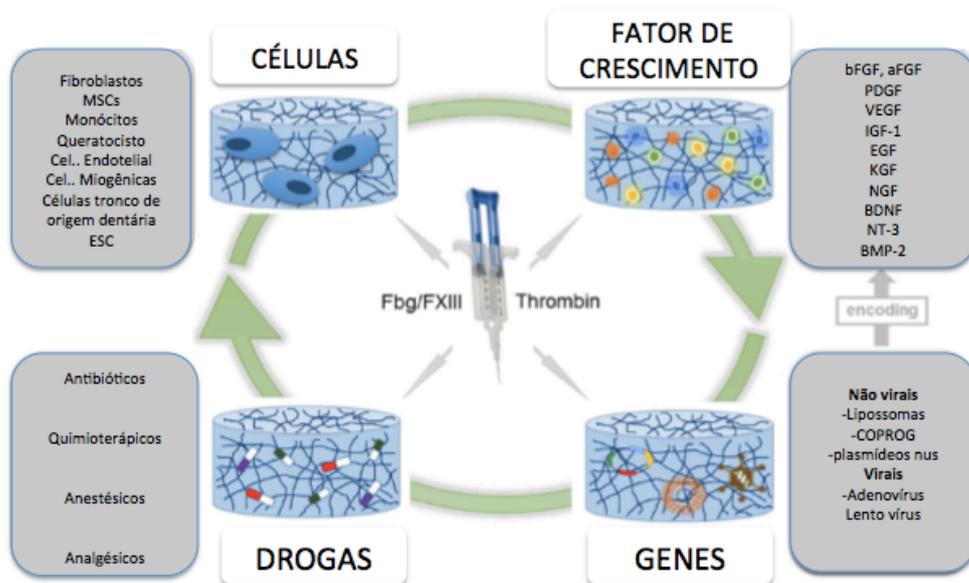


Figura 2. Aplicações experimentais e clínicas de entrega de fibrina na cicatrização de feridas. A fibrina tem sido usada para fornecer células, drogas, fatores de crescimento ou vetores de genes e combinações dos mesmos. Adaptado de Heher *et al.* 2018.

Os fatores de crescimento têm papel fundamental na cicatrização, infelizmente seu uso é limitado na prática clínica devido seu metabolismo rápido no organismo ¹⁸⁸. Carreadores biológicos estão sendo estudados para proteger estes compostos da rápida degradação sem interferir na efetividade destas proteínas. Após a polimerização, a fibrina forma matriz extracelular temporária que aprisiona células e agem como reservatório de fatores de crescimento, posteriormente, as células invadem a rede e reorganizam a matriz extracelular ¹⁸⁹.

A forma mais simples de usar a fibrina como *drug delivery* é colocar em algum dos seus componentes antes da polimerização. Muitas variáveis ditam a dinâmica da liberação da droga ou dos fatores de crescimento incorporadas no gel. A fibrina possui grande afinidade por fatores de

crescimento como o VEGF e o TGF- β 1 que são liberados pelas plaquetas e provavelmente têm áreas de ligação na fibrina para atuarem na cicatrização. Entretanto outras drogas sintéticas também foram usadas com a fibrina, por exemplo, a lidocaína, a vancomicina e quimioterápicos, em vários casos conseguindo uma liberação lenta e local do medicamento desejado ¹⁹⁰.

A liberação local do BF é regido de duas formas, a difusão dos fatores para o meio e a fibrinólise que libera gradualmente quimiotáticos conforme ocorre a degradação ²⁹. Alguns fatores têm ligação fraca com a fibrina e vão ser liberados por difusão mais rapidamente, já fatores com uma interação maior como é o caso da FGF, VEGF e IL-1b, irá ser liberado após a penetração celular e degradação da fibrina ¹⁹¹. Vale ressaltar que os subprodutos de degradação da fibrina já constituem por si fatores quimiotáticos para neutrófilos e aumentam a expressão de receptores de membrana CD11 e CD18 ¹⁹². Em regeneração periodontal, a fibrina por si demonstrou potencial de promover a cicatrização desafiando a microbiota agressiva da boca ¹⁹³.

Para ser efetivo na liberação de fatores o BF não pode ser rapidamente degradado pela plasmina, é necessário sua permanência no organismo tempo suficiente para os quimiotáticos agirem na hora certa. Desta forma estuda-se modificações no BF como alteração da estrutura da fibrina, utilização de enzimas covalentes que dificultem a ação da plasmina. O objetivo é permitir uma liberação lenta, em quantidades fisiológicas dos fatores de crescimento ³³.

Wong *et al.*, em 2003 ¹⁹⁴, avaliaram a liberação de fatores e sua eficácia em células embrionárias de galinhas, observaram que a bFGF e a

VEGF₁₆₅ possuem uma liberação muito mais lenta que VEGF₁₂₁ demonstrando uma conexão na região C-terminal da fibrina com a VEGF₁₆₅. Esta proteína é potencialmente útil em tratamento de queimados em fixações de enxerto pelo seu potencial angiogênico ¹⁹⁵.

A fibrina possui alguns fatores excepcionalmente desejáveis na *drug delivery*. Primeiro, a fibrina polimeriza *in situ*, conferindo maleabilidade na aplicação, e também permitem o acréscimo das moléculas desejáveis na sua formulação e finalmente, sua microestrutura pode ser trabalhada para melhorar sua cinética ^{29,196}.

Alterações na concentração de fibrinogênio foram propostas com o objetivo de produzir uma malha densa que limitaria a evasão de fatores de crescimento. Outras alternativas para promover uma liberação lenta dos fatores estão sendo estudadas como alterar estruturalmente a fibrina e adicionar nanopartículas de quitosana que dobraram o tempo de liberação com resultados promissores ^{33,197}. Outra alternativa para conter a difusão rápida, é a incorporação de heparina livre na matriz, a heparina se liga à fibrina ¹⁹⁸, bem como a muitos fatores de crescimento ¹⁹⁹, e pode, portanto, ser usada para proteger os fatores de crescimento retardando sua liberação²⁹ **(Figura3)**.

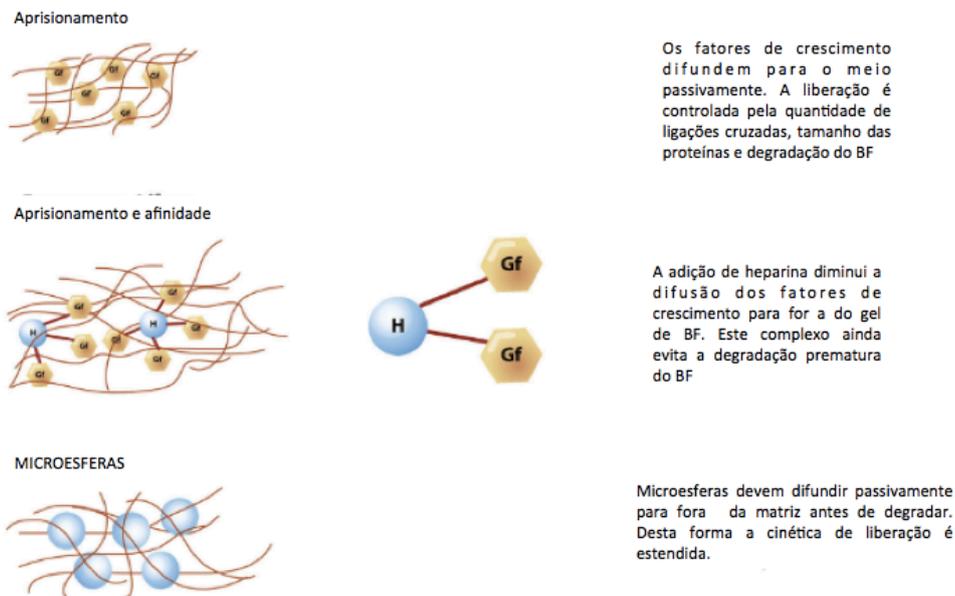


Figura 3. Diferentes meios de aplicação de fatores bioativos nos biopolímeros de Fibrina com intuito de diminuir a difusão rápida dos fatores de crescimento para fora do gel. Adaptado de Whelan *et al.*, 2014³³.

O uso de BF tem sido encorajado em várias indicações clínicas como no tratamento de úlceras crônicas, queimaduras, traumas severos, os quais são facilmente infectados e a administração local de drogas local e de lenta liberação seria muito mais efetivo que a aplicação sistêmica. A aplicação de antibióticos, quimioterápicos, anestésicos tem sido estudadas, com o desafio de manter os bioprodutos por períodos terapêuticos na ferida³⁰.

O estudo pioneiro realizado por *Redi et al.*, em 1983²⁰⁰, comparou a eficácia da fibrina com três diferentes antibióticos, e observaram que a liberação ocorreu dentro de três dias. Uma observação interessante deste estudo foi a interação da gentamicina com as cadeias alfa da fibrina tornando o BF mais fraco. Estudos mais recentes demonstram que a cefazolina não altera sua estrutura ao ser incorporada no BF, e atesta o potencial terapêutico desta união²⁰¹. A maioria dos antibióticos ao serem implantado

são liberados a metade da sua concentração por osmose nas primeiras 24 horas e restante dentro de 48 a 96 horas²⁰².

Os antibióticos lipofílicos (pouco solúveis, como é o caso da estreptomicina e a tetraciclina) são mantidas por mais tempo nos BF. O modelo experimental de ratos com peritonites causadas por *Staphylococcus aureus*, revelou 100% de sobrevivência dos animais no grupo em que o BF foi usado, validando a eficácia do tratamento²⁰³.

O colágeno e a fibrina são “competidores” na bioengenharia e podem encapsular células e fatores de crescimento. Embora o colágeno seja mecanicamente mais resistente na indução óssea e atualmente o material utilizado para carrear as BMPs, a BF com adição de heparina consegue manter a liberação de BMPs por 20 dias enquanto o colágeno por apenas 6 dias. Nestes trabalhos o grupo BF promoveu maior diferenciação dos osteoblastos e maior densidade óssea^{204, 205}.

Outras modalidades terapêuticas já foram estudadas como adicionar lidocaína para minimizar a dor após cirurgias de aumento de mamas em mulheres com resultados satisfatórios²⁰⁶.

2.3.7) Biopolímero de fibrina como arcabouço celular

Os BFs têm sido sistematicamente usados como carreadores de células em diversas áreas da medicina pelas propriedades já descritas anteriormente. Os géis de fibrina podem enclausurar células mantendo sua viabilidade e permitindo que grande porcentagem sobreviva quando comparado com aplicações sistêmicas^{207, 127}.

No entanto, ainda há controvérsia à formulação ideal do BF; qual a quantidade de células a oferecer ao tecido; e se devemos adicionar outros biomateriais para conferir resistência ^{90, 128, 129, 130}. Acredita-se que as concentrações ideais de inserção células variam de 3×10^5 até 1×10^6 células por mL de fibrina e as concentrações maiores de fibrinogênio alteram a conformação celular e a cinética do arcabouço ³³.

Os poros no *scaffold* de fibrina possuem um delicado balanço, que deve se adequar a cada linhagem celular trabalhada, pois poros largos permitem melhor passagem de nutrientes, trocas gasosas, e remoção de detritos, mas também afeta a integridade da rede pois poucas conexões da fibra resultarão em um suporte inadequado. Assim os poros foram classificados em microporos (menor que 2 nm) mesioporos (com 2 a 50 nm) e macroporos ²⁰⁸ (mais de 50 nm).

O BF pode funcionar com meio de cultura tridimensional, nestes casos, a concentração de fibrinogênio tem grande influência no desenvolvimento celular. Em menores concentrações, a rede é mais esparsa as células se desenvolvem como plano linearmente, nas redes mais densas a célula faz uma ponte (*bridge*) fechando os poros. Em *scaffolds* muito porosos a osteogênese ocorrerá de forma mais lenta entretanto a perda celular será um fator prevalente. A questão chave da cultura celular é evitar a perda celular no arcabouço ²⁰⁹.

O BF derivado de peçonha de serpente utilizado em tendões de ratos, manteve constante a quantidade de células-tronco derivada do tecido adipogênico, após 14 dias da cirurgia. Entretanto, o melhor resultado se deu no uso de apenas BF sem adição de células ¹⁷¹.

As culturas bidimensionais tendem a atrasar diferenciação celular em comparação com as estruturas tridimensionais do BF. Na cultura tridimensional temos uma melhora na adesão celular e a organização tecidual, pois a fibrina possui alta eficiência na colonização celular e distribuição homogênea das células ²¹⁰.

Kim *et al.*, em 2014, ¹⁶⁰ avaliaram o crescimento celular no BF em diferentes concentrações do BF com hMSC e pó de osso. Estes autores observaram por rtPCR que a maior concentração de fibrinogênio promoveu maior liberação de fatores de crescimento ósseos como o ALP e a OCN que os demais grupos e até os 10 dias teve o melhor crescimento *in vitro*, decaindo aos 15 dias possivelmente pela confluência. O ALP representa a quantidade de células que estão passando pela diferenciação celular e a OCN é frequentemente usado como marcador tardio de diferenciação.

O BF foi usado para testar a capacidade osteogênica das células da camada íntima da membrana de Schneiderian com aplicação ectópica na pele de ratos. A presença do BF por si não foi capaz de induzir a formação óssea, e as células produziram quantidade menor que a associação de células e salante de fibrina ²¹¹. Os autores concluem que a fibrina produz um microambiente propício similar ao coágulo sanguíneo para a formação óssea ¹⁵⁹. Outro estudo em aplicações ectópicas demonstrou que a formação óssea ocorreu do tipo endocondral, ou seja, inicialmente se fez cartilagem para posterior substituição para tecido ósseo ²¹².

3) REFERÊNCIAS ¹

1. Kang S-H, Chung Y-G, Oh I-H, Kim Y-S, Min K-O, Chung J-Y. Bone regeneration potential of allogeneic or autogeneic mesenchymal stem cells loaded onto cancellous bone granules in a rabbit radial defect model. *Cell Tissue Res* 2014; 355(1):81–8.
2. Weatherholt AM, Fuchs RK, Stuart J, Warden SJ Specialized connective tissue: bone, the structural framework of the upper extremity *Hand Ther* 2012; 25 (2): 123–132.
3. Lee J, Heo S, Koak J. Bone Regeneration with Rabbit Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Bone Graft Materials. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2012;27:1389–400.
4. Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M: Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17: 136e140.
5. Doherty MJ, Vvilsoni DJ, Schwarzs N, Mollan RAB. Biocompatibility of xenogeneic bone , commercially available coral , a bioceramic and tissue sealant for human osteoblasts. *Biomaterials.* 1994;15(8): 601–8.
6. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant. Dent* 1993; 2:158-167.
7. Radosevich M, Goubran HA, Burnouf T. Fibrin Sealant: Scientific Rationale , Production Methods , Properties , and Current Clinical Use. *Vox Sang.* 1997;72:133–43. Browaeys H, Bouvry P, Bruyn H De. A Literature Review on Biomaterials in Sinus. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2007;9(3):166–177.
8. Browaeys H, Bouvry P, Bruyn H De. A Literature Review on Biomaterials in Sinus. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2007;9(3):166–177.
9. Boyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin.* 1968 Suppl. 97:77-89.

1. Segundo normas de Vancouver: “Uniform Requeriments for Manuscripts submitted to Biomedical Journals” (International Comitte of Medical Journals Editors, 1993) (213) e por deliberação do Curso de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu da UNESP.

10. Parekkadan B, Milwid JM. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Rev Biomed Eng* 2010; 12: 87–117.
11. Meirelles LS, Caplan AL, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2008;26: 2287-99.
12. Zucconi E, Vieira NM, Bueno DF, Secco M, Jazedje T, Ambrosio CE, et al. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein – a novel source for cell therapy studies. *Stem Cells and Development*. 2009;1-33.
13. Kulterer B, Friedl G, Jandrositz A, Sanchez-Cabo F, Prokesch A, Paar C, et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*. 2007;8: 70.
14. Caplan AI, Bruder SP. Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends Mol Med*. 2001; 7: 259-64.
15. Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154–156
16. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145–1147.
17. Araújo M, Kyrylenko S, Barroso A, Vidigal M, Seabra R, Junior F, et al. Transgenic human embryonic stem cells overexpressing FGF2 stimulate neuroprotection following spinal cord ventral root avulsion. *Exp Neurol*; 2017;294:45–57
18. Ovchinnikov DA, Turner JP, Titmarsh, DM, Thakar NY, Sin DC, Cooper-White JJ, Wolvetang EJ,. Generation of a human embryonic stem cell line stably expressing high levels of the fluorescent protein Cherry. *World J. Stem Cells*. 2012; 4: 71–79.
19. Kunova M, Matulka K, Eiselleova L, Salykin A, Kubikova, I, Kyrylenko S, Hampel A, Dvorak P. Adaptation to robust monolayer expansion produces human pluripotent stem cells with improved viability. *Stem Cells Transl. Med*. 2013; 2: 246–254.
20. Prockop DJ. Repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs): Controversies, myths, and changing paradigms. *Mol Ther* 2009; 17: 939–946.

21. Srijaya TC, Ramasamy TS, Kasim NH. Advancing stem cell therapy from bench to bedside: Lessons from drug therapies. *J Transl Med* 2014; 12: 243.
22. Hwang SJ, Cho TH, Lee B, Kim IS. Bone-healing capacity of conditioned medium derived from three-dimensionally cultivated human mesenchymal stem cells and electrical stimulation on collagen sponge. *J Biomed Mater Res Part A*. 2017; 106A: 311–20.
23. Tran C, Damaser MS. Stem cells as *drug delivery* methods: Application of stem cell secretome for regeneration. *Adv Drug Deliv Rev*. 2015; 82–83:1–11.
24. Heliotis M, Ripamonti U, Ferretti C, Kerawala C, Mantalaris A, Tsiridis E. Leading article The basic science of bone induction. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2009;47: 511–4.
25. Gaßling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Jorg W. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009; 108 (1):48–55..
26. Harmon A M, Kong W, Buensuceso CS, Gorman AJ, Muench TR. Effects of fibrin pad hemostat on the wound healing process in vivo and in vitro. *Biomaterials*. 2011; 32: 9594–601.
27. Bootle-Wilbraham CA, Tazzyman S, Thompson WD, Stirk CM, Lewis CE. Fibrin fragment E stimulates the proliferation, migration and differentiation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Angiogenesis* 2001;4(4):269–75.
28. Herrick S, Blanc-Brude O, Gray A, Laurent G. Fibrinogen. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31(7):741–6.
29. Heher P, Mühleder S, Mittermayr R, Redl H, Slezak P. Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing. *Adv Drug Deliv Rev* [; 2018;129:134–47.
30. Ahmad E, et al., Fibrin matrices: the versatile therapeutic delivery systems, *Int. J. Biol. Macromol*. 2015; 811:21–136.
31. Brennan M, London N. Fibrin Glue. *Blood Rev*. 1991; 5:240–4.
32. Janmey P a, Winer JP, Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface*. 2009;6(30):1–10.

33. Whelan D, Caplice NM, Clover AJP. Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. *J Control Release*. 2014;196:1–8.
34. Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. *World J. Surg*. 2010; 34 (4):632–4.
35. Barros LC, Ferreira RS Jr., Barravieira SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos , Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: applications in medicine. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*.2009; 12:553 - 571.
36. Gasparotto VP, Landim-Alvarenga FC, Oliveira AL, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera, Ferreira-Jr RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells *Stem Cell Research & Therapy* 2014; 5(3): 78.
37. Seeman E, Delmas PD. Bone quality--the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 354: 2250–2261, 2006.
38. Park HW, Shin JS, Kim CW, Proteome of mesenchymal stem cells. *Proteomics* 2007, 7, 2881–2894.
39. Segeletz S, Hoflack B. Proteomic approaches to study osteoclast biology. *Proteomics*. 2016;16:2545–56.
40. Xiao Z, Camalier CE, Nagashima K, Chan KC et al., Analysis of the extracellular matrix vesicle proteome in mineralizing osteoblasts. *J. Cell. Physiol*. 2007; 210: 325–335.
41. Junqueira LC, Carneiro J. Tecido ósseo. *Histologia básica*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995; Cap.5: 108-26.
42. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis P V Current concepts of molecular aspects of bone healing *Injury, Int. J. Care Injured*. 2005; 36: 1392—1404.
43. Carter DR, Van der Meulen MC, Beaupre GS. Mechanical factors in bone growth and development. *Bone* 1996;18S: 5—10. 18.
44. Marshel R, Einhorn TA The biology of fracture healing. *Injury*. 2011; 42(6):551-5.
45. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*.1998; 355S: 7—21.

46. Peterson, Principios de cirugía bucomaxilofacial Editora Santos 2008 Ed.2.
47. Kon T, Cho T, Aizawa T, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF- κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 2001;16:1004—14.
48. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg [Am]* 2002;84-A(6):1032—44.
49. Asparuhova MB, Caballé-Serrano J, Buser D, Chappuis V. Bone-conditioned medium contributes to initiation and progression of osteogenesis by exhibiting synergistic TGF- β 1/BMP-2 activity. *Int J Oral Sci [Internet]*. Springer US; 2018;10(2):20.
50. Ten Dijke P, Fu J, Schaap P, Roelen BA. Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg [Am]* 2003;85(Suppl. 3):34—8
51. Reddi AH. Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg [Am]* 2001;83- A(Suppl. 1):1—6.
52. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, et al. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 2002;106: 2263—70.
53. Henriksen K, Neutzsky-wulff A V, Bonewald LF, Karsdal MA. Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone*. 2009; 44 (6):1026—33.
54. Yu Y. Osteogenic differentiation from mouse embryonic stem cells 2013. A thesis submitted in conformity with the requirements for the degree of Master of Science in the Graduate Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, in the University of Toronto.
55. Prisell PT, Edwall D, Lindblad JB, et al. Expression of insulin-like growth factors during bone induction in rat. *Calcif Tissue Int* 1993;53:201—5

56. Osugi M, Katagiri W, Ph D, Yoshimi R, Ph D. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration. *TISSUE Eng A*. 2012;18:1479–89
57. Spencer, E.M., Liu, C.C., Si, E.C.C., and Howard, G.A. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on bone formation and resorption in rats. *Bone*. 1991;12: 21.
58. Yan S, Zhang R, Wu K, Cui J, Shen Y, Wang X, et al. ScienceDirect Characterization of the essential role of bone morphogenetic protein 9 (BMP9) in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) through RNA interference. *Genes Dis* 5. 2018;5(April):172–84.
59. Gerstenfeld LC, Barnes GL, Shea CM, Einhorn TA. Osteogenic 49. differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient 50. Rich growth environment. *Connect Tissue Res* 2003;44 (Suppl. 1):85—91.
60. Rehder J, Aparecida C, Bosnardo F, Beatriz M, Leite DP, Andrey M, et al. A comparative study of cell therapy and fibrin glue applied to chronic venous ulcers. *Procedia Eng [Internet]*. Elsevier B.V.; 2013;59:85–91.
61. Gomes PS; Fernandes MH, Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Laboratory animals*. 2011; 45(1): 14-24.
62. Horwitz EM. Advancing regenerative medicine the translational way. *Sci Transl Med*. 2013; 5: 177.
63. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 299-308.
64. Ferguson, D.; et al. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction – induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin. Orthop*. 1987; 219 :251-258.
65. Mankani MH, et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem cells*. 2006; 24(9): 2140-9.
66. Alamada, BVP. Comparação entre fontes de células--troncomesenquimais na indução à regeneração óssea. Mestrado IB-USP 2013.

