



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

Geração e caracterização de tecido equivalente endotelial e seu potencial osteopromotor

Geórgia da Silva Feltran

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, *Campus* de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre, junto ao Programa de Pós-Graduação em BIOTECNOLOGIA.

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Botucatu – SP

2019

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

Feltran, Georgia da Silva.

Geração e caracterização de tecido equivalente
endotelial e seu potencial osteopromotor / Georgia da
Silva Feltran. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Willian Fernando Zambuzzi

Coorientador: Rodrigo Augusto da Silva

Capes: 90400003

1. Ossos. 2. Células. 3. Células endoteliais. 4.
Esferóides celulares.

Palavras-chave: Células Endoteliais; Células Ósseas;
Esferóides; Osso; Tecido Ósseo.

Dedico este trabalho àqueles que são a razão do meu esforço diário:

Meus pais, Sérgio e Selma.

Agradecimentos

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer ao meu melhor e mais fiel amigo, ao meu companheiro de 30 anos de jornada, ao Deus que me criou, me guiou, iluminou e me concedeu sabedoria para sempre seguir em frente com os meus sonhos e não desanimar jamais com as dificuldades pelo caminho.

Agradeço grandemente aos meus pais Sérgio e Selma por serem exemplo de casal, de força, de união, por não desistirem de mim, por me apoiarem em cada passo e me encorajarem a caminhar rumo ao sucesso. Á vocês dedico a seguinte passagem: "A neve e a tempestade destroem as flores, mas nada podem contra a semente!" (Gibran Khalil).

Aos meus irmãos Nadja e Fúlvio, que sempre me motivaram, entenderam minhas faltas e momentos de afastamento principalmente quando precisaram de mim. Obrigada pelos nossos encontros, pelos intermináveis risos e obrigada por se esforçarem ao máximo para me fazerem feliz. Amo vocês!!

Ao meu amado sobrinho Felipe que com sabedoria, inocência e grandiosidade de criança alegra meus dias nublados. "Hoooooje não, hoooooje eu vou estudar!"

Aos meus avós maternos Vilma e Lorival e minha avó paterna Stella (*in memorian*) que sempre esperaram minha volta e não se cansaram de me contar histórias de vida para que minhas barreiras e frustrações fossem vencidas.

Aos meus vizinhos Antônio e Maria que na sua simplicidade e humildade de casal me acolheram como filha, cuidando de mim nos dias de sufoco, me alimentando com o melhor tropeiro do mundo e me ensinando a cada dia mais que mesmo com pouco muito se faz! Saudades eternas! Amo vocês!

Agradeço as amigas Bianca, Fernanda, Mariana, Luciana e Thaís pela acolhida, pelas risadas, pelas tequilas, pela energia positiva, pelos conselhos e por estarem dispostas a me apoiarem nesse sonho. Agradeço também às duas amigas de longa data, Dáphne e Tatiana, minhas metades da vida, que estiveram a todo o momento ao meu lado, rindo, chorando, compreendendo minha ausência e vivenciando minhas loucuras e insanidades. (Love you! Very, very much. Forever and ever! Ever, ever, ever...) “Das coisas que a sabedoria proporciona para tornar a vida inteiramente feliz, a maior de todas é a amizade!” (Epicuro).

A minha amiga, afilhada, companheira e irmã de coração Victória Macarena que mesmo distante me transmitia sentimentos de prosperidade, apoio e energias infinitas para a realização desse projeto, além de torcer imensamente para que meu Santo Antônio fosse passado para outras mãos, rsrsrsrs.... Da UFRJ pra vida! Te amo!

Ao meu professor de ensino médio e hoje amigo Luiz Fernando Abreu, que sempre torceu pelo meu sucesso e que com seu carinho e sua dedicação me mostrou o quão apaixonada sou pela biologia e pelo poder do ensinamento. “Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas!” Obrigada!

Agradeço a minha amiga Maria Lígia, minhaaaaa queeeridaaaaa, por todos os momentos vividos na época de graduação, pela força nos dias difíceis, pelo cuidado e carinho durante meu tratamento e por todos os momentos de risadas, brincadeiras e insanidades nerds que vivemos! Estarei sempre aqui pra você! E viva o melão de São Caetano!

Sou imensamente grata aos técnicos e professores da época de graduação na UFRJ-Macaé, em especial meu primeiro orientador, Jackson, carinhosamente apelidado de “Dear boss”, por me ensinar a dar os primeiros passos e abrir meus olhos para ciência me deixando prosperar em um mundo grandioso e cheio de descobertas. Muito obrigada por tudo! “Gege, comer dá sono e dormir dá fome...”

Ao amigo Francisco Eliezer, carinhosamente conhecido por “Dinho”, que durante minha árdua jornada em Macaé segurou minha mão nos momentos de aflição e me enchia de esperança e alegria com seu sorriso! Obrigada pelo carinho, pela companhia e por mesmo longe continuar sendo “meu coração”!!

A Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita, *campus* Botucatu, pela oportunidade, pelo espaço físico e apoio técnico para que este projeto fosse desenvolvido.

A professora Daniela Carvalho e a toda equipe do Centro de Microscopia Eletrônica do IBB, pela dedicação e atenção direcionadas ao desenvolvimento do projeto.

Agradeço aos técnicos e professores do Departamento de Química e Bioquímica da UNESP Botucatu pela dedicação, pró-atividade, ajuda e acolhimento durante esse tempo em que desenvolvi meu trabalho. Em especial a Gabi, ao Fabinho e a Dani que com alegria e atenção fizeram do trabalho mais divertido.

A Elaine, por me proporcionar longas manhãs de risadas, preparar o café e fazer o meu povo trabalhar, por ser minha confidente, irmã e amiga. E claro, por ter me adotado e me deixado fazer parte da família Morato, pela qual sou imensamente apaixonada. Guardarei vocês comigo sempre!

Aos meninos e meninas da grande família “verdinha” da UNESP. A presença, o carinho, a convivência e a história de vida de vocês fizeram dos meus dias os melhores! Obrigada família!

Ao corpo docente e a todos os colegas de pós-graduação em Biotecnologia, em especial Ana Livia, pela companhia, disposição, pelo apoio e bom humor durante esse período.

