

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

**DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS
MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL CANINO**

Talita Floering Brêda Souza
Médica Veterinária

Araçatuba – SP
2013

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

**DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS
MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL CANINO**

Talita Floering Brêda Souza

Orientador: Prof. Adj. Alexandre Lima de Andrade

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal (Fisiopatologia Médica e Cirúrgica).

ARAÇATUBA – SP
2013

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

TALITA FLOERING BRÊDA SOUZA – nascida em Maceió, em 20 de março de 1982, iniciou e concluiu o Curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco (2000 – 2005), como primeira aluna da turma. Durante o período acadêmico desenvolveu atividades relacionadas à pesquisa como estágios extracurriculares e curriculares, monitoria e participação em projetos de pesquisa, sendo integrante do Programa Institucional de Bolsas concedido pela Capes/Pibic CNPq a alunos pesquisadores, tendo durante todo o período acadêmico desenvolvido trabalhos científicos e participado de projetos científicos relacionados à área acadêmica. Realizou Residência na área de Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária na Unesp-Araçatuba de 2006 a 2008. Iniciou e concluiu o Curso de Mestrado pela Universidade Estadual Paulista (2008-2010) no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Unesp, Câmpus Araçatuba, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica, tendo sido classificada como primeira aluna na seleção. Foi bolsista da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Durante o período de pós-graduação a aluna continuou a desenvolver projetos junto ao orientador, que resultaram em trabalhos científicos, além de participar como co-autora de projetos de outros discentes. Realizou estágio de docência, como parte de iniciação à docência, tendo colaborado nas aulas práticas e teóricas da disciplina de Clínica Cirúrgica de Pequenos Animais. Iniciou em 2010 o Curso de Doutorado pela Universidade Estadual Paulista no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal – Unesp, Câmpus Araçatuba, área de concentração Fisiopatologia Médica e Cirúrgica. Integralizou os créditos em 2012, tendo desenvolvido seu projeto de pesquisa durante o ano de 2010 a 2013, o qual resultou na presente Tese.

EPÍGRAFE

“Os cães vivem menos que as pessoas, pois já nascem sabendo o que a maioria dos homens leva mais de uma vida para aprender:
AMAR INCONDICIONALMENTE!”
(Autor desconhecido)

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese...

...às pessoas que mais amo: meu marido, Gabriel, meu filho Guilherme, meus pais, José Domingos e Sônia e minha irmã, Lívia, com todo amor, respeito e gratidão e por tudo que representam em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Papai do Céu pela vida e pelo privilégio de ter me tornado uma Medica Veterinária. Por estar presente e apoiando tudo para realização deste trabalho.

Ao meu marido e amigo, Gabriel, pelo amor, companheirismo, paciência e colaboração 30 horas por dia tanto no trabalho como em casa, e por me dar a melhor coisa de nossas vidas: Guilherme.

Ao meu filho, Guilherme, por simplesmente fazer parte das nossas vidas e fazê-la valer ainda mais a pena. Por ter sido um anjinho de tão calmo facilitando a finalização deste trabalho.

Aos meus pais (Sônia e Domingos) por me darem todo amor, apoio e conforto necessários e por estarem presentes sempre que precisei. A minha irmã por estar mais próxima a mim me dando todo apoio, bem como ao meu cunhado, Gustavo, por fazer parte de nossa família. Aos meus avós todo amor...

A toda a família do Gabriel que agora é também minha família, em especial meus sogros (Valter e Cida), cunhados (Thiago e Luana) e avós.

Ao meu orientador professor, Alexandre Lima de Andrade, pela orientação e oportunidade de fazer o que gosto, além da permissão de exercer a docência neste período, isto me permitiu um enorme amadurecimento. E, sobretudo pela paciência durante esta trajetória à distância.

À professora Tereza Cristina por possibilitar a realização do cultivo celular e de toda a parte experimental. Pela paciência e dedicação com que me deu orientações sobre um tema tão novo para mim.

À professora Suely Regina Mogami Bomfim pelos ensinamentos e conselhos na realização da parte experimental para obtenção do PRP.

A Gabriel Ferreira e Silmara Sakamoto, que executaram muitas tarefas na minha ausência, tanto no que se refere à execução do projeto, quanto a procedimentos burocráticos ligados a pós-graduação.

A todos os amigos de Araçatuba que vêm juntos desde o mestrado Silmara, Juliana Tesália, Acácio, Caio, Juliana Peloi, Karina, Bia, Lucila.

Ao Acácio e Alex, proprietários que autorizaram a realização da cesariana em suas cadelas para a colheita dos cordões umbilicais.

A todos os professores do Hospital Veterinário, em especial à professora Flávia, pelos ensinamentos, conselhos, orientações e sobretudo pelo apoio e incentivo nesta fase difícil.

Aos meus “filhos” Preta, Trakinas, Neguinho e Tata.

Aos professores Marcelo Vasconcelos e Caris Nunes por cederem seus laboratórios para preparação do PRP.

A todos os funcionários do Hospital Veterinário que direta ou indiretamente me ajudaram no decorrer deste projeto.

Ao Centro Universitário de Rio Preto (UNIRP), pelas liberações para realização do Doutorado.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Hospital Veterinário “ Dr. Halim Atique” Carla, Karina, Tatianna, Lívia, Cândice, Lucas, Alfredo, Tatiana Cruvinel, Rodrigo Storti, Juliana, Letícia, Bruno e Igor pelo apoio.

À Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realização do doutorado.

A todos que, por algum motivo, deixaram de ser citados, mas que também contribuíram neste trabalho.

SUMÁRIO

Assunto	Página
I - INTRODUÇÃO	15
II - REVISÃO DE LITERATURA.....	18
Tecido ósseo	18
Diferenciação celular e fatores de crescimento.....	18
Plasma rico em plaquetas (PRP).....	25
Matriz óssea desmineralizada (MOD).....	27
Marcadores de diferenciação óssea.....	28
III OBJETIVOS.....	30
IV – MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
Obtenção das células mesenquimais do cordão umbilical.....	31
Cultivo das células do cordão umbilical.....	32
Caracterização das células mesenquimais caninas oriundas da geleia de Wharton.....	33
Preparo do plasma rico em plaquetas (PRP).....	36
Obtenção da matriz óssea desmineralizada (MOD).....	38
Grupos experimentais.....	38
Coloração pelo vermelho de Alizarina.....	39
Dosagem de fosfatase alcalina (FA).....	40
Expressão mRNA dos genes osteopontina, osteocalcina e Runx 2 pela técnica reação em cadeia da polimerase em tempo real.....	40
Cálculo da expressão gênica relativa.....	41
Avaliação estatística.....	43
V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
VI – CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conjunto de primers utilizados na amplificação PCR em tempo real..... **42**

Tabela 2 - Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da expressão RNAm referente ao gene Runx 2 segundo o grupo e momentos.....**55**

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Potencial de diferenciação das células mesenquimais em diferentes tecidos (Fonte: domínio público, Google).....	20
FIGURA 2 - Locais de colheita de células mesenquimais do cordão umbilical (Modificado segundo TROYER; WEISS, 2008).....	20
FIGURA 3 - Sequência dos fatores de crescimentos requeridos durante a regeneração óssea (modificado segundo LIN et al., 2006). BMP: proteína óssea morfogenética; TGF- β : fator de crescimento transformador beta; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; FGF: fator de crescimento de fibroblasto; IGF: fator de crescimento semelhante a insulina.....	21
FIGURA 4- (a). Visualização do cordão umbilical canino “in situ”; (b). ligadura da porção fetal e 1/3 da porção materna do cordão umbilical canino contendo: veias, artéria, substância fundamental (geléia de Wharton) e anexos placentários.....	32
FIGURA 5- (a). Porção do cordão umbilical isolada para a obtenção de células endoteliais, substância fundamental no espaço perivascular; (b). Remoção asséptica das células endoteliais, substância fundamental e conteúdo de artéria e veias para o início do isolamento das células mesenquimais caninas; (c). Aspecto do cordão em garrafas de cultivo celular após a remoção da geléia de Wharton.....	33
FIGURA 6 - Imagem ilustrativa do preparo do PRP em laboratório até sua utilização. (a). Sedimentação obtida após a primeira centrifugação. (b). Separação do plasma sobrenadante juntamente com a capa leucocitária para segunda centrifugação. (c). Sedimentação após a segunda centrifugação, com visualização do PRP ao fundo do tubo.....	37
FIGURA 7 - Caracterização morfológica das células mesenquimais indiferenciadas caninas provenientes da geléia de Wharton do cordão umbilical: (a.) Aspecto das células aderidas após cinco dias de cultivo inicial coradas com hematoxilina Harris; (b.) Aspecto alongado, fusiforme das células após a décima passagem (P10); (c.) Citometria de fluxo acústica das células na décima passagem revelando o fenótipo na décima passagem; (d.) contagem do número de células em cada passagem confirmando aumento das mesmas.....	47
FIGURA 8 - Caracterização fenotípica e genotípica das células mesenquimais caninas isoladas do cordão umbilical após a décima passagem. (a.) Diferenciação em osteócitos com depósitos de cálcio pela coloração da Alizarina; (b.) Diferenciação em condrócitos com a coloração da Safranina O revelando os aminoglicosaminoglicos; (c.) Diferenciação em adipócitos confirmado pela coloração Oil red com depósitos lipídicos em vermelho; (d.) Cariótipo das células mesenquimais compatível com <i>Canis familiaris</i>	48
FIGURA 9 - Fotomicrografias, contraste de fase microscópio Olympus IX-70 (Tokyo, Japão) aumento x 20, visualizando a coloração Vermelho de Alizarina confirmando deposição e mineralização da matriz extracelular. Gráfico da mensuração da	

fosfatase alcalina (absorvância nm) em cultivo de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos sem adição de meios osteoindutivos, ao longo do tempo. G-Controle: Células mesenquimais; G-PRP: células mesenquimais mais PRP; G-MOD: células mesenquimais mais MOD e G-PRP+MOD: células mesenquimais mais PRP e MOD.....	53
FIGURA 10 - Expressão do mRNA das proteínas OPN, Osteocalcina e Runx 2, em cultivo de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos aos 7 dias pós cultivo.....	56
FIGURA 11 - Expressão do mRNA das proteínas Osteopontina, Osteocalcina e Runx 2, em cultivo de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos aos 14 dias pós cultivo.....	57
FIGURA 12 - Expressão do mRNA das proteínas Osteopontina, Osteocalcina e Runx 2, em cultivo de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos aos 21 dias pós cultivo.....	58
FIGURA 13 - Gráfico da análise de regressão da expressão de RNAm Runx2 (fator de transcrição 2) em cultivo de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos sem adição de meios osteoindutivos, ao longo do tempo.....	59

DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DO CORDÃO UMBILICAL CANINO

RESUMO – o presente trabalho teve por objetivo isolar células mesenquimais da geléia de Wharton do cordão umbilical canino e avaliar, *in vitro*, o efeito do plasma rico em plaquetas (PRP) e da matriz óssea desmineralizada (MOD) na diferenciação osteogênica destas células na ausência de meio osteoindutor. As células foram isoladas e caracterizadas como células mesenquimais indiferenciadas com fenótipo semelhante a de fibroblastos e fenótipo característico confirmado pela citometria de fluxo com CD44+, CD105+, CD271+, CD34- e CD45-; além da habilidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteócitos. Com exceção do grupo controle (células mesenquimais), em todos os grupos, G-PRP (células mesenquimais e PRP), G-MOD (células mesenquimais e MOD) e G-PRP+MOD (células mesenquimais e PRP + MOD), houve diferenciação osteoblástica com produção de matriz óssea mineralizada, confirmada pela coloração vermelho de Alizarina. A dosagem de fosfatase alcalina (FA) aumentou aos 14 dias em todos os grupos, com redução temporal subsequente. Proteínas ósseas foram expressas na reação em cadeia da polimerase em tempo real e puderam confirmar a diferenciação óssea em todos os grupos. A osteopontina teve sua maior expressão no G-PRP aos sete dias, seguido do grupo G-PRP+MOD; nos demais momentos, o G-PRP+MOD apresentou maior expressão que os demais grupos. A osteocalcina e o Runx2 estiveram expressas mais intensamente no

G-PRP+MOD, ao final do experimento. Pode-se concluir que o PRP e a MOD são capazes de promover osteoindução em células mesenquimais da geleia de Wharton do cordão umbilical canino, com superioridade na presença da MOD.

Palavras-chave: Cães, fator de crescimento transformador beta, osteogênese, osso e ossos e plasma rico em plaquetas

OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MESENCHYMAL CELLS FROM CANINE UMBILICAL CORD

SUMMARY – This study aimed to isolate MSCs from canine Wharton's jelly umbilical cord and evaluate in vitro the effect of PRP and the MOD in osteogenic differentiation of these cells in the absence of osteogenic medium. Cells were isolated and characterized as undifferentiated mesenchymal cells with a phenotype fibroblasts-like and characteristic phenotype of confirmed by flow cytometry with CD44 +, CD105 +, CD271 +, CD34-and CD45-, plus the ability to differentiate into adipocytes, chondrocytes and osteocytes. Except for the control group (MSCs), in all groups, G-PRP (PRP and MSCs), G-DBM (DBM and MSCs) and G-PRP + DBM (MSCs and PRP + DBM) was differentiation osteoblastic with production of mineralized bone matrix confirmed by Alizarin red staining. The measurement of alkaline phosphatase (AP) increased up to 14 days in all groups. Bone proteins were expressed in the polymerase chain reaction in real time and were able to confirm the differentiation bone in all groups. Osteopontin had its greatest expression in G-PRP to seven days followed by G-PRP + DBM, at other times the G-PRP + DBM had higher expression than the other groups. The osteocalcin and Runx2 were expressed more intensely in the G-PRP + DBM at the end of the experiment. It can be concluded that the PRP and DBM are capable of promoting osteogenesis mesenchymal cells in Wharton's jelly of the umbilical cord with canine, with advantage in the presence of DBM.

Key-works: Dogs, transforming growth factor beta, osteogenesis, bone and bones and platelet rich plasma

I. INTRODUÇÃO

Atualmente, inúmeros pacientes, quer sejam homem ou animais, sofrem de afecções ósseas e necessitam de intervenções cirúrgicas, onde os grandes defeitos ósseos representam um dos maiores desafios para os cirurgiões (LORO, 2009; OLIVEIRA et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Entre os tratamentos existentes, a engenharia tecidual vem ganhando destaque com alternativas estratégicas para a regeneração óssea e três componentes têm sido postulados como essenciais: isolamento e expansão de osteoprogenitores ou células-tronco, presença de fatores osteoindutores apropriados e um meio que mimetize o ambiente propício à regeneração óssea (HANDSCHEL et al., 2010; PARTRIDGE et al., 2002). Entre eles, os fatores de crescimento representam um dos elementos essenciais em combinação com células osteoprogenitoras e estabilização mecânica (DEVESCOVI et al., 2008).

Materiais biológicos têm sido testados para auxiliar nessas intercorrências, sendo alguns utilizados para corrigir defeitos ósseos e outros para recobrir implantes. Diante da relevância desses materiais, a capacidade osteoindutora e/ou osteocondutora vem sendo avaliada. Materiais autólogos ou homólogos frescos e/ou preservados representam alternativa com baixo custo, fácil execução e praticidade de uso clínico (SILVA et al., 2003; SOUZA et al., 2012).

Citam-se, entre eles, a matriz óssea desmineralizada (MOD) que é rica em proteínas ósseas morfogenéticas com alto potencial osteoindutor *in vivo*. O uso de enxertos ósseos homólogos mineralizados e desmineralizados produz resultados similares, embora o padrão do primeiro seja osteocondutor, ao passo que do segundo tenha efeito osteoindutor (SILVA et al., 2003).

O plasma rico em plaquetas (PRP) autógeno consiste numa concentração de plaquetas em pequeno volume de plasma, obtido a partir da centrifugação de sangue total. É utilizado na prática clínica por estimular a

reparação óssea em diversas situações, por conter elevada concentração de fatores de crescimento (fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF, fator de crescimento transformador beta – TGF β e fator de crescimento semelhante à insulina - IGF). Ainda, estão presentes proteínas osteocondutoras (fibrina, fibronectina e vitronectina), que servem de matriz para migração celular, favorecendo a osteocondução e a osteointegração (HENDERSON et al., 2003; OBARRIO et al., 2000; PRADEEP et al., 2009; SOUZA et al., 2012).

Estudos comparativos demonstraram que a utilização do PRP, associada ou não, a outros tipos de enxerto abrevia o tempo requerido para consolidação óssea, com intensa neoformação óssea, maior invasão vascular e melhor remodelamento do enxerto (GERARD et al., 2007; PRADEEP et al., 2009; SANCHEZ et al., 2003; SOUZA et al., 2012).

Células osteoprogenitoras e células-tronco da medula óssea foram marcadas com anticorpos de receptores de membrana para PDGFs e TGF- β (MARX et al., 1998). Além disso, foi observada maior imunomarcagem do PDGF-B e TGF- β nos focos de fraturas experimentais de cães tratados com PRP (SOUZA et al., 2012).