67. Costa NMF, Melo BR, Brito RT, Fernandes GVO, Bernardo VG, Fonseca EC. Techniques to study cellular response in critical size bone defect healing on rat calvaria treated with hydroxyapatite implants. *Key Eng Mater.* 2009; 396-8: 285-8.
- 68 Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg.* 1982; 196: 100-9.
69. Dahlin C, Alberius P, Linde A. Osteopromotion for cranioplasty. An experimental study in rats using a membrane technique. *J Neurosurg.* 1991; 74: 487-91
70. Anderson de Oliveira P. Terapia de defeito crítico em crânio de ratos pela associação de xenoenxerto bovino e células derivadas de perióstio autógeno. Tese de Doutorado Araraquara, 2009.
71. Xu J, Wang B, Sun Y, Wu T, Liu Y, Zhang J, et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. *Stem Cell Res Ther Stem Cell Research & Therapy.* 2016;7:134–46.
72. Khojasteh A, Eslaminejad B, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106:356–62.
73. Petridis X, Diamanti E, Ch G, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Cranio-Maxillofacial Surg ;* 2015;43(4):483–90.
74. Seo BM, Sonoyama W, Yamaza T, Coppe C, Kikuri T, Akiyama K, et al. SHED repair critical-size calvarial defects in mice. *Oral Diseases.* 2008;14:428–34.
75. Wang P, Liu X, Zhao L, Weir MD, Sun J, Chen W, et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomater.* 2015;18:236–48.
76. Thompson, W.D., Evans, A.T., and Campbell, R. The control of fibrogenesis: stimulation and suppression of collagen synthesis in the chick chorioallantoic membrane with fibrin degradation products, wound extracts and proteases. *J Pa- thol* 148, 207, 1986. 29.

77. Morrison S J, J. Kimble J, Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer, *Nature* 2006; 441: 1068–1074.
78. Robey PG. Cell sources for bone regeneration: the good, the bad, and the ugly (but promising). *Tissue Eng Part B Rev* 2011;17(6):423–30.
79. Friedenstein, AJ, Chailakhyan, RK, Latsinik, N.V, Panasyuk, AF, and Keiliss-Borok, I.V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. 1974;17: 331.
80. Bonnaure G, Gervais CA, Neron, S. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Enhance the Differentiation of Human Switched Memory B Lymphocytes into Plasma Cells in Serum-Free Medium. *J of Immunol Res* 2016, 7801781, 18.
81. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JCY, Helgerson SAM, Tawil B. Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Osteogenic. *TISSUE Eng.* 2006;12(8):2385–96.
82. Li JIE, Tian W, Song J. Proteomics Applications in Dental Derived Stem Cells. *Journal cellular Physiol.* 2017;232(October):1602–10.
83. Bacakova L, Zarubova J, Travnickova M, Musilkova J, Pajorova J, Slepicka P, et al. Stem cells : their source , potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnol Adv . Elsevier*; 2018;(January):0–1.
84. Mooney DJ, Vandenburgh H. Review Cell Delivery Mechanisms for Tissue Repair. *Cell Stem Cell.* 2008;2(March):205–13.
85. Laugwitz, K.L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.Z., Cai, C.L., Lu, M.M., Reth, M., et al. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature.* 2005; 433, 647–653.
86. Fisher MB, Mauck RL. Tissue Engineering and Regenerative Medicine : Recent Innovations and the Transition to Translation. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013;19.
87. Friedenstein A, Gorskaja J, Kulagina N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol.* 1976; 4:267–74.

88. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25:2739-2749.
89. Caplan AI: Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009, 217:318-324.
90. Sorrell JM, Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther.* 2010;1(4):30.
91. Bunpetch V, Zhang Z, Zhang X, Han S, Zongyou P, Wu H, et al. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration. *Biomaterials.* 2017.
92. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J, Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study., *Transplantation.* 2013; 95:1535–41.
93. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ Human mesenchymal Stem cells- current trends and future perspective *Biosc Rep*, 2015: 35; 1-18.
94. Wang KL, Rui Y, Huang S, Lin S. The Effects of Secretion Factors from Umbilical Cord Derived Mesenchymal Stem Cells on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One.* 2015;23:1–16.
95. Liechty, K.W., MacKenzie, T.C., Shaaban, A.F., Radu, A., Moseley, A.M., Deans, R., et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nat Med.* 2000; 6: 1282.
96. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP, Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection *Journal of inflammation* 2005 2:8; 1-11.
97. Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol.* 2007; 25: 1015–1024.
98. Parekkadan B, Jack M. Milwid. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. *Annu Rev Biomed Eng.* 2010;15(12):87–117.

99. Granéli C, Thorfve A, Ruetschi U, Brisby H, Thomsen P, Lindahl A, et al. ScienceDirect Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res.* 2014;12(1):153–65.
100. Long, F. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2012; 13: 27-38.
101. Yanhong Yu M.Sc Osteogenic differentiation from mouse embryonic stem cells and the role of calreticulin., Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, Mastery, University of Toronto 2013
102. Sun L, Blair HC, Peng Y, Zaidi N, Adebajo OA, Wu XB, Wu XY, Iqbal J, Epstein S, Abe E, Moonga BS, Zaidi M. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(47):17130–17135.
103. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.* 1996; 76:593–629.
104. Birmingham E, Niebur GL, Mchugh PE, Shaw G, Barry FP, Mcnamara LM, et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells. *Eur Cells Mater.* 2012;23(353):13–27.
105. Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.* 2007;13: 2311-2320.
106. Ichida M, Yui Y, Yoshioka K, Tanaka T, Wakamatsu T, Yoshikawa H, et al. Changes in cell migration of mesenchymal cells during osteogenic differentiation. *FEBS Lett . Federation of European Biochemical Societies;* 2011;585(24):4018–24.
107. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998;282: 1145–1147.
108. Zhu H, Kimura T, Swami S, Wu JY. Pluripotent stem cells as a source of osteoblasts for bone tissue regeneration. *Biomaterials* 2018 [Internet]. Elsevier Ltd e-pub.
109. Cohen DE e Melton D.. Turning straw into gold: directing cell fate for regenerative medicine. *Nat Rev. Genet.* 2011. 12: 243-252.

110. Allegrucci C e Young LE.. Differences between human embryonic stem cell lines. *Hum. Reprod. Update* 2007. 13: 103-120.
111. Wang L, Wang P, Weir MD, Reynolds MA, Zhao L, Xu HK, et al. Hydrogel fibers encapsulating hiPSC-MSCs, hESC-MSCs and hUCMSCs in injectable calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. *HHS Public Access. Biomed mater.* 2017;11(6):1–23.
112. Liu X, Wang P, Chen W, Weir MD, Bao C, Xu HHK. Human embryonic stem cells and macroporous calcium phosphate construct for bone regeneration in cranial defects in rats. *Acta Biomater.* 2014;10(10):4484–93.
113. Emmert MY, Hitchcock RW, Hoerstrup SP. Cell therapy , 3D culture systems and tissue engineering for cardiac regeneration. *Adv Drug Deliv Rev B.V.* 2014;69–70: 254–69.
114. Xie J, Peng C, Zhao Q, Wang X, Yuan H, Yang L, et al. *Acta Biomaterialia* Osteogenic differentiation and bone regeneration of iPSC-MSCs supported by a biomimetic nanofibrous scaffold. *Acta Materialia Inc.* 2016;29: 365–79.
115. Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:4937–61.
116. Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther.* 2005;105 (2):151-63.
117. Caplan AI: Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009, 217:318-324.
118. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol.* 2014;5(May):1–6.
119. Bilgimol JC, Ragupathi S, Vengadassalopathy L, Senthil NS, Ganesan M, Manjunath SR, et al. Stem cells : An eventual treatment option for heart diseases. *World J Stem Cells.* 2015;7(8):1118–26.
120. Quevedo HC, Hatzistergos KE, Oskouei BN, Feigenbaum GS,. Rodriguez JE, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells restore cardiac function in chronic ischemic cardiomyopathy via trilineage differentiating capacity., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009; 106 14022–7.

121. Von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, Uzunel M, Ringden O, Le Blanc K, Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation, *Stem Cells*. 2012;30. 1575–1578.
122. Langer R, Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science*; 1993; 260, 920–926
123. Huebsch ND, Mooney DJ. FRET: a tool for probing molecular cell-biomaterial interactions in three dimensions. *Biomaterials* 2007; 28: 2424–2437.
124. Brafman DA. Constructing stem cell microenvironments using bioengineering approaches Constructing stem cell microenvironments using bioengineering approaches. *Physiol Genomics*. 2014;45:1123–35.
125. Evans ND, Gentleman E, Polak JM. Scaffolds for stem cells. *Materials Today*. 2006;9:26e33. 10.
126. Sheen Y, Lin T, Chang K, Lai C, Lin S, Lee S. Commercially available materials as scaffold candidates for adipose-derived stromal / progenitor cell tissue engineering. *Formos J Surg [Internet]*. Elsevier Taiwan LLC; 2014;47(1):1–10.
127. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003;24:2497–502.
128. Chen H, Liu Y, Jiang Z, Chen W, Yu Y, Hu Q. Cell – scaffold interaction within engineered tissue. *Exp Cell Res [Internet]*. Elsevier; 2014;323(2):346–51.
129. Karp JM, Sarraf F, Shoichet MS, Davies JE. Fibrin-filled scaffolds for bone-tissue engineering : An in vivo study. *J Biomed Mater Res*. 2004;22–6.
130. Oh, S., Oh, N., Appleford, M., and Ong, J.L. Bioceramics for tissue engineering applications—a review. *Am J Biochem Biotechnol* 2006;2: 49.
131. Lavoie JR, Rosu-Myles M Uncovering the secretome of mesenchymal stem cells *Biochimie* 2013; 95: 2212e-2221.
132. Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Biochimica et Biophysica Acta Stem cells: Insights into the secretome. *BBA - Proteins Proteomics*; 2013;1834(11): 2380–4.

133. Kinnaird, T., Srabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S.E. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* 2004;109: 1543.
134. Maguire, G. Stem cell therapy without the cells. *Commun. Integr. Biol.* 2013, 6, e266-31.
135. Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y.G., and Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008; e1886.
136. Madrigal, M.; Rao, K.S.; Riordan, N.H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med.* 2014, 12, 260.
137. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome : Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1852–76.
138. Rilla K, Mustonen A, Arasu UT, Härkönen K, Matilainen J, Nieminen P. Extracellular vesicles are integral and functional components of the extracellular matrix. *Matrix Biol [Internet]. International Society of Matrix Biology;* 2017.
139. Xu J, Wang B, Sun Y, Wu T, Liu Y, Zhang J, et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy;* 2016;7:134.
140. Li YU, Gao XIN, Wang J. Human adipose - derived mesenchymal stem cell - conditioned media suppresses inflammatory bone loss in a lipopolysaccharide - induced murine model. 2018;1839–46.
141. Henkels KM, Frondorf K, Gonzalez-Mejia ME, Doseff AL, Gomez-Cambronero J. IL-8-induced neutrophil chemotaxis is mediated by Janus kinase 3 (JAK3). *FEBS Lett* 2011;585:159–166. 38.
142. Caballé-Serrano J, Fujioka-Kobayashi M, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, Miron RJ. Pre-coating deproteinized bovine bone mineral (DBBM) with bone-conditioned medium (BCM) improves osteoblast migration, adhesion, and differentiation in vitro. *Clin Oral Clinical Oral Investigations;* 2016;20(9):2507–13.

143. Jin Z, Feng Y, Liu H. Conditioned media from differentiating craniofacial bone marrow stromal cells influence mineralization and proliferation in periodontal ligament stem cells. *Hum Cell. Springer Japan*; 2016;29(4):162–75.
144. Katagiri W, Osugi M, Kawai T, Hibi H. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells. *Head Face Med* 2016;12:5.
145. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int* 2014;2014.
146. Costa C, Assunç RC, Anjo SI, Manadas B, Gimble JM, Behie LA, et al. Biochimie Influence of passage number on the impact of the secretome of adipose tissue stem cells on neural survival , neurodifferentiation and axonal growth. *Biochimie*. 2018;155:119–28.
147. Boomsma RA, Geenen DL. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* 2012;7:e35685.
148. Skalnikova HK. Biochimie Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie. Elsevier Masson SAS*; 2013;95(12):2196–211.
149. Maffioli E, Nonnis S, Angioni R, Santagata F, Cali B, Zanotti L, et al. Proteomic analysis of the secretome of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells primed by pro-inflammatory cytokines. *J Proteomics*. 2017;166:115–26.
150. Mukherjee P, Mania S Methodologies to decipher the cell secretome *Biochim Biophys Acta*. 2013 November ; 1834(11): 2226–2232. doi:10.1016/j.bbapap.2013.01.022.
151. Janmey PA, Winer JP, Weisel JW. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J R Soc Interface*. 2009;6(January):1–10.
152. Weisel, J. W. Fibrinogen and fibrin. *Adv. Protein Chem*. 2005 ;70: 247–299.
153. Falvo MR, Gorkun O V, Lord ST. Biophysical Chemistry The molecular origins of the mechanical properties of fibrin. *Biophys Chem [Internet]. Elsevier B.V.*; 2010;152(1–3):15–20.

154. Brown AC, Barker TH. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level Ashley. *Acta Biomater.* 2014;10(4):1502–14.
155. Doolittle R F, Kollman J M, Natively unfolded regions of the vertebrate fibrinogen molecule, *Proteins* 2006; 63 (2) 391–397.
156. Weisel, J. W. a Structure of fibrin: impact on clot stability. *J. Thromb. Haemost.* 2007; 5(Suppl. 1), 116–124.
157. Wolberg AS. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Reviews.* 2007; 21:131–42.
158. Mossesson, M.W., DiOrio, J.P., Muller, M.F., Shainoff, J.R., Siebenlist, K.R., Amrani, D.L., Homandberg, G.A., Soria, J., Soria, C. and Samama, M. *Blood* 1987; 69: 1073-1081.
159. Robson SC, Shephard EG, Kirsch RE. Fibrin degradation product D-dimer induces the synthesis and release of biologically active IL-1 beta, IL-6 and plasminogen activator inhibitors from monocytes in vitro. *Br J Haematol.* 1994; 86:322–6.
160. Blinc A, Magdic J, Fric J, Musevic I. Atomic force microscopy of fibrin networks and plasma clots during fibrinolysis. *Fibrinolysis and Proteolysis.* 2000;14(5):288–99.
161. Kim B, Sung H, You H, Lee J. Effects of fibrinogen concentration on fibrin glue and bone powder scaffolds in bone regeneration. *J Biosci Bioeng Ltd;* 2014;118(4):469–75.
162. Weisel, J. W. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys.Chem.* 2004; 112, 267–276.
163. Litvinov RI, Weisel JW. Fibrin mechanical properties and their structural origins. *Matrix Biol B.V.;* 2017;60–61:110–23.
164. Janmey, P. A., Amis, E. & Ferry, J. Rheology of fibrin clots. VI. Stress relaxation, creep and differential dynamic modulus of fine clots in large shearing deformations. *J. Rheol.* 1983; 27, 135–153.
165. Brown AE, Litvinov RI, Discher DE, Purohit PK, Weisel JW. Multiscale mechanics of fibrin polymer: gel stretching with protein unfolding and loss of water. *Science* 2009; 325: 741-e4.

166. Rowe, S.L., Lee, S., and Stegmann, J.P. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomater.* 2007; 3; 59.
167. Xie J, Peng C, Zhao Q, Wang X, Yuan H, Yang L, et al. Osteogenic differentiation and bone regeneration of iPSC-MSCs supported by a biomimetic nanofibrous scaffold. *Acta Materialia Inc.*; 2016;29:365–79.
168. Gaßling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Jorg W. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(1):48–55.
169. Radosevich, M., Goubran, H.A., Burnouf, T(1997) Fibrin Sealant: Scientific Rationale , Production Methods , Properties , and Current Clinical Use. *Vox Sang* 72:133–43.
170. Orsi PR, Landim-Alvarenga FC, Justulin LA, Kaneno R, De Assis Golim M, Dos Santos DC, et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–14.
171. Frauz K, Teodoro LFR, Carneiro GD, Cristina F, Ferrucci DL, Bombeiro L, et al. Transected Tendon Treated with a New Fibrin Sealant Alone or Associated with Adipose-Derived Stem Cells. *Cells.* 2019;8(56):1–26.
172. Ferraro GC, Moraes JRE , Pereira GT, Moraes FR, Bueno de Camargo MH. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived of fibrin glue tendon healing in dogs. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* 2005;11:433–446.
173. Rahal SC, Amaral MSP, Pai VD, Barraviera SRCS, Caporal EHG, Crocci AJ. Effect of fibrin glue derived from snake venom on the viability of autogenous split-thickness skin graft. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2004; 10: 161-72.
174. Bagot DM, Daculsi G Micro macroporous biphasic ceramics and fibrin sealant as a moldable material for bone reconstruction in chronic otitis media surgery. A 15 years experience. *J Mater Sci Mater Med.* 2003 Mar;14(3): 229-33.

175. Shiu HT, Goss B, Lutton C, Crawford R, Xiao Y. Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(6):697–712.
176. Puente P de la, Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res;* 2013;322(1):1–11.
177. Kim B-S, Kim H-J, Choi J-G, You H-K, Lee J. The effects of fibrinogen concentration on fibrin/attelocollagen composite gel: an in vitro and in vivo study in rabbit calvarial bone defect. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 17: 1–7.
178. Rowe SL, Lee S, Stegemann JP. Influence of thrombin concentration on the mechanical and morphological properties of cell-seeded fibrin hydrogels. *Acta Biomater* 2007;3:59–67.
179. Bluteau G, Pilet P, Bourges X, et al. The modulation of gene expression in osteoblasts by thrombin coated on biphasic calcium phosphate ceramic. *Biomaterials.* 2006;27(15):2934–2943
180. Kim BS, Lee J. Enhanced bone healing by improved fibrin-clot formation via fibrinogen adsorption on biphasic calcium phosphate granules. *Clin Oral Implants Res.* 2014;26(10):1203–1210
181. Maciel J, Oliveira MI, Colton E, et al. Adsorbed fibrinogen enhances production of bone- and angiogenic-related factors by monocytes/macrophages. *Tissue Eng Part A.* 2013;20(1–2):250–263
182. Linsley C, Wu B, Tawil B. The effect of fibrinogen, collagen type I, and fibronectin on mesenchymal stem cell growth and differentiation into osteoblasts. *Tissue Eng Part A.* 2013;19(11–12):1416–1423.
183. Colley H, McArthur SL, Stolzing A, Scutt A. Culture on fibrin matrices maintains the colony-forming capacity and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater.* 2012;7(4):045015
184. Guéhennec L Le, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cells Mater Vol.* 2004;8:1–11.
185. Ahmann KA, Weinbaum JS, Ph D, Johnson SL, Tranquillo RT. Fibrin Degradation Enhances Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Matrix Deposition in Fibrin-Based Tissue Constructs Fabricated In Vitro. *TISSUE Eng A.* 2010;16

186. Charo, IF, Bekeart, LS, Phillips DR Platelet glyco- protein IIb-IIIa-like proteins mediate endothelial cell at- tachment to adhesive proteins and the extracellular matrix. *J Biol Chem* 1987;262: 993-5,
187. Breen A, Ph D, Brien TO, Ch B, Pandit A. Fibrin as a Delivery System for Therapeutic Drugs and Biomolecules. *TISSUE Eng B*. 2009;15(2).
188. Post MJ, Laham R,. Sellke FW. Simons M, Therapeutic angiogenesis in cardiology using protein formulations, *Cardiovasc. Res*. 2001;49 :522–531.
189. Gaßling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Jorg W. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. Mosby, Inc.; 2009;108(1):48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.02.007>
190. Spicer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a drug delivery system. *J Control Release*. 2010;148(1):49–55.
191. Sahni, O.D. Altland, C.W. Francis, FGF-2 but not FGF-1 binds fibrin and supports prolonged endothelial cell growth, *J. Thromb. Haemost*. 2003; 1(6) : 1304–1310.
192. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 2006 Mar;101(3):e56-60.
193. Sonmez AB, Castelnuovo J. Applications of basic fibroblastic growth factor (FGF-2, bFGF) in dentistry, *Dent. Traumatol*. 2014; 30 (2): 107–111.
- 194 Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost* 2003; 89; 573
195. Mittermayr R, et al., Skin graft fixation by slow clotting fibrin sealant applied as a thin layer. *Burns* 2006;32 (3):305–311.
196. Rajangam T, An SS, Fibrinogen and fibrin based micro and nano scaffolds incorporated with drugs, proteins, cells and genes for therapeutic biomedical applications, *Int. J. Nanomedicine*. 2013; 8: 3641–3662.
197. Zhou W, Zhao M, Zhao Y, Mou Y, A fibrin gel loaded with chitosan nanoparticles for local delivery of rhEGF: Preparation and in vitro release studies, *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 2011; 22: 1221–1230.

198. Odrliin TM, et al. Heparin-binding domain offibrin mediates its binding to endo- thelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996; 16(12): 1544–1551.
199. Bhang SH, et al., Controlled release of nerve growth factor from fibrin gel, *J. Biomed. Mater. Res. A* 2007;80 (4): 998–1002.
200. Redl H, et al., In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics, *Biomaterials* 1983; 4 (1): 29–32.
201. Tredwell S, et al., Use of fibrin sealants for the localized, controlled release of cefazolin, *Can. J. Surg.* 49 (5) (2006) 347–352.
202. Greco F, et al., Fibrin-antibiotic mixtures: an in vitro study assessing the possibility of using a biologic carrier for local *drug delivery*, *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25 (1) 39–51.
203. Woolverton CJ, et al., Subverting bacterial resistance using high dose, low solubil- ity antibiotics in fibrin, *Infection.* 1999;27 (1): 28–33.
204. Yang HS, La WG, Cho YM, Shin W, Yeo GD, Kim BS, Comparison between heparin-conjugated fibrin and collagen sponge as bone morphogenetic protein-2 carriers for bone regeneration, *Exp. Mol. Med.* 2012. 44: 350–355.
205. Oh JH, Kim HJ, Kim TI, Woo KM, Comparative evaluation of the biological prop- erties of fibrin for bone regeneration, *BMB Rep.* 2014;47:110–114.
206. Zhibo X, Miaobo Z, Effect of sustained-release lidocaine on reduction of pain after subpectoral breast augmentation, *Aesthet. Surg. J.* 2009 ;29 (1): 32–34.
207. Christman KL, Fok HH, Sievers RE, Fang Q, Lee RJ, Fibrin glue alone and skeletal myoblasts in a fibrin scaffold preserve cardiac function after myocardial infarction, *Tissue Eng.* 2004;10: 403–409.
208. Chiu CL, Hecht V, Duong H, Wu B, Tawil B. Permeability of Three-Dimensional Fibrin Constructs Corresponds to Fibrinogen and Thrombin Concentrations. *BioResearch.* 2012;1(1):34–40.