Agradeço aos colegas do laboratório de Bioensaios e Dinâmica Celular, minha segunda casa em Botucatu, pelo apoio técnico e ajuda durante esse período. A convivência e o aprendizado com vocês foram importantes em minha jornada.

A amiga Carolina Albano pelas noites de longos áudios com crises de risos, pelas manhãs de mau humor, pelas gordices de finais de semana, pela torcida e por pisar nas minhas costas todas as noites. Estará no meu coração sempre!

Aos integrantes do Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Nacional de Córdoba - Argentina, em especial à Dra. Liliana Sosa por me receber em sua casa e em seu laboratório e por dedicar preciosos momentos ao desenvolvimento de parte dos resultados deste trabalho. A todos de la República Argentina, Muchas Gracias!

A Profa. Dra. Denise Andia da FOP – UNICAMP por toda disponibilidade, ensinamentos e apoio técnico durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu coorientador, Rodrigo Augusto, pelos ensinamentos, pelos puxões de orelha, pela companhia, pelas longas risadas, pelos pães de queijo, pelas intermináveis noites de qPCR, pela ajuda, pela confiança. Pelo exemplo de caráter, profissionalismo e dedicação à ciência. Mas acima de tudo pela humildade! Sua companhia neste tempo foi fundamental para o meu crescimento pessoal e profissional. "...se me vi mais longe, foi por estar de pé em ombros de gigantes." (Isaac Newton).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)/CAPES (Processo: 2016/20505-8) pelo suporte financeiro indispensável para realização deste trabalho.e pela oportunidade de BEPE processo 2018/18.785-8.

E por último e não menos importante, ao meu querido orientador Willian por me acolher em seu grupo, me motivar a cada dia, por financiar minhas loucuras, pelas longas conversas e risadas. Pelos ensinamentos, pela agradabilíssima companhia, pela sua dedicação, pelas melhores aulas de bioquímica que já tive nessa vida e por me ajudar a realizar o sonho de um dia ser “mestre”! Obrigada, obrigada e obrigada! Em uma de nossas conversas me disse que é esta frase que te motiva a lutar pelos dias difíceis, pela vida, pelos alunos, pela gente. E é com ela que termino esta pequena fase da minha iniciante carreira: “...não se trata de quão duro consegue bater e sim do quanto aguenta apanhar e seguir em frente, do quanto consegue aguentar e continuar tentando. É assim que consegue vencer!” (Sylvester Stallone—“Rock Balboa” 2006).

"Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana."

(Carl Gustav Jung)

RESUMO

Com o aumento progressivo da expectativa de vida da população, defeitos ósseos se tornou um problema de saúde pública. Por sua vez, o sistema esquelético abriga um conjunto de células que, de maneira hierárquica, sustentam a formação do osso ao longo da vida, sendo sua capacidade regenerativa comprometida durante o processo de envelhecimento. Com o aumento da expectativa de vida, a população idosa vem crescendo nos últimos anos e com ela o aumento eminente de fraturas ósseas. Sabe-se que o desenvolvimento e regeneração ósseos são eventos complexos e controlados por mecanismos parácrinos de sinalização intercelulares, destacando que a osteogênese está acoplada, principalmente, à angiogênese. Embora relatado, este mecanismo de comunicação entre células endoteliais e células osteoprogenitoras não está bem elucidado, sobretudo considerando o repertório de moléculas tróficas envolvidas. A fim de compreender melhor estes mecanismos, o objetivo deste trabalho foi desenvolver metodologias capazes de mimetizar o microambiente endotelial-ósseo, bem como desvendar eventos acoplados entre os diferentes tipos celulares envolvidos no processo, sobretudo gerando tecido endotelial *in vitro*, equivalente ao original. Para isso, fizemos uso de células humanas primárias, as quais foram submetidas a diferentes protocolos experimentais, onde a mesma densidade de células endoteliais arterial (HCAEC) e venosa (HUVEC) e de musculatura lisa (AoSMC) (cultivo misto) foi plaqueada em tubos cônicos sem tratamento e, após 72 horas, os esferóides gerados foram tecnicamente processados para caracterização bioquímica (expressão das proteínas CD31 e α -SMA pelas células endoteliais e musculares lisa, respectivamente), estrutural (através de microscopia eletrônica) e morfológica (avaliações histológicas). Os resultados obtidos demonstram uma sequência experimental capaz de gerar esferóides de tecido endotelial com propriedades funcionais. Como nota, essas análises preliminares mostram uma concentração de células endoteliais (positivas para CD31⁺) ao centro do esferóide, enquanto células de musculatura lisa concentram-se periféricamente (positivas para α -SMA), estabelecendo uma distribuição hierárquica-estrutural entre as duas linhagens primárias. Os dados moleculares aqui obtidos evidenciam que estes eventos de homeostase do tecido requerem processamento de microRNAs (miRs) e envolvimento do fator indutor de hipóxia (HIF-1 α), o qual foi significativamente mais expresso por células de musculatura lisa, localizada na periferia do tecido gerado. Os resultados mostram ainda que os esferóides gerados expressam biomarcadores osteogênicos (RUNX 2, OTX, ALP), podendo, assim, contribuir com eventos de diferenciação osteoblástica. Variando estratégias experimentais através da modulação da atividade de HIF-1 α , mostramos haver efeito diferencial entre esferóides arteriais e venosos, em processos de diferenciação osteoblástica a partir de células indiferenciadas (CTM-MS). Em conjunto, os dados demonstram que a metodologia investigada fornece um fluxo experimental capaz de gerar um modelo de cultura 3D de tecido equivalente endotelial venoso e arterial, com propriedades celulares, bioquímicas e ultra-estruturais definidas, capazes de contribuir paracrinamente com a fenótipo osteogênico com envolvimento dinâmico e diferencial de HIF-1 α .

Palavras-Chave: Osso; Células Ósseas; Células Endoteliais; Tecido ósseo; Esferóide.