Estudos preliminares *in vitro* foram conduzidos na medicina e odontologia humanas na tentativa de determinar a real ação dos fatores de crescimento na diferenciação de células mesenquimais em células ósseas (SHAN et al., 2009), bem como, na mitogênese de osteoblastos e células do ligamento periodontal (KAWASE et al., 2003; LEE et al., 2011; MARKOPOULOU et al., 2009; OKUDA et al., 2003; PAPADOPOULOS et al., 2003).

Células mesenquimais indiferenciadas podem ser embrionárias, do cordão umbilical e da medula óssea (células adultas). Todas são pluripotentes, entretanto, a capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação diminui com a idade, o que valoriza o uso de células embriogênicas diante de sua potencialidade e alta capacidade em fornecer células osteoprogenitoras e osteoblastos de forma ilimitada (HANDSCHEL et al., 2006). Entretanto, as

células do cordão umbilical mostraram-se alternativa promissora em substituição às células embrionárias no que se refere à regeneração óssea (HANDSCHEL et al., 2010).

Estudos experimentais em cães revelaram reparação óssea mais rápida quando utilizadas células da medula óssea em osteotomias do rádio (OLIVEIRA et al., 2010). *In vitro*, as células da medula óssea humana diferenciaram-se em células ósseas na presença de meios osteoindutores comerciais ou de matriz óssea liofilizada (LORO, 2009). As células do cordão umbilical canino foram isoladas e mantiveram características de células mesenquimais indiferenciadas (SEO et al., 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o efeito osteoindutor, *in vitro*, da MOD e do PRP, isolados ou em associação, sobre células mesenquimais indiferenciadas obtidas da geleia de Wharton do cordão umbilical canino, na ausência de meios osteoindutores. Sendo assim, buscou-se associação promissora de fácil obtenção para uso clínico. Hipotetizou-se que a associação do PRP e MOD promoveria maior diferenciação osteoblástica em cultivo de células mesenquimais obtidas da geleia de Wharton.

II REVISÃO DA LITERATURA

Tecido ósseo

O tecido ósseo é metabolicamente ativo e sofre contínuo processo de renovação e remodelação. Assim, ele modifica sua estrutura em resposta aos estresses internos e externos, além de possuir habilidade regenerativa e adaptativa (PARALKAR et al., 2003; RAISZ, 1999).

O osso é composto de material orgânico (30%) no qual se incluem células osteogênicas e a matriz orgânica, além de material mineral (70%) que consiste de cálcio e fósforo em forma de cristais de hidroxiapatita que, associado ao colágeno, responde pela dureza e resistência óssea. Três tipos de células (os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos) agem para a manutenção da atividade deste tecido especializado (RAISZ, 1999).

Os osteoblastos são células cuboides, geralmente encontrados na forma de folhetos unicelulares, que secretam matriz óssea não mineralizada ao longo da superfície óssea. Os osteócitos são células fusiformes resultantes do aprisionamento de osteoblastos na matriz óssea recém produzida, estando abrigados em lacunas individuais e responsáveis pela manutenção da matriz. Os osteoclastos são células móveis, gigantes, extensamente ramificadas e, geralmente, multinucleadas, muito próximas uma das outras, formando camadas até próximo à superfície óssea. Realizam a reabsorção óssea no momento de fraturas e continuamente na manutenção do equilíbrio do metabolismo ósseo (DATTA et al., 2008; RAISZ, 1999).

Diferenciação celular e fatores de crescimento

O adequado processo de reparação óssea envolve a diferenciação osteoblástica que por sua vez é modulada por interações nas células mesenquimais indiferenciadas (denominadas de osteoprogenitoras), a matriz envolvida e grande quantidade de fatores solúveis, incluindo fatores de

crescimento, interleucinas, ácido retinóico, glicocorticóides, estrógeno, hormônios da paratireóide, vitamina D e tiroxina (DEVESCOVI et al., 2008; RAISZ, 1999; SANDY et al., 1998).

As células mesenquimais indiferenciadas foram, originalmente, identificadas por Alexander Friedenstein e colaboradores (1966) a partir de células mononucleares da medula óssea de camundongos. Elas são encontradas em pequenas quantidades, mas podem ser isoladas e expandidas por técnicas de cultivo celular. Quando induzidas, podem se diferenciar em múltiplas linhagens com grande potencial para o uso na regeneração de tecidos e órgãos (PREVSNER-FISCHER et al., 2011) (FIGURA 1). Elas podem ser embrionárias, do cordão umbilical e da medula óssea (células adultas). Todas, sem exceção, são pluripotentes, entretanto, sua capacidade de proliferação, auto-renovação e diferenciação diminui com a idade do doador, o que destaca as células embrionárias para o uso em reconstruções ósseas por sua potencialidade e alta capacidade em fornecer células osteoprogenitoras e osteoblastos de forma ilimitada (HANDSCHEL et al., 2006). As células do cordão umbilical mostraram-se alternativa promissora às células embrionárias no que se refere à regeneração óssea, em virtude da semelhança entre as mesmas (FIGURA 2) (HANDSCHEL et al., 2010; TROYER; WEISS, 2008).

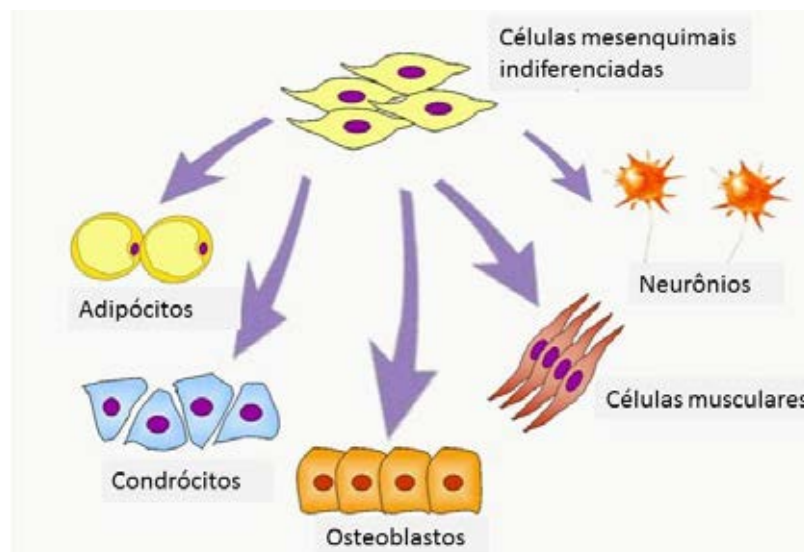


FIGURA 1- Potencial de diferenciação das células mesenquimais em diferentes tipos celulares (Fonte: modificado segundo MEREGALLI et al., 2011).

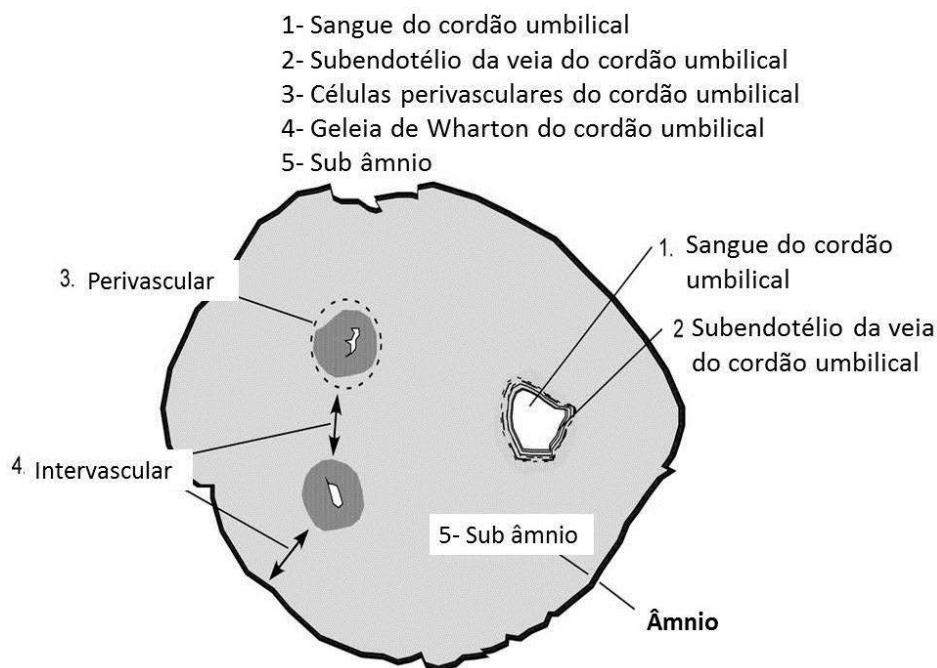


FIGURA 2- Locais de colheita de células mesenquimais do cordão umbilical (Modificado segundo TROYER; WEISS, 2008).

Os principais fatores de crescimento com ação no tecido ósseo são: as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), TGF- β , PDGF, IGF-I, IGF-II, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (DEVESCOVI et al., 2008; MUSCHLER; MIDURA, 2002; ROSIER et al., 1998; SANDY et al., 1998). A FIGURA 3 apresenta esquema com a sequência dos fatores de crescimento requerida durante o processo de reparação óssea.

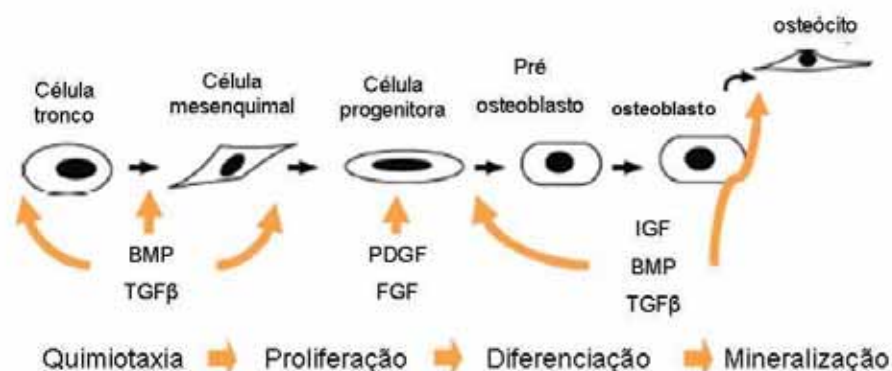


FIGURA 3- Sequência dos fatores de crescimentos requeridos durante a regeneração óssea **BMP**: proteína óssea morfogenética; **TGF-β**: fator de crescimento transformador beta; **PDGF**: fator de crescimento derivado de plaquetas; **FGF**: fator de crescimento de fibroblasto; **IGF**: fator de crescimento semelhante a insulina. (Fonte: Modificado segundo LIN et al., 2006).

Fatores de crescimento (FC) constituem-se em polipeptídeos específicos, presentes no plasma e em alguns tecidos, que regulam a diferenciação e a proliferação celulares e, portanto, a regeneração e cicatrização dos tecidos (WILTFANG et al., 2004).

Os osteoblastos produzem muitos desses FC que podem ter ação parácrina (influenciam células vizinhas com diferentes fenótipos) ou autócrina (influenciam células de sua origem e mesmo fenótipo) (DEVESCOVI et al., 2008; MARX, 2004). Eles desempenham sua função em concentrações muito baixas nos líquidos corporais, da ordem de picogramas. Ligam-se à receptores na célula alvo e induzem sinal de transdução intracelular que atinge o núcleo gerando respostas por meio da indução da expressão de genes (CHAUDHARY et al., 2004; DEVESCOVI et al., 2008; MARX, 2004; SANCHEZ et al., 2003).

Os FC que atuam no tecido ósseo têm origem local e/ou sistêmica. Os de origem local são secretados por células ósseas e se difundem no meio extracelular ou são armazenados na matriz calcificada, sendo recrutados, respectivamente, de forma imediata ou tardia em casos de injúria tissular. Os FC locais e sistêmicos atuam nas fases de inflamação, reparo e

remodelamento, durante a reparação óssea, exercendo funções importantes que variam de acordo com cada fator de crescimento (MILLIS, 1999).

A presença do PDGF e do TGF- β foi demonstrada no tecido ósseo de cães por imunomarcação com o emprego de anticorpos monoclonais na reparação óssea de ostectomias radiais experimentais (SOUZA et al., 2012). Também foi identificada a presença de receptores para esses fatores nas células osteoprogenitoras da medula óssea (MARX, 2001; MARX et al., 1998).

O PDGF é sintetizado pelas plaquetas e estocado em grânulos. É também produzido por osteoblastos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos. Ele é um polipeptídeo dimérico, produto dos PDGF A e B. Existem, portanto, três formas de PDGF: AA, BB e AB. O PDGF BB é mais mitogênico que o PDGF AB e esse, por sua vez, tem essa ação mais intensa que o PDGF AA. As plaquetas e o soro são ricos em PDGF AB e BB, enquanto os tecidos periféricos (esqueléticos e não esqueléticos) contêm principalmente PDGF AA (CANALIS et al., 1991; RUTKOWSKI et al., 2008). Esse FC possui pronunciada atividade mitogênica sobre células mesenquimais, incluindo fibroblastos e osteoblastos. Estimula, ainda, a expressão do TGF- β proveniente de macrófagos, além de angiogênese e quimiotaxia para macrófagos e fibroblastos (ANITUA et al., 2004; CANALIS et al., 1991; MARX et al., 1998; MILLIS, 1999; RUTKOWSKI et al., 2008). Apesar da sua potente ação mitogênica e quimiotática, o PDGF foi indicado como possível causador da redução de diferenciação osteogênica em estudo *in vitro* com células da medula óssea, uma vez que maior proliferação reduz a capacidade de diferenciação (GRUBER et al., 2004).

O primeiro fator de crescimento presente em ferimentos é o PDGF, e está presente mais intensamente na primeira semana da injúria (SOUZA et al., 2012). Inicia o processo de reparação, incluindo a consolidação óssea, emergindo da degranulação das plaquetas quando ocorre lesão tecidual (GARG, 1999; MARX et al., 1998).

O TGF- β , peptídeo sintetizado por alguns tecidos, é considerado uma superfamília de fatores de crescimento e diferenciação (ANITUA et al., 2004;

CANALIS et al., 1991; ROSIER et al., 1998). Age como fator de crescimento multifuncional com ação fisiológica celular e na embriogênese dos tecidos. A maior quantidade de TGF- β no organismo está presente na matriz óssea extracelular, produzido por osteoblastos. É encontrado, ainda, nas plaquetas, além de fibroblastos e macrófagos (MARTINEZ; WALKER, 1999; MILLIS, 1999; RUTKOWSKI et al., 2008).

O TGF- β é importante no recrutamento de células mesenquimais indiferenciadas para formação de calo ósseo. Participa dos processos inflamatórios e de reparação. Apresenta efeito mitogênico para fibroblastos e é potente estimulador de colágeno, fibronectina e produção de proteoglicanos pelos fibroblastos (MILLIS, 1999). Está em maior quantidade na fase de reparação óssea com intensa atividade osteoblástica (SOUZA et al., 2012). Possui grande espectro de ação de atividades celulares, incluindo controle da proliferação e da atividade metabólica de células precursoras mesenquimais ósseas, diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, além de exercer potente ação quimiotática para macrófagos (LIN et al., 2006; MARTINEZ; WALKER, 1999). Um estudo revelou que o TGF- β induziu formação cartilaginosa e óssea quando injetado pela via subperiosteal (ROSIER et al., 1998). Outro, no entanto, comprovou que ele teve ação na diferenciação inicial de condroblastos e osteoblastos, porém com efeito inibidor sobre a diferenciação terminal destas células (DEVESCOVE et al., 2008). O TGF- β pode influenciar negativamente a angiogênese, embora promova a produção das proteínas ósseas da matriz (ANITUA et al., 2004; DEVESCOVE et al., 2008).

O IGF é a única proteína que possui receptor de superfície específico. É o menor dos FCs e estimula diretamente a formação de matriz óssea e replicação de osteoblastos e seus precursores. Além de ser estocado nos grânulos das plaquetas, também é sintetizado por osteoblastos (ANITUA et al., 2004).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) são produzidas por células osteoprogenitoras, condrócitos e células endoteliais (BMP-2). Têm efeito

condro e osteogênico, sendo a BMP-2 e BMP-7 as mais osteoindutoras. Suas principais ações são migração de células mesenquimais indiferenciadas, indução da proliferação, diferenciação celular e síntese de matriz extracelular (DEVESCOVE et al., 2008).

Em cultivo de células embrionárias humanas, as BMPs foram expressas intensamente durante a diferenciação osteoblástica e por imunomarcação foi observado uma maior concentração nas áreas de agregação de nódulos para posterior formação óssea (KÄRNER et al., 2007).

Os fatores de crescimento podem interagir entre si e com outras substâncias, o que pode desencadear cascata de diferentes proteínas sinalizadoras, tornando seu mecanismo de ação complexo (SANDY et al., 1998).