209. McCoy RJ, Jungreuthmayer C, Brien FJO. Influence of Flow Rate and Scaffold Pore Size on Cell Behavior During Mechanical Stimulation in a Flow Perfusion Bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. 2013;109(6):1583–94.
210. Wu X, Ren J, Li J. Fibrin glue as the cell-delivery vehicle for mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Cytotherapy*. 2012;14(5):555–62.
211. Srouji S, Lotan R, Riminucci M, Livne E, Bianco P. The innate osteogenic potential of the maxillary sinus (Schneiderian) membrane : an ectopic tissue transplant model simulating sinus lifting. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. International Association of Oral and Maxillofacial Surgery; 2010;39(8):793–801.
212. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, et al. Experimental Use of Fibrin Glue to Induce Site-Directed Osteogenesis from Cultured Periosteal Cells. *Plast Reconstr SURGERY*,. 2000;105(3):953–63.
213. Uniform Requeriments for Manuscripts submitted to Biomedical Journals (International Comitte of Medical Journals Editors, 1993) [citado 2019 fev 20]. Acessado em: URL: <http://www.icmje.org>

Capítulo 2.
Original Article

**Biopolímero de fibrina como *scaffold* para células-tronco e secretomas
na formação *de novo* osso**

Resumo

A reconstrução óssea ainda é um desafio em casos de traumas, onde grandes quantidades de enxertos são necessárias e atualmente nenhum substituto ósseo é totalmente eficaz. A bioengenharia procura associar células, fatores de crescimento e arcabouços, como Biopolímeros de Fibrina (BF) para promover a recuperação óssea. O objetivo deste trabalho foi avaliar o BF derivado de peçonha de serpente como *drug delivery system* e compará-lo com diferentes tipos celulares na formação de osso novo na calota de ratos, também objetivou observar a interação do BF com as células *in vitro* e *in vivo*. Foram realizados defeitos críticos em crânio de ratos com 8 mm de diâmetro e avaliados aos 14 e 54 dias. Os grupos experimentais foram BF+ESC (células embrionárias Humanas); BF+MSC (células-tronco mesenquimais de ratos); BF+BMSC (células-tronco mesenquimais de ratos diferenciadas); BF+Meio ESC (ESC); BF+Meio BMSC (CM proveniente das BMSC); BF; e Controle (nenhum tratamento). Os resultados foram avaliados por tomografia computadorizada, análise histomorfométrica e microscopia eletrônica. A tomografia demonstrou pouca mineralização e um adelgaçamento das amostras aos 54 dias. A morfometria demonstrou que o grupo BF+ESC proporcionou melhor formação óssea (46,36%), seguido pelos grupos BF+MSC (37,64%) e BF+Meio BMSC (37,82%). O grupo BF+Meio ESC também demonstrou bons resultados (28,58%) e potencial terapêutico comparado com o controle (16,62%). Os grupos BF e BMSC apresentaram, a menor formação óssea (19,82% e 18,89% respectivamente) no período. A microscopia eletrônica demonstrou as MSC com aspecto de

vitalidade e interação com o BF aos 14dpi. Este estudo demonstrou que o BF é um scaffold promissor para *drug delivery systems* obtendo resultados semelhantes às células na formação óssea, além de observar as células foram mantidas com vitalidade aos 14 dpi *in vivo*. Também foi observado que a capacidade proliferativa da célula influenciou a formação óssea.

Palavras-chave: Secretoma, Géis de fibrina, Células tronco embrionárias, células-tronco mesenquimais, bioengenharia óssea.

ABSTRACT

Bone reconstruction is still a challenge in cases of trauma when a lot of graft material is needed because no bone substitute is flawless. Bioengineering seeks to associate cells, growth factors, and scaffolds, such as Fibrin Biopolymers (BF) to promote bone recovery. This study evaluate the bone formation with BF derived from snake venom as drug delivery of conditioned media from two cell types and as scaffold for different cells types in rat critical calvariam. Critical defects were performed with a 8 mm diameter and evaluated after 14 and 54 days. The experimental groups were BF + ESC (Human embryonic cells); BF + MSC (rat mesenchymal stem cells); BF + BMSC (differentiated rat mesenchymal stem cells); BF + Mean ESC (ESC); BF + BMSC medium (CM from BMSC); BF; and Control (no treatment). The results were evaluated by computed tomography, histomorphometric analysis and electron microscopy. The tomography showed little mineralization and thinning of the samples at 54 days. Morphometry showed that the BF + ESC group provided better bone formation (46.36%), followed by BF + MSC (37.64%) and BF + BMSC medium (37.82%). The BF + ESC group also showed good results (28.58%) and therapeutic potential compared to control (16.62%). The BF and BMSC groups had the lowest bone formation (19.82% and 18.89%, respectively. Electron microscopy demonstrated MSCs with vitality and BF interaction at 14 dpi. This study evidenced the repair potential of conditioned cell media and also stem cells in bone formation.

Key words: Secretome, Fibrin Gels, Embryonic Stem Cell, Mesenchymal Stem cell, bone tissue engeneering.

1) INTRODUÇÃO

O tecido ósseo em condições ideais tem a capacidade de se regenerar, refazendo a estrutura perdida à semelhança da nova ¹. Entretanto muitas fraturas e tumores resultam em defeitos denominados críticos que não permitem ao corpo sua regeneração ^{2, 3}. Estima-se que nos EUA sejam gastos 2,5 bilhões de dólares anualmente em pacientes vítimas de fraturas ósseas ⁴. As fraturas mandibulares por exemplo são mais comuns em homens jovens que são vítimas de violência. Há necessidade de hospitalização e intervenção cirúrgica em mais da metade dos casos ⁵.

Para reparação destes defeitos o enxerto ósseo autógeno é considerado o padrão ouro, mas na maioria das vezes necessita de área doadora, o que leva à morbidade no local ⁶. Como possíveis substitutos ao seu uso, diversos biomateriais já estão comercialmente disponíveis.

Atualmente, muitas das técnicas de regeneração óssea têm resultados satisfatórios. Entretanto, há sempre limitações pois não temos disponível um material que mimetize as características físico-químicas do osso com perfeição ⁷.

A regeneração do tecido necessita de células indutoras, um arcabouço biocompatível e fatores de crescimento para promover a diferenciação celular^{8, 9}. Neste conceito de bioengenharia, as células-tronco mesenquimais (MSCs) tem se mostrado uma alternativa promissora pois possuem a característica de se replicarem ou se diferenciarem nas linhagens de músculo, gordura, osso ou cartilagem, além de realizar sinalização celular no local onde são implantadas ¹⁰.

Existem ainda poucas evidências de sobrevivência das células por um longo período de tempo no hospedeiro e uma quantidade muito grande delas são necessárias para uma efetividade clínica. Atualmente credita-se o efeito regenerador das MSC aos mediadores químicos secretados localmente^{11,12,13}. Além disso, as MSC também possuem um alto custo operacional, pois necessitam de profissionais especializados para sua produção e manutenção, além do risco de formar teratomas nos pacientes¹⁴.

As células embrionárias pluripotentes (ESC) são células isoladas da massa interna do blastocisto^{15, 16}, e representam uma fonte abundante de osteoblastos que são essenciais na formação óssea. Estas células têm a capacidade de se auto renovar e se diferenciar em qualquer tecido do corpo humano, sendo assim, potencialmente melhores que qualquer outro tipo celular¹⁷. Entretanto esta alta capacidade proliferativa aumenta o risco da formação de tumores, o que levou os autores a diferenciá-las na linhagem osteoblástica antes de sua implantação^{18, 19}.

As durante o cultivo produzem muitos fatores de crescimento e quimiotáticos capazes de influenciar na reparação tecidual. Estes fatores podem ser aproveitados e enxertados no sítio de interesse, recrutando as MSC do organismo e auxiliando na reparação²⁰. O Meio condicionado (MC) foi eficaz na formação óssea associado com agarose, mas outros scaffolds podem ser usados para este fim. Entretanto o CM ainda não foi testado com BFs.

Biopolímeros de fibrina (BF) possuem enorme potencial como biomaterial cirúrgico para carrear células e substâncias bioativas pois podem ser alterados mudando suas características mecânicas estruturais e seu

tempo de degradação, para melhorar as propriedades em cada situação cirúrgica ²¹. Além da homeostase ²², desempenham outros papéis fundamentais como: promover a adesão ²³, proliferação e migração celular^{24,25}, além de se ligar e liberar a fatores de crescimento durante a cicatrização ^{26, 27, 28}.

Este trabalho avaliou capacidade do BF como *drug delivery* do meio de cultura condicionado pelas células ESC e pelas MSC diferenciadas formarem osso em calotas de ratos. Também avaliou o potencial de formação de novo osso em defeito crítico em calota óssea de ratos com células tronco embrionárias, MSC e MSC diferenciadas na linhagem osteogênica associadas ao biopolímero de fibrina derivado de peçonha de serpente.

2) MATERIAL E MÉTODOS

2.1) Obtenção do BF

O BF derivado de veneno de serpente foi gentilmente cedido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (CEVAP), cujos componentes e fórmula de aplicação constam das suas patentes (Números do registro: BR1020140114327 e BR1020140114360). No momento do uso os componentes foram previamente descongelados, reconstituídos, misturados e aplicados de acordo com o protocolo do presente projeto estabelecido.

Todos os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com o comitê de ética no uso de animais e foram submetidos e aprovados sob o protocolo FMB-PE-1 2015 CEUA1117 (Anexo A). Com as alterações do projeto, foi escolhido um novo título e as mudanças devidamente cadastradas na comissão de ética no uso de animais (Anexo B e C).

2.2) Obtenção das células-tronco mesenquimais a partir da medula óssea de ratos

2.2.1) Coleta das MSCs

As células-tronco mesenquimais utilizadas foram retiradas dos animais e desenvolvidas como uma cultura primária. Foram coletadas da medula óssea de cinco ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 21 dias de vida, obtidos do Biotério do Laboratório Experimental da UNESP e eutanasiados com uma sobre dose de xilazina e ketamina. A coleta proveniente da medula óssea

dos fêmures e tíbias foi realizada pela fratura das respectivas epífises e posicionadas dentro de uma ponta de pipeta de 1 mL inserida no interior de um tubo cônico e centrifugado a 340G por 10 minutos com meio de cultura. O pellet celular depositado no tubo cônico foi homogeneizado com meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle[®] Medium) e plaqueadas em garrafas de cultivo celular de 25 cm², com 5 mL de meio DMEM alta glicose, L-glutamina e 10% de SFB (soro fetal bovino) contendo penicilina, estreptomicina e anfotericina-B.

As células atingiram confluência aos 7 dias, foram tripsinizadas e transferidas para novos frascos até a quinta passagem quando foram utilizadas.

2.2.2) Linhagem adipogênica

As células-tronco mesenquimais foram avaliadas quanto a capacidade de diferenciação osteogênica e adipogênica. Para a diferenciação adipogênica foi utilizado o Kit StemPro Adipogenesis Differentiation[®] – InvitrogenXIII; e para a diferenciação osteogênica foi utilizado o Kit StemPro Osteogenesis Differentiation[®] – InvitrogenXV. O protocolo empregado seguiu as orientações dos fabricantes.

Assim que as células de primeira passagem atingiram a confluência, foram semeadas em placas de 6 poços e seu meio substituído pelo meio de diferenciação adipogênico. O meio indutor foi trocado a cada 3 dias até sua diferenciação. As células foram avaliadas por microscopia ótica ¹⁶.

2.3.3) Linhagem osteogênica

As MSC provenientes dos frascos de cultivo celular de primeira passagem foram ressuspensas e transferidas para placa de 6 poços contendo meio completo e cultivadas em estufa até que atingissem 80% de confluência antes de iniciar a diferenciação.

Quando a cultura atingiu a confluência esperada, o meio completo foi trocado pelo kit de diferenciação específico contendo 90% de StemPro Osteocyte/Chondrocyte Differentiation Basal Medium, 10% de StemPro Osteogenesis Supplement, penicilina/estreptomicina 100 µg/mL e 20 Anfotericina B 3 µg/mL.

O Indutor foi trocado a cada 3 dias durante 10 dias. Após este procedimento, as células foram fixadas em álcool 70%, lavadas com água destilada e em seguida adicionado 2 mL de Alizarin Red. As células foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e removido o corante, lavou-se 4 vezes com água e os campos foram observados com auxílio de microscópio óptico de luz invertida.

Este procedimento foi utilizado para a caracterização das células bem como a sua utilização no grupo BMSC ²⁹.

2.3.4) Caracterização celular por citometria de fluxo

As células foram ressuspensas na concentração de 1×10^6 cel/mL, e desta suspensão amostra de 1×10^5 cel/mL para cada teste realizado. Foi utilizando os marcadores positivos: CD90/Thy1, ICAM1, CD44 e CD 73 e marcadores negativos Cb11b, NHC-CLASS II CD34, CD45, também foi realizado controle só célula e controle secundário Alexa flúor 488 com CD73.

Os anticorpos foram adicionados em diluição de 1:10 e aguardam 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram lidos no Citômetro de Fluxo FACS Calibur BD[®] - Hemocentro da Faculdade de Medicina de Botucatu – SP.

2.3) Cultura das Células Embrionárias

Células tronco embrionárias humanas, da linhagem CCTL12 foram fornecidas pelo Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, da Universidade Estadual de Campinas, em parceria com o Prof. Dr. Sergiy Kyrylenko da Universidade de Masaryk em Brno, República Tcheca e cultivadas em nosso laboratório, utilizando placas de cultura celular com 6 poços (TPP[®] - Código 92406), recobertas com Matrigel[®] (Corning[®] - Código 354277), uma matriz extracelular eficaz para a ancoragem desse tipo celular, uma vez que o mesmo não se adere diretamente ao plástico e/ou vidro. O meio de cultura utilizado foi o mTeSR[™]1 (STEMCELL Technologies[™]; Catálogo 85850), altamente específico para células embrionárias humanas, sem qualquer suplemento adicional.

Em resumo, as células foram mantidas a 37°C, em atmosfera constituída de 5% de CO₂, e umidade relativa de 90%. O meio foi trocado a cada 48h e em poucos dias já foi possível observar confluência total (80% confluyente). Nesse estágio, faz-se necessário o repique das células para uma nova placa (para o uso, é necessário repicar as células pelo menos uma vez, para garantir que as mesmas estão metabolicamente viáveis). Para isso, foi utilizado TrypLE[™] Express (GIBCO[®] by Life Technologies; Catálogo 12605-028), enzimas de dissociação de células recombinantes que substituem a

tripsina porcina, incubado às células durante 3 minutos e posteriormente bloqueado com a adição do próprio meio de cultura. A solução TrypLE™ Express, meio e células foi coletada e centrifugada à 200g, durante 3 minutos, em temperatura ambiente. As células decantadas foram ressuspendidas com meio mTeSR™1 e o número de células foi estimado utilizando-se câmara de Newbaver e aproximadamente $2,5 \times 10^4$ selecionadas para aplicação nos animais.

2.4) Coleta do meio de cultivo condicionado

O meio de cultivo foi preparado segundo Osugi *et al.*, em 2012¹⁴. Quando as células ESC e MSC diferenciadas em linhagem osteogênica atingiram mais de 80% de confluência o meio foi trocado e as células cultivadas por mais 48 horas. Este meio foi filtrado e estocado em freezer (-23 °C) para seu uso no ato da cirurgia.

2.5) Delineamento experimental

Foram utilizados 74 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos adultos, obtidos do Biotério Central da UNESP-Botucatu, ao desmame foram transferidos para o biotério de experimentação da UNIPEX quando aguardaram a maturidade. Os animais utilizados eram convencionais para mimetizar a diferenças que ocorrem entre os seres humanos de variabilidade nos resultados.

Os animais foram divididos em sete grupos descritos a seguir e na Tabela 1.

- **Grupo BF-** Foram usados 12 animais tratados apenas com BF no defeito
- **Grupo MSC-** Foram usados 12 animais tratados com MSCs e BF.
- **Grupo BMSC-** Foram usados 10 animais tratados com MSC diferenciadas na linhagem osteogênica em BF.
- **Grupo ESC-** Foram usados 12 animais tratados com células-tronco embrionárias em BF.
- **Grupo Meio ESC (M ESC)-** Foram usados 12 animais tratados com BF e meio de cultivo condicionado em células ESC.
- **Grupo Meio BMSC (M BMSC)-** Foram usados 10 animais tratados biopolímero de fibrina e meio de cultura condicionado em células-tronco mesenquimais diferenciadas na linhagem osteogênica.
- **Grupo Controle** - Foram usados 6 animais nos quais não foi realizado nenhum tratamento e o defeito cicatrizou espontaneamente.

Cada animal (exceto grupo controle) foi tratado com 300 µL de biopolímero de fibrina a saber: 150 µL de crioprecipitado, 90 µL de Cloreto de Ca⁺ e 60 µL de serinoprotease. O BF foi alíquotado e descongelado aproximadamente 30 minutos antes da sua inserção, pois quando descongelado por muito tempo começa a perder sua capacidade de formar o gel. As células foram contadas com ajuda da câmara de Neubauer e marcação com azul de Tripán (Alamar Tecno-científica Ltda) e aliqüotadas em $2,5 \times 10^5$ unidades cada amostra. O CM foi descongelado

aproximadamente 30 minutos antes de seu uso. Alíquotas de 120 µL foram acrescentadas aos crioprecipitados e homogeneizados antes da manipulação do BF.

Tabela 1. Número de animais presentes em cada grupo experimental e análises realizadas nos dias pós-intervenção (dpi).

14 dpi	54 dpi
Grupo BF. n = 6	Grupo BF. n = 6
Grupo MSC. n= 6	Grupo MSC. n= 6
Grupo BMSC. n= 5	Grupo BMSC. n= 5
Grupo ESC. n=6	Grupo ESC. n=6
Grupo M ESC. n= 6	Grupo M ESC- n= 6
Grupo M BMSC. n = 5	Grupo M BMSC n = 5
Grupo Controle n=3	Grupo Controle n=3
Histomorfometria Tomografia MET e MEV	Histomorfometria Tomografia

2.5.1) Procedimento cirúrgico

Os animais foram operados com 8 semanas de vida, pesando aproximadamente 400 g. Os animais foram acondicionados em gaiolas com monitoramento de luz e umidade com alimentação *ad libitum*.

Os animais foram pesados e submetidos à anestesia inalatória, realizado por vaporizador universal com Isoflurano a 3%, (Takaoka® UNIPLEX – FMB – UNESP/Botucatu), protocolo de anestesia injetável com 0,2mL de

ketamina e 0,2 mL de xylazina, 0,2mL /100g peso corpóreo, para que se mantivessem imóveis durante o período da cirurgia.

Após aprofundamento do plano anestésico, os animais foram colocados sobre um campo operatório esterilizado, a região fronto-parietal foi tricotomizada e degermada com clorexidina alcoólica 2%. Foi realizada uma incisão semilunar, seguida de retalho total com o auxílio de descolador do tipo Molt e cinzel de Ochsenbein nº 1, expondo a cortical óssea da região interparietal. Com uma broca trefina cirúrgica de 8 mm de diâmetro, sob irrigação abundante com solução fisiológica, foi realizada uma osteotomia bicortical e remoção da estrutura óssea parietal caracterizando um defeito crítico ¹⁸ (Anexo D fig.1A). Este procedimento foi realizado com cuidado para evitar lesões na dura-máter ou no encéfalo (Anexo D fig.1B). Posteriormente os defeitos críticos foram preenchidos com uma das modalidades terapêuticas descritas e o retalho reposicionado e suturado em seguida, com fio de nylon 4.0.

A analgesia foi realizada com dipirona sódica diluída na água, por ser um fármaco sem ação anti-inflamatória, não alterando assim os resultados a serem analisados no presente estudo. Os ratos foram mantidos em gaiolas individuais com ração peletizadas e água *ad libitum*, com acompanhamento veterinário durante o período pós-operatório.

A eutanásia foi realizada com sobre dose anestésica nos tempos experimentais de 14 e 54 dias pós-cirúrgico (dpi).

2.5.2) Microscopia

Após 14 e 54 dias os animais foram eutanasiados utilizando-se de aprofundamento anestésico, utilizando uma sobre dose de xilazina e ketamina. A região do crânio eleita para o defeito foi separada do corpo do animal, a pele delicadamente removida para evitar lesionar a ferida cirúrgica. Uma pequena amostra da porção periférica lateral do defeito foi incisada e removida delicadamente, armazenada em criotubos e emergida imediatamente em nitrogênio líquido, após 3 horas colocadas em freezer - 80°C. As amostras foram estocadas até sua posterior análise.

As calotas cranianas removidas foram fixadas em formalina tamponado a 10%, durante 48 horas, lavados em água corrente por 24 horas e imersos em álcool 70%. Neste momento foram realizadas as tomadas radiográficas com tomógrafo iCat. A desmineralização foi feita com EDTA durante 45 dias realizando três trocas semanais. As peças foram então desidratadas em sequência de álcool até o 100%. Concluída a desidratação, as amostras foram diafanizadas em xilol por 30 minutos e mergulhadas em novo xilol por mais 30 minutos.

As peças foram seccionadas longitudinalmente na região central e cortadas com micrótomo na espessura de 5 µm e coradas com Hematoxilina Eosina (HE) e Tricrômio de Masson para avaliação óssea.

2.5.3) Histomorfometria

Cada amostra foi fotografada (Câmera dfc 295) com auxílio do software Leica Application Suite 4.2 no microscópio de luz convencional

(LEICA dm 4000 b led) com na objetiva de 5x (50x de aumento) em formato tiff para melhor resolução. Com auxílio do software ImageJ[®] (1.52e) as amostras foram avaliadas quanto a presença de osso novo e biopolímero de fibrina presentes nas imagens.

As áreas demarcadas foram quantificadas pela mensuração do software (quantidades de pixels), e a área total do defeito foi calculada na mesma unidade (altura do defeito x largura do defeito). A divisão da área demarcada pela área total gerou a porcentagem de cada amostra. (ANEXO D fig. 2) As lâminas de HE e Tricrômio Masson foram avaliadas simultaneamente para melhor precisão. As mensurações foram realizadas em cada quadrante do defeito.

2.5.4) Tomografia computadorizada

Todos os animais após eutanásia foram submetidos a tomografia computadorizada cone beam (iCat[®]) na programação *high resolution* com cortes de 0,2 mm, para avaliar a imagem do defeito ósseo. Com a utilização do software (Shoran[®]), foram calculadas a densidade do enxerto na escala de Hounsfield (HU), em cortes axiais com profundidade de 2,6 mm nas regiões lateral, anterior e posterior do defeito ósseo.