ABSTRACT

With the progressive increase in the life expectancy of the population, bone defects became a public health problem. In turn, the skeletal system houses a set of cells that, in a hierarchical way, support the formation of the bone throughout life, and its regenerative capacity is compromised during the aging process. With the increase in life expectancy, the elderly population has been increasing in recent years and with it the eminent increase of bone fractures. It is known that bone development and regeneration are complex events and controlled by paracrine mechanisms of intercellular signaling, emphasizing that osteogenesis is mainly coupled with angiogenesis. Although reported, this mechanism of crosstalk between endothelial cells and osteoprogenitor cells is not well elucidated, especially considering the repertoire of involved trophic molecules. In order to better understand these mechanisms, the objective of this work was to develop methodologies capable of mimicking the endothelial-bony microenvironment, as well as unveiling the coupled events between the different cell types involved in the process, especially generating endothelial tissue in vitro, equivalent to the original one. For this, we used primary human cells, which were submitted to different experimental protocols, where the same density of arterial (HCAEC) and venous (HUVEC) endothelial cells and smooth muscle cell (AoSMC) (mixed culture) were plated in tubes (s), and after 72 hours the generated spheroids were technically processed for biochemical characterization (expression of CD31 and α -SMA proteins by smooth muscle and endothelial cells, respectively), structural (through electron microscopy) and morphological (histological evaluations). The results obtained demonstrate an experimental sequence capable of generating endothelial tissue spheroids with functional properties. As a note, these preliminary analyzes show a concentration of endothelial cells (positive for CD31) at the center of the spheroid, while smooth muscle cells concentrate peripherally (positive for α -SMA), establishing a hierarchical-structural distribution between the two primary lineages. The molecular data obtained here evidenced that these tissue homeostasis events require the processing of microRNAs (miRs) and involvement of the hypoxia inducing factor (HIF-1 α), which was significantly more expressed by smooth muscle cells located at the periphery of the tissue generated. The results also show that the generated spheroids express osteogenic biomarkers (RUNX 2, OTX, ALP), thus contributing to osteoblastic differentiation events. By varying experimental strategies by modulating the activity of HIF-1 α , we show a differential effect between arterial and venous spheroids in processes of osteoblastic differentiation from undifferentiated cells (CTM-MS). Together, the datas demonstrate that the methodology investigated provides an experimental flow capable of generating a model of 3D culture of venous and arterial equivalent endothelial tissue, with defined cellular, biochemical and ultrastructural properties, capable of contributing in a way to the osteogenic phenotype with dynamic and differential involvement of HIF-1 α .

Keywords: Bone; Bone cells; Endothelial Cells; Bone tissue; Spheroids

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
	Desenvolvimento e Remodelação ósseos	2
	Angiogênese.....	3
	Experimentação Animal	5
	Tecido equivalente	6
2.	OBJETIVOS	10
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	11
	MATERIAIS	11
	MÉTODOS:	12
	Desenho experimental.....	12
	Cultivo celular	13
	Geração dos Esferóides e Coleta de meio condicionado	13
	Caracterização dos Esferóides:	14
	Ensaio de Viabilidade Celular (MTT):.....	15
	Tratamento com meio condicionado pelos esferóides:	16
	Western Blotting:	16
	Expressão Gênica:	17
	Análise de dados:.....	19
4.	RESULTADOS.....	20
	Formação e caracterização morfológica dos tecidos equivalentes: venoso e arterial	20
	Caracterização ultra-estrutural e bioquímica dos esferóides de tecido endotelial através de microscopias eletrônica de transmissão e confocal	22
	Testes funcionais revelam envolvimento diferencial de HIF1 α	33
	Análise da maquinaria de processamento de miRs e potenciais miRs envolvidos na geração de esferóides endoteliais	41
	Seria o tecido endotelial uma fonte de marcadores osteogênico?.....	45
	Capacidade osteogênica dos tecidos equivalentes de endotélio, em uma provável sinalização parácrina com envolvimento de HIF1 α	46
	Participação de HIF1 α no fenótipo osteogênico disparado por sinalização parácrina ao tecido endotelial.....	49
5.	DISCUSSÃO	62
6.	CONCLUSÃO.....	69
7.	INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:	70

	<i>Apêndice A - Artigos publicados durante o período do mestrado</i>	<i>70</i>
8.	<i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	<i>72</i>

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema da via de acoplamento de angiogênese com osteogênese: participação direta do endotélio com um novo tipo celular definido como tipo H de células endoteliais localizadas no tecido ósseo. Este tipo H de células endoteliais secretam a proteína Noggin, a qual regula o metabolismo de osteoblastos e condrócitos.-----	02
FIGURA 2. Esquema da formação de esferóide por dois tipos celulares: Células introduzidas num esferóide resultando na formação da estrutura (fibroblastos humanos mistos de aorta e células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC).-----	09
FIGURA 3. Modelo experimental 1. Esquema da metodologia utilizada durante o desenvolvimento e formação das estruturas equivalentes.-----	12
FIGURA 4. Caracterização Histológica. Fotomicrografia representativa de cortes histológicos de 5 µm das estruturas de tecido equivalente (esferóide) venoso e arterial corados com azul de toluidina-----	21
FIGURA 5. Caracterização ultra-estrutural -Eletromicrografias do esferóide venoso obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão -----	23
FIGURA 6. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente venoso. Imunofenotipagem de células de musculatura lisa (AOSMC) marcadas com anticorpo específico para α-SMA.-----	25
FIGURA 7. Imunocitoquímica com ouro coloidal: Marcação específica de α-SMA em tecido equivalente venoso.-----	26
FIGURA 8. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente venoso. Imunofenotipagem de células de endoteliais de veia umbilical (HUVEC) marcadas com anticorpo específico para CD 31-----	27
FIGURA 9. Imunocitoquímica com ouro coloidal: Marcação específica de CD 31 em tecido equivalente venoso-----	28
FIGURA 10. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente arterial. Imunofenotipagem de células de musculatura lisa (AOSMC) marcadas com anticorpo específico para α-SMA-----	29
FIGURA 11. Imunocitoquímica com ouro coloidal: Marcação específica de α-SMA em tecido equivalente arterial-----	30
FIGURA 12. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente arterial. Imunofenotipagem de células de endoteliais de artéria aorta (HCAEC) marcadas com anticorpo específico para CD 31-----	31
FIGURA 13. Imunocitoquímica com ouro coloidal: Marcação específica de CD 31 em tecido equivalente arterial-----	32