No momento da injúria ao tecido ósseo, fatores de crescimento são liberados da matriz óssea e o coágulo formado na fase inflamatória propicia a liberação dos fatores de crescimento contidos nos grânulos das plaquetas (TGF- β , PDGF, VEGF e IGF). A migração de células osteoprogenitoras é intensificada pelas BMPs, PDGF, FGF e VEGF e a diferenciação osteoblástica é modulada pelos fatores TGF- β , IGF, BMP-6, BMP-2 e BMP-7. O FGF e o PDGF estimulam a proliferação de células do periósteo nos estágios iniciais da reparação óssea. (ANITUA et al., 2004; BOLANDER, 1992; DEVESCOVE et al., 2008).

Dereka et al. (2006) e Papadopoulos et al. (2003) avaliaram, respectivamente, o efeito mitogênico do PDGF-BB e do FGF em combinação com diferentes enxertos, e observaram resultados positivos em estudos preliminares com células do ligamento periodontal.

O efeito mitogênico dos FCs do PRP em osteoblastos humanos foi demonstrado ao utilizar-se culturas comerciais previamente estabilizadas (FERREIRA et al., 2005), e também em relato onde as células mesenquimais foram extraídas de osso alveolar com doença periodontal (MARKOPOULOU et al., 2009).

Estudos com BMP-2 e 7 demonstram incremento na diferenciação celular, na atividade de marcadores osteogênicos e maior mineralização óssea em cultura (BHAT et al., 2008; CHAUDHARY et al., 2004). Linhagens de células mesenquimais foram infectadas por adenovírus que carrega o gene BMP-2 humano e, após transdução, tornaram-se células que expressam a BMP-2, induzindo a diferenciação osteoblástica com formação e mineralização de matriz óssea (PARTRIDGE et al., 2002).

Plasma rico em plaquetas (PRP)

O PRP é obtido pela centrifugação de sangue total resultando em pequeno volume de plasma autólogo com a presença de FCs, além de proteínas favorecendo osteocondução e osteointegração (HENDERSON et al., 2003; MARX, 2004; OBARRIO et al., 2000). Por ser autógeno, impede a transmissão de doenças infecto-contagiosas e reações imunológicas (OBARRIO et al., 2000).

Para ser eficiente, o PRP deve promover incremento de, no mínimo, 338% no valor basal da contagem de plaquetas (MARX et al., 1998), com contagem final acima de 1.000.000. Entretanto, concentrações muito elevadas não demonstraram melhora na consolidação (MARX, 2001; MARX, 2004). Foi demonstrado que a quantidade de plaquetas, bem como a concentração dos FC contidos no PRP muda quando se comparam diferentes espécies (DOLDER et al., 2006). Dos diferentes FC contidos nos grânulos α das plaquetas (MARX, 2001; SANCHEZ et al., 2003; WROTONIAK et al., 2007), o TGF- β 1 foi o mais abundante no PRP de ratos, ovelha e do homem (DOLDER et al., 2006).

Estudos na odontologia foram conduzidos empregando-se o PRP, principalmente em pequenos enxertos ósseos na região alveolar, em cirurgias periodontais e maxilo-faciais com resultados clínicos positivos (GERARD et al., 2006; THORN et al., 2004; VENDRAMIN et al., 2006). Também, foi observada intensa redução de osteíte alveolar com o uso do PRP após extração dentária (RUTKOWSKI et al., 2007).

As plaquetas apresentam a desvantagem de ter vida média curta no enxerto, considerando-se o tempo que já permaneceram no sistema vascular. Elas se fragmentam totalmente em torno de três a cinco dias, e a atividade de seus fatores se extingue entre sete a dez dias (MARX, 2004; SCARSO FILHO et al., 2001).

O PRP pode ser obtido por diferentes protocolos necessitando de equipamentos com altos custos (MARX, 2004; OBARRIO et al., 2000). Mas, também pode ser obtido por técnicas relativamente simples e de custo mais baixo, como centrífuga laboratorial comum (RUTKOWSKI et al., 2008). O sangue a ser utilizado deve ser colhido em tubos contendo, preferencialmente, citrato de sódio, como anticoagulante (CAMARGO et al., 2002).

A manipulação do sangue durante a centrifugação deve ser realizada de forma cuidadosa, asséptica e processada em rotação adequada para assegurar a separação das células plaquetárias das demais presentes no sangue, além de evitar ruptura ou danos às suas membranas. A centrifugação pode ser realizada de maneira única ou repetida, em duas etapas (SOUZA et al., 2012).

Vários autores utilizaram única centrifugação alterando, entre eles, o número de rotações por minuto (rpm) e o tempo de centrifugação (CAMARGO et al., 2002; MARCHESANO, 2005). Há autores que utilizaram duas centrifugações sequenciais com resultados igualmente positivos (DIAS et al., 2002; OYAMA et al., 2004).

Após a extração do PRP, com o auxílio de uma pipeta, deve-se adicionar o gluconato ou cloreto de cálcio 10% para induzir coagulação, formação de gel, além da ativação das plaquetas (MARCHESANO, 2005; SOUZA et al., 2012), porém, ao término de três horas da centrifugação, apenas o PDGF mantém sua concentração, com decréscimo considerável do TGF- β (RUTKOWSKI et al., 2008).

A concentração do PRP adicionado à cultura interfere na sua capacidade mitogênica, sendo que baixas concentrações intensificaram a

proliferação de osteoblastos humanos em cultura (LEE et al., 2011; MARKOPOULOU et al., 2009).

O PRP contém FCs osteoindutores para células da medula óssea de ratos, mas pode haver variação entre as diferentes espécies (DOLDER et al., 2006). O PRP quando incubado em material de alginato, permite liberação gradual de seus fatores de crescimento e promove atividade osteoindutora *in vitro*, quando utilizado em culturas de células mesenquimais da medula óssea (LIN et al., 2006). *In vivo*, o PRP, associado a células mesenquimais da medula óssea, previamente expandidas em cultura, apresentou superioridade no tempo de consolidação de falhas ósseas no crânio de camundongos, quando comparado ao grupo controle (MONTEIRO et al., 2012).

Matriz óssea desmineralizada (MOD)

A matriz extracelular do osso é composta por 90% de proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (20% de osteocalcina (OCN), 20% de osteonectina, 12% de sialoproteínas, 10% de proteoglicanos, osteopontina (OPN), fibronectina, fatores de crescimento, BMPs, entre outros, sendo todas elas proteínas sintetizadas pelos osteoblastos (ANSELME, 2000).

O processo de desmineralização óssea expõe as BMPs, podendo ativá-las. Entretanto, comparações clínicas utilizando enxertos homólogos mineralizados e desmineralizados produzem resultados similares, embora o padrão do primeiro seja osteocondutor, enquanto do segundo é considerado osteoindutor (SCHWARTZ et al., 1998; SILVA et al., 2003). Quanto maior a desmineralização, ou seja, menor a quantidade de cálcio residual, maior é o potencial osteoindutor da MOD (TRAIANEDES et al., 2004; ZHANG et al., 1997).

A desmineralização ocorre por ação de substâncias ácidas, e os diferentes métodos para obtenção da MOD (DEL CARLO et al., 2003; SCHWARTZ et al., 1998), bem como a idade do doador podem interferir no potencial osteoindutor da mesma, sendo menor em pacientes idosos

(SCHWARTZ et al., 1998; TRAIANEDES et al., 2004; ZHANG et al., 1997), bem como o método de esterilização e o tipo de osso (DEVESCOVE et al., 2008).

O mecanismo da desmineralização pelo ácido clorídrico é pouco difundido, pois se trata de processo agressivo ao tecido ósseo com intensa destruição celular (DEL CARLO et al., 2003). Entretanto, a sua utilização a 0,6 N mostrou-se eficiente, tornando-o viável, de baixo custo, rápido e prático, não alterando o potencial osteoindutor da MOD (TRAIANEDES et al., 2004). Foi observada formação óssea ectópica quando implantada em tecido mole de coelhos, além de não ter induzido reação inflamatória do tipo corpo estranho (DEL CARLO et al., 2003).

A incorporação de osso desvitalizado no hospedeiro depende de neovascularização e da disponibilidade de células mesenquimais indiferenciadas. A eficácia da MOD em promover osteoindução *in vivo* foi demonstrada no preparo de defeitos ósseos para implantes (KIM et al., 2013) e em falhas ósseas de coelho quando, histologicamente, observou-se que os canais vasculares e a lacuna do canal medular serviram de arcabouço para penetração celular, determinando também osteocondução (SILVA et al., 2003).

Há bancos de MOD comercialmente disponíveis, entretanto, existe variação dos métodos de obtenção, bem como, na maneira de esterilização e estocagem. A MOD pode ser obtida e congelada até sua utilização (SCHWARTZ et al., 1998), pode ser encontrada adicionada de sulfato de cálcio (AlloMatrix®) (KIM et al., 2013), de glicerol (Grafton Putty®) ou gelatina suína (Osteofil®) (TAKIKAWA et al., 2003), bem como, acondicionada pura em etanol 70% (DEL CARLO et al., 2003; SILVA et al., 2003).

Marcadores de diferenciação óssea

Alguns genes alvo para a sinalização das BMPs são conhecidos, sendo um deles o Runx2, denominado fator de transcrição chave para indução do fenótipo osteogênico, e sendo o mais antigo marcador ósseo conhecido (KÄRNER et al., 2007).

Além do Runx2 ser essencial para a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, também desempenha papel na ossificação endocondral e age localmente inibindo a diferenciação de células mesenquimais em adipócitos e condrócitos (DATTA et al., 2008).

Durante a osteoblastogênese, as vias do TGF- β e das BMPs modulam o Runx2 (DATTA et al., 2008), e o aumento da sua expressão foi associado ao aumento da espessura periosteal e do número de osteoblastos maduros, devido à administração BMP-2 (BHAT et al., 2008).

Os efeitos da superexpressão de Runx2 sobre a mineralização são melhorados quando as células são cultivadas nos meios de diferenciação osteoblástica contendo ácido ascórbico, b glicerol-fosfato e dexametasona (BHAT et al., 2008).

O Runx2 desencadeia a expressão gênica de importantes proteínas da matriz óssea como o colágeno tipo I, OPN e OCN, em fase inicial de diferenciação; além de manter suas ações em fornecer préosteoblastos (DATTA et al., 2008). Osteoblastos maduros sintetizam e secretam OCN e outros componentes da matriz, como colágeno tipo I e fosfatase alcalina (FA) (RODRIGUES et al., 2012).

Proteínas ósseas, como OPN e OCN, são mensuradas, pois suas expressões em culturas são os indicadores de diferenciação osteoblástica, demonstrando diferença entre grupos de células indiferenciadas que foram ou não expostas a meios osteoindutores (CHUNG et al., 2010; VIEIRA et al., 2010).

A OPN indica formação e organização da matriz extracelular, enquanto, a OCN é o marcador tardio, da fase final da mineralização da matriz, expressando especificamente a atividade de osteoblastos maduros (KÄRNER et al., 2007). A deficiência de OCN está relacionada com alteração na funcionalidade de osteoblastos e a redução da sua expressão no soro e nos ossos foi relacionada a maior número de fraturas da pelve em humanos (RODRIGUES et al., 2012).

III. OBJETIVOS

Objetivos gerais

Diante do exposto, o presente trabalho teve por objetivo geral avaliar o efeito osteoindutor, *in vitro*, da matriz óssea desmineralizada (MOD) e do plasma rico em plaquetas (PRP), isolados ou em associação, sobre células mesenquimais indiferenciadas obtidas da geleia de Wharton do cordão umbilical canino, na ausência de meios osteoindutores.

Objetivos específicos

1. Isolar e caracterizar as células mesenquimais da geleia de Wharton de cordões umbilicais caninos quanto à sua morfologia, fenótipo e genótipo, além de avaliar a proliferação celular *in vitro*;
2. Avaliar a capacidade da MOD com ou sem PRP em induzir a diferenciação óssea, pela quantificação da fosfatase alcalina e visualização dos depósitos mineralizados de cálcio, com a coloração de vermelho de Alizarina em períodos determinados no curso de 21 dias pós-cultivo;
3. Quantificar a expressão genética dos marcadores osteocalcina, osteopontina e Runx 2 pela reação em cadeia da polimerase em tempo real em períodos determinados no curso de 21 dias pós-cultivo.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado nas dependências da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da UNESP, junto ao Laboratório de Virologia Animal e Cultivo Celular, do campus de Araçatuba. O referido trabalho foi analisado e aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob o protocolo 01301/2012.

Os meios empregados nos procedimentos de cultivo celular, solução de antibióticos e antimicóticos, tripsina e soro fetal bovino foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA. A procedência dos demais reagentes e soluções utilizadas nos procedimentos laboratoriais apresenta-se descrita no texto. Os plásticos relacionados aos procedimentos de cultivo celular foram adquiridos da Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA.

Obtenção das células mesenquimais do cordão umbilical

Durante cesariana eletiva realizada em cadela hígida, foram colhidos cordões umbilicais de quatro neonatos, com prévia autorização do proprietário, para obtenção das amostras. O procedimento foi executado de maneira asséptica, com a ligadura do cordão umbilical na extremidade próxima ao neonato, bem como, a ligadura na extremidade mais distante (FIGURA 4). Os cordões foram colocados, individualmente, em tubos cônicos estéreis contendo 5 mL de meio Dulbecco's modificado com mistura F-12 Ham (DMEN-F12) com 20% de soro fetal bovino (SFB) acrescido de solução de antibiótico e antimicótico (100 x), para então serem transportados até o laboratório. O período entre a colheita dos cordões, acondicionamento dos mesmos nos tubos cônicos e transporte compreendeu um intervalo máximo de 60 minutos.

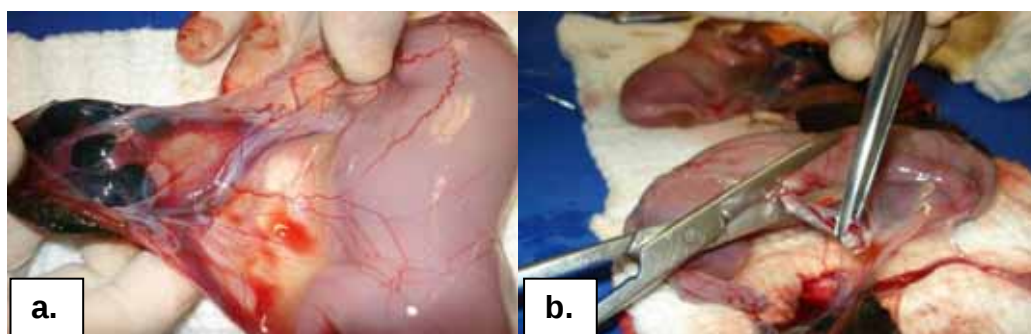


FIGURA 4– (a). Visualização do cordão umbilical canino “in situ”, após a remoção dos neonatos do útero por cesariana; **(b).** ligadura da porção fetal e 1/3 da porção materna do cordão umbilical canino contendo: veias, artéria, substância fundamental (geleia de Wharton) e anexos placentários. (Fonte: fotodocumentação dos autores).

Cultivo das células do cordão umbilical canino

Em capela de fluxo laminar, foram removidos, aproximadamente, 3,0 mL de fluido localizado no espaço extravascular e perivascular (da artéria e veias do cordão umbilical) correspondendo ao conteúdo da geleia de Wharton ou substância fundamental. Este material foi misturado ao DMEM-F12, 20% de SFB e solução de antibióticos e antimicóticos (100 x), em seguida, mantido em estufa 5% de CO₂, com 85% de umidade e a 37°C (FIGURA 5). Durante dez dias consecutivos, o meio foi trocado e a migração das células mesenquimais foi observada pela sua capacidade de aderência ao plástico da garrafa de cultivo celular. Após este período, os cordões foram removidos e as células remanescentes mantidas por mais cinco a sete dias, até a completa confluência do tapete celular. Todas as trocas do meio foram realizadas diariamente.