2.6) Microscopia eletrônica de varredura

A fim de avaliar as amostras do BF e as células-tronco mesenquimais de ratos quanto a sua forma, contorno e topografia de sua superfície foi

utilizada a microscopia eletrônica de varredura. As MSC foram avaliadas em dois momentos, imediatamente após a mistura e após 72 horas (3 dias) de cultivo no BF. Com a finalidade de observar a presença do BF nos animais e a morfologia celular das MSCs, um animal do grupo MSC foi eutanasiado aos 14 dias, e o conjuntivo na região do defeito seccionado para MEV e MET.

As amostras foram fixadas em fixador de Karnovsky, referente à solução de paraformaldeído 1%, glutaraldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,1M com pH 7,3 por 24h. Foram então desidratadas em álcool absoluto e secadas em ponto crítico. Após a secagem foram montados em stubs para avaliação em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL – JSM5800LV, com voltagem de 10 kV e documentadas por fotografia digital no próprio aparelho. Este processamento foi realizado pelo laboratório de microscopia eletrônica do IB-UNESP Botucatu.

2.7) Microscopia eletrônica de transmissão

Para avaliar a microestrutura celular das células durante o processo de cicatrização no grupo MSC, um animal foi eutanasiado aos 14 dias. O mesmo animal foi utilizado para o MEV. Uma região central de aproximadamente 1 mm de diâmetro e 3 mm de altura do defeito foi seccionada para observação no MET. A amostra foi fixada em glutaraldeído e processada pelo laboratório de microscopia eletrônica do IB-UNESP Botucatu.

2.8) Avaliação estatística

Inicialmente foi realizada um Teste de Normalidade dos dados e verificou-se que a variável formação óssea apresentou uma distribuição assimétrica dos dados. Deste modo, foi ajustado um modelo linear generalizado com distribuição Gama para comparação dos grupos. Considerou-se $p < 0,05$ como nível de significância. O programa utilizado para realizar as análises foi o SAS, versão 9.

3) RESULTADOS

Não houve nenhuma morte acidental durante o período de estudo. As intercorrências observadas foram sangramento e deiscência parcial da ferida em alguns ratos. No grupo MSC houve maior incidência de inflamação nos 14 dpi (Anexo D Fig. 3). O sangramento foi resolvido com a aplicação do BF.

A quantidade de BF utilizado foi aquela suficiente para cobrir o defeito crítico de 8 mm na calota e ter um sobre contorno de aproximadamente 1 a 2 mm.

3.1) Isolamento e caracterização das células–tronco mesenquimais

As células retiradas dos fêmures de ratos apresentaram aderência ao plástico e morfologia fibroblastoide típica de MSC. Atingiram a confluência (maior que 80%) a cada duas semanas aproximadamente e foram utilizadas na quinta passagem. Ao atingirem a confluência foram tripsinizadas, contadas e utilizadas na quantidade de 250000 unidades por animal. (Anexo D fig. 4)

3.1.1) Citometria de fluxo

Os resultados provenientes da citometria de fluxo revelaram-se com baixa marcação para os marcadores negativos, a saber, CD45 com 2,8%, CD34 com 3%, CD 105 com 1,94% e CD11b com 4,65%. Apresentaram alta

marcação para os marcadores positivos(ICMAM1, 95,8% e CD 90, 87,79%).
(Anexo D Fig.5)

3.1.2) Diferenciação e marcação para linhagem osteogênica e adipogênica

Para avaliar a capacidade das MSC em se diferenciar nas linhagem adipogênica, condrogênica e osteogênica as células foram submetidas a diferentes meios de diferenciação.

Na linhagem adipogênica, observou-se que após 7 dias em meio de cultivo específico ficou aparente a presença de vacúolos ricos em lipídeos no interior das células. O cultivo foi fixado por Oil Red-O solution (Anexo D Fig. 6).

Para linhagem Osteogênica, com 10 dias de indução com meio específico, as MSC iniciaram a deposição de cálcio, confirmado pelo corante Alizarin Res (Fig. 13B) .

3.1.3) Descongelamento e desenvolvimento das ESC

As ESC foram descongeladas e se desenvolveram com grande rapidez (Anexo D fig.7). A troca de meio foi feita a cada 2 dias, pois havia uma alteração de cor acentuada sugerindo sua acidificação. No final um frasco cultura celular de 25ml possuía aproximadamente 7×10^6 células, valor muito maior que as MSC de rato. Outro fato curioso, ao serem alíquotadas em apenas algumas horas foi observado a mudança de cor no meio

sugerindo alta proliferação. Estas células foram adquiridas com a linhagem selecionadas, logo nenhuma caracterização foi realizada.

3.2) Histologia

3.2.1) Pós operatório de 14 dias

O grupo controle apresentou discreta formação óssea nas regiões periféricas do enxerto próximo ao remanescente ósseo. Na região central havia um tecido conjuntivo vascularizado com discreto infiltrado inflamatório, apresentando majoritariamente macrófagos (fig. 2A). O tecido conjuntivo é mais denso na região superficial mais frouxo próximo a dura mater. No grupo BF observou-se características semelhantes ao grupo controle com maior celularidade e infiltrado inflamatório. Foi observado um material amorfo e eosinófilo na região central da ferida sugestivo de BF (fig. 2B).

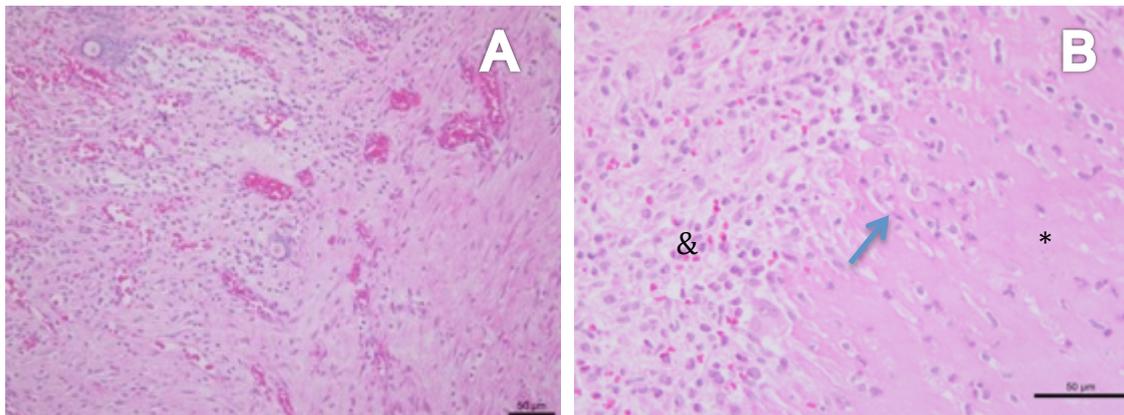


Fig. 1. Grupo BF A) Presença de infiltrado inflamatório e grande celularidade no conjuntivo e área com neovascularização B) Material amorfo eosinófilo (*) sendo degradado e colonizado (→), a resultante é um tecido conjuntivo denso e celular(&).

O grupo MSC, à semelhança do grupo BF, apresentou um conjuntivo mais denso com fibras dispostas longitudinalmente a lesão. Nas regiões centrais observou-se células no interior do BF sem sinais histológicos de apoptose (fig. 3A). No grupo meio ESC o conjuntivo se apresentou menos denso, desorganizado e com grande infiltrado inflamatório (fig. 3B e C). O grupo ESC apresentou visivelmente maior formação óssea próxima ao centro da ferida (fig. 3D) e na região inferior apresenta um tecido frouxo pouco celularizado, com características estranhas ao tecido ósseo (fig. 3E).

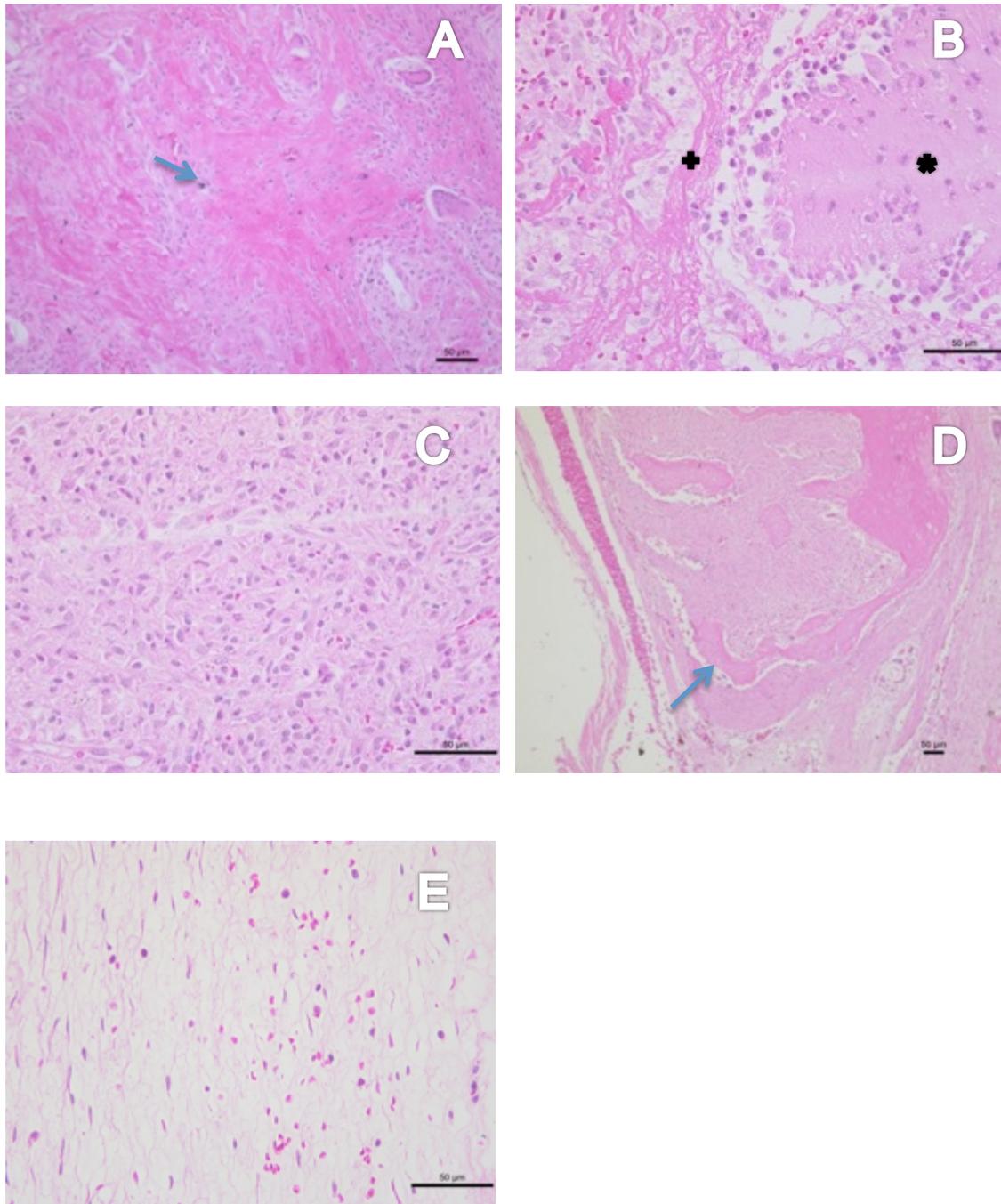


Fig. 2. Cortes com 14 dias HE. A) Presença de células no interior do material amorfo (BF) sem sinais apoptóticos(→) grupo MSC. B) Grupo meio ESC, o BF apresenta-se heterogêneo, algumas áreas mais densas (*) e outras formando fibras esparsas (+). C) conjuntivo desorganizado e com grande presença de células no grupo meio ESC. D) Grupo ESC formação óssea para o centro da ferida (→). E) Tecido conjuntivo frouxo no grupo ESC, atípico na região de formação óssea.

O grupo meio BMSC foi semelhante aos demais, apresentou mais áreas de sangramento e resquícios do BF (fig. 4A). A formação óssea na maioria das lâminas ocorre da região periférica para a central (fig. 4B), o grupo BMSC apresentou formações ósseas distantes da borda da ferida, também há presença do BF e grande infiltrado inflamatório.

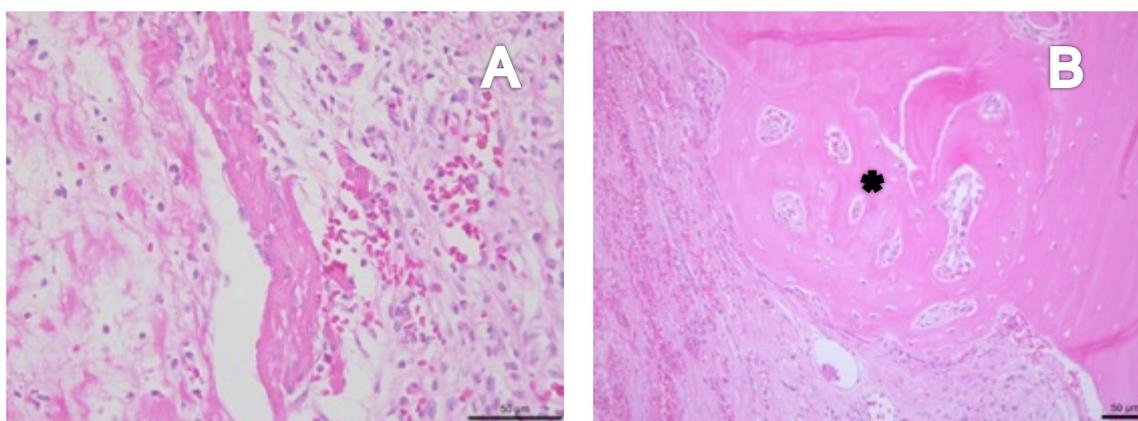


Fig. 3. A) Grupo M BMSC grande vascularização no tecido conjuntivo, presença do BF mais denso em mais frouxo e vários vasos sanguíneos. HE aumento 40x. B) Formação óssea nas bordas da ferida (*), grupo MCS.

3.2.2) Pós operatório de 54 dias

Na maioria das lâminas foi difícil a divisão entre o osso novo formado e o osso remanescente, dificultando a morfometria (fig. 5A). A diferenciação foi realizada pela quantidade de osteócitos e os canais de Havers que no osso maduro se apresentam longitudinais e no osso novo estão ausentes ou desorganizados.

O grupo controle apresentou pouca formação óssea próximo às extremidades da ferida e um grande adelgaçamento do tecido conjuntivo na região central.

No grupo MSC a formação óssea ocorreu em direção ao centro da lesão, alguns casos praticamente fechando o defeito com *de novo osso* (fig. 5B).

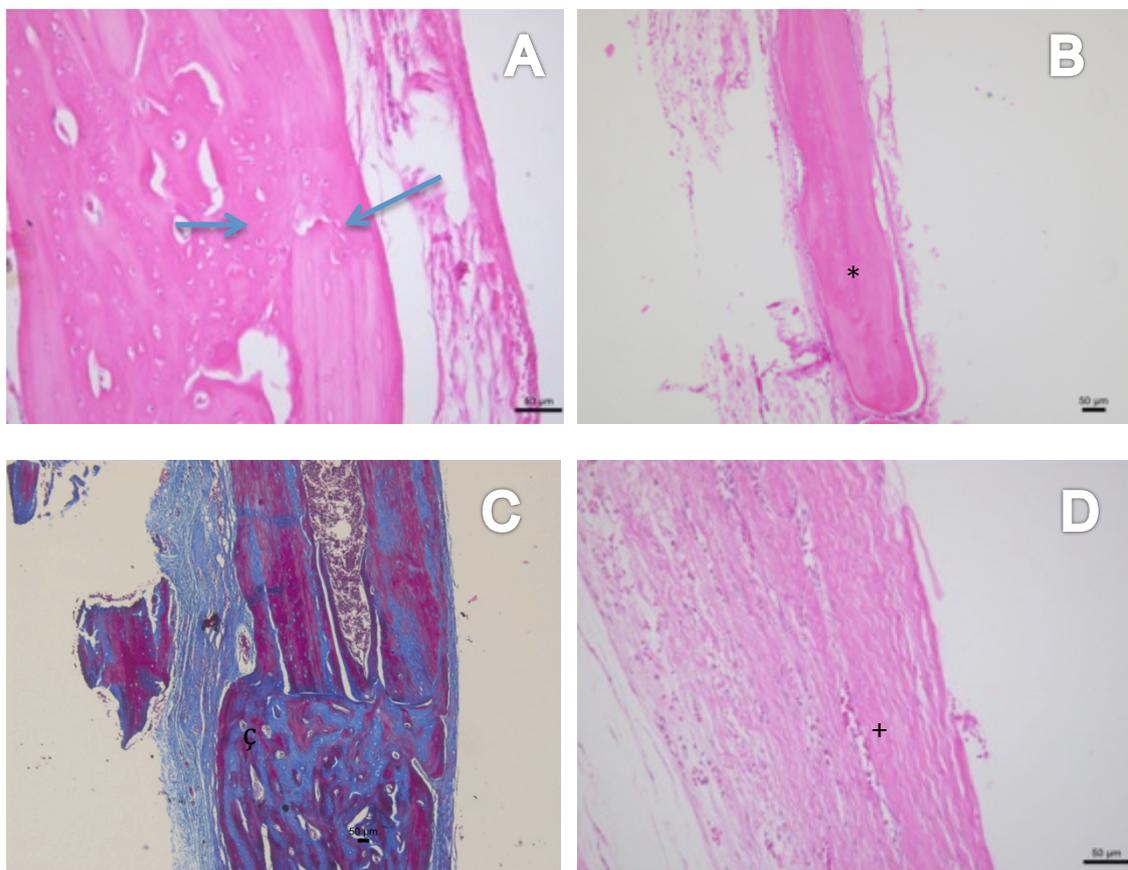


Fig. 4. Cortes histológicos com 54 dias HE. A) Interseção entre o osso novo e o osso remanescente (→), observar a quantidade de osteócitos e canais de Havers grupo MSC 10x B) formação óssea na região central do enxerto, osso mais fino, com canais de Havers do grupo MSC (*) 5x. C) Formação de calo ósseo (ζ) próximo ao osso remanescente com canais de Havers desorganizados, grupo ESC 5x. D) Conjuntivo disposto longitudinalmente, a porção superficial com maior quantidade de fibras colágenas comparado com a porção interna grupo (+) ESC 10x.

No grupo BF ocorreu uma formação óssea visivelmente maior que no grupo controle. Este osso novo apresentou-se pouco vascularizado e com canais de Havers desorganizados. O grupo ESC se destacou pela formação de osso novo e em alguns casos o quase fechamento da lesão. Foi observado um calo ósseo nas regiões proximais, e ausência de medular óssea (fig.5C). Nas regiões sem osso produziu um conjuntivo denso organizado com pouca celularidade e inflamação (fig.5D).

O grupo meio ESC apresentou um conjuntivo denso e acelular na região superior e no restante da lamina observou-se um conjuntivo mais celularizado. Em apenas um caso houve o fechamento quase completo da lâmina.

O grupo meio BMSC se destacou pela grande celularidade no seu tecido conjuntivo com sinais de inflamação moderada e formação de calo ósseo. O crescimento celular deste grupo não se deu em direção ao centro da ferida mas volumetricamente (fig. 7A). Foi o grupo mais difícil de identificar o limite do defeito pois ocorreu uma alta celularidade no osso adjacente à ferida (fig. 7B). O Grupo BMSC apresentou resultados similares ao anterior, com grande quantidade de osteócitos no osso e linhas de Havers definidas.

No anexo D fig. 8 observa-se adelgaçamento do tecido 54 dpi e no anexo D fig. 9 as imagens de um espécime de cada grupo demonstrando todo o defeito crítico.

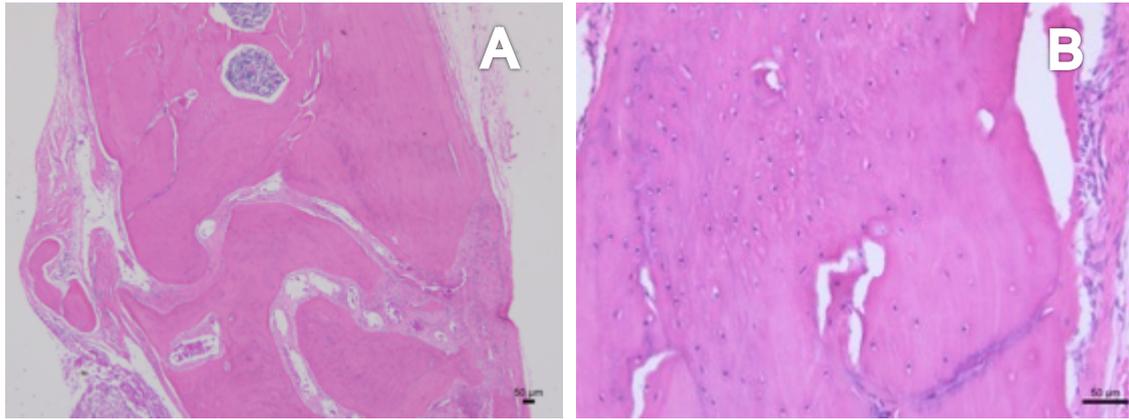


Fig. 5. A) Substituição da medular óssea por um tecido conjuntivo permeando o osso novo e calo ósseo meio BMSC 54 dpi HE B) Grupo Meio BMSC na 54 dpi, grande quantidade de osteócitos presentes no osso novo e no osso remanescente.

3.3) Morfometria

3.3.1) Morfometria do BF aos 14 dias.

Na segunda semana todos os grupos possuíam pelo menos um animal que apresentasse resquícios de BF na região da lesão. Não houve diferença estatística entre os grupos, entretanto os grupos com meio de cultura apresentaram maior quantidade de BF (meio ESC 12,55 e meio BMSC 18,28 e os grupos com células; ESC 9,2, BMSC 8,55 e MSC 3,75). (Anexo D **tabela 1**)

3.3.2) Morfometria do osso novo

A formação óssea mais acentuada ocorreu no grupo ESC. Alguns dos animais tiveram o defeito quase completamente ocluídos com osso novo e foi estatisticamente melhor que o grupo Meio ESC. Os grupos Meio BMSC e MSC foram semelhantes e não variaram estatisticamente do grupo ESC e do grupo Meio ESC, mas foram melhores que os demais grupos. O grupo Meio ESC foi estatisticamente melhor que os grupos Controle, BF e BMSC. Estes três tiveram os piores resultados, embora BF e BMSC apresentaram maior formação óssea que Controle, mas sem diferença estatística, (**Tabela. 2** e anexo D fig. 11).

Tabela 2. Volume de osso novo em porcentagem (%) da área total com desvio padrão (\pm), comparativo entre os grupos com 14 e 54 dpi. Maiúsculas representam semelhança estatística e minúsculas diferença estatística ($p < 0,05$).