FIGURA 14. Análise quantitativa por tempo real (q-PCR) dos níveis de expressão gênica de marcadores de angiogênese (VEGF; VEGFr)-----	34
FIGURA 15. Níveis de expressão gênica e proteica do fator de hipóxia (HIF-1 α) nos esferóides venoso e arterial-----	35
FIGURA 16. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente venoso. Imunofenotipagem de células de endoteliais de veia umbilical (HUVEC) marcadas com anticorpo específico para HIF-1 α -----	37
FIGURA 17. Imunocitoquímica com ouro coloidal: Marcação específica de HIF-1 α em tecido equivalente venoso-----	38
FIGURA 18. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente arterial. Imunofenotipagem de células de endoteliais de artéria aorta (HCAEC) marcadas com anticorpo específico para HIF-1 α -----	39
FIGURA 19. Imunocitoquímica com ouro coloidal: Marcação específica de HIF-1 α em tecido equivalente arterial-----	40
FIGURA 20. Análise da expressão gênica da maquinaria de processamento de miR's - Dicer, Drosha e XPO 5 nos esferóides venoso e arterial-----	42
FIGURA 21. Análise da expressão gênica dos microRNAs 10b, 15 ^a , 16, 17, 21, 23 ^a , 23b e 32 envolvidos na angiogênese-----	43
FIGURA 22. Análise da expressão gênica dos microRNAs 101, 132, 143, 145, 335, 365, 485 e 1293 envolvidos na angiogênese-----	44
FIGURA 23. Níveis de expressão gênica dos principais marcadores de diferenciação osteoblástica RUNX 2; OSTERIX (OTX) e Fosfatase Alcalina (ALP)-----	45
FIGURA 24. Modelo Experimental. Esquema da metodologia utilizada durante o protocolo de diferenciação das células tronco mesenquimais tratadas com meio condicionado pelos esferóides-----	46
FIGURA 25. Expressão gênica e proteica do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelos tecidos equivalentes-----	48
FIGURA 26. Níveis de expressão gênica do marcador indutor de hipóxia (HIF – 1 α) em CTM tratadas com meio condicionado-----	49
FIGURA 27. Envolvimento de HIF nos diferentes processos celulares-----	51
FIGURA 28. Ação da presença de DMOG (agonista) e Chrysin (antagonista) no perfil gênico de HIF em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente controle (AoS)-----	52

<u>FIGURA 29.</u> Ação da presença de DMOG (agonista) e Chrysin (antagonista) no perfil gênico de HIF em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente venoso (Ven)-----	53
<u>FIGURA 30.</u> Ação da presença de DMOG (agonista) e Chrysin (antagonista) no perfil gênico de HIF em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente arterial (Art)-----	54
<u>FIGURA 31.</u> Efeito de agonista e antagonista de HIF no perfil proteico e gênico do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente controle (AoS)-----	57
<u>FIGURA 32.</u> Efeito de agonista e antagonista de HIF no perfil proteico e gênico do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente venoso (Ven)-----	59
<u>FIGURA 33.</u> Efeito de agonista e antagonista de HIF no perfil proteico e gênico do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente arterial (Art)-----	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Especificações dos anticorpos primários e secundários utilizados durante o desenvolvimento do projeto.-----11

Tabela 2. Sequência de primers dos genes utilizados durante o desenvolvimento deste projeto-----18

Tabela 3. Sequência de primers dos microRNA's envolvidos nos processos de angiogênese e osteogênese-----18

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

%: Porcentagem

°C: Grau centígrado

µg/mL: Microgramas por mililitro

18S: RNA ribossomal

ALP: proteína Fosfatase Alcalina

ANOVA: Análise de variância

AoSMC: Linhagem primária de músculo liso de aorta

AoS: sigla representante do esferóide formado apenas por células de musculatura lisa

Art: sigla representante do esferóide arterial formado por células de musculatura lisa e endotelial de artéria aorta

BRU: (“bone remodeling unit”) Unidade de remodelamento ósseo

BSA: proteína albumina bovina

CD31: Proteína marcadora de célula endotelial

Chrysin: composto químico comercial utilizado como antagonista de HIF-1α

CO₂: Dióxido de carbono

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTM: Célula tronco mesenquimal

DMOG: composto químico comercial utilizado como agonista de HIF-1α

DTT: Ditioneitol

ECL: Quimioluminescente

EDTA: (“Ethylenediamine tetraacetic acid”) Ácido etilenodiamino tetra-acético

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCAEC: Linhagem primária de endotélio arterial

HCl: Ácido clorídrico

HIF: Fator indutor de Hipóxia

hMSC: Linhagem de célula tronco mesenquimal humana

HUVEC: Linhagem primária de endotélio venoso de veia umbilical

kDa: KiloDalton

KI67: Proteína nuclear de ativação de ciclo celular

MEC: Matriz Extracelular

min: minuto

miRNA ou miR: microRNA

NaF: Fluoreto de sódio

NF-Kb: Fator nuclear kappa B

nm: Nanômetro

NOTCH: Proteína de sinalização de desenvolvimento embrionário

OM: Meio osteogênico

OTX/SP7: gene codificador da proteína OSTERIX

PAGE: ("polyacrylamide gel electrophoresis") eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS: ("phosphate-buffered-saline") Solução salina tamponada com fosfato

PCR: ("Polymerase chain reaction") Reação da polimerase em cadeia

PFA: Paraformaldeído

pH: Potencial Hidrogeniônico

PMSF: ("phenylmethylsulfonyl fluoride") Fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVDF: Polyvinylidene difluoride

RANKL: Proteína ativadora do receptor do ligante de NF-Kb

RNA: Ácido Ribonucleico

RUNX2: Fator de Transcrição relacionado ao RUNT 2

SDS: Dodecilsulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

TBST: (Tris-buffered-saline + Tween 20) Solução salina tamponada com Tris + Tween

Tris: tris(hidroximetil) aminometano

UI: unidades internacionais

UI/mL: Unidades internacionais por mililitro

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR: Receptor de membrana do fator de crescimento endotelial vascular

Ven: sigla representante do esferóide venoso formado por células de musculatura lisa e endotelial de veia umbilical

x g: força de rotação medida em "g"

α -SMA: Proteína marcadora de célula muscular.