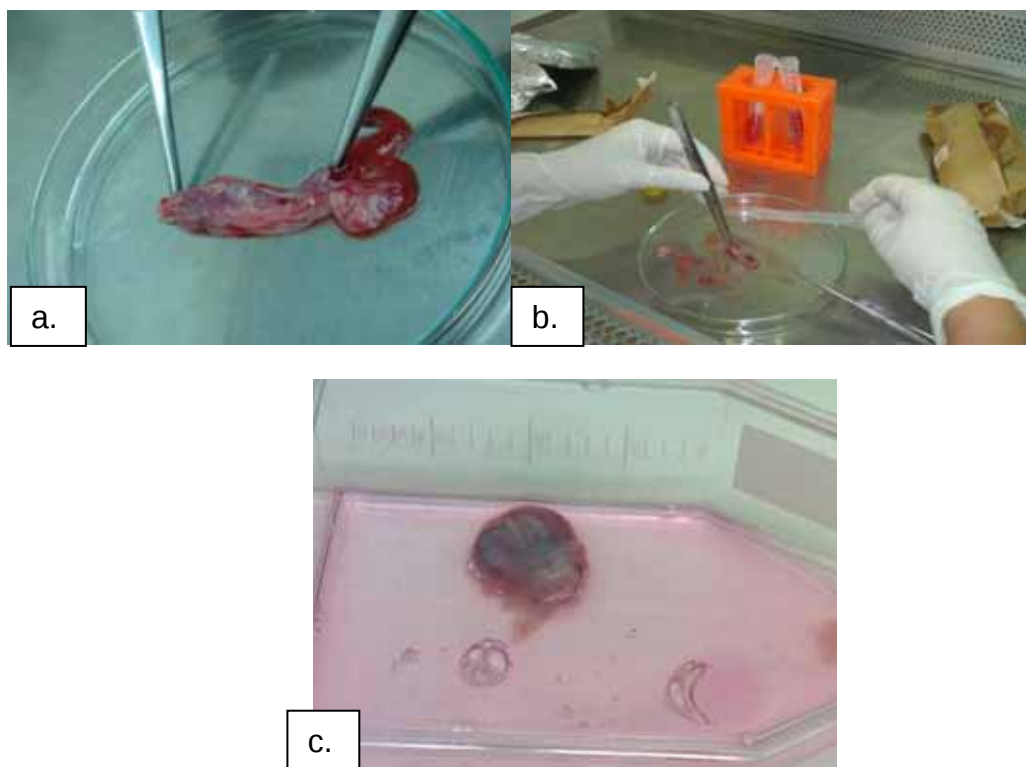


FIGURA 5- (a). Porção do cordão umbilical isolada para a obtenção de células endoteliais, substância fundamental no espaço perivascular; (b). Remoção asséptica das células endoteliais, substância fundamental e conteúdo perivascular para o início do isolamento das células mesenquimais caninas; (c). Aspecto do cordão em garrafas de cultivo celular após a remoção da geleia de Wharton (Fonte: fotodocumentação dos autores).

Caracterização das células mesenquimais caninas oriundas da geleia de Wharton

As células foram mantidas em cultivos individualizados (n=4), correspondentes aos quatro cordões umbilicais, com trocas diárias do meio DMEM-F12 acrescidos de SFB, antibióticos e antimicóticos (100 x), na primeira semana. No momento em que as monocamadas apresentavam 100% de confluência, foi realizada a primeira passagem (P). Esse procedimento foi executado com adição de 0,5 mL de tripsina-EDTA 0,25% até o momento de desprendimento da superfície do plástico e, assim, transferidas para novas garrafas até a décima passagem. Nesse momento, foram realizadas as

caracterizações quanto à morfologia, proliferação, fenótipo, capacidade de diferenciação e cariótipo.

Para a caracterização quanto à morfologia, foi realizada a visualização em microscópio invertido, com posterior fotodocumentação das monocamadas, nos primeiros dias após cultivo; este procedimento foi repetido até a décima passagem. A proliferação celular foi obtida por cálculo de “doubling-time”, que consiste, primeiramente, na padronização da concentração inicial de 1×10^3 células/cm² em cada garrafa de 25 cm² (BD, Falcon™). As passagens foram repetidas por dez vezes e o tempo entre as mesmas foi de sete dias, até que o tapete celular estivesse confluyente. As contagens realizadas em cada passagem (P1 até P10) seguiram a seguinte fórmula: $DT = CT (n+1)/CD (nf/ni)$, onde DT (“doubling time”), CT (“culture time”) e CD (“cell duplication”). Os valores de CT correspondem ao número da passagem acrescido de 1 ($n + 1$) e os valores de CD ao número final (nf) dividido pelo número inicial de células contadas por citometria de fluxo acústica. A contagem foi realizada após a remoção das células com tripsina EDTA 0,25% e levadas ao citômetro somente para a contagem de eventos (células)/mL.

A análise de citometria de fluxo acústica (Attune®, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi empregada, na décima passagem, para a fenotipagem das células mesenquimais para os seguintes marcadores celulares:

- **CD34:** fator de adesão celular, também atua mediando a ligação de células mesenquimais hematopoéticas à matriz extracelular;
- **CD45:** fator de diferenciação de células linfocitárias;
- **CD44:** receptor para ácido hialurônico, podendo interagir com osteopontina, colágenos e metaloproteinases, sendo também marcador de células linfoides;
- **CD105:** fator de angiogênese, endoglina;
- **CD271:** presente em células multipotentes embrionárias.

Para tanto, as células foram removidas do plástico na décima passagem com adição de tripsina EDTA 0,25%, e após a centrifugação (500 x g) por 5 minutos, o “pellet” foi ressuspendido em 4% de paraformoldeído e submetido à análise, segundo descrito por Cardoso et al. (2012). A fenotipagem foi conduzida com anticorpos monoclonais adquiridos para espécie humana que interagem com os receptores caninos, na diluição 1:50 em tampão PBS adicionado de Tween 20 (Sigma-Aldrich®). Todos os anticorpos monoclonais foram acoplados ao FITC (isotiocianato de fluoresceína) com excitação em espectro 280 nm (filtro BL1-A).

Conforme descrito por Seo et al. (2009), as células oriundas do cordão umbilical canino foram isoladas e caracterizadas para confirmação da origem celular de linhagem pluripotente, diante de sua capacidade de se diferenciarem em osteócitos, condrócitos e adipócitos. Esse procedimento seguiu o protocolo descrito por Cardoso et al. (2012) para células mesenquimais bovinas. Para tanto, os “kits” comerciais STEMPRO® “adipogenic, condrogenic, and osteogenic differentiation” foram empregados segundo as recomendações do fabricante (GIBCO®, Grand Island, NY, USA).

Para visualização da diferenciação osteoblástica, após 14 dias, as monocamadas induzidas foram fixadas com paraformoldeído 4% durante 15 minutos e, em seguida, lavadas com água ultra-pura e deixadas secar à temperatura ambiente. Os depósitos de mineralização óssea foram identificados pela coloração vermelho de Alizarina. Para tanto, na diferenciação em adipócitos as monocamadas também foram fixadas com o mesmo fixador e coradas com solução de Oil Red 0,3% (0.3% Oil Red em pó dissolvido em 60% de isopropanolol), durante 10 minutos (Sigma-Aldrich). Após, as células foram submetidas à lavagem com isopropanolol a 60% e deixadas secar, em temperatura ambiente, para visualização. Por fim, a diferenciação em condrócitos foi observada após a indução, fixando as monocamadas, a exemplo do que foi informado anteriormente. E, após a completa secagem, realizou-se a coloração com Safranina O que possui afinidade por

glicosaminoglicanos. Todas as imagens foram realizadas em microscópio invertido IX 70 (Olympus[®], Tokyo, Japan).

Para realização da análise do cariótipo, as culturas foram adicionadas de 1µg/mL de colcemid (Sigma-Aldrich[®]) por duas horas consecutivas. Em seguida, as células no sobrenadante foram removidas e lavadas três vezes consecutivas com solução fixadora (3 partes metanol:1 parte ácido acético). As células que estavam no estágio de metáfase foram submetidas à solução de KCl 3M gelada e, por contato, espalhadas na lâmina de vidro aquecida, o que promove o rompimento das células, com espalhamento dos cromossomos. Para identificação, as lâminas foram coradas com Giemsa e os padrões morfológico e numérico avaliados, considerando o que é observado para a espécie canina (*Canis familiaris*, LINNAEUS, 1758) em microscópio invertido IX 70 (Olympus). Ato contínuo, as imagens foram digitalizadas no software AxioVision 4.8 (Carl Zeiss[®], Oberkochen, Germany).

Preparo do plasma rico em plaquetas (PRP)

O cão doador de sangue para obtenção do PRP foi submetido a exames físico geral e específico, bem como, laboratoriais (com contagem manual de plaquetas), para atestar sua saúde. Tratava-se de uma cadela de seis anos de idade, sem raça definida e castrada há quatro anos.

Foi realizada colheita asséptica de 24,0 mL de sangue por venopunção da jugular em tubo estéril, contendo 6,0 mL de citrato de sódio como anticoagulante, para o preparo do PRP. Separou-se uma alíquota do sangue para a contagem total de plaquetas basal, submetendo o restante à primeira centrifugação (160 x *g* por 20 minutos). Em seguida, todo o sobrenadante, juntamente com a capa leucocitária, foi transferido para outro tubo para realização da segunda centrifugação (400 x *g* por 15 minutos), obtendo-se volume final de 2,0 mL de PRP (FIGURA 6). Ao final do processamento, nova contagem manual de plaquetas foi realizada para confirmação da contagem final de $1.2 \times 10^6/\text{mm}^3$.

Inicialmente, utilizou-se o método adotado por Souza et al. (2012) no qual, após a primeira centrifugação, houve transferência de todo o sobrenadante juntamente com a capa leucocitária mais 2,0mm da camada de hemácias para a segunda centrifugação. O PRP obtido neste procedimento piloto foi citotóxico, ocasionando 100% de morte. A partir deste resultado, padronizou-se apenas o uso do plasma e da capa leucocitária. E, com vistas a se padronizar em qual concentração o PRP seria utilizado, outro estudo piloto foi conduzido. Para tanto, foi realizado ensaio com três concentrações diferentes (5%, 10% e 20%). E dentre elas, a de 5% apresentou maior proliferação celular após 72h da adição do PRP às culturas.

Desta forma, o PRP final foi subdividido em alíquotas iguais e adicionado às culturas de décima passagem, na concentração de 5% referente ao volume de meio, mais o cloreto de cálcio 10% (25µl/0,5ml de PRP). A concentração de 5% foi definida, corroborando os resultados de Markopoulou et al. (2009), pois nesta concentração observou-se maior proliferação de células mesenquimais indiferenciadas da geleia de Wharton proveniente de cordão umbilical.

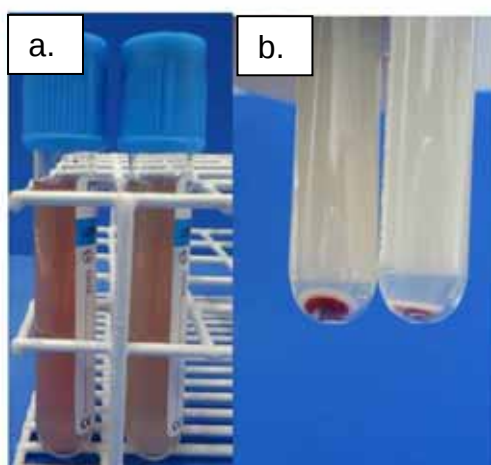


FIGURA 6- Imagem ilustrativa do preparo do PRP em laboratório até sua utilização. **(a).** Separação do plasma sobrenadante juntamente com a capa leucocitária para segunda centrifugação. **(b).** Sedimentação após a segunda centrifugação, com visualização do PRP no fundo do tubo. (Fonte: fotodocumentação dos autores).

Obtenção da matriz óssea desmineralizada (MOD)

Para preparar a MOD, foram colhidos os rádios de um cão hígido de aproximadamente um ano de idade, pesando 5,0 Kg. O animal deu entrada no Hospital Veterinário “Luiz Quintiliano de Oliveira”, UNESP, Araçatuba, vítima de atropelamento e que veio a óbito em poucas horas. Com autorização prévia do proprietário, procedeu-se a colheita de ambos os radios após preparo asséptico dos membros torácicos. Todo o tecido mole foi dissecado do osso, sem uso de qualquer produto químico. Os ossos foram desmineralizados segundo Del Carlo et al. (2003) por imersão em ácido clorídrico 0,6N, em temperatura ambiente, sendo considerado totalmente desmineralizado quando se apresentou macio, transparente e flexível. A desmineralização ocorreu em, aproximadamente, 20 dias. Este método de descalcificação foi escolhido, por apresentar facilidade e rapidez na execução. Além disso, apesar deste ácido promover redução da viabilidade celular, estudar participação das células ósseas remanescentes não era objetivo do presente estudo. O que se pretendia era a liberação das BMPs pela MOD. A MOD foi seccionada em fragmentos de 4,0 mm de espessura no sentido transversal ao eixo longo do osso e estocada em etanol 70%, em temperatura ambiente por, no mínimo, 30 dias, até o momento da sua utilização. Antes da sua adição às placas de cultivo, os fragmentos foram lavados com solução PBS e mantidos “over night” em solução de antibióticos e antimicóticos, como profilaxia à infecção das culturas. Os fragmentos foram, então, colocados nas garrafas de cultivo sem qualquer tipo de material que o mantivesse aderido ao plástico, mantendo-se, portanto, flutuante no interior da garrafa. Observou-se que a MOD, a partir do sétimo dia, sedimentava em algum espaço da garrafa, mantendo-se, assim, até o final da observação proposta neste estudo (21 dias).

Grupos Experimentais

Após a padronização das células mesenquimais caninas, foram constituídos quatro grupos experimentais:

- **1) G-controle:** grupo de células mesenquimais indiferenciadas;
- **2) G-PRP:** grupo de células mesenquimais indiferenciadas com PRP 5%;
- **3) G-MOD:** grupo de células mesenquimais indiferenciadas com adição de MOD;
- **4) G-PRP+MOD:** grupo de células mesenquimais indiferenciadas com adição de PRP + MOD.

Para cada grupo constituído, procederam-se seis repetições com os ensaios descritos subsequentemente.

Para cada avaliação, foram utilizadas placas de cultivo com seis poços, todas contendo DMEM-F12 (3,0 mL/orifício) adicionado de suplemento B-27 XenoFree[®] (50x) (GIBCO[®]), em substituição ao SFB. As células mesenquimais do cordão umbilical na concentração de 1×10^6 células/mL estavam na décima passagem e foram utilizadas para os quatro experimentos. A primeira troca de meio ocorreu após quatro dias de cultivo, seguida de duas trocas semanais, onde foi trocada apenas metade do volume de meio. Devido ao objetivo de se avaliar o potencial osteoindutor do PRP e da MOD, não foi adicionado meio osteogênico em qualquer grupo. Os momentos de avaliação quanto aos parâmetros adotados foram: sete, 14 e 21 dias após o início do cultivo. Nesses momentos foram avaliadas: atividade da fosfatase alcalina no sobrenadante das monocamadas, coloração das células aderidas com vermelho de Alizarina, remoção de células e sobrenadante para avaliar a expressão RNA mensageiro dos genes OPN, OCN e Runx 2 pela técnica de PCR em tempo real (“real time polymerase chain reaction”).

Coloração pelo vermelho de Alizarina

Após os períodos de sete, 14 e 21 dias, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e o depósito de mineralização óssea detectado com a coloração de vermelho de Alizarina. A coloração foi realizada para visualização

da formação de grânulos de depósitos de cálcio para a mineralização da matriz óssea, em todos os grupos. As imagens foram obtidas no microscópio invertido IX 70 (Olympus, Tokyo, Japan) e as imagens capturadas para análise. O procedimento geral da coloração seguiu o protocolo descrito anteriormente.

Dosagem da atividade da fosfatase alcalina (FA)

A FA foi mensurada nos mesmos períodos (sete, 14 e 21 dias) após o início dos cultivos, nos diferentes grupos. Para tanto, o sobrenadante foi removido, transferindo-se 50 µL em triplicata para uma placa de ELISA 96 cavidades (NUNC™) e adicionados 50 µL do substrato para-nitro-fenil-fosfato de sódio (60 mmol/L) diluídos em tampão glicina pH 10,5 na concentração final 1 mg/mL (Sigma-Aldrich®). A leitura foi realizada em um leitor de microplacas (Multiskan®, Labsystems, NY, USA) utilizando-se um filtro de 405 nm. Os resultados foram calculados após a determinação do ponto de corte, que foi estabelecido pela média aritmética dos valores de densidade óptica dos controles negativos (células sem indução) adicionado 3 x o desvio padrão.

Expressão mRNA dos genes osteopontina, osteocalcina e Runx 2 pela técnica reação em cadeia da polimerase em tempo real

O RNA foi extraído utilizando-se um “kit” comercial pelo método do TRIZOL®, segundo instruções do fabricante (GIBCO®), sendo suas concentrações determinadas por leitura da absorvância a 260, 280 e 320 nm por espectrofotometria. O RNA extraído foi mantido a -80°C até o seu processamento.

Para amplificação do RNA, foi utilizado o “Enhanced Avian RT First stand synthesis kit” para a produção de uma fita complementar cDNA (Sigma-Aldrich®). Em um tubo foram adicionados 5,0µL de amostra, 1,0µL de Deoxynucleotide mix, 1,0µL de Oligo (d+)23 e 3,0µL de H₂O. Após, a mistura foi levada ao termociclador por 10 minutos na temperatura de 70°C. Com o término do ciclo, a amostra foi resfriada e centrifugada (*spin*) e então,

adicionada de 2,0µL de “Buffer for Eamv-RT”, 1,0µL de “Enhanced avian RT” , 1,0µL de RNase “inhibitor” e 6,0µL de H₂O. A mistura foi novamente levada ao termociclador, por 50 min, a temperatura de 46°C. A reação de “polymerase chain reaction” foi conduzida segundo o Kit Jumpstart (Sigma-Aldrich®). Para tanto, 10,0µl de cDNA foi adicionado em um tubo contendo 25,0µL mix, 1,0µL de cada “primer” (Tabela 1), 1,5 µL de MgSO₄ (25 mM) e 11,0µL de água ultrapura. As condições da reação foram: 5 min a 94°C, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 56° C, 1 minuto 72° C, repetidos 40 vezes. A extensão final foi conduzida a 72° C por 10 minutos.