	14 dpi	54 dpi
Controle	3,50 \pm 1,31	16,62 \pm 5,26ab
MSC	6,89 \pm 3,46	37,64 \pm 10,2AB
ESC	11,60 \pm 3,93	46,36 \pm 17,75A
BMSC	6,80 \pm 3,71	18,89 \pm 5,86ab
M ESC	3,47 \pm 1,4	28,58 \pm 5,85aB
M BMSC	3,73 \pm 2,31	37,82 \pm 11,28AB
BF	4,71 \pm 2,21	19,82 \pm 6,26ab

3.4) Tomografia computadorizada

Nos animais eutanasiados em 14 dpi, observamos no corte axial um tecido mole ocluindo toda a ferida. Este tecido se apresentou mais volumoso que o osso remanescente, exceto no grupo vazio (Fig. 9 A e B). Nos animais de 54 dpi houve um adelgaçamento do tecido. Alguns animais possuíam uma fina camada de hiperdensidade sugerindo uma formação óssea imatura fechando totalmente ou parcialmente o defeito (Fig. 9 C a F)

O cálculo na escala de Hounsfield (HU) foram feitas em cortes axiais e não conseguiram captar a presença do osso novo. Os valores variaram abaixo de -500, semelhante ao tecido pulmonar, o osso varia entre 700 e 3000 (Anexo D Tabela 2)

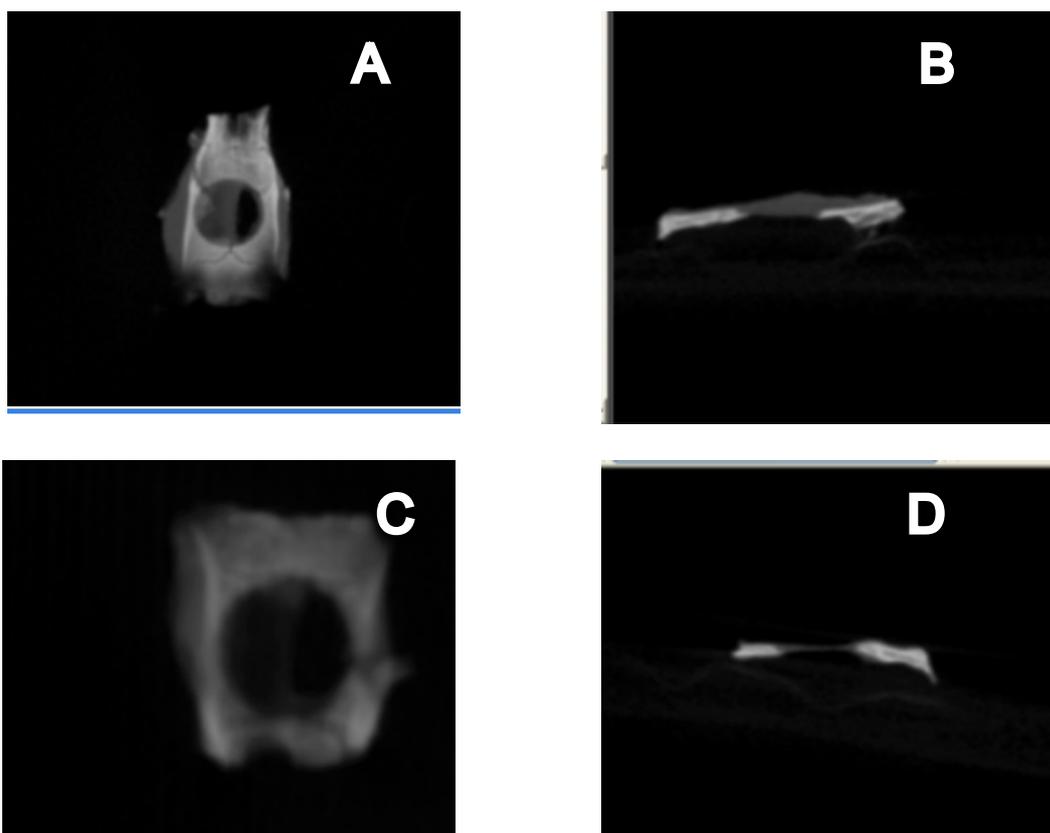
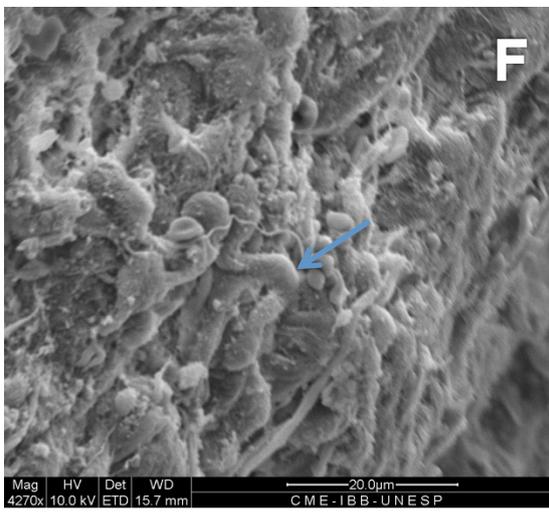
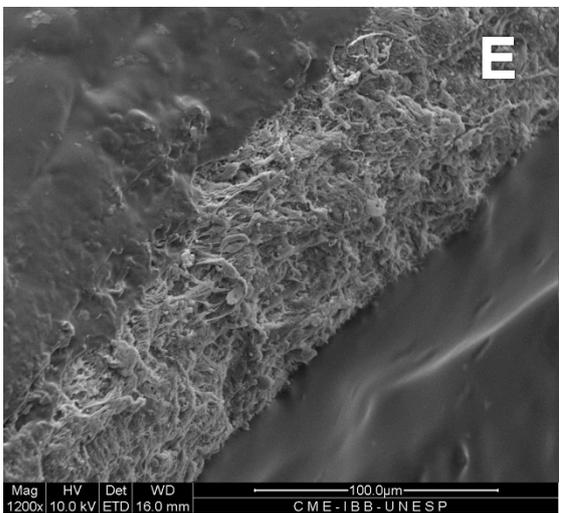
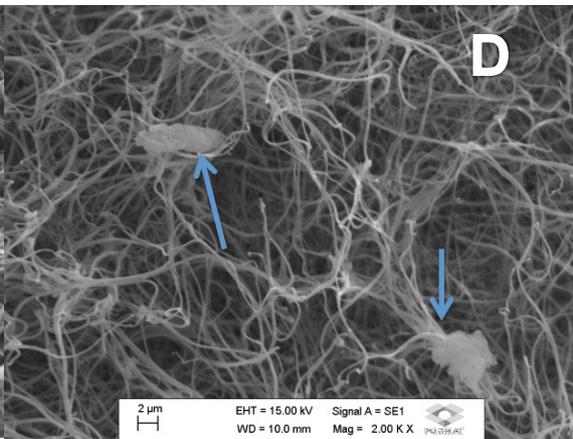
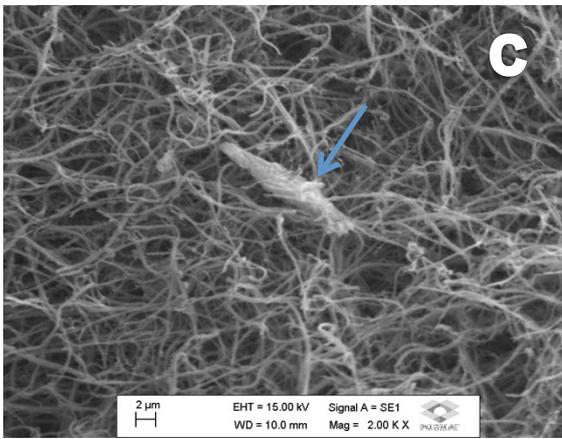
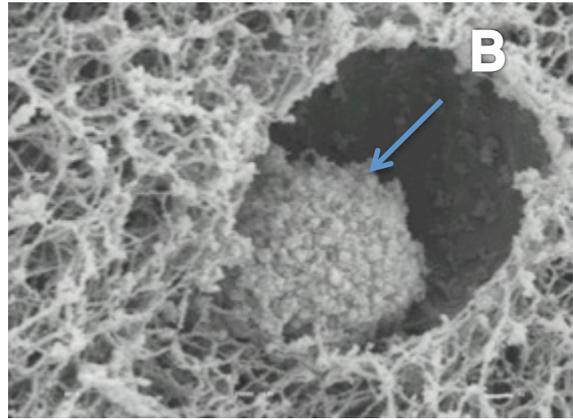
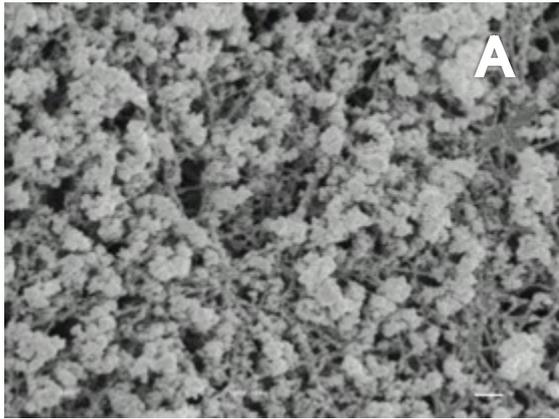


Fig. 6 A) Grupo Meio BMSC 14 dpi, presença de conjuntivo fechando a lesão B) Corte sagital demonstrando presença de maior volume na região enxertada C e D) Grupo ESC 54 dpi, adelgaçamento do enxerto.

3.5) MEV

As imagens do complexo BF/MSC demonstram que o BF possui uma heterogeneidade, ou seja áreas onde a fibras de fibrina ficam fechadas formando uma massa homogênea e áreas onde a rede abre permitindo maior troca de nutrientes celulares. As células apresentaram uma interação com a malha e seus contornos mantidos em formato circular (Fig. 10 A, B e C). Quando avaliadas após o cultivo de 72 horas o BF apresentou uma malha mais esparsa e células com aspecto alongado (fig. 10). O cultivo de células em biomateriais de superfície como o titânio, demonstrou que o BF diluído ajudou as células a se fixarem nos materiais com a rede de fibrina (fig. 10).



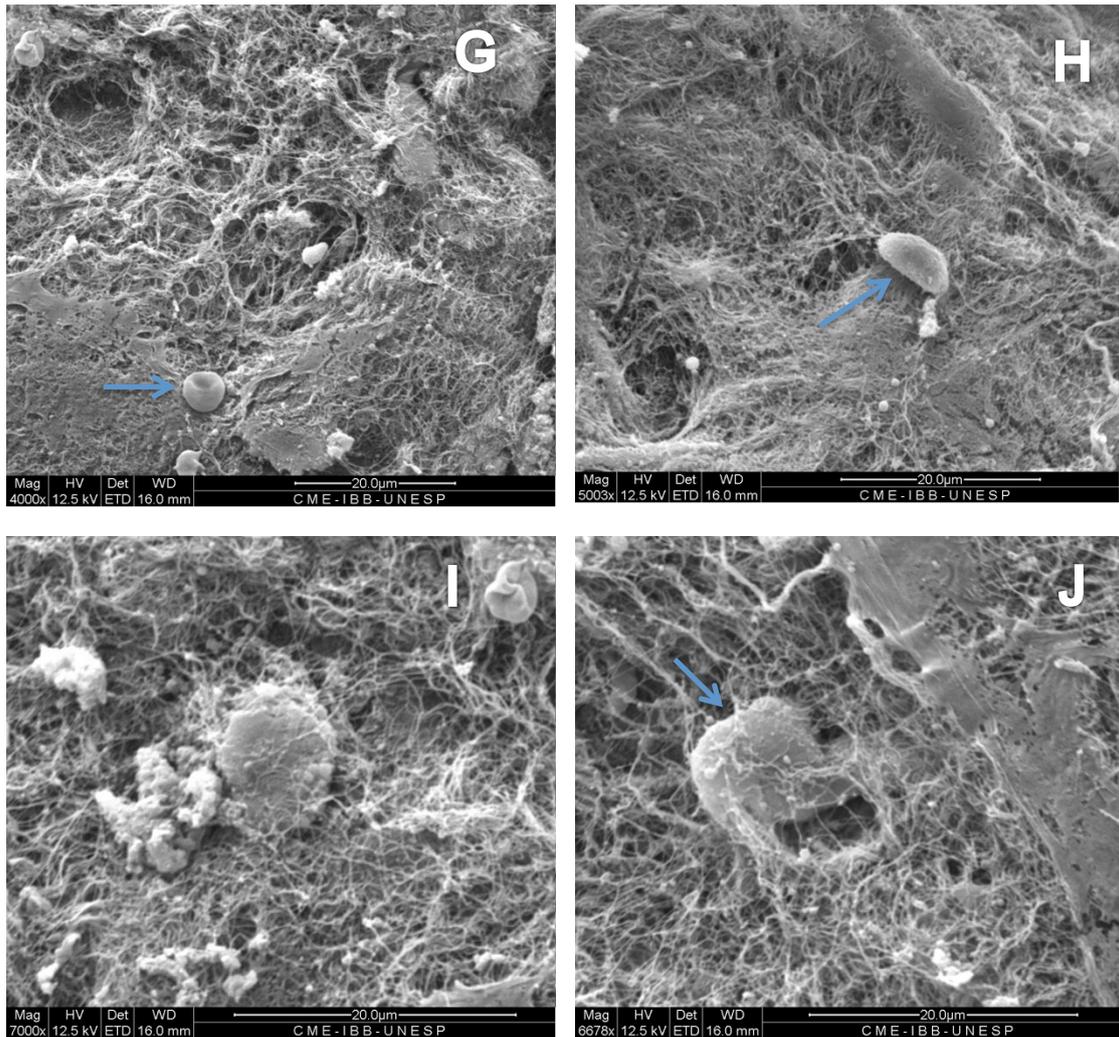
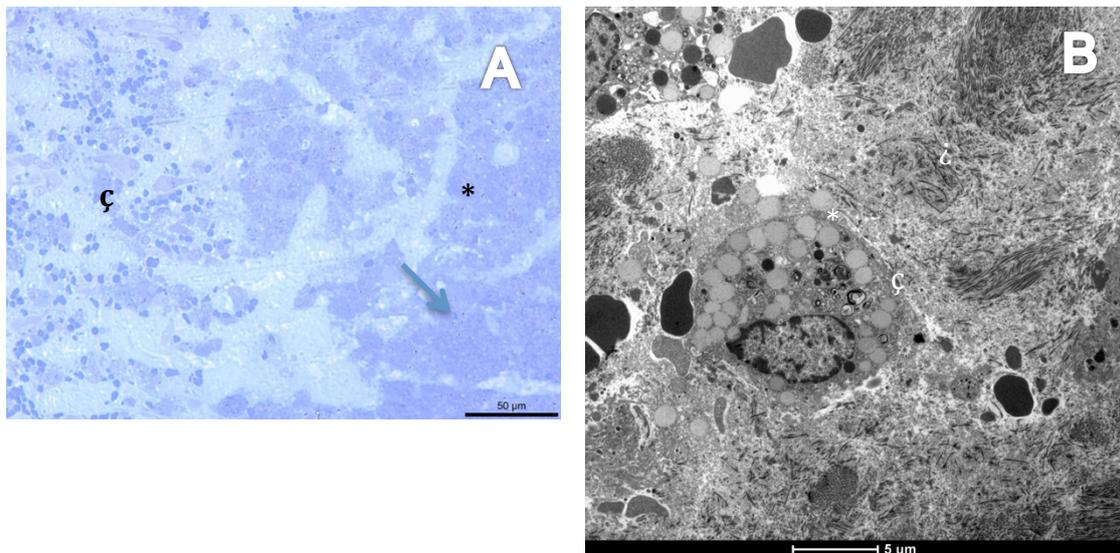


Fig. 7. Imagem do MEV. A) Superfície do BF com áreas heterogêneas formando um “condensado de fibrina” B) Interação entre as células (→) e o BF imediatamente após a manipulação C e D) Interação ente o BF e as MSC após 3 dias de cultivo na malha de fibrina E) Conjuntivo em corte lateral do lesão F) Fibras colágenas (seta) presentes amostra coletada do grupo MSC com 14 dpi. G) Malha de fibrina presente remanescente aos 14 dpi, indicação de uma hemácia (seta) I e J) Presença de células na região da rede de fibrina. J e K) Possíveis MSC presas na malha de fibrina (seta), possuem grande interação com a rede de BF sem sinais de lesão da membrana celular sugestivo de vitalidade.

3.6) Microscopia eletrônica de varredura

As imagens do MET mostram a microestrutura celular, suas organelas e o MEC. Foi realizado uma lamina histológica com azul de toluidina na qual foi escolhida duas áreas do defeito crítico. A primeira área (fig. 8) trata-se da degradação da fibrina, ao lado direito da lâmina podemos ver o BF em fase de degradação e do lado esquerdo o colágeno sendo depositado. O MEC apresentou diversos vacúolos com liquido intersticial denso, proveniente da degradação da fibrina ³¹ e macrófagos. O objetivo inicial era avaliar a estrutura das MSC no BF, foi observado células similares ao descrito na literatura, mas leva-se em consideração as alterações morfológicas causadas pelo cultivo celular.

Na segunda área observamos um tecido de cicatrização inicial com colágeno mais organizado, presença de fibroblastos e MEC com líquido extracelular abundante (fig 9).



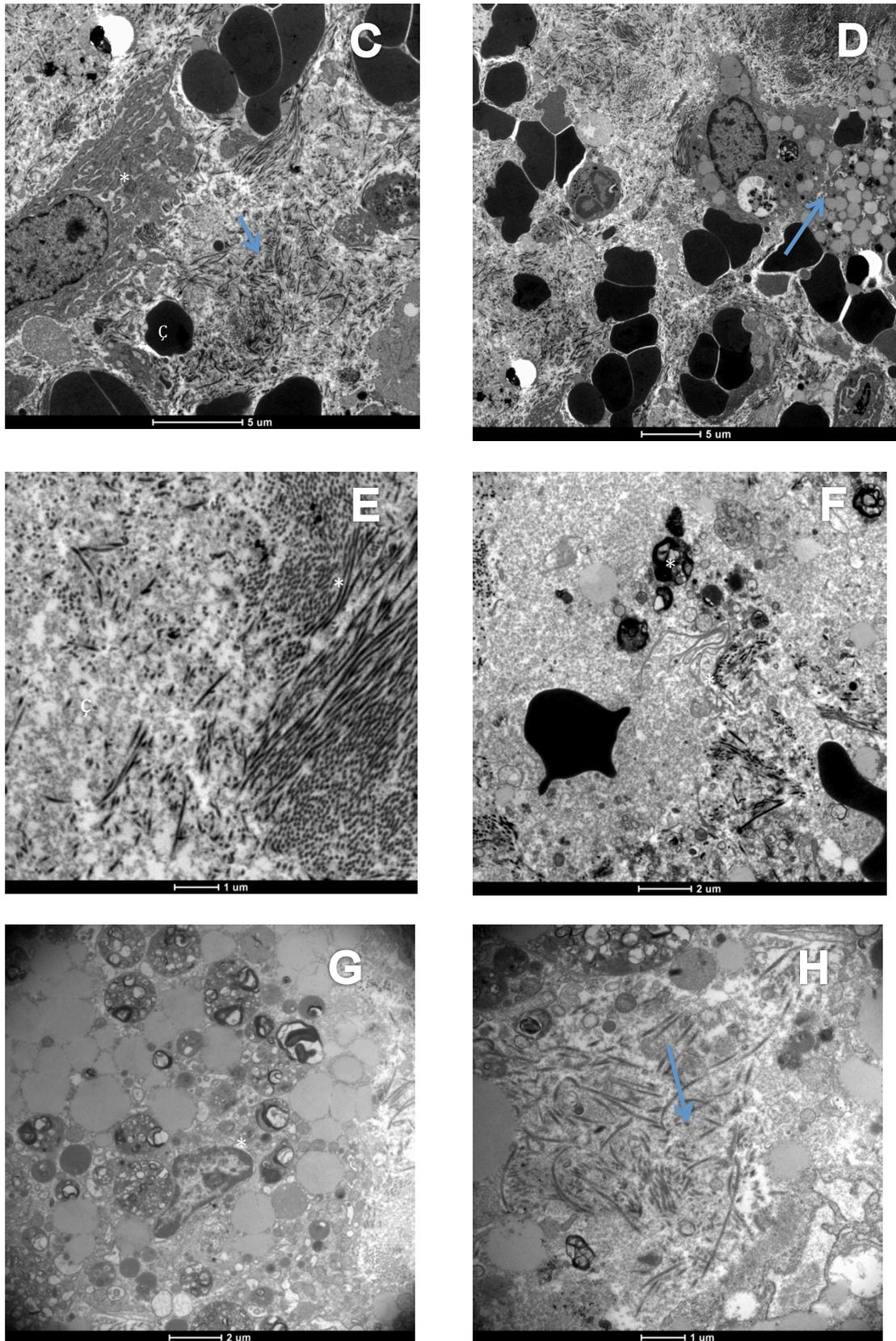


Fig. 8. A) Imagem da lâmina histológica do azul de toluidina região direita (*) representa o remanescente de BF com células no seu interior, possivelmente

MSC (seta), No lado esquerdo da lâmina área com degradação do BF (ç). B) Imagem de microscopia eletrônica evidenciando um macrófago, com lisossomos (*), mitocôndrias (ç) e núcleo (ι) D) Presença de fibroblasto (*) ao redor fibras colágenas desorganizadas (seta) e vacúolos provavelmente derivados da degradação do BF(ç). E) Liberação de exossomas para o meio intersticial (seta). F) Fibras colágenas (*) com denso conteúdo intersticial oriundo da degradação do BF (ç). F) Lise celular presença da Membrana plasmáticas e organelas soltas no MEC(*). G) Célula fagocitária com diversas organelas no seu interior(*). H) Fibras dispostas de forma desorganizada provavelmente colágeno ou fibrina (seta).