1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido altamente especializado, abrigando um conjunto de células que, de maneira hierárquica, sustentam a formação do osso ao longo da vida, sendo sua capacidade regenerativa comprometida durante o processo de envelhecimento. Com o aumento progressivo da expectativa de vida da população, defeitos ósseos e fraturas se tornaram um problema de saúde pública crescente. O processo de reparo ósseo é extremamente complexo e pode ser dividido em três estágios principais: 1. fase inflamatória, que se inicia imediatamente após a fratura, (Dyce et al., 2004); 2. a fase de reparo, que apresenta como característica mais evidente a proliferação de células precursoras de osteoblastos do periósteo, responsáveis em depositar uma matriz intercelular de colágeno e polissacarídeos que se torna, posteriormente, "scaffold" para depósito de sais de cálcio, formando assim, um tecido neoformado (Di Toro, et. al. 2004); e, 3. a cicatrização, processo que necessita da angiogênese, concomitante ao processo de osteogênese (Grivas, et. al. 2019).

Sabe-se que todo esse processo de regeneração requer, sistemicamente, a sincronia de diferentes tipos celulares capazes de recuperar o tecido perdido, trazendo-o de volta às características originais. Neste sentido, tem-se mostrado que durante mecanismos de osteogênese há sincronia entre células endoteliais e osteoprogenitoras (**Fig.1**), porém pouco ainda se sabe acerca do repertório proteômico envolvido neste contexto caracterizado como o acoplamento desses dois eventos (angiogênese – osteogênese).

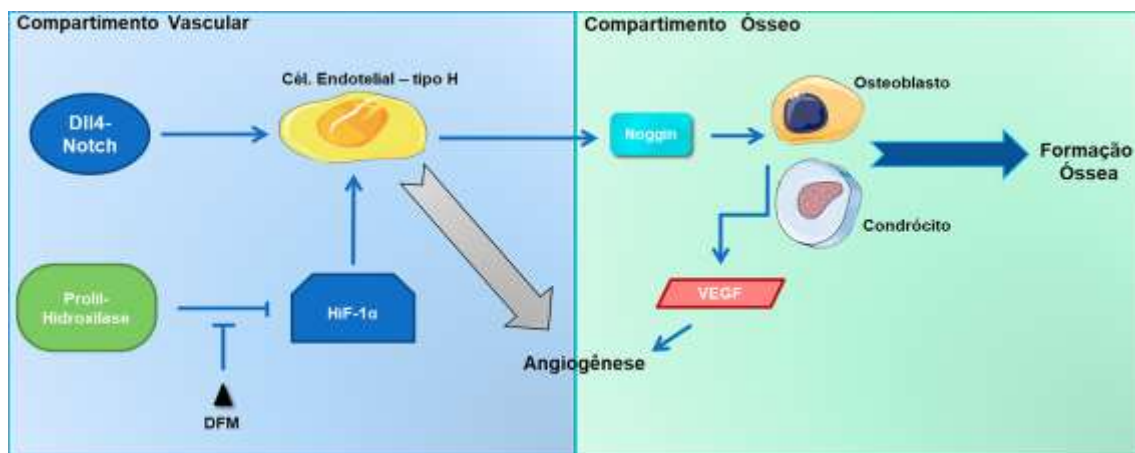


Figura 1: Representação esquemática da participação direta do endotélio com um novo tipo celular definido como tipo H de células endoteliais localizadas no tecido ósseo. Este tipo H de células endoteliais secretam a proteína Noggin, a qual regula o metabolismo de osteoblastos e condrócitos. Adaptada de le Noble & le Noble, 2014; Kusumbe *et al.* 2014.

Desenvolvimento e Remodelação ósseos

Dependendo de sua origem, o desenvolvimento ósseo ocorre de dois modos distintos de ossificação: **1-** intramembranosa: (ossos chatos, como crânio e clavícula) caracterizado por se desenvolver no interior de membranas do tecido conjuntivo, onde células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos. Estes, por sua vez, sintetizam matriz osteóide (matriz óssea recém-sintetizada), que se mineralizam, e sequestram osteoblastos secretores na matriz sintetizada, originando os osteócitos. Vários desses centros de ossificação acontecem simultaneamente dentro de uma membrana de tecido conjuntivo. Desse modo, as estruturas ósseas formadas dão aspecto esponjoso ao osso, propiciando a penetração de vasos sanguíneos nessas cavidades formadas, originando a medula óssea (Sanverdi, SE, *et. al.* 2015); e **2 –** Endocondral: (exemplo: fêmur) ocorre através da ossificação de uma cartilagem hialina, utilizada aqui como molde, que tem formato similar ao aspecto ósseo final. Na primeira etapa do processo, a cartilagem sofre alterações, com hipertrofia e morte dos condrócitos; redução e calcificação da matriz cartilaginosa, seguidas de apoptose dos condrócitos. As cavidades deixadas pela morte dos condrócitos são invadidas por capilares sanguíneos, que trarão células mesenquimais indiferenciadas do tecido conjuntivo adjacente para o interior da estrutura óssea recém formada.

Essas células se diferenciarão em osteoblastos, e passarão a secretar matriz óssea (Kronenberg, 2003). Apesar de suas diferenças, no entanto, vascularização é um pré-requisito para os dois tipos de ossificação (Dirckx *et al.*, 2013; Gerber *et al.*, 2000; Jian *et al.*, 2012).

Ossos adultos são submetidos continuamente à remodelação, a fim de manter a sua integridade e estabilidade biomecânica (Chim *et al.*, 2013). A remodelação óssea ocorre em duas fases importantes: na reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos e na formação *de novo* do osso, mediada pelos osteoblastos (Santos & Reis, 2010; Karsenty, 2000; Barou *et al.*, 2002). Este processo ocorre em estruturas especializadas chamadas de unidade de remodelação óssea (BRUs) (Dirckx *et al.*, 2013; Thamsborg SMet *et al.*, 2001). A BRU facilita a interação celular entre osteoblastos e precursores de osteoclastos: onde ocorre a secreção do ligante ativador de receptor de NF- κ B (RANKL), modulando a ativação de células mononucleares a se agregarem e diferenciarem em osteoclastos (Yasuda *et al.*, 1998; Martin & Seeman, 2008; Sims & Gooi, 2008; Henriksen *et al.*, 2009). Como sugerido, a vascularização é necessária para que ocorra a osteogênese. Além de exercer um papel vital durante o processo de ossificação e remodelação óssea (Dirckx *et al.*, 2013; Chim *et al.*, 2013; Maes, 2013), a angiogênese é o componente-chave durante sua reparação. Isto demonstra que o desenvolvimento de vasos sanguíneos nos ossos e osteogênese são eventos acoplados, o que é indicativo da presença de um *crosstalk* molecular entre as células endoteliais e osteoblásticas (Eshkar-Oren *et al.*, 2009; Maes *et al.*, 2010).