Para a reação PCR em tempo real utilizou-se “Power SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems®) seguindo protocolo do fabricante, em equipamento “StepOne Real Time PCR System” (Applied Biosystems™). As condições bem como o volume por reação, seguiram as recomendações do fabricante sem qualquer alteração.

Cálculo da expressão gênica relativa

Os resultados foram expressos em valores de Ct “cycle threshold”– (número de ciclos necessários para atingir o limiar de detecção). A beta-actina canina foi considerada para a expressão basal nos ensaios. Para o cálculo da expressão gênica relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct$ foi obtido pela razão entre o ΔCt dos diferentes alvos nos grupos estudados (sete, 14 e 21 dias pós-cultivo) e o ΔCt da expressão do gene padrão (beta-actina canina).

Tabela 1- Conjunto de “primers” utilizados na amplificação PCR em tempo real

Gene	Sequência primer (5'-3')	Amplificação
Osteopontina	Sequência CATATGATGGCCGAGGTGATAG	114
	Reverso CAAGTGATGTGAAGTCCTCCTC	
Osteocalcina	Sequência GAGGGCAGCGAGGTGGTGAG	134
	Reverso TCAGCCAGCTCGTCACAGTTGG	
Runx2	Sequência TGGGAGAGGTACCAGATGGG	152
	Reverso TCTTGCCTCGTCCACTCCGG	

Runx2 = Fator de transcrição 2

Análise estatística

Para análise estatística, foi realizada Análise de Variância (ANOVA) com medidas repetidas e teste de Tukey para comparação de médias entre os grupos e análise de regressão para comparar os momentos em cada grupo. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$), empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System; Cary, NC, USA).

V. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diferentes tecidos vêm sendo utilizados como fontes de células mesenquimais indiferenciadas. Alguns autores já realizaram a caracterização destas células oriundas de tecido adiposo de cães (CHUNG et al., 2010;

GUERCIO et al., 2013; VIEIRA et al., 2010), da medula óssea (CHUNG et al., 2010), da membrana e fluido amnióticos (PARK et al., 2012; URANIO et al., 2011), de células do cordão umbilical (SEO et al., 2009) e oriundas da geleia de Wharton, conforme o presente trabalho e a revisão de Troyer e Weiss (2008).

Na fase de isolamento e expansão, as células indiferenciadas demonstraram morfologia típica de células mesenquimais, sendo fusiformes e alongadas semelhantes a fibroblastos, durante todas as passagens (FIGURA 7). Mantiveram sua característica de aderência ao plástico, conforme descreveram Seo et al. (2009), que também estudaram células isoladas do cordão umbilical canino e, o que também foi observado por Uranio et al. (2011), que isolaram células dos anexos fetais (fluido amniótico, amnio e matriz do cordão umbilical).

Conforme descrito por Troyer e Weiss (2008), é importante que após expansão e diversas passagens, as células mesenquimais mantenham suas características pluripotentes com potencial de diferenciação em osteócitos, adipócitos e condrócitos. Este resultado foi reproduzido neste estudo e, confirmado por caracterização fenotípica das células mesenquimais caninas isoladas da geleia de Wharton após a décima passagem (FIGURA 8).

A diferenciação foi induzida após a décima passagem e confirmada por colorações específicas sendo, respectivamente, Vermelho de Alizarina para tecido ósseo (CHUNG et al., 2012; SEO et al., 2009; SCHWARZ et al., 2011), “Oil Red” para adipócitos (VIEIRA et al., 2010) e Safranina O, que consiste em coloração que possui afinidade por glicosaminoglicanos (FIGURA 8). Outras colorações também podem ser utilizadas de maneira efetiva para a confirmação da diferenciação celular, como a de “von Kossa” para tecido ósseo (VIEIRA et al., 2010) e o azul de toluidina para condrócitos (SEO et al., 2009; VIEIRA et al., 2010).

A caracterização molecular por citometria de fluxo para CD34, CD45, CD44, CD105 e CD271 seguiu conforme o que foi descrito por Seo et al. (2009), Troyer e Weiss (2008) e Uranio et al. (2011). Neste procedimento,

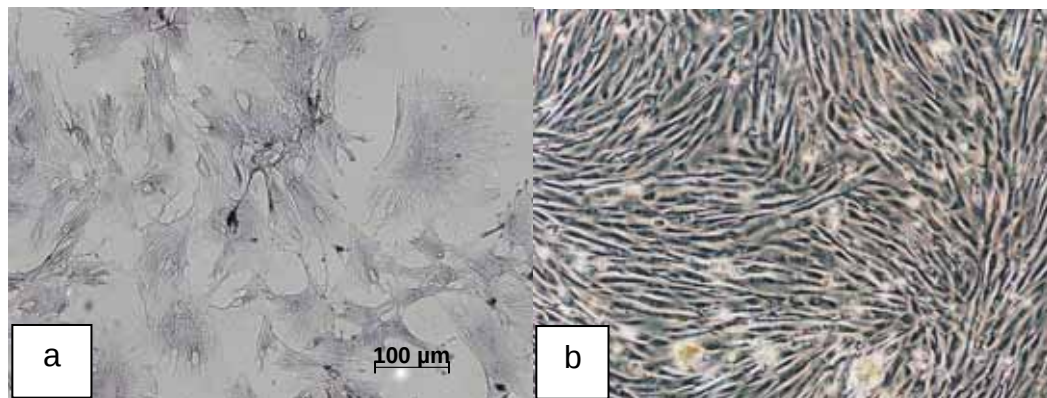
observou-se positividade para marcadores de células mesenquimais (CD44, CD105 e CD271) e negatividade para marcadores fenotípicos de células hematopoiéticas (CD34 e CD45). Tais resultados atestam a pureza do cultivo, e afirmam que a colheita da geleia de Wharton deu-se de forma adequada, permitindo apenas o isolamento de células mesenquimais sem a contaminação por células de origem hematopoiética (FIGURA 7C). Em contrapartida, os resultados diferem dos achados de Vieira et al. (2010) que demonstraram positividade para CD34 em 10% das células isoladas do tecido adiposo.

Alterações cromossômicas podem ocorrer ao longo das passagens e, por este motivo, foi realizada, em todas as amostras, a avaliação do cariótipo. Os dados desse trabalho corroboram o que descreveram Seo et al. (2009), Uranio et al. (2011) e Vieira et al. (2010), e permitiu a confirmação de que, ao longo das passagens, não houve alteração do número de cromossomos e que se tratava de material genético de mamífero da espécie canina (*Canis familiaris*, Linnaeus, 1758), cujo número total era de 39 cromossomos ($n=39$). Isto foi observado em todas as passagens, não sinalizando qualquer tipo de alteração em números ou estrutura (FIGURA 8D). À semelhança, notou-se aumento na contagem de células a cada nova passagem (FIGURA 7D).

Quanto à colheita da geleia de Wharton do cordão umbilical canino, não se encontram óbices em obtê-la, o que permitiu o cultivo das células mesenquimais nela contida. Cada vez mais, buscam-se métodos de colheita inócuos ao doador e, neste estudo, o material colhido é, via de regra, descartado após a cesariana. A colheita da geleia de Wharton possibilitou o isolamento de células mesenquimais que, posteriormente, podem ser utilizadas na terapia celular. Resultados semelhantes foram obtidos com a colheita de membrana amniótica (PARK et al., 2012; URANIO et al., 2011), líquido amniótico (URANIO et al., 2011) e cordão umbilical (SEO et al., 2009). Os anexos fetais representam fonte de elevada quantidade de células indiferenciadas (URANIO et al., 2011). Outros tecidos para colheita de células mesenquimais indiferenciadas, como tecido adiposo e medula óssea (CHUNG et al., 2010; SCHWARZ et al., 2011; VIEIRA et al., 2010), também podem ser

adquiridos sem prejuízos ao cão doador durante procedimentos cirúrgicos rotineiros.

Diferentes tecidos se constituem em fonte de obtenção de células indiferenciadas, mas ressalta-se que o potencial de diferenciação é maior, quanto mais jovem for a célula. Células embrionárias e do cordão umbilical têm maior potencial de diferenciação, quando comparadas a células adultas, a exemplo daquelas obtidas do tecido adiposo e medula óssea (HANDSCHEL et al., 2006). As células colhidas da geleia de Wharton apresentam características que as assemelham das células embrionárias, pois possuem maior potencial de diferenciação, além de serem menos imunogênicas, o que reduz os riscos ao receptor, tornando-a atrativa como fonte de células para terapias celulares (TROYER; WEISS, 2008).



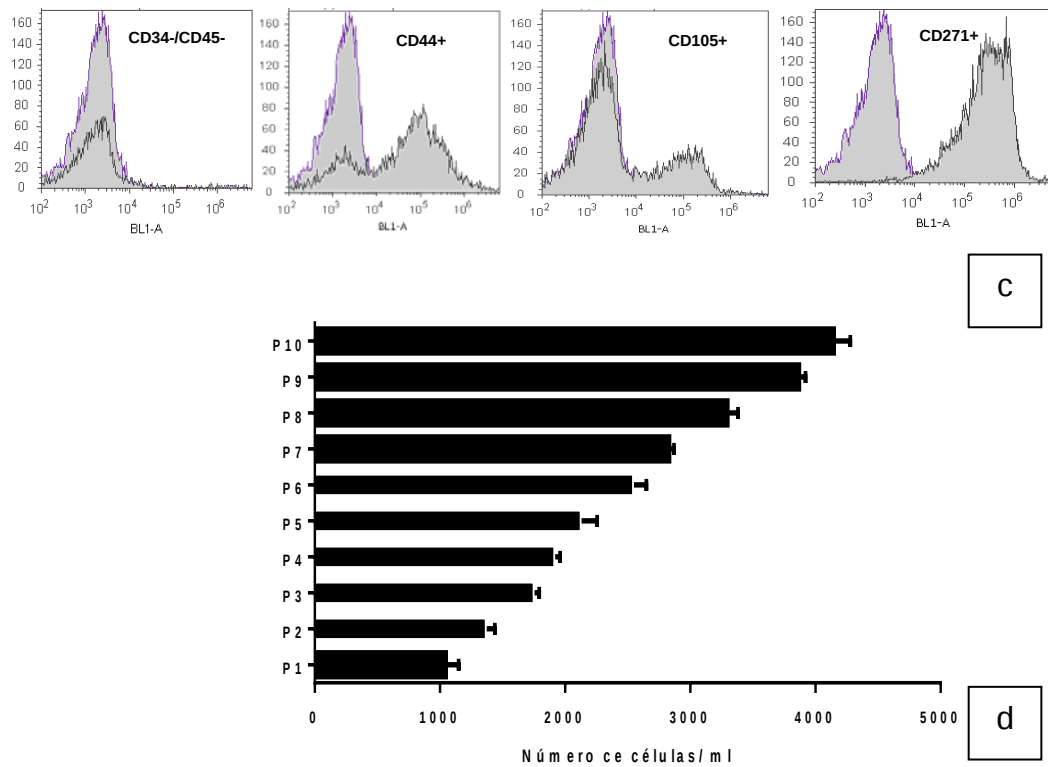


FIGURA 7- Caracterização morfológica das células mesenquimais indiferenciadas caninas provenientes da geleia de Wharton do cordão umbilical: **(a)** Aspecto das células aderidas após cinco dias de cultivo inicial coradas com hematoxilina Harris; **(b)** Aspecto alongado, fusiforme das células após a décima passagem; **(c)** Citometria de fluxo acústica das células na décima passagem revelando o fenótipo na décima passagem; **(d)** contagem do número de células em cada passagem confirmando aumento das mesmas.

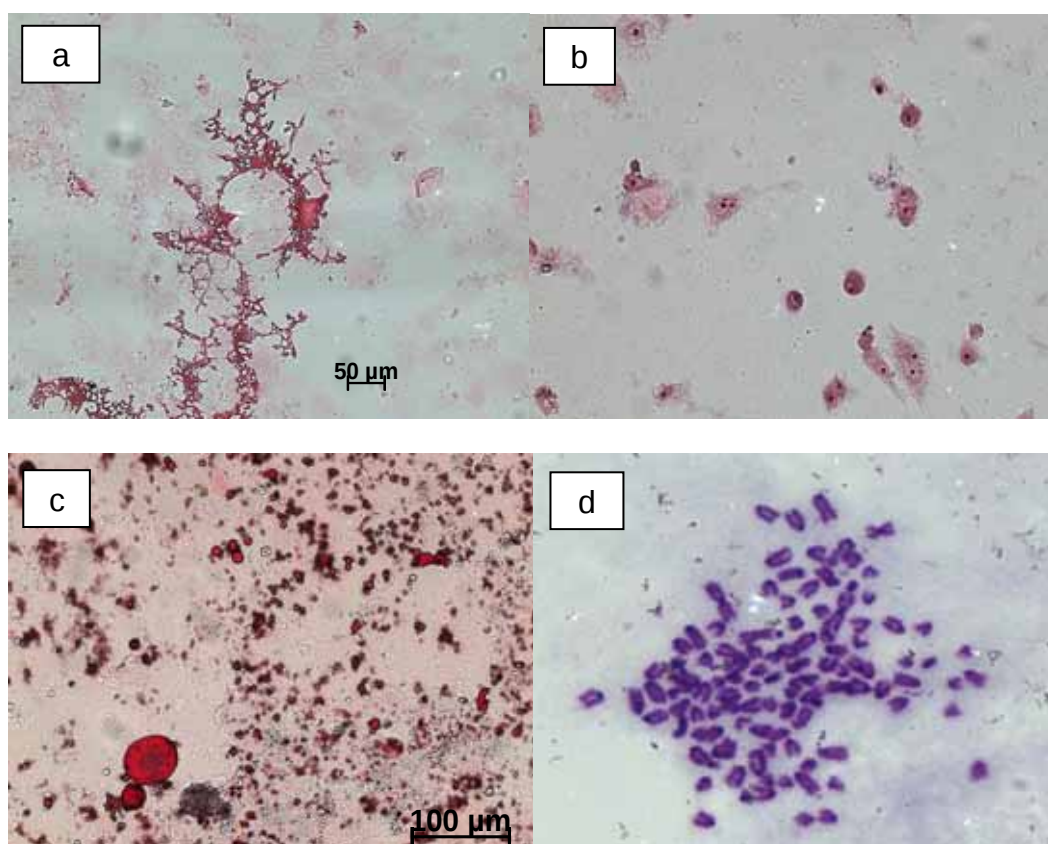


FIGURA 8- Caracterizações fenotípica e genotípica das células mesenquimais caninas isoladas do cordão umbilical após a décima passagem. **(a)** Diferenciação em osteócitos com depósitos de cálcio pela coloração da Alizarina; **(b)** Diferenciação em condrócitos com a coloração da Safranina O revelando os glicosaminoglicanos; **(c)** Diferenciação em adipócitos confirmado pela coloração “Oil red” com depósitos lipídicos em vermelho; **(d)** Cariótipo das células mesenquimais compatível com *Canis familiaris* (n=39).

O protocolo de obtenção do PRP utilizado permitiu adquirir uma concentração plaquetária ótima corroborando o que descreveram Dias et al. (2002) e Oyama et al. (2004). Estes autores utilizaram protocolos com rotação e tempo de centrifugação idênticos. Mesmo não se removendo a camada mais profunda do tubo, correspondente a 2,0mm da camada de hemácias, conforme descrito por Souza et al. (2012), a contagem final de plaquetas atingiu o incremento mínimo necessário para que o PRP seja eficiente ($>1.000.000/\text{mm}^3$) (MARX, 1998). Ressalta-se que, no presente estudo, foi utilizada para tal, centrífuga laboratorial comum, constituindo-se, portanto, de procedimento de fácil execução e de baixos custos; comprovando tratar-se de técnica factível

para a aplicação na rotina clínica. Ao contrário do que Obarrio et al. (2000) e Marx (2004) descreveram, quando utilizaram equipamentos de elevado custo para tal fim.

A preparação do PRP ocorreu, imediatamente, antes de sua adição às placas de culturas para assegurar a concentração máxima dos fatores de crescimento, uma vez que, ao término de três horas após a centrifugação há redução da quantidade de FC, principalmente do TGF- β (RUTKOWSKI et al., 2008).

O processo de desmineralização aqui utilizado mostrou-se eficaz, cuja consistência final da MOD possibilitou a obtenção de fragmentos de igual espessura, com menor interferência quanto ao que seria liberada de BMPs em cada garrafa de cultivo. Salienta-se, que tal processo não interferiu na sua capacidade osteoindutora *in vitro*, à semelhança ao que fora observado *in vivo* por Del Carlo et al. (2003) e Traianedes et al. (2004). Obteve-se descalcificação óssea rápida, de forma que pode ser implementada na rotina cirúrgica hospitalar, a partir de bancos de MOD. Outro fato interessante refere-se à preservação da MOD em etanol 70% até a sua utilização. Esta solução mostrou ser eficaz no processo de preservação, salientando-se que também foi eficaz em coibir o crescimento de microorganismos com potencial risco de contaminação das culturas, sendo o mesmo observado em estudo clínico onde não foram observadas infecções no foco do defeito ósseo tratado (SILVA et al., 2003).