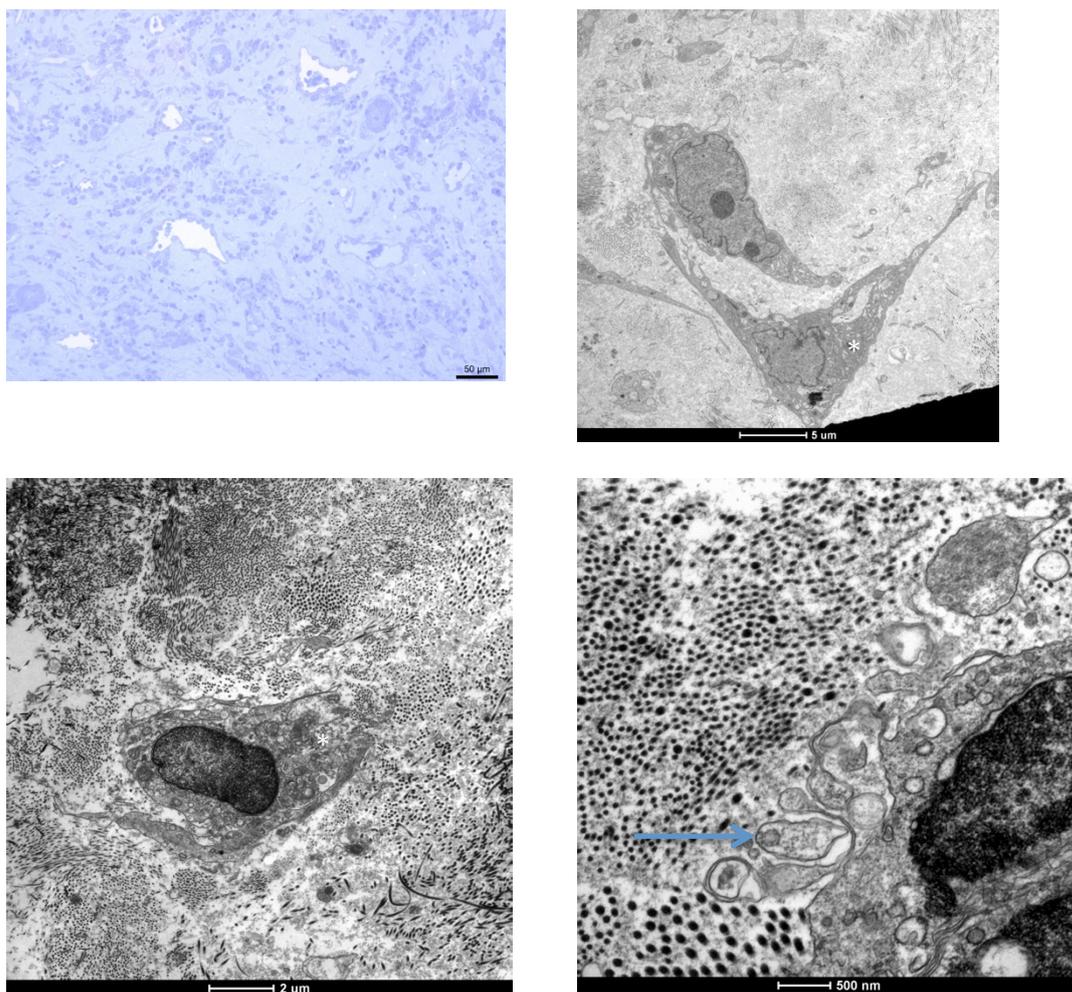


Fig. 9. Imagem da lâmina histológica do azul de toluidina demonstrando conjuntivo celularizado durante a reparação da ferida. B) dois fibroblastos com Reticulo endoplasmático rugoso abundante (seta) C) Célula em meio ao colágeno possivelmente uma MSC ou linfócito (*). E) Célula similar a foto F secretando para o meio extracelular (seta).

4) DISCUSSÃO

O BF oriundo de peçonha de serpente foi experimentado em diversas modalidades como, enxertos gengivais ^{32, 33} enxertos de cartilagem, arcabouço tridimensional de MSC *in vitro* ²⁹, regeneração de defeitos ósseos em fêmures com MSC ³¹. Este trabalho demonstrou o uso do BF como *drug delivery* de secretomas celulares e *scaffold* de células-tronco. Foi observado uma formação óssea similar aos grupos MSC e ESC. Também foi observado a biocompatibilidade entre o BF e as células ESC resultando na melhor formação óssea dentre os grupos estudados.

O modelo proposto foi o defeito crítico em calvária de ratos que é caracterizado por uma lesão que não pode ser reparada espontaneamente em toda a vida do animal ². O defeito de 8 mm se manteve crítico durante todo o período experimental (54 dias) corroborando a literatura ³⁵. A calvária é composta por osso membranoso, com suplemento sanguíneo relativamente limitado e livre de estresse mecânico, conferindo estabilidade relativa das estruturas que circundam o defeito ^{2,36,37}. Assim, este modelo cirúrgico é usado para avaliar a capacidade osteoindutiva de diferentes biomateriais, principalmente na reconstrução dos ossos da face ^{38, 39, 40}.

Os resultados tomográficos revelaram um adelgaçamento do conjuntivo dos 14 para os 56 dias em todos os casos, mesmo quando a reparação óssea foi completa. Os substitutos ósseos osteocondutores mantêm o volume do enxerto até a colonização por células progenitoras, a exemplo do TCP que apresenta boa compatibilidade celular e possui tempo de degradação compatível com a formação óssea ^{41, 42} e conferem resistência reológica ao arcabouço ^{43, 44}. Entretanto os substitutos ósseos seriam variável a mais neste experimento e fugiria ao objetivo proposto ^{45, 46}.

O maior percentual de formação óssea foi verificada no grupo com ESC. É sabido que as células pluripotentes podem se multiplicar mais de

120 vezes e ainda se diferenciar em outros tipos celulares, o que ajudaria na sobrevivência depois após o transplante ⁴⁷. O resultado desta pesquisa sugere que ocorreu uma integração favorável entre estas células e o BF.

As ESC representam um enxerto exógeno, enquanto os grupos MSC e BMSC são enxertos alógenos. Mesmo assim, as ESC foram pouco imunogênicas, apresentando pouca inflamação local e formação óssea. O grupo ESC apresentou agrupamentos celulares que não foram observados em nenhum outro grupo. Estas células pluripotentes não se diferenciam apenas no tecido alvo, mas também nas estruturas anexas, que pode ser um fato positivo ao enxerto pois ajuda na proteção e nutrição ⁴⁸.

As ESC entretanto, esbarram em duas limitações importantes, o sua restrição ética por se tratar de um embrião humano e seu risco de formar teratomas. Alguns pesquisadores sugerem a pré-diferenciação destas células antes do seu uso ¹⁹.

O grau de diferenciação das células que produz o melhor resultado clínico é questionável para a maioria das células. A diferenciação reduz a capacidade de proliferação, minimizando o risco de um teratoma, mas pode diminuir a sobrevivência celular *in vivo* ^{49, 50, 51}.

As células-tronco em três estágios diferentes da sua ontogênese foram também comparadas neste estudo. Observou-se que, quanto maior o estágio de diferenciação, menor a formação óssea. As MSC ao se diferenciarem em osteoblastos, inicialmente ganham mobilidade e expressam STRO-1, ALP, PPR, e colágeno tipo I, em seguida ficam sesses, ganham adesão e começam a apresentar ALP, OPN, BSP, e OCN ^{52, 53, 54}.

No presente trabalho o grupo MSC apresentou formação óssea similar estatisticamente ao grupo ESC. As MSC humanas autógenas apresenta dificuldades para sua utilização como necessidade de área doadora, complexidade técnica para expansão em laboratório e o custo destas

intervenções ⁵⁵. Estima-se que as MSCs representem apenas 0,01% das células mononucleadas no interior do osso ^{56,57}. Antes de começar o uso em humanos, alguns problemas devem ser considerados como a limitada expansão em laboratório, o método de fixação do enxerto, os resultados a longo prazo, e as aprovações de órgãos reguladores ⁴¹. Durante a cultura celular o fenótipo das MSC é alterado. Além disso, os seus marcadores de superfície de MSC recém-colhidas são diferentes daquelas cultivadas, além do seu tamanho que aumenta consideravelmente ⁵⁸.

As MSC secretam fatores pró-inflamatórios como o IL-1 e antiinflamatório como o TGF- β , sendo que sua ação depende diretamente do balanço entre estas citocinas ¹². Nossos animais com MSC apresentaram uma maior inflamação que os grupos sem células clínica e histologicamente. Possivelmente a ação pró-inflamatória do BF ⁵⁹ tenha um efeito sinérgico com as células.

É sabido que, o fato da rápida mortalidade das células-tronco após sua aplicação endovenosa visando resultados reparadores, sugere que o efeito terapêutico das MSC se dá por via parácrina ⁶⁰. Os fatores de crescimento responsáveis por estes efeitos são secretados pelas MSCs e ficam acumulados nos meios de cultura ao cultivar as células ⁶¹. Surge portanto a possibilidade de implantação do meio de cultura condicionado (CM) como novo conceito para diminuir os custos, o tempo e a possível rejeição imunogênica destas terapias celulares ⁶².

Osugi *et al.*, 2012 ²⁰ demonstraram que o CM foi mais efetivo na formação óssea que a própria célula. Este fato se deu pelas MSCs endógenas que migraram para a ferida com o estímulo do CM. Este fato é ainda objeto de discussão na literatura pois as células podem ser proveniente do sangue ou do próprio tecido ⁵⁸.

Neste estudo comparamos duas alternativas de meio condicionado, sendo o meio das células ESC e o das células MSC diferenciadas. Ambos

mostraram potencial osteogênico. O grupo BMSC obteve melhor desenvolvimento por dois possíveis fatores; a presença de componentes da família BMPs diretamente associados a formação óssea; e a maior quantidade na produção de quimiotáticos por serem células especializadas^{63,64}.

O uso de CM derivado de células ósseas sinalizou a formação óssea no ligamento periodontal, pois possuem grandes quantidades de quimiotáticos para proliferação como VEGF e PEDF que as células indiferenciadas produzem⁶⁵.

O grupo M ESC também resultou em formação óssea melhor que o grupo controle e BF. Isto se deveu aos fatores de crescimento da família TGF- β , como é o caso da VEGF, IGF-1, não estarem diretamente associados com a formação óssea, mas com proliferação endotelial e recrutamento das MSC respectivamente^{20, 66}.

A forma mais simples de usar o BF como *drug delivery* é misturar uma de suas frações com o composto desejável. Devido à sua porosidade, grande parte deste material sairá por difusão e será rapidamente degradado quase sem efeito terapêutico⁶⁷. Entretanto a fibrina possui afinidade com fatores de crescimento e células, assim fatores de crescimento ficam “presos” na fibrina e serão liberados apenas quando o BF for absorvido⁶⁸. Os MC também possuem vesículas extracelulares, como exossomos que por serem maiores podem ficar presos na malha⁶⁹.

A fibrina na cicatrização tecidual *in vivo* durante a fase inflamatória, coloniza a ferida e dá suporte as MSC oriundas do sangue que migram para a área e começam a secretar seus fatores de crescimento. Assim podemos assumir que vários dos fatores do secretoma possuem afinidade natural com a fibrina e podem manter os quimiotáticos protegidos do efeito osmose, como o FGF, VEGF₁₆₅ e IL-1b⁷⁰. Muitos outros fatores podem também possuir ligações específicas com a fibrina no entanto ainda não foram identificadas.

Os arcabouços de fibrina após a sua implantação permanecem nos tecidos até sua completa fibrinólise. Nossos resultados corroboram a literatura pois na segunda semana o BF ainda podia ser encontrado nas amostras por meio das análises histológicas⁶⁸ sendo completamente degradado no 54 dpi.

Os grupos com CM retiveram maior quantidade de BF na 2 semana. Embora não houvesse diferença estatística, podemos supor que as células aceleram a degradação do BF pela ação da plasmina. A degradação muito rápida do BF deixa as células expostas antes do momento desejável e a absorção muito lenta impede a formação óssea. O bioproduto deve ser degradado ao passo que a nova matriz é depositada^{71,72}.

Nossos resultados demonstraram que o uso do BF teve melhor formação óssea que o grupo controle, porém sem diferença estatística. Podemos inferir que o BF possui um potencial indutor embora menor que os demais grupos. A utilização do BF em enxertos autógenos e submetidos a laserterapia demonstrou resultados favoráveis na integração do enxerto com o leito receptor⁷³.

As células no cultivo avaliadas pela microscopia eletrônica e as análises histológicas sugerem que a vitalidade foi mantida por 2 semanas *in vivo*. O BF oriundo do veneno de serpente já havia demonstrado que não possui efeito tóxico e permite crescimento celular²⁹. Mesmo resultado foi observado com a microscopia eletrônica de transmissão e testes de citotoxicidade³¹. Neste trabalho o BF cumpriu seu efeito protetivo nas células e CM enxertados permitindo a liberação de fatores de crescimento na fase proliferativa.

Este trabalho é o primeiro evidenciando as células-tronco por MEV e MET, em cultura celular após 72 horas e 14 dpi *in vivo*, capturadas pelo BF derivado do veneno de serpente. Este fato enaltece a sua utilização como scaffold mostrando que estas células permanecem viáveis.

A morfologia celular sugere que as células *in vivo* foram protegidas pela malha de fibrina durante o processo de reparação. As concentrações mais altas de fibrinogênio dificultam a proliferação e difusão dos fatores de crescimento conferindo as células formato arredondado⁷⁴ e maior diâmetro⁵⁸. Em lesões de tronco nervoso de ratos foi aplicado MSC e BF, observou-se o deslocamento das MSC marcadas por imunohistoquímica para a região lesionada 28 dpi demonstrando assim a viabilidade celular⁷⁵.

O BF utilizado é derivado de peçonha de serpente e plasma sanguíneo de bubalino, sendo assim sua fonte é muito mais abundante e de fácil acesso que os produtos comerciais oriundos do sangue humano. Pode-se assim, usar concentrações mais altas de fibrinogênio que por si induzem a diferenciação das MSC em células osteogênicas e aumentam a expressão de marcadores ósseos⁷⁶. Além de criar malhas mais resistentes à degradação⁷⁷, permite que as MSC tenham tempo suficiente de se diferenciarem e produzirem sua própria MEC e liberar diferentes fatores⁷⁸. Esta malha densa e fechada como foi observado no MEV pode ser vantajoso no uso de CM evitando a rápida difusão dos fatores e permitindo assim a degradação lenta.

5) CONCLUSÕES

Assim esta tese evidenciou mais um potencial terapêutico do BF derivado de peçonha de serpente. A associação do BF com o CM se mostrou eficaz na formação óssea, sendo uma terapia barata e promissora. O CM é um material de descarte durante a cultura celular, mas possui diversos fatores que podem ser eficientes não apenas na reparação do osso, como também em outros tecidos. Demonstrou que diferentes CM oriundos de células distintas podem ter resultados diferentes. O CM derivado de células ósseas foi mais efetivo na formação de novo osso que o meio das ESC. As

células com maior capacidade proliferativa foram melhores na formação óssea neste estudo. A microscopia eletrônica evidenciou que o BF fez uma interação com as células mantendo-as protegidas e viáveis até os 14 dpi.

As MSC e ESC foram eficientes na formação óssea, mas o uso do CM é muito mais seguro, barato e tangível apresentando melhor custo benefício, ainda que a formação óssea tenha sido menor. Nossos resultados também sugerem que quanto maior a capacidade proliferativa das células enxertadas melhor sua sobrevida no enxerto.

5) REFERÊNCIAS

1. Marshel R, Einhorn TA The biology of fracture healing. *Injury*. 2011; 42(6):551-5.
2. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*. 1986; 299-308.
3. Ferguson, D.et al. Bovine bone morphogenetic protein (bBMP) fraction – induced repair of craniotomy defects in the rhesus monkey (*Macaca speciosa*). *Clin. Orthop.*, 1987; 219 :251-258.
4. Johnson PC, Mikos AG, Fisher JP, Jansen JA. Strategic directions in tissue engineering. *Tissue Eng*. 2007; 13:2827–37.
5. Lee KH Epidemiology of mandibular fractures in a tertiary trauma centre *Emergency Medicine Journal* 2008;25: 565-568.
6. Caballé-Serrano J, Fujioka-Kobayashi M, Bosshardt DD, Gruber R, Buser D, Miron RJ. Pre-coating deproteinized bovine bone mineral (DBBM) with bone-conditioned medium (BCM) improves osteoblast migration, adhesion, and differentiation in vitro. *Clinical Oral Investigations*. 2016;20(9):2507–13.
7. Dimitriou R , Tsiridis E,. Giannoudis P V Current concepts of molecular aspects of bone healing *Injury. Int. J. Care Injured*. 2005; 36, 1392—1404.
8. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng*. 2005; 11 (7-8): 1198-1211.
9. Leor J, Amsalem Y, Cohen S. Cells, scaffolds, and molecules for myocardial tissue engineering. *Pharmacol Ther*. 2005; 105 (2):151-63.
10. Caplan AI: Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009, 217: 318-324.
11. Madrigal, M.; Rao, K.S.; Riordan, N.H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med*. 2014; 12: 260.
12. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-fernandez R. Mesenchymal Stem Cell Secretome : Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18: 1852–76.

13. Parekkadan B, Milwid JM. Annu Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. Rev Biomed Eng 2010; 12: 87–117.
14. Srijaya TC, Ramasamy TS, Kasim NH. Advancing stem cell therapy from bench to bedside: Lessons from drug therapies. J Transl Med 2014;12:243.
15. Evans, M.J., Kaufman, M.H., 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. Nature 292, 154–156.
16. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. Science 282, 1145–1147.
17. Yu Y. Osteogenic differentiation from mouse embryonic stem cells 2013. A thesis submitted in conformity with the requirements for the degree of Master of Science in the Graduate Department of Laboratory Medicine and Pathobiology, in the University of Toronto.
18. Araújo M, Kyrlylenko S, Barroso A, Vidigal M, Seabra R, Junior F, et al. Transgenic human embryonic stem cells overexpressing FGF2 stimulate neuroprotection following spinal cord ventral root avulsion. Exp Neurol; 2017;294:45–57
19. Zhu H, Kimura T, Swami S, Wu JY. Pluripotent stem cells as a source of osteoblasts for bone tissue regeneration. Biomaterials . Elsevier Ltd; 2018.
20. Osugi M, Katagiri W, Ph D, Yoshimi R, Ph D. Conditioned Media from Mesenchymal Stem Cells Enhanced Bone Regeneration. TISSUE Eng A. 2012;18
21. Spicer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a *drug delivery* system. J Control Release [Internet]. 2010;148(1):49–55.
22. Spotnitz WD. Fibrin sealant: past, present, and future: a brief review. World J. Surg. 2010;34(4):632–4.
23. Barros LC, Ferreira RS Jr., Barravieira SRCS, Stolf HO, Thomazini-Santos , Mendes-Giannini MJS, Toscano E, Barraviera B. A new fibrin sealant from crotalus durissus terrificus venom: applications in medicine. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.2009; 12: 553 - 571.

24. Gaßling VLW, Açil Y, Springer IN, Hubert N, Jorg W. Platelet-rich Plasma and Platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(1):48–55.
25. Shiu HT, Goss B, Lutton C, Crawford R, Xiao Y. Formation of blood clot on biomaterial implants influences bone healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2014;20(6):697–712.
26. Breen A, Ph D, Brien TO, Ch B, Pandit A. Fibrin as a Delivery System for Therapeutic Drugs and Biomolecules. *TISSUE Eng B.* 2009;15(2).
27. Spicer PP, Mikos AG. Fibrin glue as a drug delivery system. *J Control Release.* 2010;148(1):49–55.
28. Whelan D, Caplice NM, Clover AJP. Fibrin as a delivery system in wound healing tissue engineering applications. *J Control Release.* 2014;196:1–8.
29. Gasparotto VP, Landim-Alvarenga FC, Oliveira AL, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera, Ferreira-Jr RS: A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells *Stem Cell Research & Therapy.* 2014; 5(3): 78.
30. Kunova M., Matulka K, Eiselleova L, Salykin A, Kubikova I, Kyrylenko S, Hampl A, Dvorak P. Adaptation to robust monolayer expansion produces human pluripotent stem cells with improved viability. *Stem Cells Transl. Med.* 2013; 2 : 246–254
31. Orsi PR, Landim-Alvarenga FC, Justulin LA, Kaneno R, De Assis Golim M, Dos Santos DC, et al. A unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):1–14
32. Barbosa M, Gregh SLA, Passanezi E. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *J Periodontol* 2007; 78 (10):2026–31.
33. Barbosa MDS, Stipp AC, Passanezi E, Gregh SL. Fibrin adhesive derived from snake venom in periodontal surgery. *T Appl Oral Sci.* [Internet]. 2008;16 (5):310–5.
34. Frauz K, Teodoro LFR, Carneiro GD, Cristina F, Ferrucci DL, Bombeiro L, et al. Transected Tendon Treated with a New Fibrin Sealant Alone or Associated with Adipose-Derived Stem Cells. *Cells.* 2019;8(56):1–26.

35. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann Surg.* 1982; 196: 100-9.
36. Mankanl, M. H. et al. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible. *Stem cells* 2006; 24(9): 2140-9.
37. Almada, BVP. Comparação entre fontes de células- troncomesenquimais na indução à regeneração óssea. Mestrado IB-USP 2013
38. Sawyer AA, Song SJ, Susanto E, Chuan P, Lam CXF, Woodruff MA, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL – TCP / collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials* 2009;30(13):2479–88.
39. Wang P, Liu X, Zhao L, Weir MD, Sun J, Chen W, et al. Bone tissue engineering via human induced pluripotent, umbilical cord and bone marrow mesenchymal stem cells in rat cranium. *Acta Biomater.* 2015;18:236–48.
40. Oliveira A P. Terapia de defeito crítico em crânio de ratos pela associação de xenoenxerto bovino e células derivadas de periósteo autógeno. Tese de Doutorado, Araraquara, 2009.
41. Xu L, Lv K, Zhang W. The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB , BMSCs , and b -TCP scaffolds. *J Mater Sci Mater Med.* 2012;234:1073–84
42. Khojasteh A, Eslaminejad B, Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelete-rich. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106: 356–62.
43. Kim B-S, Kim H-J, Choi J-G, You H-K, Lee J. The effects of fibrinogen concentration on fibrin/atelocollagen composite gel: an in vitro and in vivo study in rabbit calvarial bone defect. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 17: 1–7.
44. Wang L, Wang P, Weir MD, Reynolds MA, Zhao L, Xu HK, et al. Hydrogel fibers encapsulating hiPSC-MSCs, hESC-MSCs and hUCMSCs in injectable calcium phosphate scaffold for bone tissue engineering. *HHS Public Access. Biomed mater.* 2017;11(6):1–23.
45. Noori A, Ashrafi SJ, Vaez-Ghaemi R, Hatamian-Zaremi A, Webster TJ. A review of fibrin and fibrin composites for bone tissue engineering. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:4937–61.

46. Xu J, Wang B, Sun Y, Wu T, Liu Y, Zhang J, et al. Human fetal mesenchymal stem cell secretome enhances bone consolidation in distraction osteogenesis. *Stem Cell Res Ther Stem Cell Research & Therapy*. 2016;7:134–46
47. Lian Q, Zhang Y, Zhang J, Zhang HK, Wu X, Lam FF, et al. Functional mesenchymal stem cells derived from human induced pluripotent stem cells attenuate limb ischemia in mice. *Circulation*. 2010; 121:1113–23
48. Mckee C, Chaudhry GR. *Colloids and Surfaces B : Biointerfaces Advances and challenges in stem cell culture*. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. Elsevier B.V.; 2017;159:62–77.
49. Laflamme, M.A., Chen, K.Y., Naumova, A.V., Muskheli, V., Fugate, J.A., Dupras, S.K., Reinecke, H., Xu, C., Hassanipour, M., Police, S., et al. (). Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat. Biotechnol*. 2007; 25: 1015–1024.
50. Mooney DJ, Vandenburgh H. Review Cell Delivery Mechanisms for Tissue Repair. *Cell Stem Cell*. 2008;2:205–13.
51. Laugwitz, K.L., Moretti, A., Lam, J., Gruber, P., Chen, Y., Woodard, S., Lin, L.Z., Cai, C.L., Lu, M.M., Reth, M., et al.. Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature*. 2005; 433: 647–653.
52. Sun L, Blair HC, Peng Y, Zaidi N, Adebajo OA, Wu XB, Wu XY, Iqbal J, Epstein S, Abe E, Moonga BS, Zaidi M. Calcineurin regulates bone formation by the osteoblast. *Proc Natl Acad Sci U* 2005; 102(47):17130–17135.
53. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev*. 1996; 76:593–629.
54. Soltanoff C S, Chen W, Yang S, Li Y-P. Signaling Networks that Control the Lineage Commitment and Differentiation of Bone Cells. *Crit Rev Eukaryot Gene Expre*. 2009;19(1):1–46
55. Rohban R, Pieber TR. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration : Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*. Hindawi Publishing Corporation; 2017;2017:16.