Angiogênese

Sabe-se que existe uma diferença estrutural entre veias, artérias e capilares sanguíneos, porém todos estes componentes são responsáveis pelo transporte de células circulantes, oxigênio, nutrientes e resíduos metabólicos, além de desencadearem e fornecerem uma cascata de sinalização “angiócrina” capaz de controlar diversas funções, dentre elas o crescimento e homeostase tecidual (Kusumbe, et al. 2014, Butter et al 2010).

O processo de formação de novos vasos e capilares a partir de vasos pré-existentes caracterizado como angiogênese é complexo e abrange diversas etapas, incluindo ativação de proteases para degradação de matriz extracelular, proliferação, morfogênese e maturação de células endoteliais, além de migração e surgimento de extensões vasculares através de brotamento (Profirovic et. al. 2013, Gupta& Manoj Kumar, 2003).

Sabemos que a vascularização é essencial para o desenvolvimento do esqueleto, sobretudo em eventos biológicos referente ao crescimento e remodelação do osso (Chim *et al.*, 2013; van der Eerden, Teti e Zambuzzi, 2014), abastecendo o tecido de acordo com as necessidades; além da importante função de remoção de resíduos metabólicos (Brandi et al., 2006; Kanczler & Oreffo, 2008).

Anatomicamente, a vasculatura de ossos longos é constituída por 4 artérias, destacando as metafisárias, epifisárias e artérias do perióstio (Clemens, 1996). Estas artérias entram nos ossos e atingem a cavidade medular, onde se dividem formando as corticais e microcirculações da medula (Santos & Reis, 2010). No osso cortical, os vasos alimentam os capilares Haversianos e canais de Volkmann (Laroche, 2002), enquanto que na medula, os capilares drenam para sinusóides (Wilson & Trumpf, 2006). Estes capilares, por sua vez, unem-se para formar uma única vénula que segue o percurso da arteríola e volta para o plexo pericondral (Hayashi, 1992). Um dos componentes histológicos mais importantes de vasos sanguíneos é o endotélio, o qual desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase óssea, não só ao funcionar como uma barreira, mas também altamente permeável, segregando fatores capazes de recrutar células especiais ao osso (Brandi *et al.*, 2006; Imai *et al.*, 1999; Imai *et al.*, 1999).

Recentes estudos identificaram um novo subtipo de capilar presente no processamento do sistema esquelético (subtipo H), com propriedades morfológicas, moleculares e funcionais distintas. Eles demonstraram que estes vasos sanguíneos são capazes de gerar um metabolismo distinto mediando o crescimento vascular do osso, mantendo osteoprogenitores perivasculares, acoplando angiogênese e osteogênese.

Uma interação molecular entre angiogênese, sinais angiócrinos e osteogênese, foi então validado através da atividade de Notch endotelial e que desempenha um papel crucial na promoção e acoplamento da angiogênese e osteogênese. A ruptura de sinalização Notch não só prejudica a morfologia e crescimento dos vasos nos ósseos, mas também leva a uma diminuição da osteogênese (Ramasamy *et al.*, 2014). Além disso, mostraram o envolvimento de VEGF, da sinalização Dll4–Notch e de Hif-1 α , fator importante no desenvolvimento e crescimento celular (le Noble & le Noble, 2014).

A sinalização do Fator Indutor de Hipóxia (HIF-1) está diretamente ligada a múltiplos processos celulares convencionais e constitutivos (Drager, et. al. 2015), além de ser fundamental na fisiopatologia do câncer, doenças cardiovasculares e doenças pulmonares crônicas, representando importante causas de mortalidade (Semenza, GL 2000). A proteína HIF-1 é caracterizada por um heterodímero $\alpha\beta$, onde HIF-1 α destaca-se por ser universal em todos os organismos. Sua estabilidade gera respostas diretas de células nucleadas à disponibilidade de O₂ (Tomlinson, R. E. et al 2014; Semenza, GL 2000). O processo de resposta á hipóxia é rápido, onde em normóxia a proteína é rapidamente degradada pela via da ubiquitina-proteassoma. Hif-1 α se tornou um dos fatores chaves na angiogênese já que é responsável por ativar vias sinalizadoras atuantes na remodelação e formação vascular, controle vasomotor, além de controlar a homeostase tecidual (Epstein, AC et al 2001).

Experimentação Animal

Experimentação animal tem ganho destaque nos meios acadêmico e social, que se posicionam quanto ao uso de animais em pesquisa. Argumentos a favor e contra o uso de animais em pesquisas científicas pôde ser lida em jornais de circulação nacional:

(...) “Nesta sexta-feira (19), ativistas invadiram um laboratório de pesquisas científicas e levaram 178 cães da raça Beagle, além de 7 coelhos por conta de supostos maus-tratos” (...)

fonte: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/debate-pesquisa-animais/platb/>. Acessado em 13/09/2018.

Visando diminuir o número de espécies usadas na experimentação, em 1959, um estudo publicado por William Russell e Rex Burch apresentou ao mundo o programa dos três R's: *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*, que em português significa substituição, redução e refinamento (Cazarin; Corrêa; Zambrone, 2004). Este princípio busca por métodos que evitem e/ou substituam o uso de animais tradicionais. Este processo prevê alcances relativos, quando troca-se organismos mais sensíveis (vertebrados), por organismos cientificamente comprovados com baixa percepção de dor (invertebrados), ou absolutas, onde os animais são substituídos por sistemas inanimados, como banco de dados e programas de bioinformática. Neste cenário, o desenvolvimento de tecidos equivalentes tem ganhado destaque.

No Brasil, a lei responsável por regulamentar a experimentação em animais é a lei de nº 11794, e foi validada em 8 de outubro de 2008, pelo então presidente da República, Luís Inácio Lula da Silva. Intitulada lei Arouca, esta regulamenta os testes experimentais em espécies animais dentro do território nacional, além de ter dado origem ao Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. O CONCEA visa formular e zelar pelo cumprimento das regras na experimentação, credenciar instituições, monitorar e avaliar novas técnicas, incluindo a de cultura celular de linhagens primárias e subculturas (linhagens imortalizadas), que possam substituir a utilização de animais em ensino e pesquisa, dentre outras.