A MOD foi mantida solta na garrafa de cultivo, o que permitia a sua movimentação, sob flutuação, no meio de cultura. Nas observações diárias notou-se que, na primeira semana, ela se encontrava flutuando sobre o meio de cultivo, tornando-se submersa em torno de 14 dias e, conseqüentemente, menos móvel, porém não aderida ao plástico, aos 21 dias. Quando fragmentos ósseos, com o mesmo objetivo, são depositados de maneira a permanecerem fixos nas garrafas, há descrição de migração celular para as trabéculas ósseas do enxerto (LORO, 2009). Algumas formas de apresentações comerciais da MOD diferem são apresentadas em pó ou sob a forma de géis (KIM et al.,

2013; SCHWARTZ et al., 1998; TAKIKAWA et al., 2003). Salienta-se que se a tivéssemos utilizado desta forma, inviabilizaria as condições experimentais que foram idealizadas, uma vez que haveria total dissolução imediata no meio de cultura, com perdas subsequentes durante as trocas.

A morfologia das células, observada por microscópio invertido, foi diferente entre os grupos aos 21 dias. Sabe-se que os osteoblastos são células cuboides, responsáveis pela produção de matriz óssea, e foi possível perceber que as células dos grupos com adição da MOD apresentavam-se mais cuboides e menos alongadas, sugerindo maior diferenciação do que o grupo PRP (FIGURA 9). Este resultado deve-se, provavelmente, à ação das BMPs da MOD corroborando trabalho anterior que verificou morfologia cuboide em cultivo de células mesenquimais humanas da medula óssea tratadas com BMP-7, enquanto o grupo tratado apenas com dexametasona apresentou morfologia semelhante a fibroblastos (CHAUDHARY et al., 2004).

No que se refere à avaliação com a coloração Vermelho de Alizarina, demonstrou-se que, com exceção do grupo controle, todos os grupos experimentais apresentaram diferenciação osteoblástica com produção de matriz mineralizada ao final de 21 dias, sem a adição de meios osteoindutores. Entre os grupos, o G-PRP+MOD foi o que apresentou coloração menos intensamente distribuída pela placa, seguida pelos grupos G-PRP e G-MOD, que obtiveram coloração mais intensa (FIGURA 9).

Quanto ao uso isolado de PRP (G-PRP), sabe-se que o efeito mitogênico dos FC contidos nas plaquetas já foi demonstrado em células tronco e em culturas comerciais de osteoblastos (DEREKA et al., 2006; FERREIRA et al., 2005; GRUBER et al., 2004). Todavia, o efeito osteoindutor do PRP traz resultados controversos. Os resultados aqui obtidos corroboram Lin et al. (2006), que verificaram osteoindução após uso de PRP incorporado a hidrogel em cultura de células mesenquimais humanas. Resultados positivos também foram encontrados utilizando células da medula óssea de ratos e PRP (DOLDER et al., 2006). Entretanto, divergem de resultados nos quais há diminuição de diferenciação osteoblástica (GRUBER et al., 2003). A

metodologia de obtenção do PRP interfere na concentração das plaquetas e na quantidade dos FC, portanto, a falta de padronização da técnica pode justificar tais divergências nos resultados (GRUBER et al., 2003; LIN et al., 2006). Outra hipótese refere-se à capacidade de diferenciação das células mesenquimais utilizadas, uma vez que, no presente trabalho, foram utilizadas células indiferenciadas obtidas da geleia de Wharton do cordão umbilical, que sabidamente têm potencial de diferenciação superior às células da medula óssea (HANDSCHEL et al., 2006), uma vez que apresentam semelhança com células embrionárias que possuem alta capacidade de diferenciação (TROYER; WEISS, 2008).

No grupo G-MOD, a coloração Vermelha foi mais intensa que nos demais grupos, o que demonstra, de maneira qualitativa, a maior produção de matriz mineralizada pelos osteoblastos. As BMPs contidas na MOD (SCHWARTZ et al., 1998) são as prováveis responsáveis por este resultado superior, corroborando o estudo que verificou aumento da espessura periosteal e do número de osteoblastos maduros devido à administração BMP-2 (BHAT et al., 2008). Loro (2009), ao estudar o uso de osso humano liofilizado, também obteve diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em tecido ósseo funcional, sem a adição de meios osteoindutores.

No G-PRP+MOD a coloração vermelho de Alizarina foi menos intensa que no grupo que utilizou a MOD isoladamente. Entretanto, a coloração estava concentrada em locais específicos por toda a placa, com forte intensidade de cor nestes nódulos de mineralização. Isto pode ter dificultado a comparação visual entre grupos e não, necessariamente, indicar que o G-PRP+MOD tenha tido menor diferenciação osteogênica que o G-MOD. Kärner et al. (2007) também verificaram a coloração com vermelho de Alizarina localizada em alguns pontos das placas tratadas com meios osteogênicos. Nestes mesmos pontos de mineralização os autores confirmaram, por imunoistoquímica, grande quantidade de BMPs aglomeradas. Hoemann et al. (2009) observaram mineralização em foco e difusa em células mesenquimais, na dependência da quantidade de meio osteoindutor, havendo mais nódulos quanto maior a

quantidade de dexametasona. Possivelmente, a associação do PRP com a MOD forneceu as células indiferenciadas maior quantidade de FCs osteoindutores.

Não se detectou a presença FA no grupo controle, em todos os momentos. Nos demais grupos houve aumento da mesma até os 14 dias, com pico de sua produção, seguido de decréscimo aos 21 dias, quando se observou maior mineralização.

A dinâmica da produção de FA entre os grupos seguiu o mesmo que foi observado quanto à mineralização, sendo, discretamente, maior no G-MOD quando comparado a sua associação ao PRP aos 21 dias. Este resultado foi semelhante ao observado em um estudo que demonstrou que o PRP pode promover o decréscimo na atividade da FA, apesar do aumento de cálcio na cultura. O PDGF foi implicado como possível causador desta redução, pois em placas onde sua ação foi suprimida a diferenciação osteoblástica ocorreu mais intensamente (GRUBER et al., 2004). O FGF-II antagonizou a atividade da FA induzida pela BMP-7 em cultivos de células mesenquimais humanas (CHAUDHARY et al., 2004). O PRP desempenhou efeito na estimulação inicial do crescimento celular e para o início da mineralização da matriz (DOLDER et al., 2006) (FIGURA 9). A atividade da FA não é sempre condizente com a intensidade da mineralização, estudos mostram incremento da mensuração de FA, sem tão pouco, acréscimo na mineralização da matriz (HOEMANN et al., 2009). Marcadores mais específicos de maturidade osteoblástica, como células transgênicas com fluorescência para colágeno tipo I, foram testados e se mostraram mais sensíveis uma vez que a atividade da FA, bem como colorações para mineralização, quando utilizadas isoladamente, não são suficientes para demonstrar esta maturação (REPIC et al., 2013). A atividade da FA em cultura é necessária para mineralização da matriz, entretanto, não é suficiente para desencadear a produção da mesma (HOEMANN et al., 2009).

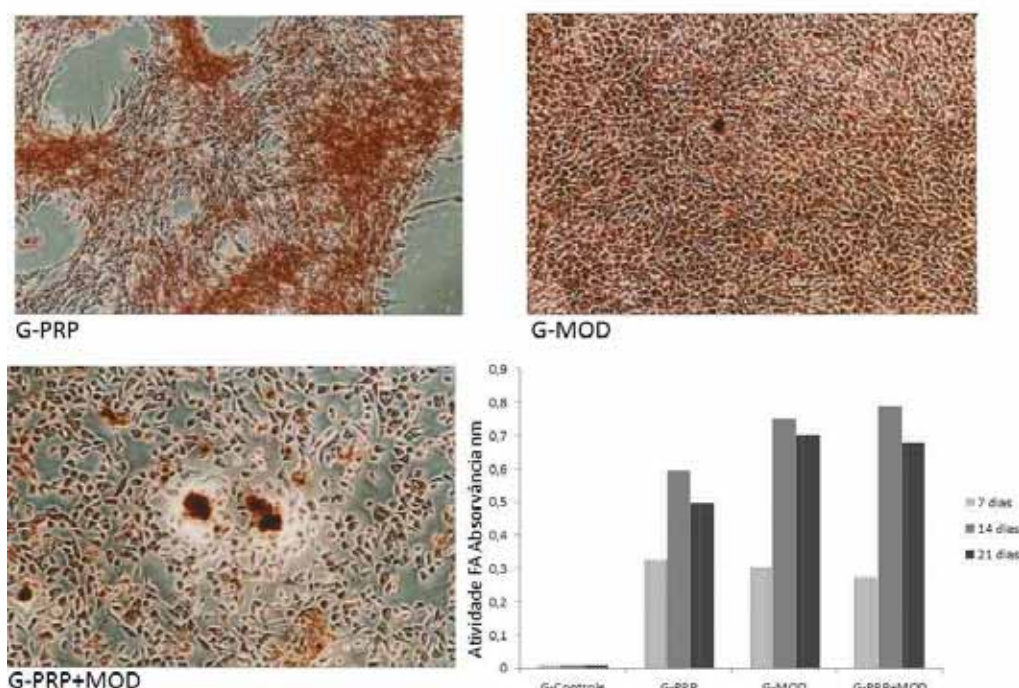


FIGURA 9- Fotomicrografias, contraste de fase microscópio Olympus IX-70 (Tokyo, Japão) aumento x 20, visualizando a coloração Vermelho de Alizarina confirmando deposição e mineralização da matriz extracelular. Gráfico da mensuração da fosfatase alcalina (absorvância nm, filtro 405nm) em cultivo de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos sem adição de meios osteoindutivos, ao longo do tempo. G-Controle: Células mesenquimais; G-PRP: células mesenquimais mais PRP; G-MOD: células mesenquimais mais MOD e G-PRP+MOD: células mesenquimais mais PRP e MOD.

Todos os grupos tratados expressaram OPN e OCN, que são proteínas que indicam formação e maturação da matriz extracelular (VIEIRA et al., 2010) (FIGURAS 10, 11 e 12). Aos sete dias, a OPN teve sua maior expressão no G-PRP, seguida do G-PRP+MOD, corroborando Dolder et al. (2006) que referem que o PRP é o responsável pelo início da mineralização da matriz nos primeiros oito dias. Aos 21 dias, houve superioridade do G-PRP-MOD em relação aos demais que demonstraram redução da sua expressão. A OCN, um marcador tardio de diferenciação, aos sete dias apresentou maior expressão no

G-PRP, enquanto que aos 21 dias sua expressão foi muito semelhante em todos os grupos. Nota-se que todos os grupos tratados apresentaram expressão de marcadores de osteogênese, o que é condizente com a presença de diferenciação osteoblástica nos mesmos. Esses resultados são semelhantes aos trabalhos que confirmaram osteogênese com a expressão destas proteínas em células mesenquimais adultas (CHUNG et al., 2010; DOLDER et al., 2006; ISHIDA et al., 2013), do cordão umbilical (SEO et al., 2009; VIEIRA et al., 2010) e embrionárias (KÄRNER et al., 2007).

Observou-se a expressão de Runx2 apenas nos três grupos tratados, sendo maior aos 21 dias no G-PRP+MOD, seguida do G-MOD e do G-PRP, com diferença estatística entre eles (Tabela 2) (FIGURAS 10, 11 e 12). A via de diferenciação do TGF- β e BMP está ligada a expressão do Runx2 (DATTA et al., 2008) e, desta forma, a liberação das BMPs contidas na MOD, bem como a do TGF- β pelos grânulos alfa das plaquetas do PRP favoreceram este resultado.

Nos momentos iniciais (sete e 14 dias), a expressão de Runx2 no G-PRP+MOD também foi estatisticamente superior aos demais, entretanto, o G-PRP foi superior ao G-MOD (Tabela 2). Tal fato se torna mais claro, quando da comparação dos momentos em cada grupo, pois nota-se que houve expressão sempre crescente nos grupos G-MOD e G-PRP+MOD, diferentemente ao que ocorreu no G-PRP, que apresentou aumento inicial com valores máximos aos 14 dias, seguido de sua redução (FIGURA 13).

Ao se analisar o comportamento das três proteínas mensuradas, observou-se que, no G-PRP, tanto as proteínas da fase inicial de diferenciação (OPN e Runx2), como a de fase tardia (OCN), apresentou-se com alta expressão logo aos sete dias. Aos 21 dias há redução de todas, especialmente da OPN. No G-MOD, apenas a OPN e o Runx2 foram expressos em quantidades constantes aos sete e 14 dias, enquanto a OCN teve discreta expressão nestes momentos e considerável aumento aos 21 dias. O G-PRP+MOD comportou-se de modo semelhante ao G-MOD aos sete dias, mas

logo aos 14 dias houve aumento da OCN e a expressão das três proteínas continuou aumentando até os 21 dias. (FIGURAS 10, 11 e 12). Estes resultados podem ser explicados, pois a liberação do TGF- β pelos grânulos alfa das plaquetas ocorre mais precocemente (MARX, 2004) quando comparado à liberação mais lenta das BMPs pela MOD (ANITUA et al., 2004).

Tabela 2 Média ($\bar{x}$) e desvio padrão (s) da expressão RNAm referente ao Runx 2 segundo o grupo e momento de avaliação.

Dias	Grupo ($\bar{x} \pm s$)			
	G-PRP	G-MOD	G-PRP+MOD	G-controle
7	0,868 $\pm$ 0,013 Bb	0,562 $\pm$ 0,004 Cb	0,977 $\pm$ 0,018 Ab	0,117 $\pm$ 0,008 Da
14	0,955 $\pm$ 0,005 Aa	0,562 $\pm$ 0,004 Bb	0,977 $\pm$ 0,018 Ab	0,117 $\pm$ 0,008 Ca
21	0,868 $\pm$ 0,013 Cb	0,983 $\pm$ 0,005 Ba	1,232 $\pm$ 0,008 Aa	0,117 $\pm$ 0,008 Da

^{AB} Médias seguidas de letras distintas, maiúsculas na linha e minúsculas na coluna, diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

G-PRP grupo Plasma rico em plaquetas; G-MOD grupo matriz óssea desmineralizada; G-PRP+MOD grupo plasma rico em plaquetas associado a matriz óssea desmineralizada.

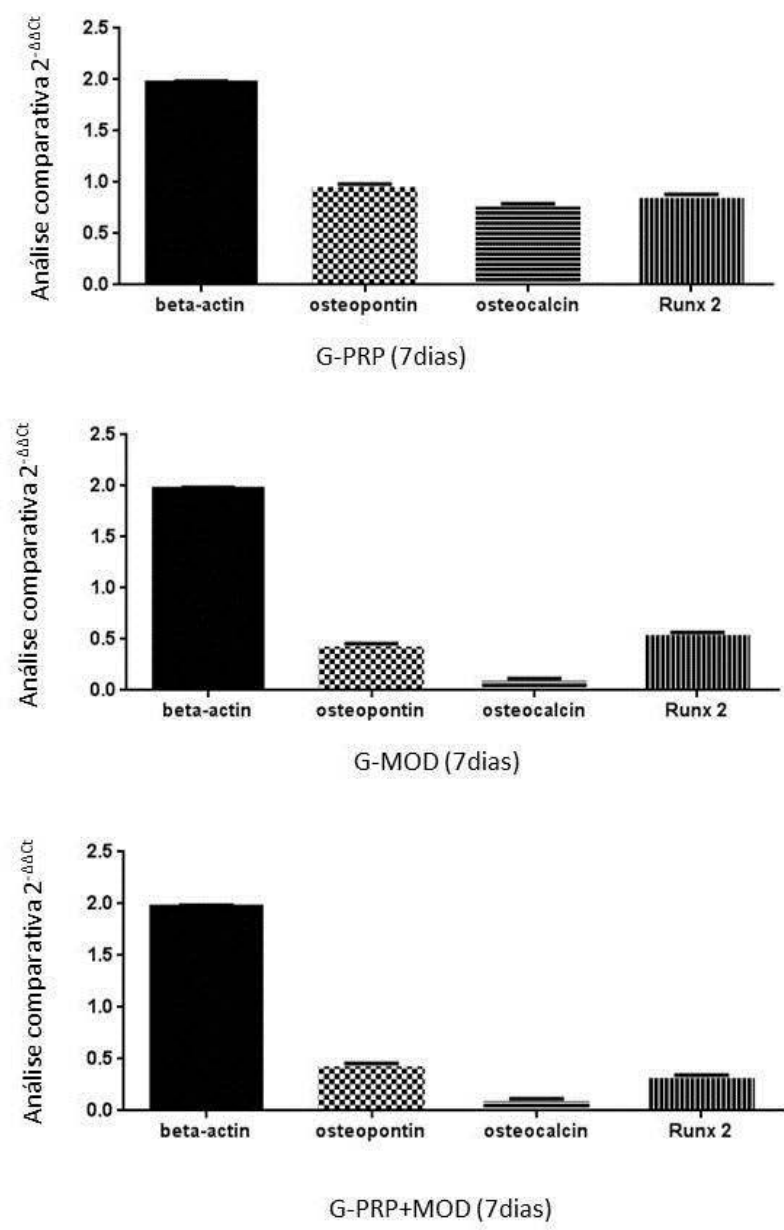


FIGURA 10 – Expressão do mRNA das proteínas Osteopontina, Osteocalcina e Runx 2, em cultura de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino, nos diferentes grupos, aos 7 dias pós cultivo.