56. Bunpetch V, Zhang Z, Zhang X, Han S, Zongyou P, Wu H, et al. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration. *Biomaterials*. 2017.
57. Orozco L, Munar A, Soler R, Alberca M, Soler F, Huguet M, Sentís J, Sánchez A, García-Sancho J, Treatment of knee osteoarthritis with autologous mesenchymal stem cells: a pilot study., *Transplantation*. 2013; 95:1535–41.
58. Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Front Immunol*. 2014;5:1–6.
59. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* . 2006 Mar;101(3):e56-60.
60. Maguire, G. Stem cell therapy without the cells. *Commun. Integr. Biol*. 2013, 6, e26631.
61. Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y.G., and Wu, Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 2008; e1886.
62. Madrigal, M.; Rao, K.S.; Riordan, N.H. A review of therapeutic effects of mesenchymal stem cell secretions and induction of secretory modification by different culture methods. *J. Transl. Med*. 2014, 12, 260.
63. Ichida M, Yui Y, Yoshioka K, Tanaka T, Wakamatsu T, Yoshikawa H, et al. Changes in cell migration of mesenchymal cells during osteogenic differentiation. *FEBS Lett* . Federation of European Biochemical Societies; 2011;585(24):4018–24.
64. Huang Z, Nelson ER, Smith RL, Goodman SB () The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng*. 2007;13: 2311-2320
65. Jin Z, Feng Y, Liu H. Conditioned media from differentiating craniofacial bone marrow stromal cells influence mineralization and proliferation in periodontal ligament stem cells. *Hum Cell*. Springer Japan; 2016;29(4):162–75
66. Valdimarsdottir G, Goumans MJ, Rosendahl A, et al. Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for

bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells. *Circulation* 2002;106: 2263–70.

67. Greco F, et al., Fibrin-antibiotic mixtures: an in vitro study assessing the possibility of using a biologic carrier for local *drug delivery*, *J. Biomed. Mater. Res.* 1991; 25 (1) 39–51.

68. Wong C, Inman E, Spaethe R, Helgerson S. Fibrin-based biomaterials to deliver human growth factors. *Thromb Haemost* 2003; 89; 573.

69. Beer L. Mildner M. Ankersmit HJ. Cell secretome based drug substances in regenerative medicine: When regulatory affairs meet basic science. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5: 170.

70. Breen A, Ph D, Brien TO, Ch B, Pandit A. Fibrin as a Delivery System for Therapeutic Drugs and Biomolecules. *TISSUE Eng B.* 2009;15(2):201–9.

71. Petridis X, Diamanti E, Ch G, Kalyvas D, Kitraki E. Bone regeneration in critical-size calvarial defects using human dental pulp cells in an extracellular matrix-based scaffold. *J Cranio-Maxillofacial Surg* ; 2015;43(4):483–90

72. Ahmad, E et al., Fibrin matrices: the versatile therapeutic delivery systems, *Int. J. Biol. Macromol.* 2015; 811:21–136.

73. Gonçalves JBO, Buchaim DV, Bueno CRS, Pomini KT, Barraviera B, Ferreira Jr RS, Andreo JC, Rodrigues AC, Cestari TM, Buchaim RL Effects of low-level laser on autogenous bone graft stabilized with a new heterologous fibrina sealant. *Journal of photochemistry and photobiology, B Biology* 2016; 162: 663-668.

74. Ho W, Tawil B, Dunn JC, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1587–1595.

75. Spejo ab. Emprego de selante de fibrina combinado com células tronco mesenquimais para o reparo de lesão no funículo anterior efeitos sobre a inflamação , neuroproteção e regeneração axonal universidade estadual de campinas. 2017; 1-167.

76. Catelas I, Sese N, Wu BM, Dunn JCY, Helgerson SAM, Tawil B. Human Mesenchymal Stem Cell Proliferation and Osteogenic. *TISSUE Eng.* 2006;12(8):2385–96.

77. Bensaid W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003;24:2497–502.

78. LeGuéhennec L Le, Layrolle P, Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. *Eur Cells Mater Vol*. 2004;8:1–11.

ANEXOS

Anexo A

Carta de aprovação do comitê de ética

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

FACULDADE DE MEDICINA
FMB
1963

Comitê de Ética no Uso de Animais

Ciência através da Postura. CPA nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1117/2015-CEUA

CERTIFICAMOS que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEUA 1117-2015) Selante de fibrina como arcabouço biológico 3D para células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos: Avaliação de diferentes concentrações e das propriedades estruturais in vitro e in vivo, a ser conduzido por Fausto Capuano Neto, orientado pelo Prof. Dr. Rui Seabra Ferreira Júnior está de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, com a ressalva de que os "ratos" são provenientes de Biotério Convencional, sem necessidade de atestar a sanidade dos mesmos.

CERTIFICAMOS que foi autorizada a utilização de "70 ratos wistar". Caso seja necessária a utilização de mais animais deverá ser comunicado a esta CEUA.

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 26/03/2015

Katashi Okoshi
Prof. Adjunto Katashi Okoshi
Presidente da CEUA

Kleber Messias Guimarães
Kleber Messias de Camargo
Secretário da CEUA

Anexo B

Carta de alteração no projeto de pesquisa 1



unesp

Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Fone: (14) 3880-1608/3880-1609
E-mail Secretaria:
ceua@fmb.unesp.br/graziela@fmb.unesp.br/sara.sampaio@fmb.unesp.br
Rua: João Buttignoli, s/nº - Distrito Rubião Junior - Botucatu/SP
CEP: 18.618-970



Instituída na Faculdade de Medicina através da Portaria do Diretor nº 30 de 26/04/99

Comissão de Ética no Uso de Animais

Ofício nº 014/2018-CEUA-FMB/UNESP

Botucatu, 03 de setembro de 2018.

Prezado Senhor,

Em atendimento ao documento protocolado em 23 de julho de 2018, solicitando alterações nos seguintes itens: Grupo 3 E Calendário da eutanásia, referente ao projeto: "Selante de fibrina como arcabouço biológico 3D para células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos: avaliação de diferentes concentrações e das propriedades estruturais *in vitro* e *in vivo*", sendo desenvolvido pelo pesquisador Fausto Capuano Neto, foi APROVADA pelo Colegiado em reunião realizada dia 30 de agosto de 2018.

Atenciosamente,


Prof. Ass. Guilherme Antônio Moreira de Barros

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP

Ilustríssimo Senhor

Professor Doutor Rui Seabra Ferreira Júnior

Orientador - Depto. de Doenças Tropicais e Diagnóstico por Imagem da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP.

Carta de alteração no projeto de pesquisa 2



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Botucatu, 04/03/2019

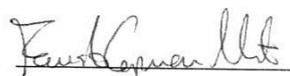
Ao Ilmo Sr.
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais
FMB-Unesp Botucatu

O projeto de pesquisa aprovado no dia 26/03/2015 sob protocolo CEUA 117-2015 inicialmente denominado "Selante de fibrina como arcabouço biológico 3D para células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de ratos: avaliação de diferentes concentrações e das propriedades estruturais in vitro e in vivo." foi avaliado pela banca de qualificação no dia 21/11/2018 que ressaltou a importância de acrescentar seis animais ao projeto inicialmente proposto. Quatro animais serão incluídos no grupo de controle (sem tratamento) adequando o "n" estatístico deste grupo e dois animais serão utilizados em análises com microscopia de transmissão para avaliar a sobrevivência celular no grupo com células tronco.

18-1807 04/03/2019 00000000 COMITE DE ETICA EM PESQUISA FMB - UNESP



Orientador: Rui Seabra Ferreira Junior



Aluno: Fausto Capuano Neto

Anexo C

Documentacao das células embrionárias

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office
Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224
represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "**Provider**")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp
Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil
represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "**the Recipient**")

(together hereinafter referred to as "**the Parties**")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "**the Contract**" or "**this Contract**") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "**VyzZ**");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.

1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:

a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Sml

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office

Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224

represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "*Provider*")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp

Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil

represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "*the Recipient*")

(together hereinafter referred to as "*the Parties*")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "*the Contract*" or "*this Contract*") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "*VyzZ*");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

- 1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.
- 1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

- 2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:
 - a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Smk

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office

Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224

represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "*Provider*")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp

Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil

represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "*the Recipient*")

(together hereinafter referred to as "*the Parties*")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "*the Contract*" or "*this Contract*") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "*VyzZ*");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

- 1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.
- 1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

- 2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:
 - a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Smk

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office

Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224

represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "*Provider*")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp

Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil

represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "*the Recipient*")

(together hereinafter referred to as "*the Parties*")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "*the Contract*" or "*this Contract*") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "*VyzZ*");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

- 1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.
- 1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

- 2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:
 - a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Smk

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office

Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224

represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "*Provider*")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp

Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil

represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "*the Recipient*")

(together hereinafter referred to as "*the Parties*")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "*the Contract*" or "*this Contract*") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "*VyzZ*");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

- 1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.
- 1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

- 2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:
 - a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Smk

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office

Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224

represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "*Provider*")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp

Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil

represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "*the Recipient*")

(together hereinafter referred to as "*the Parties*")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "*the Contract*" or "*this Contract*") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "*VyzZ*");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

- 1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.
- 1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

- 2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:
 - a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Smk

**A CONTRACT ON EXPORT OF HUMAN EMBRYONIC STEM CELLS LINES
FOR RESEARCH PURPOSES**

TTO MU no.: 27-2013-Rub

Parties to the Contract

Masaryk University
Technology Transfer Office

Seated at: Žerotínovo nám. 9, 601 77 Brno, Czech Republic
ID no.: 00216224

represented by: RNDr. Eva Janoušková, Ph.D., LL.M.
(hereinafter as "*Provider*")

And

Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia – Unicamp

Seated at: Rua Monteiro Lobato 255, Cp6109 – Cep: 13083-970, Distrito de Barão Geraldo
Campinas / SP, Brasil

represented by: Dr. Shirlei Maria Recco-Pimentel
(hereinafter "*the Recipient*")

(together hereinafter referred to as "*the Parties*")

have concluded a contract on export of human embryonic stem cells lines for research purposes (hereinafter "*the Contract*" or "*this Contract*") on the day, in the month and the year specified below and pursuant to Section 269, Sub-Section 2 and 289 and the following ones, Act No 513/1991 Coll., Commercial Code, as amended, and pursuant to Section 11, Act No 227/2006 Coll. on Research of Human Embryonic Stem Cells and Related Activities and on Amendment to Some Related Acts, as amended (hereinafter "*VyzZ*");

1. INTRODUCTORY PROVISIONS

- 1.1. The Provider is a person to whom the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic granted a permission to research human embryonic stem cells pursuant to Section 3, VyzZ. An authorized copy of this permission is an inseparable part of the Contract as Appendix No 1.
- 1.2. The Recipient is entitled to researching human embryonic stem cells in accordance with its statement delivered to the Provider by the e-mail on 03 July 2013 which is an inseparable part of the Contract as Appendix No 2.

2. THE SUBJECT-MATTER OF THE CONTRACT

- 2.1. The subject-matter of this Contract is the following lines of stem cells:
 - a) the CCTL 14 line (the identification number 014 according to the record in the register of lines attached to the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, made on 11 March 2008 under the No 5177/2008-31)

Page 1 from 5

Smk

ANEXO D

Materiais complementares

2) Material e Métodos

2.5.1) Procedimento cirúrgico

A figura 1 demonstra a perfuração com contra angulo cirúrgico 20:1 e broca trefina de 8 mm de diâmetro sob irrigação abundante. A perfuração foi feita cuidadosamente para evitar lesionar a dura mater do animal. Após a perfuração, a calota craniana foi removida cuidadosamente com um instrumental delicado como um mini osteótomo Oschenbein. Após o tratamento devido de cada grupo a insicao semilunar foi suturada com Nylon.

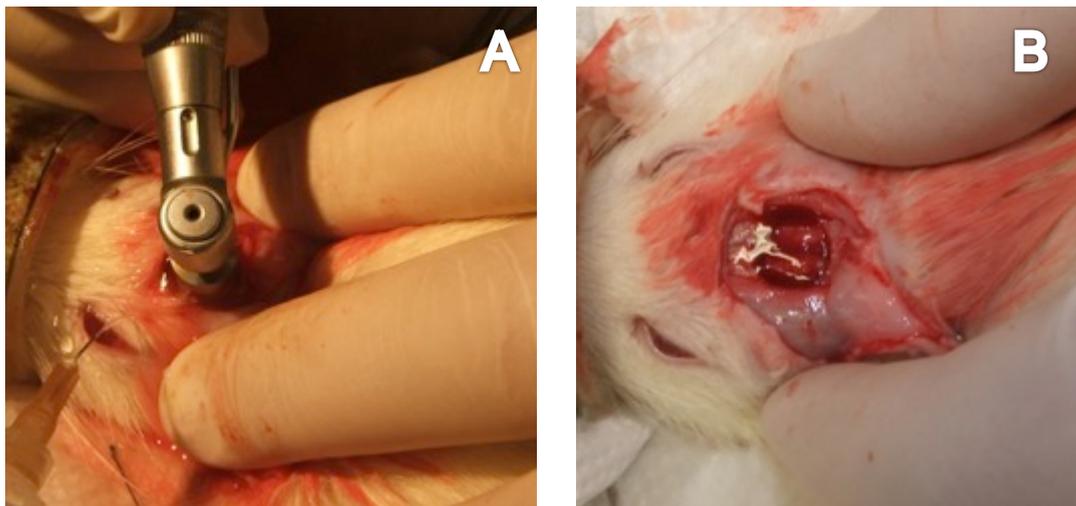


Fig1. A) Craniotomia realizada com trefina de 8mm na calota sob irrigação abundante B) Resultado do defeito crítico a ser preenchido e suturado.

2.5.3) Histomorfometria

O defeito da calota do animal foi subdividido em quadrantes denominados A, B, C e D. Após a descalcificação as peças foram divididas na região central. As avaliações foram feitas por quadrante como mostra a figura 2, sendo que, três dos quatro quadrantes foram computados desprezando a área em que foi coletado as amostras para proteômica. Após o calculo da área do osso novo e BF em pixel, a área total foi calculada por

4 mm convertido em pixel pela altura media de diversas lâminas. (Talvez tire esta parte.

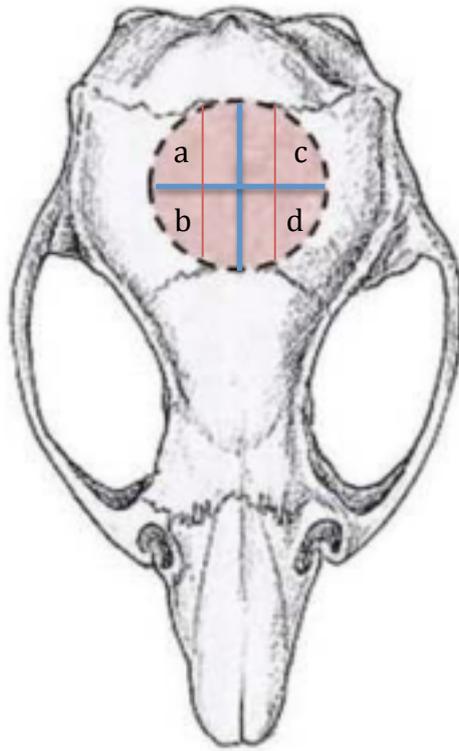


Fig. 2. Linhas azuis demonstra a divisão de cada defeito em quadrantes, e as linhas vermelhas a regial do corte histológico. Foram utilizados três dos quadrantes para a avaliação morfométrica. Adaptado de Martins 2010¹.

3) Resultados

O resultado clinico evidenciou que no grupo em que as células MSCs forma usadas houve uma inflamação local e em alguns casos com a derme se destacando apresentando um tecido inflamatório abaixo (Fig. 3).

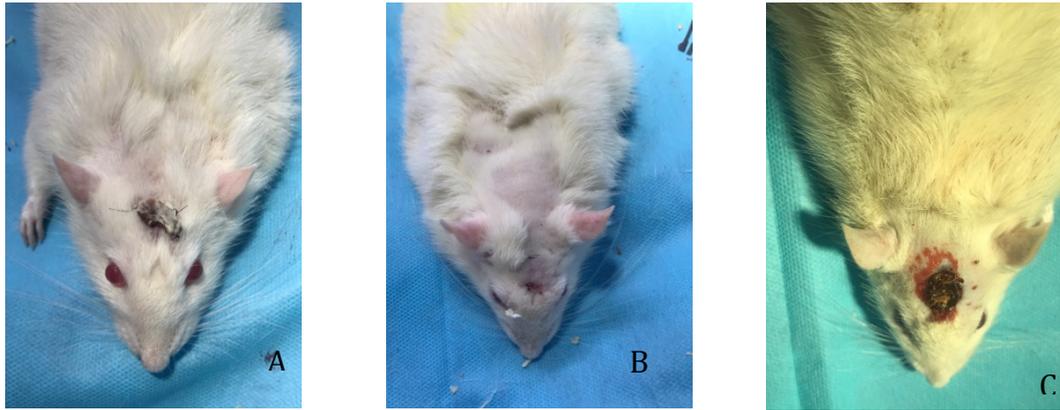


Fig. 3. Animais com 14 dpi anestesiados para eutanásia. A) Grupo M BMSC com discreta inflamação no local da cirurgia com cicatriz e discamacao da derme. B) Grupo controle ausência ou mínima inflamação local C) Grupo MSC , a derme apresenta-se deslocando com inflamação local.

3.1) Isolamento e caracterização das células–tronco mesenquimais

As células foram usadas na quinta passagem quando apresentavam-se uniformes. As células demoraram aproximadamente 10 a 14 dias para atingir a confluência e sofrer nova tripsinização. Antes de serem usadas foi feita a contagem celular com auxílio de uma câmara de Neubauer. A figura 4 demonstra as características das MSC durante o cultivo celular.

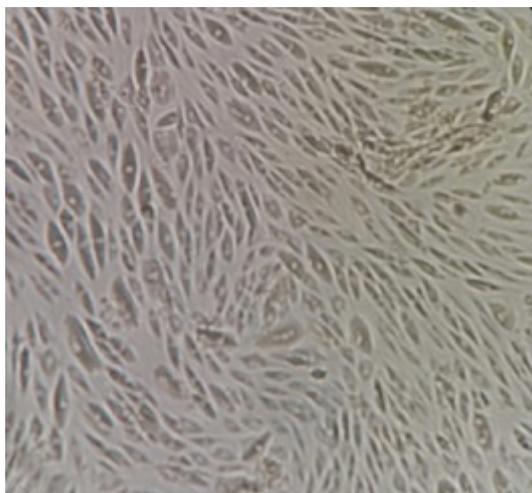
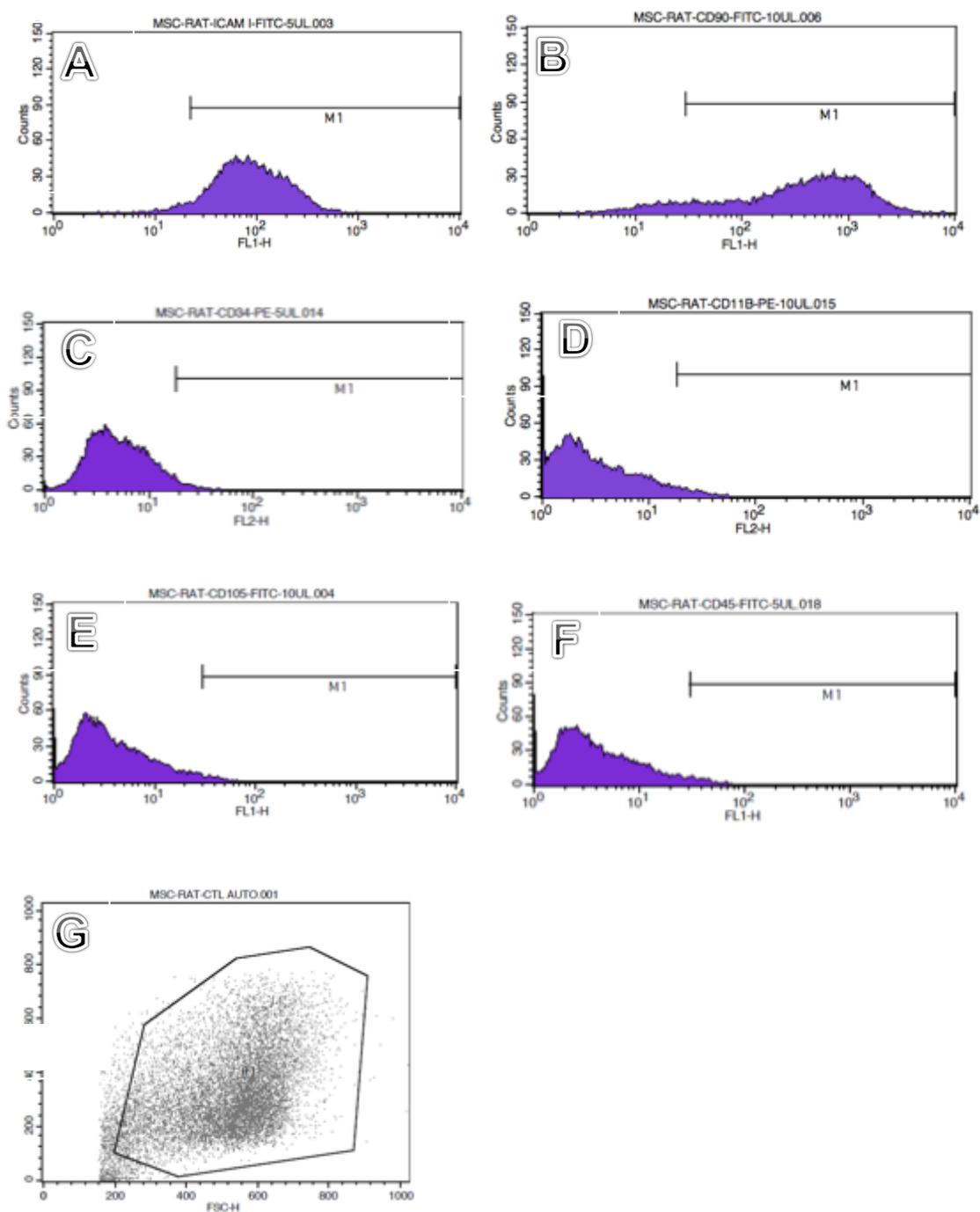


Fig. 4. Células MSC em confluência durante a cultura celular.

3.1.1) Citometria de fluxo

Não há um marcador único que caracterize as MSCs. As células usadas cumpriram os quesitos de marcadores de superfície de membrana negativo e positivo como demonstra os gráficos abaixo (fig. 5).