Tecido equivalente

Mediante a discussão acerca do uso de animais de experimentação, restrições importantes vêm sendo norteadoras do uso destes na área acadêmica, forçando pesquisadores na área a buscarem ferramentas capazes de atuar dentro do conceito dos 3R's.

Neste contexto, um dos modelos que vem ganhando relevância internacional para substituição do modelo animal é o da cultura celular (*in vitro*), com diferentes aplicabilidades e modelos biológicos. A cultura celular permite a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que as originaram. A utilização desta ferramenta tem possibilitado importantes avanços científicos, como a produção de vacinas, conhecimento da biologia tecidual tumoral e proposição de tecido equivalente (Kim et. al. 2009) (Chen et. al. 2017). Com o passar dos anos seu aperfeiçoamento fez com que grandes descobertas científicas fossem alcançadas, levando a uma maior compreensão dos mecanismos moleculares da célula e, entre outras aplicações, a exploração detalhada da biologia celular em processos fisiopatológicos.

No organismo, as células encontram-se embebidas pela matriz extracelular (MEC), ou em *crosstalk* entre si, sobretudo por meio das junções intercelulares. Entretanto, a maioria dos estudos de biologia celular *in vitro* são realizados cultivando as células de interesse em poliestireno, numa cultura 2D. Esses resultados em um ambiente controlado facilitam a análise biológica e reprodutibilidade dos dados, embora não preserve condições tridimensionais, encontradas nos tecidos. Alternativamente, nos métodos 3D, onde células são cultivadas como aglomerados (Lin & Chang, 2008), crescem em um arranjo tridimensional (Moroni et al., 2008), ou são embebidas em gel (Slaughter et al., 2009), despontando em um cenário importante como método alternativo, que busca mimetizar o tecido original e condições biológicas das células. Estes aglomerados celulares são referidos por vários nomes na literatura, como micromassas (Greco et al., 2011), tecido equivalente (Rivron et al., 2012) ou esferóides (Rivron et al., 2009). É evidente que células em um ambiente 3D se comportam de modo diferente de uma cultura celular em monocamada (2D), como é o caso de condrócitos articulares primários ou hepatócitos, os quais perdem seu fenótipo quando em cultura primária 2D; porém, algumas propriedades são preservadas quando desenvolvidas em cultivo tridimensional. Muitas destas diferenças entre ambiente 2D e 3D (esferóide) são dedicadas à interação célula-célula e/ou célula-MEC (**Fig. 2**).

Neste sentido, alguns métodos têm sido usados para “fabricar” esferóides: os primeiros registros descrevem um método de suspensão celular, aos quais as células aderem espontaneamente à face inferior da suspensão após inverter a placa onde está localizada. Essa técnica é usada, por exemplo, para gerar embriões a partir de células-tronco. Alternativamente, frascos giratórios em biorreatores possibilitam a agregação celular espontânea, sem permissão de adesão nas paredes dos frascos de cultivo.

Outra técnica, a de revestimento com líquido estático, as células suspensas são cultivadas em um substrato não aderente, geram agregação ao invés de aderência ao substrato. Mais recentemente, células têm sido semeadas em superfícies padronizadas não aderentes em dispositivos pré-fabricados, como substratos de agarose. Em conjunto, todas essas técnicas abrem portas para novas aplicações para obtenção de esferóides, como maior rendimento e a formação de um complexo mimético de tecido para enxerto organotípico (Fennema et al., 2013).

Como resultado da replicação de um nicho celular natural, esferóides se mostram como potentes ferramentas para ensaios baseados em tecidos, assim como sondagem das interações célula-célula e célula-Matriz Extracelular (MEC), sobretudo compondo nossa necessidade de método alternativo ao uso de animais de experimentação. Em suma, a crescente necessidade de métodos alternativos ao uso de animais de experimentação tem posicionado os esferóides como uma excelente abordagem *in vitro* ou *ex vivo*, onde suas estruturas recapitulam melhor a fisiologia das interações célula-célula e subsequentes arranjos morfogênicos (revisado em Fennema et al., 2013).

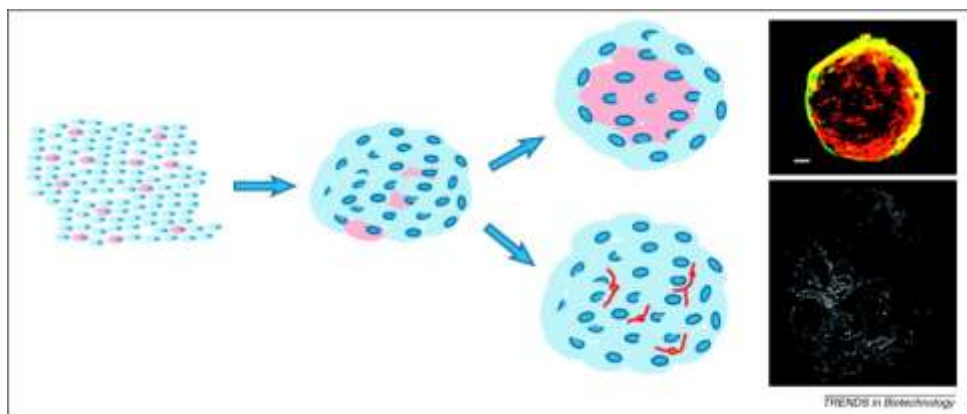


Figura 2. Representação esquemática de uma população mista de dois tipos de células. Células introduzidas num esferoide resultando na formação da camada (superior: fibroblastos humanos mistos da aorta (vermelho) e de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) (verde) (proporção de 10:1) ou estruturas vasculares [Abaixo: co-cultura de células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs) e HUVECs] (barra de escala, 20 µm). **Fonte:** Fannema et al., 2013.