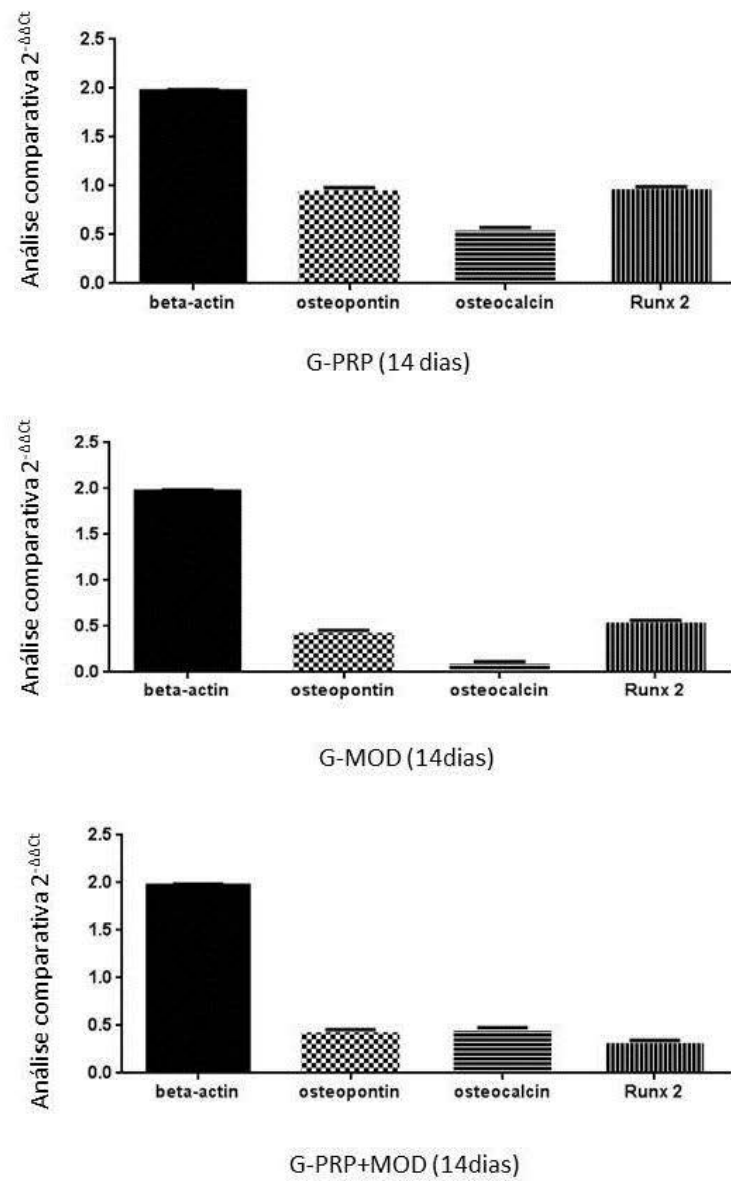


FIGURA 11 – Expressão do mRNA das proteínas Osteopontina, Osteocalcina e Runx 2, em cultura de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos aos 14 dias pós cultivo.

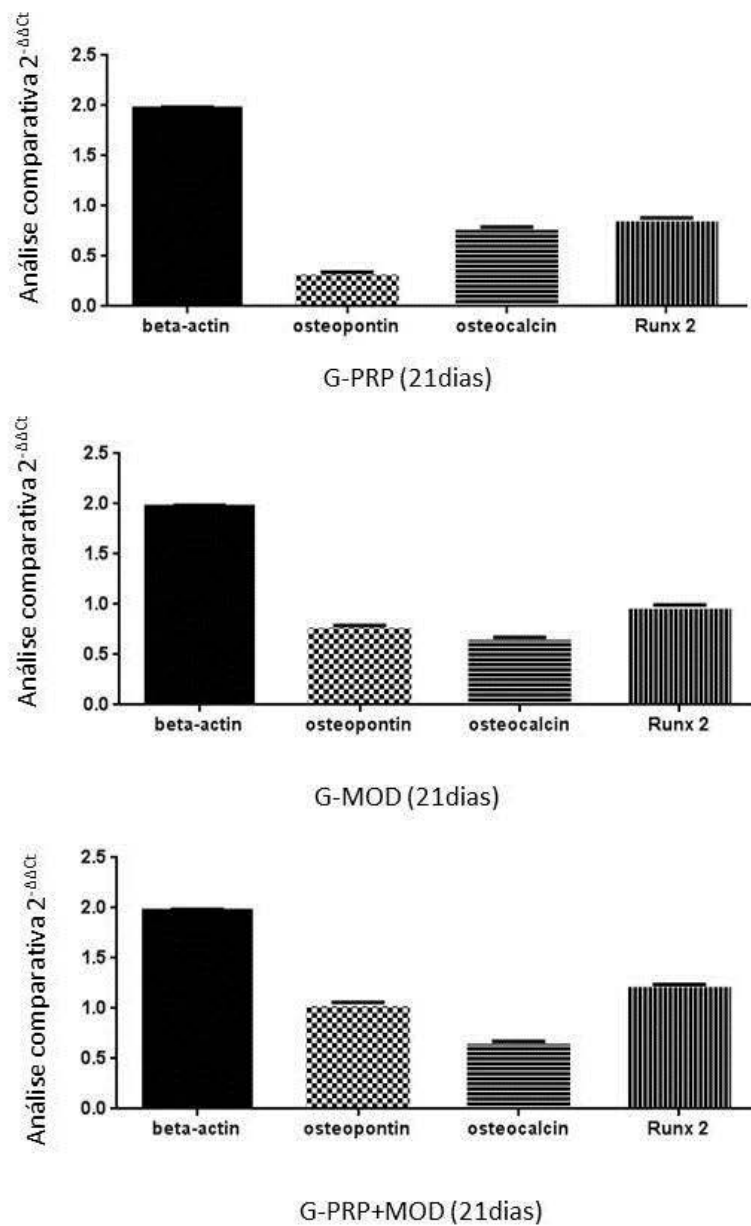


FIGURA 12 – Expressão do mRNA das proteínas Osteopontina, Osteocalcina e Runx 2, em cultura de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino nos diferentes grupos aos 21 dias pós cultivo.

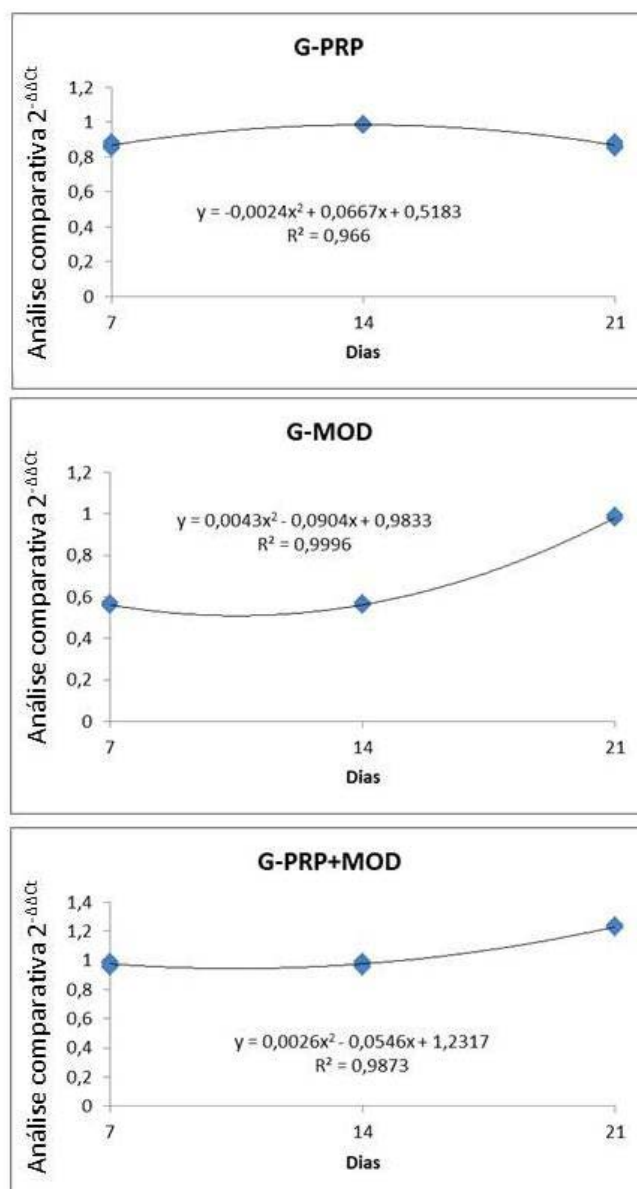


FIGURA 13- Gráfico da análise de regressão da expressão de RNAm Runx2 (fator de transcrição 2) em cultura de células mesenquimais indiferenciadas do cordão umbilical canino, nos diferentes grupos, sem adição de meios osteoindutivos, ao longo do tempo.

Esses resultados de maior expressão nos grupos onde há associação da MOD corroboram com os resultados da superexpressão de Runx2 sobre a mineralização de células cultivadas nos meios de diferenciação osteoblástica (BAHT et al., 2008) e com suplementação de BMP-2 (ISHIDA et al., 2013).

A eficácia dos fatores de crescimento e da terapia gênica na reparação óssea vem sendo comprovada, mas estas modalidades terapêuticas têm elevado custo, o que dificulta qualquer aplicação clínica em larga escala (DEVESCOVI et al., 2008). Desta forma, o uso de materiais biológicos autólogos ou heterólogos e de fácil obtenção, como o PRP e a MOD, pode trazer benefícios para pacientes com transtornos na reparação óssea. Estudo *in vivo* demonstrou a eficácia da associação de células mesenquimais indiferenciadas expandidas em cultura e PRP na consolidação óssea de camundongos (MONTEIRO et al., 2012). Estudos clínicos deverão ser realizados a fim de se verificar os mesmos resultados positivos aqui observados podem ser reproduzidos no ambiente biológico não controlado.

VI. CONCLUSÕES

Com base nos resultados, e nas condições aqui adotadas, pode-se concluir que:

1. As células mesenquimais da geleia de Wharton de cordões umbilicais caninos foram isoladas e caracterizadas quanto a sua morfologia, fenótipo e cariótipo.
2. A MOD e o PRP, isolados ou em associação, induziram a diferenciação óssea de células mesenquimais indiferenciadas colhidas da geleia de Wharton do cordão umbilical canino sem a adição de meios osteoindutores;
3. A expressão gênica de marcadores ósseos por RT-PCR permitiu a confirmação da diferenciação óssea, bem como inferir a superioridade do grupo com adição da matriz óssea desmineralizada (G- PRP+MOD) em relação aos demais.

REFERÊNCIAS

1. ANITUA, E.; ANDIA, I.; ARDANZA, B.; NURDEN, P.; NURDEN, A. T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. **Thrombosis and haemostasis**, v.91, p.4-15, 2004.
2. ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterial**, v. 21, n.7, p.667-681, 2000.
3. BHAT, B. M.; ROBINSON, J. A.; COLEBURN, V. E.; ZHAO, W.; KHARODE, Y. Evidence of in vivo osteoinduction in adult rat bone by adeno-runx2 intra-femoral delivery. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.103, n.6, p.1912-1924, 2008.
4. BOLANDER, M. E. Regulation of fracture repair by growth factors. **Experimental Biology and Medicine**, v.200, n.2, p.165-170, 1992.
5. CAMARGO, P. M.; LEKOVIC, V.; WEINLAENDER, M.; VASILIC, N.; MADZAREVIC, M.; KENNEY, E. B. Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. **Journal of Periodontal Research**, v.37, n. 4, p.300-306, 2002.
6. CANALIS, E.; MCCARTHY, T. L.; CENTRELLA, M. Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. **Annual Review of Medicine**, v. 42, p. 17-24, 1991.
7. CARDOSO, T. C.; FERRARI, H.F.; GARCIA, A. F.; NOVAIS, J. B.; SILVA-FRADE, C.; FERRAREZI, M. C.; ANDRADE, A. L.; GAMEIRO R. Isolation and characterization of Wharton's jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells obtained from bovine umbilical cord and maintained in a defined serum-free three-dimensional system. **BMC Biotechnology**, v.4, p.12-18, 2012.
8. CHAUDHARY, L. R.; HOFMEISTER, A. M.; HRUSKA, K. A. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. **Bone**. v.34, n. 3, p. 402-411, 2004.

9. CHUNG, D. J.; HAYASHI, K.; TOUPADAKIS, C. A.; WONG, A.; YELLOWLEY, C. E. Osteogenic proliferation and differentiation of canine bone marrow and adipose tissue derived mesenchymal stromal cells and the influence of hypoxia. **Research in Veterinary Science**, v.92, n.1, p.66-75, 2010.
10. DATTA, H. K.; NG, W. F.; WALKER, J. A.; TUCK, S. P.; VARANASI, S. S. The cell biology of bone metabolism. **Journal of Clinical Pathology**, v.61, n.51, p.577-587, 2008.
11. DEL CARLO, R. J.; SILVA, A. M.; VILORIA, M. I. V.; FONSECA, C. C.; OLIVEIRA, D. R. Potencial osteoindutor da matriz óssea homóloga desmineralizada de coelho. **Ciência Rural**, v.33, n.3, p.533-538, 2003.
12. DEREKA X. E.; MARKOPOULOU, C. E.; MAMALIS, A.; PEPELASSI, E.; VROTSOS, I. A. Time- and dose-dependent mitogenic effect of basic fibroblast growth factor combined with different bone graft materials: an in vitro study. **Clinical Oral Implants Research**, v.17, n.5, p.554-559, 2006.
13. DEVESCOVI, V.; LEONARDI, E.; CIAPETTI, G.; CENNI, E. Growth factors in bone repair. **La Chirurgia degli organi di movimento**, v.92, n.2, p.161-168, 2008.
14. DIAS, E. C. L. C. M.; BARROS, M. A. A.; ANDRADE, R. Plasma Rico em Plaquetas. **RBP: Revista Brasileira de Implantodontia Prótese Sobre Implante**. v.8, n.3, p.36-38, 2002.
15. DOLDER, J. V. D.; MOOREN, R.; VLOON, A. P. G.; STOELINGA, P. J. W.; JANSEN, J. A. Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. **Tissue Engineering**, v.12, n.11, p.3067-3073, 2006.
16. FERREIRA, C. F.; GOMES, C. M. C.; SCARSO FILHO, J.; GRANJEIRO, J. M.; SIMÕES, C. M. O.; MAGINI, R. S. Platelet-rich plasma influence

- on human osteoblasts growth. **Clinical Oral Implants Research**, v.16, n.4, p.456-460, 2005.
17. GARG, A. K. The future role of growth factors in bone grafting. **Dental Implantology Update**, v. 10, n.1, p.5-7, 1999.
 18. GERARD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dog. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.64, n.3, p.443-451, 2006.
 19. GERARD, D.; CARLSON, E. R.; GOTCHER, J. E.; JACOBS, M. Effects of platelet-rich plasma at the cellular level on healing of autologous bone-grafted mandibular defects in dogs. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.65, n.4, p.721-727, 2007.
 20. GRUBER, R.; KARRETH, F.; KANDLER, B.; FUERST, G.; ROT, A.; FISCHER, M. B.; WATZEK, G. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under *in vitro* conditions. **Platelets**, v.15, n.1, p.29-35, 2004.
 21. GRUBER, R.; VARGA, F.; FISCHER, M. B.; WATZEK, G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. **Clinical Oral Implants Research**, v.13, n.5, p.529-535, 2002.
 22. GUERCIO, A.; DI BELLA, S.; CASELLA, S.; DI MARCO, P.; RUSSO, C.; PICCIONE, G. Canine mesenchymal stem cells (MSCs): characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. **Cell Biology International**, v.37, n.8, p.789-798, 2013.
 23. HANDSCHEL, J.; NAUJOKS, C.; LANGENBACH, F.; BERR, K.; DEPPRICH, R. A.; OMMERBORN, M. A.; KÜBLER, N. R.; BRINKMANN, M.; KÖGLER, G.; MEYER, U. Comparison of ectopic bone formation of