Figs. 5 A e B) Figuras demonstrando os marcadores positivos ICAM 1 e CD 90
C, D, E,F) Marcadores negativos gráficos com marcadores negativos CD11b, CD11b,
CD105, CD34 G) Figura do volume total de células utilizado para análise.

3.1.2) Diferenciação e marcação para linhagem osteogênica e adipogênica

As células foram capazes de se diferenciar nas linhagens osteogênicas, condrôgenicas e adipogênicas, característica das MSCs. Este teste corrobora com a citometria de fluxo demonstrando que as células usadas são MSCs² (fig. 6).

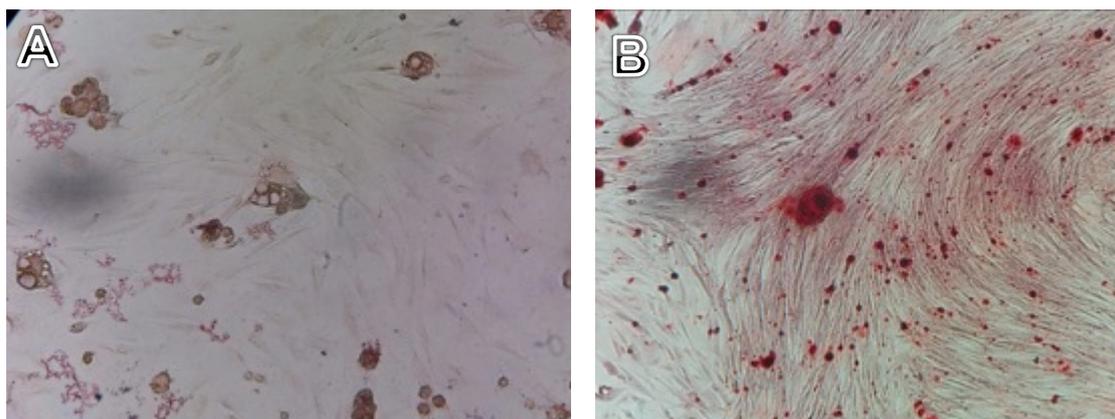


Fig. 6. A) Células diferenciadas em adipócitos B) Células diferenciadas em osteócitos.

3.1.3) Descongelamento e desenvolvimento das ESC

As ESC possuem rápido crescimento e se desenvolveram em apenas uma semana. As células ao atingirem confluência foram tripsinizadas aliqüotadas e preparadas para o uso. A figura 7 demonstra dois momentos da cultura celular.

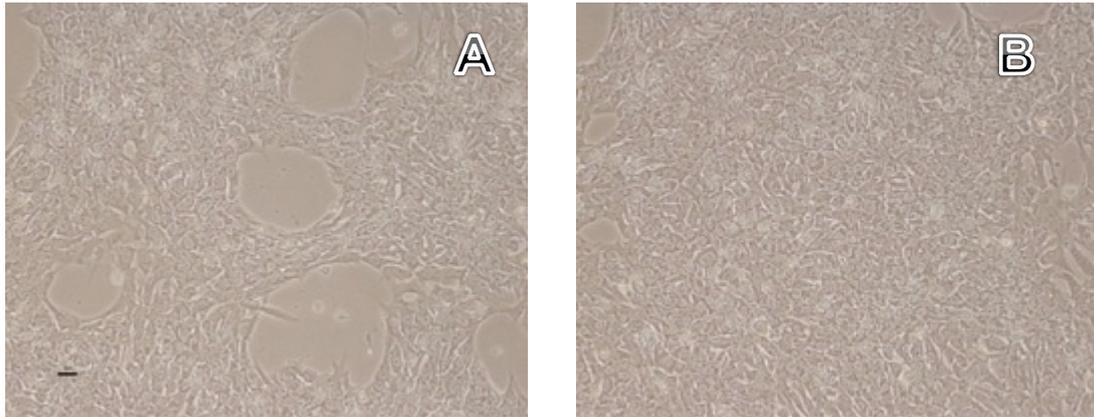


Fig.7. Aspecto histológico das hESC em 10x de aumento. A) As células crescem em contato formando ilhas acelulares, posteriormente começam a lançar prolongamentos com aspecto de estalactites para ocupar a área B) Aspecto com a confluência aproximadamente de 100%.

3.2.2) Histologia

Os enxertos sofreram um adelgaçamento em todos os casos. Na região central restou uma fina camada de conjuntivo ocluindo o defeito crítico, nos grupos em que houve uma formação *de novo* osso quase ou ocluindo a lesão, também a espessura do defeito era menor que o osso removido. (Fig. 8)

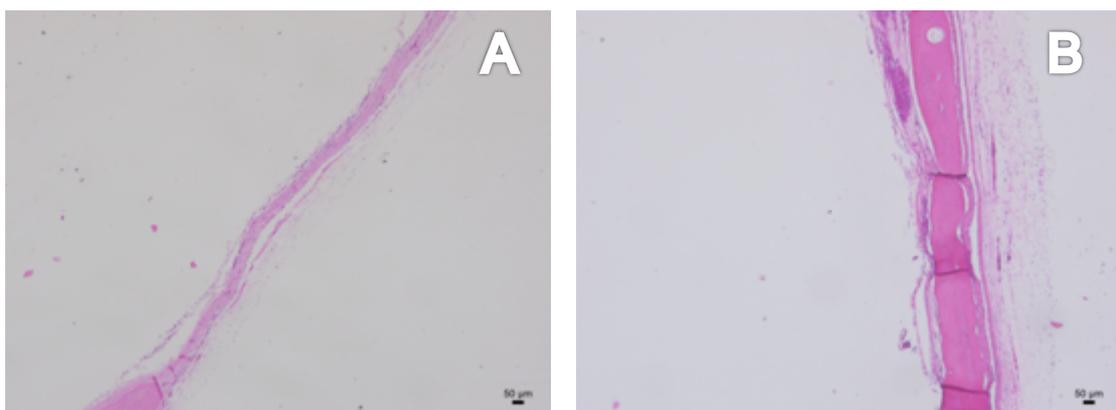
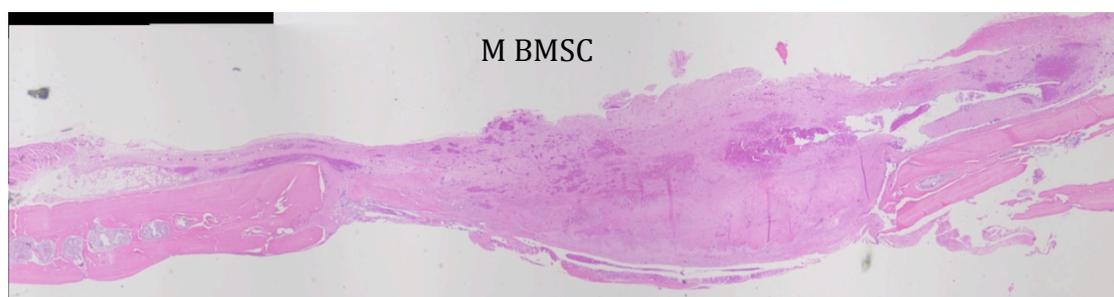
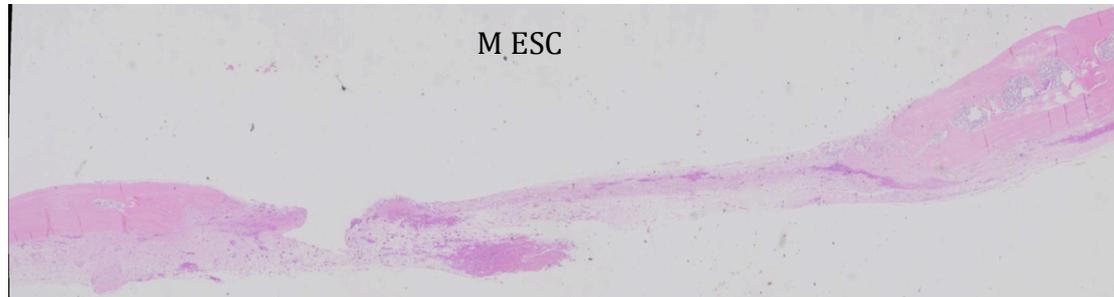
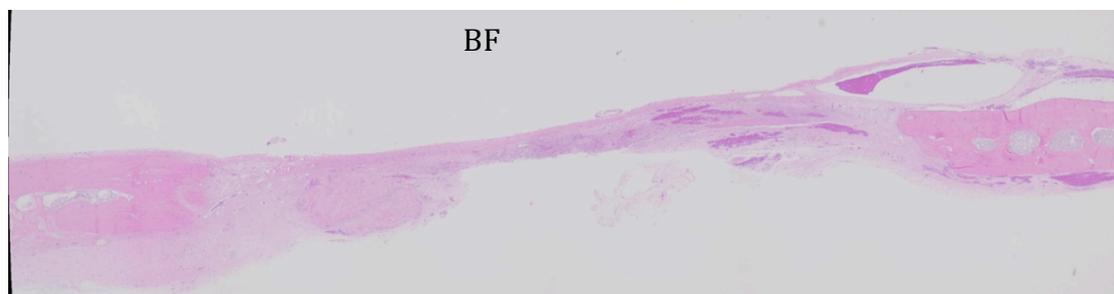
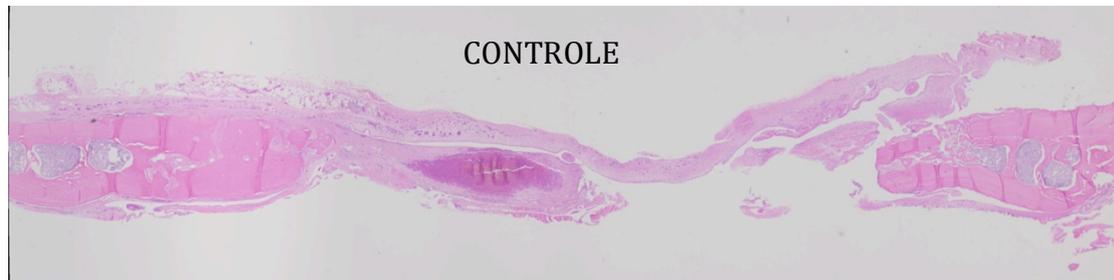


Fig.8. Aumento 5x HE A) Região central do defeito no grupo vazio com adelgaçamento do conjuntivo B) No grupo meio, formação de osso na região central.

Para melhor visualização dos resultados as lâminas histológicas foram fotografadas longitudinalmente e as imagens emendadas com o software autostich® 2.2 (Fig. 9).



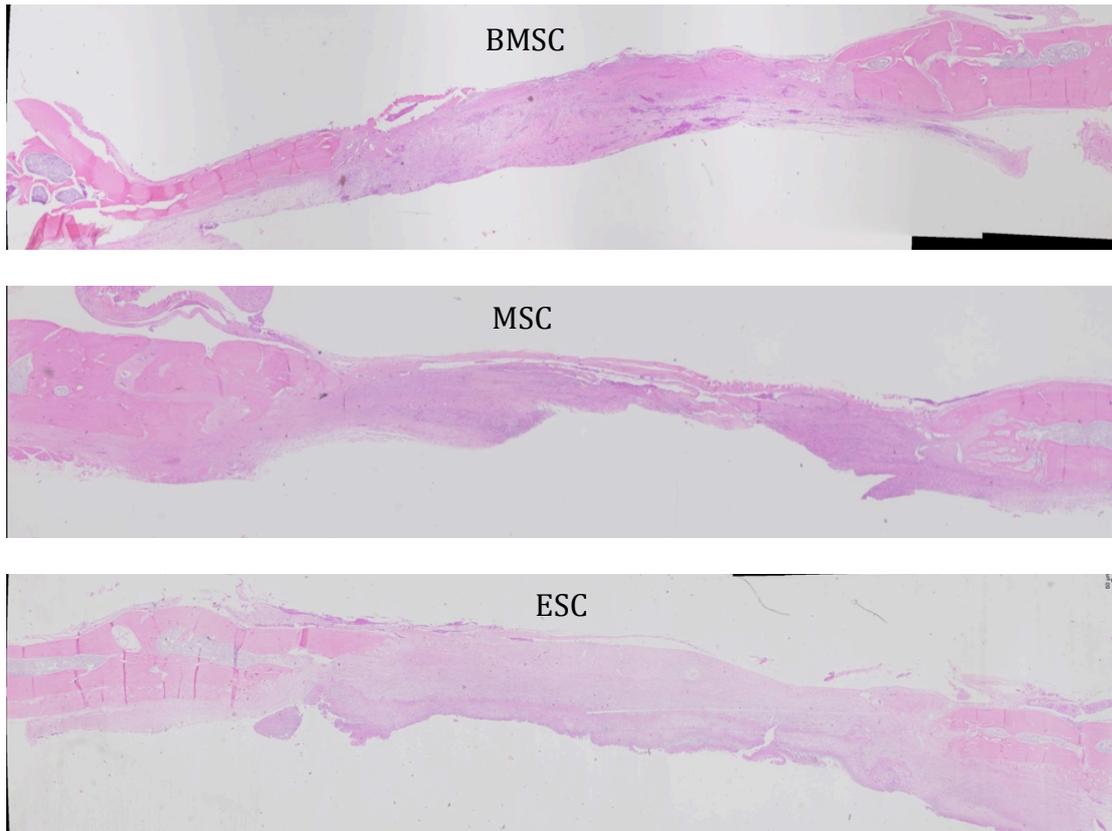
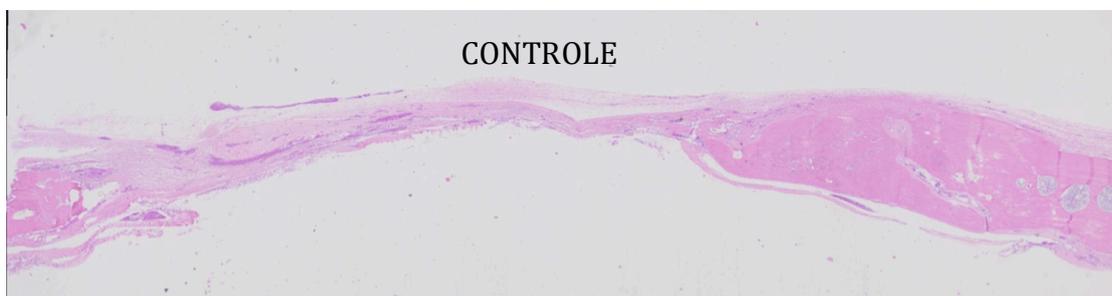


Fig. 9. Laminas inteiras com um animal representativo de cada grupo estudado aos 14 dpi, na ordem grupo Controle, BF, M ESC, M BMSC, BMSC, MSC e ESC. Observa-se um conjuntivo mais ou menos denso e adelgado com áreas de formação óssea na periferia do defeito.

Aos 54 dias os animais apresentaram formação de osso novo em maior e menor grau segundo ao tratamento realizado. (Fig. 10)



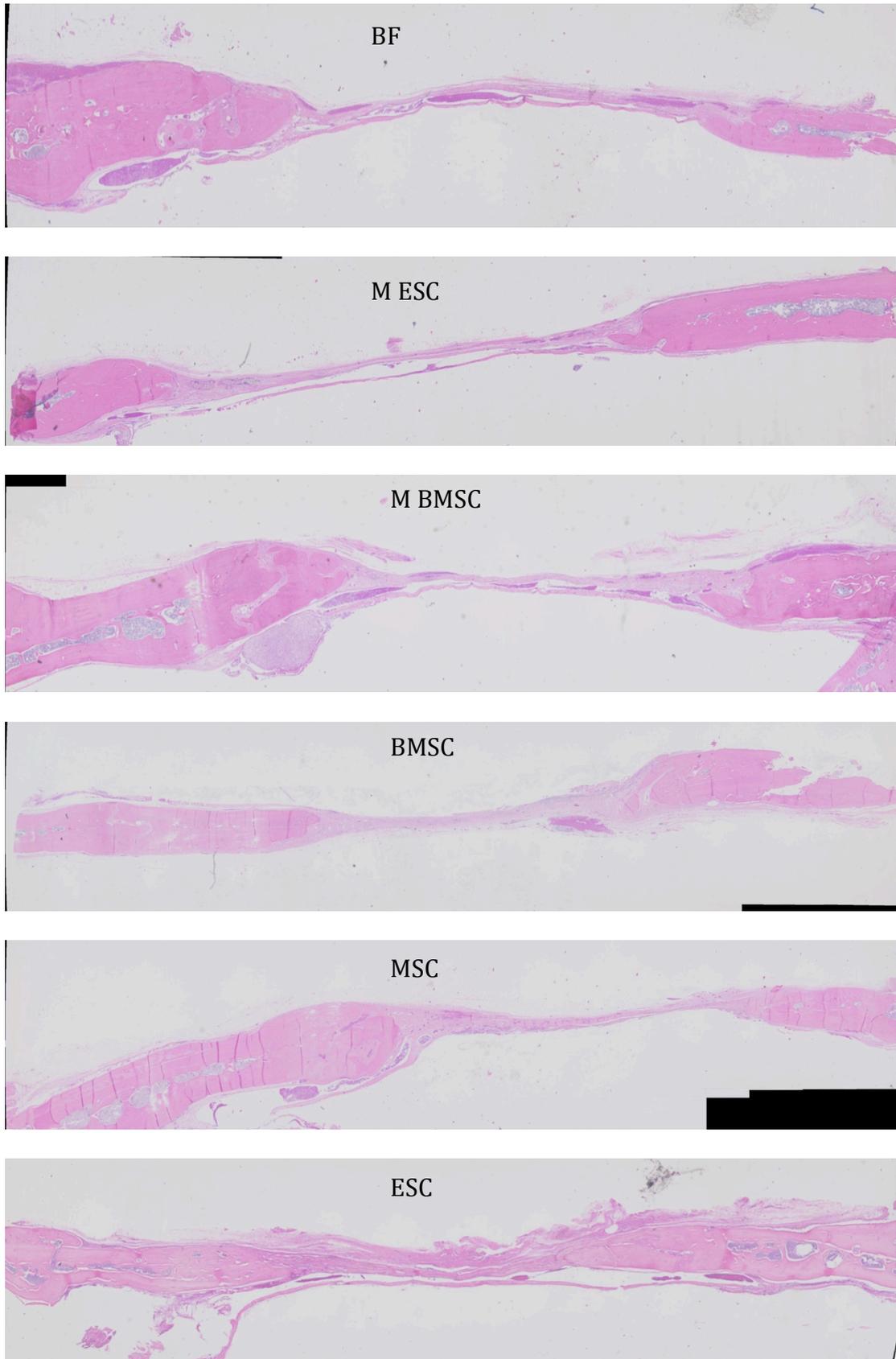


Fig. 10. Lâminas inteiras com um animal representativo de cada grupo estudado aos 54 dpi, na ordem grupo Controle, BF, M ESC, M BMSC, BMSC, MSC e ESC. Observa-se que

nenhum grupo conseguiu restabelecer com perfeição o osso removido cirurgicamente.

3.3) Morfometria

3.3.1) Morfometria do BF aos 14 dias

O BF tem função protetiva para a célula e o secretoma, entretanto sua lenta degradação pode atrapalhar o desenvolvimento da reparação e a rápida degradação expor os agentes biológicos antes do tempo. Assim foi calculado a quantidade de material remanescente por grupo aos 14 dpi (**tabela 2**).

Tabela. 2 Quantidade de **BF remanescente após 14 dpi** em cada grupo em porcentagem.

	BMSC	ESC	MSC	MESC	BF	MBMSC	Controle
BF	8,55	9,2	3,75	12,55	5,37	18,28	0

3.3.2) Morfometria do osso novo

A formação de osso novo como esperado aumentou dos 14 para os 54 dpi, o grupo ESC demonstrou o melhor resultado sem diferença estatística dos grupos MSC e e MBMSC (fig. 11).

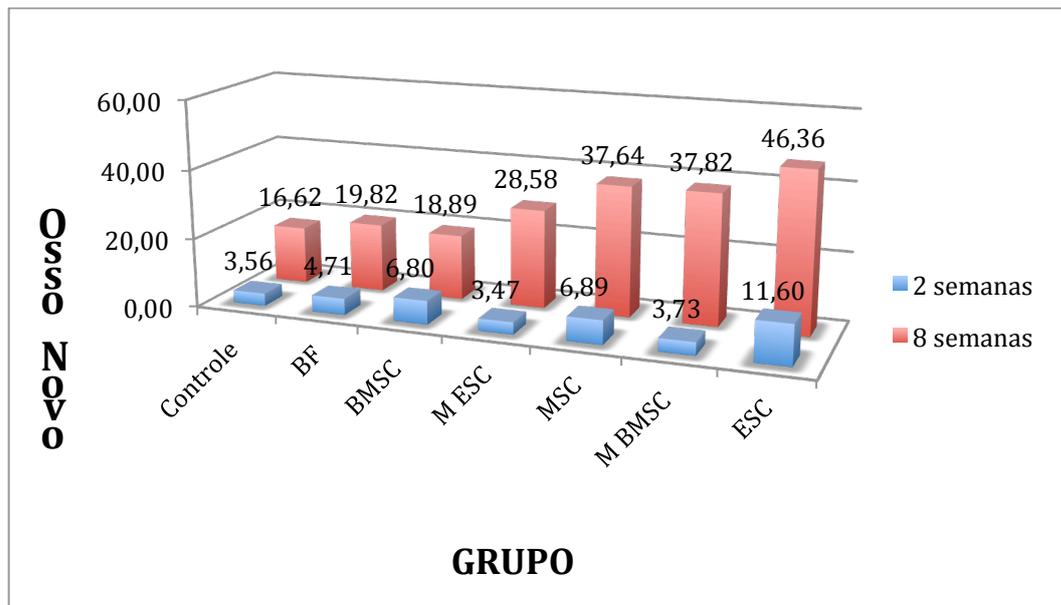


Fig. 11. Gráfico demonstrando a porcentagem do osso novo formado em cada grupo e período. O crescimento ósseo em azul na segunda semana e em vermelho na oitava semana.

3.4) Tomografia computadorizada

Tabela 2. Cálculo da escala de HU em cortes axiais com 2,6 mm de espessura medidas nas regiões centrais e periféricas do defeito crítico em tomadas radiográficas de tomografia computadorizada

	14 dias	54 dias
Controle	-406	-641
MSCr	-524	-608
ESC	-255	-518
BMSC	-142	-635
M ESC	-372	-572
M BMSC	-185	-653
BF	-501	-634

5) REFERÊNCIAS

1. MARTINS ACDO. Avaliação histomorfométrica comparativa do processo de reparo de defeitos ósseos perenes em calvária de ratos tratados com β -fosfato tricálcio, hidroxiapatita sintética, hidroxiapatita sintética + β -fosfato tricálcio e osso autógeno. 2010.
2. Gasparotto VP, Landim-Alvarenga FC, Oliveira AL, Simões GF, Lima-Neto JF, Barraviera, Ferreira-Jr RS. A new fibrin sealant as a three-dimensional scaffold candidate for mesenchymal stem cells *Stem Cell Research & Therapy* 2014; 5(3):78..