- embryonic stem cells and cord blood stem cells *in vivo*. **Tissue Enginnering: Part A**, v.16, n. 8, p.2475-2483, 2010.
24. HANDSCHEL, J.; WIESMANN, H. P.; DEPFRICH, R.; KÜBLER, N. R.; MEYER, U. Cell-based bone reconstruction therapies: cell sources. **Internal Journal oral Maxillofacial Implants**. v.21, n.6, p.890-898, 2006.
25. HENDERSON J. L.; CUPP C. L.; ROSS E. V.; SHICK P. C.; KEEFE M. A.; WESTER D. C.; HANNON T.; MCCONNELL D. The effects of autologous platelet gel on wound healing. **Ear, Nose and Throat Journal**, v.82, n.8, p.598-602, 2003.
26. HOEMANN, C. D.; EL-GABALAWY, H.; MC-KEE, M. D. In vitro osteogenesis assays: Influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. **Pathologie Biologie**, v.57, p.318-323, 2009.
27. ISHIDA, K.; ACHARYA, C.; CHRISTIANSEN, B. A.; YIK, J. H. N.; DICESARE, P. E.; HAUDENSCHILD, D. R. Cartilage oligomeric matrix protein enhances osteogenesis by directly binding and activating bone morphogenetic protein-2. **Bone**, v.55, n.1, p.23-35, 2013.
28. KÄRNER, E.; UNGER, C.; SLOAN, A. J.; ÄHRLUND-RICHTER, L.; SUGARS, R. V.; WENDEL, M. Bone matrix formation in osteogenic cultures derived from human embryonic stem cells in vitro. **Stem cells and development**. v. 16, n.1, p.39-52, 2007.
29. KAWASE, T.; OKUDA, K.; WOLFF, L. F.; YOSHIE, H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. **Journal of Periodontology**, v.74, n.6, p.858-864, 2003.
30. KIM, Y.K.; LEE, J. Y.; KIM, S. G.; LIM, S. C. Guided bone regeneration using demineralized allogenic bone matrix with calcium sulfate: cases

- series. **Journal of Advanced Prosthodontics**, v.5, n.2, p.167-171, 2012.
31. LEE, J. Y.; NAM, H.; PARK, Y. J.; LEE, S. J.; CHUNG, C. P.; HAN, S. B.; LEE, G. The effects of platelet-rich plasma derived from human umbilical cord blood on the osteogenic differentiation of human dental cells. *In vitro cellular & developmental biology – animal*, v.47, p.157-164, 2011.
32. LIN, S. S.; LANDESBURG, R.; CHIN, H. S.; LIN, J.; EISIG, S. B.; LU, H. H. Controlled release of prp-derived growth factors promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **EMBS Annual International Conference**, v.1, n.1, p.4358-4361, 2006.
33. LORO, R. C. D. **O papel de um arcabouço de osso alógeno e de um meio de cultura na osteogênese de células tronco adultas da medula óssea humana.** Tese (Doutor em Odontologia, área de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2009.
34. MARCHESANO, Luiz Henrique. **Comportamento de marcadores séricos de formação e reabsorção óssea após enxerto autógeno em fissura alveolar congênita: sem e com plasma rico em plaquetas.** Tese (Doutor em Análises Clínicas Área de Análises Clínicas) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.
35. MARKOPOULOU, C. E.; MARKOPOULOS, A.; DEREKA, X. E.; PEPELASSI, E.; VROTSOS, I. A. Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. *In vitro* preliminary study. Report of a case. **Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions**, v.9, n.3, p.167-172, 2009.
36. MARTINEZ, S. A.; WALKER, T. Bone grafts. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v.29, n.5, p.1207-1219, 1999.

37. MARX, R. E. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? **Implant Dentistry**, v.10, n.4, p.225-228, 2001.
38. MARX, R. E. Platelet-rich plasma: evidence to support its use. **Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v.62, n.4, p.489-496, 2004.
39. MEREGALLI M, FARINI A, TORRENTE Y. Mesenchymal cells as muscle reservoir. Stem cell research and therapy. v.1, n.2. (on-line: doi: 10.4172/2157-7633.1000105)
40. MARX, R. E.; CARLSON, E. R.; EICHSTAEDT, R. M.; SCHIMMELE, S. R.; STRAUSS, J. E.; GEORGEFF K. R. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.
41. MILLIS, D. L. Bone end non-bone-derived growth factors and effects on bone healing. **The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice**, v.29, n.5, p.1221-1245, 1999.
42. MONTEIRO, B. S.; DEL CARLO, R. J.; ARGÔLO-NETO, N. M.; NARDI, N. B.; CARVALHO, P. H.; BONFÁ, L. P.; CHAGASTELLES, P. C.; MOREIRA, H. N.; VILORIA, M. I. V.; SANTOS, B. S. Association os mesenchymal stem cells with platelet rich plasma on the repair of critical calvarial defects in mice. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.27, n. 3, p.201-209, 2012.
43. MUSCHLER, G. F.; MIDURA, R. J. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n.395, p.66-80, 2002.
44. OBARRIO, J. J.; ARAÚZ-DUTARI, J. I.; CHAMBERLAIN, T. D.; CROSTON, A. The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology: case reports. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v.20, n.5, p.487-497, 2000.

- 45.OKUDA, K; KAWASE T.; MOMOSE, M.; MURATA, M.; SAITO, Y.; SUZUKI, H.; WOLFF, L. F.; YOSHIE, H. Platelet rich plasma contains high levels platelet derived growth factor and transforming growth factor- β and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. **Journal of Periodontology**, v.74, n.6, p.849-857, 2003.
- 46.OLIVEIRA G. K.; RAISER, A.G.; OLSSON, D.; SALBEGO, F. Z.; MARTINS, D.B.; DEZENGRINE, R.; SANTOS JÚNIOR, E.B.; RAPPETI, J.; TRINDADE, L.B.; TOGNOLI, G.K.; PIPPI, N.L.; SAUSEN, L. Células-tronco mononucleares autólogas e proteína óssea morfogenética na cicatrização de defeitos tibiais experimentalmente induzidos em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.62, n.1, p.72-79, 2010.
- 47.OYAMA, T.; NISHOMOTO, S. TSUGAWA, T.; SHIMIZU, F. Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. **American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**. v.62, n.5, p.555-558, 2004.
- 48.PAPADOPOULOS, C. E., DEREKA, X. E., VAVOURAKI, E. N.; VROTSOS, I. A. In vitro evaluation of the mitogenic effect of platelet-derived growth factor-BB on human periodontal ligament cells cultured with various bone allografts. **Journal of Periodontology**, v.74, n.4, p.451-457, 2003.
- 49.PARALKAR, V. M.; BOROVECKI, F.; KE, H. Z.; CAMERON, K. O.; LEFKER, B.; GRASSER, W. A.; OWEN, T. A.; LI, M.; DASILVA-JARDINE, P.; ZHOU, M.; DUNN, R. L.; DUMONT, F.; KORSMEYER, F.; KRASNEY, P.; BROWN, T. A.; PLOWCHALK, D.; VUKICEVIC, S.; THOMPSON, D. D. An EP2 receptor-selective prostaglandin E₂ agonist induces bone healing. **The National Academy of Sciences Medical Sciences**, v.100, n.11, p.6736–6740, 2003.
- 50.PARK, S. B.; SEO, M. S.; KIM, H. S.; KANG, K. S. Isolation and characterization of canine amniotic membrane-derived multipotent stem cells. **Plos One** v.7, n.9, 2012.

51. PARTRIDGE, K.; YANG, X.; CLARKE, N. M.; OKUBO, Y.; BESSHO, K. SEBALD, W.; HOWDLE, S. M.; SHAKESHEFF, K. M.; OREFFO, R. O. C. Adenoviral BMP-2 gene transfer in mesenchymal stem cells: in vitro and in vivo bone formation on biodegradable polymer scaffolds. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.292, n.1, p.144-152, 2002.
52. PRADEEP, A. R.; SHETTY, S. K.; GARG, G.; PAI, S. Clinical effectiveness of autologous platelet-rich plasma and peptide-enhanced bone graft in the treatment of intrabony defects. **Journal of Periodontology**, v.80, n.1, p.62-71, 2009.
53. PREVSNER-FISCHER, M.; LEVIN, S.; ZIPORI, D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. **Stem Cell Res and Rep.** (online - doi: 10.1007/s12015-011-9229-7), 2011.
54. REPIC, D.; TORREGGIANI, E.; FRANCESCHETTI, MATTHEWS, V. G.; IVCEVIC, IVCEVIC, S.; LICHTLER, A. C.; GRCEVIC D, KALAJZIC I. Utilization of transgenic models in evaluation of osteogenic differentiation of embryonic stem cells. **Connectivity Tissue Research**, 2013.
55. RODRIGUES, A. M.; CAETANO-LOPES, J.; VALE, A. C.; VIDAL, B.; LOPES, A. ALEIXO, I.; POLIDO-PEREIRA, J.; SEPRIANO, A., PERPÉTUO, I. P.; MONTEIRO, J.; VAZ, M. F.; FONSECA, J. E.; CANHÃO, H. Low osteocalcin/collagen type I bone gene expression ratio is associated with hip fragility fractures. **Bone**, v.51, n.1, p. 981-989, 2012.
56. ROSIER, R. N.; O'KLEEFEE, R. J.; HICKS, D. G. The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. **Clinical orthopaedics and related research**, n. 355s, p.s294-s300, 1998.
57. RUTKOWSKI, J. L.; FENNELL, J. W.; KERN, J. C.; MADISON, D. E.; JOHNSON, D. A. Inhibition of alveolar osteitis in mandibular tooth extraction sites using platelet-rich plasma. **Journal of Oral Implantology**, v.33, n.3, p.116-121, 2007.

58. RUTKOWSKI, J. L.; THOMAS, J. M.; BERING, C. L.; SPEICHER, J. L.; RADIO, N. M.; SMITH, D. M.; JOHNSON, D. A. An Analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. **Journal of Oral Implantology**, v.34, n.1, p.25-33, 2008.
59. SANCHEZ, A. R.; SHERIDAN, P. J.; KUPP, L. I. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? Current Review. **The international journal of oral and maxillofacial implants**, v.18, n.1, p.93-103, 2003.
60. SANDY, J.; DAVIES, M.; PRIME, S.; FARNDAL, R. Signal pathways that transduce growth factor-stimulated mitogenesis in bone cells. **Bone**, v.23, n.1, p.17-26, 1998.
61. SCARSO FILHO, J.; BARRETO, M. A.; MENDONÇA, R. G.; DINATO, J. C. Plasma rico em plaquetas. In: DINATO, J. C.; POLIDO, W. D. ed. **Implantes osteointegrados: cirurgia e prótese**. São Paulo: Artes Médicas, 2001. p. 315-342.
62. SEO, M. S.; JEONG, Y. H.; PARK, J. R.; PARK, S. B.; RHO, K. H.; KIM, H. S.; YU, K. R.; LEE, S. H.; JUNG, J. W.; LEE, Y. S.; KANG, K. S. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Veterinary Science**. v.10, n.3, p.181-187, 2009.
63. SCHWARZ, C.; LEICHT, U.; DROSSE, I.; ULRICH, V.; LUIBL, V.; SCHIEKER, M.; ROCKEN, M. Characterization of adipose-derived equine and canine mesenchymal stem cells after incubation in agarose-hydrogel. **Veterinary Research Communications**, v.35, p. 487-499, 2011.
64. SCHWARTZ, Z.; SOMERS, A.; MELLONING, J. T.; CARNES, D. L.; DEAN, D. D.; COCHRAN, D. L.; BOYAN, B. D. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation is dependent on donor age but not gender. **Journal of Periodontology**, v.69, n.4, p.470-478, 1998.

65. SHAN, L.; WANG, G.; ZHANG, C.; ZENG, B. Effect of various concentrations of platelet-rich plasma on osteogenic differentiation of skeletal muscle-derived stem cells. **Chinese journal of reparative and reconstructive surgery**, v.23, n.8, p.991-996, 2009.
66. SILVA, A. M.; DEL CARLO, R. J.; VILORIA, M. I. V.; SILVA, A. S. FILGUEIRAS, R. R. Matriz óssea homóloga desmineralizada na preparação de falhas ósseas segmentares produzidas no radio de coelhos. **Ciência Rural**. v.33, n.3, p.539-545, 2003.
67. SOUZA, T. F.; ANDRADE, A. L.; FERREIRA, G. T.; SAKAMOTO, S. S.; ALBUQUERQUE, V. B.; BOMFIM, S. R. M.; LUVIZOTTO, M. C.; LOUZADA, M. J. Healing and expression of growth factors (TGF- β and PDGF) in canine radial ostectomy gap containing platelet-rich plasma. **Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology**, v.25, n.6, p.445-452, 2012.
68. THORN, J. J.; SORENSEN, H.; WEIS-FOGH, U.; ANDERSEN, M. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.33, n.1, p.95-100, 2004.
69. TRAIANEDES, K.; RUSSEL, J. L.; EDWARDS J. L.; STUBBS, H. A.; SHANAHAN, I. R.; KNAACK, D. Donor age and gender affects on osteoinductivity of desmineralized bone matrix. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v.70, n.01, p.21-29, 2004.
70. TROYER, D. L.; WEISS, M. L. Wharton's Jelly-Derived Cells are primitives stromal cell population. **Stem Cells**, v.26, n.3, p.591-599, 2008.
71. URANIO, M. F.; VALENTINI, L.; LANGE-CONSIGLIO, A.; CAIRA, M.; GUARICCI, C.; L'ABBATE, A.; CATACCHIO, C. R.; VENTURA, M.; CREMONESI, F.; DELL'AQUILA, M. E. Isolation, proliferation, cytogenetic, and molecular characterization in vitro differentiation

potency of canine stem cells from foetal adnexa: a comparative study by amniotic fluido, amnion; and umbilical cord matrix. **Molecular Reproduction & Development**, v.78, n.5, p.361-373, 2011.

72. VASCONCELOS GURGEL, B. C.; GONÇALVES, P. F.; PIMENTEL, S. P.; AMBROSANO, G. M. B.; NOCITI JÚNIOR, F. H.; SALLUM, E. A.; CASATI, M. Z. Platelet-rich plasma may not provide any additional effect when associated with guided bone regeneration around dental implants in dogs. **Clinical Oral Implants Research**, v.18, n.5, p.649-654, 2007.
73. VENDRAMIN, F. S.; FRANCO, D.; NOGUEIRA, C. M.; PEREIRA, M. S.; FRANCO, T. R. Plasma rico em plaquetas e fatores de crescimento: técnica de preparo e utilização em cirurgia plástica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgia**, v.33, n.1, p.208-212, 2006.
74. VIEIRA, N. M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E.; SECCO, M.; STRAUSS, B. E.; ZATZ, M. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. **Cell Transplantation**, v.19, n.3, p.279-289, 2010.
75. WILTFANG, J.; KLOSS, F. R.; KESSLER, P.; NKENKE, E.; SCHULTZE-MOSGAU, S.; ZIMMERMANN, R.; SCHLEGEL, K. A. Effects of platelet-rich plasma no bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. **Clinical Oral Implants Research**, v.15, n.2, p.187-193, 2004.
76. WROTNIAK, M.; BIELECKI, T.; GAZDZIK, T.S. Current opinion about using the platelet-rich gel in orthopaedics and trauma surgery. **Ortopedia Traumatologia Rehabilitacja**, v.9, n.3, p.227-238, 2007.
77. ZHANG, M.; POWERS JUNIOR, R. M.; WOLFINBARGER JUNIOR, L. Effect(s) of the Demineralization Process on the Osteoinductivity of Demineralized Bone Matrix. **Journal of Periodontology**, v.68, n.11, p.1058-1092, 1997.

ANEXO 1

Catalogação na Publicação (CIP)

Serviço de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

Souza, Talita Floering Brêda

C991d Diferenciação osteogênica de células mesenquimais do cordão
umbilical canino / Talita Floering Brêda Souza.
Araçatuba : [s.n.], 2013
77f. : il.; + 1 CD-ROM

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade
de Medicina Veterinária, 2013
Orientador: Prof Adj. Alexandre Lima de Andrade

1. Fator de crescimento transformador beta 2. Cães 3.
Osteogênese 4. Osso e ossos 5. Plasma rico em plaquetas

CDD 636.8



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Aracatuba
Setor Técnico de Graduação e Pós-Graduação



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Diferenciação osteogênica de células mesenquimais do cordão umbilical canino.

AUTORA: TALITA FLOERING BRÊDA SOUZA

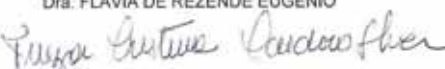
ORIENTADOR: Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL (FISIOPATOLOGIA MÉDICA E CIRÚRGICA) pela Comissão Examinadora.


Dra. RITA CÁSSIA MENEQUATI DORNELLES

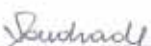

Dr. MÁRCIO MATEUS BELOTTI


Dra. FLÁVIA DE REZENDE EUGÊNIO


Dra. TEREZA CRISTINA CARDOSO DA SILVA


Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE

DATA DA REALIZAÇÃO: 30 de agosto de 2013.


Presidente da Comissão Examinadora
Dr. ALEXANDRE LIMA DE ANDRADE
- Orientador -