Em conjunto, estas informações sugerem fortemente que os esferóides tragam relevância para elucidar os fatores celulares e moleculares envolvidos no acoplamento da angiogênese e osteogênese, até então pouco elucidado pelos grupos já envolvidos no tema. Além do já mencionado, o desenvolvimento de tecidos-equivalente aos tecidos originais certamente impactará o desenvolvimento de processos e produtos biotecnológicos, com mais rapidez e confiabilidade, como é o caso da indústria farmacêutica e estética. Assim, esse trabalho buscou desenvolver um modelo de tecido equivalente adequando diferentes protocolos à realidade do grupo, no departamento de Química e Bioquímica, IBB-UNESP, Botucatu-SP, além de promover e padronizar ensaios de caracterização destes, partindo de ferramentas ultra-estruturais, morfológicas e bioquímicas; além de iniciar estudos de seu efeito parácrino em eventos de osteogênese.

2. OBJETIVOS

O principal objetivo deste estudo foi gerar esferóides funcionais de tecido endotelial humano, através de células primárias, e buscar compreender seu potencial efeito na osteogênese. Especificamente pretendemos:

1. Padronização da cultura celular das linhagens primárias usadas durante o desenvolvimento desta proposta (células endoteliais arterial e venosa e célula de musculatura lisa);
2. Geração e caracterização ultra-estrutural, morfológica e bioquímica dos tecidos equivalentes arterial e venoso gerados;
3. Análise da expressão gênica de osteo-marcadores envolvidos no processo de osteogênese, buscando compreender a atividade do crosstalk parácrino entre o esferóide e células indiferenciadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Meio de cultura, RPMI-1640, *Cell Basal Medium*, fatores de crescimento endotelial (*Endothelial Growth SingleQuot Kit -EGM™-MV BulletKit™*) foram obtidos da Lonza (Lonza, Walkersville, EUA). Soro fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina, penicilina e tripsina foram obtidos da Nutricell (Campinas, SP, Brasil). Albumina de soro bovino (BSA), Tween 20 e etanol foram obtidos da Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). Anticorpos primários e secundários de variados fabricantes foram utilizados neste projeto (**Tabela 1**).

Anticorpo	Cód. Catálogo	Fabricante
α -smooth™ Cy3	1A4	Sigma Aldrich
Anti-HIF 1 α	Ab 113642	Abcan
Anti-CD 31	Orb 10314	Biorbyt
Anti- β actina	#3700	Cell Signaling
Anti-GAPDH	#5174	Cell Signaling
Anti-Runx 2	Sc 101145	Santa Cruz
Anti-mouse (HRP)	#7076	Cell Signaling
Anti-rabitt (HRP)	#7074	Cell Signaling
Anti-mouse (H+L) Alexa Fluor 488	#4408	Cell Signaling
Anti-rabitt (H+L) Alexa Fluor 488	#4412	Cell Signaling

Tabela 1: Especificação de anticorpos primários e secundários utilizados durante o desenvolvimento da caracterização e obtenção de dados do modelo experimental deste projeto.

MÉTODOS:

Desenho experimental

Nosso desenho experimental está resumido na **Figura 3**, onde células primárias foram cultivadas em culturas mistas, buscando obter esferóides funcionais do tecido endotelial e posteriormente verificar seu potencial efeito osteogênico.

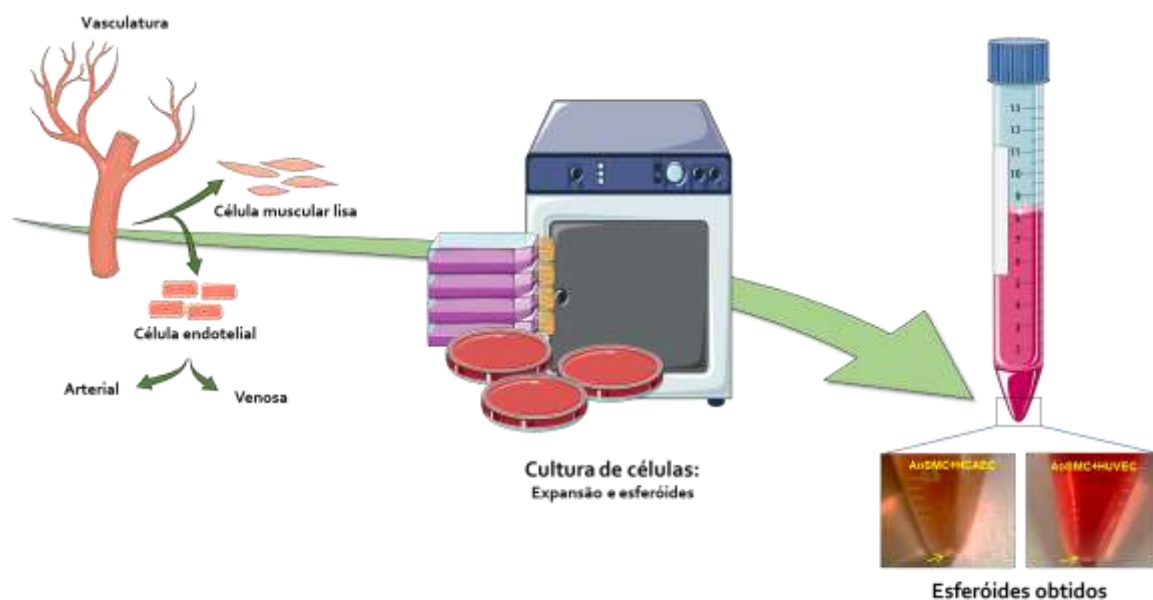


Figura 3. Modelo Experimental. Esquema da metodologia utilizada durante o desenvolvimento e formação das estruturas equivalentes.

Cultivo celular

As linhagens primárias utilizadas neste estudo foram obtidas da Lonza (Lonza, Walkersville, Walkersville, EUA) e utilizou-se passagens entre o3 e o9 o que garante seu estado (primário). As células endoteliais provenientes de veia umbilical humana (HUVEC) e artéria aorta (HCAEC) foram mantidas em cultura em meio especial *Endothelial Cell Basal-Medium 2*, suplementado com *Endothelial Growth SingleQuot Kit (EGM™-MV BulletKit™)* (Lonza, Walkersville, EUA) e as células primárias humanas musculares provenientes de músculo liso de aorta (AoSMC) mantidas em *Smooth muscle cell Basal-médium 2*, suplementado com *SmoothGrowth SingleQuot Kit, (SmBM®-2 BulletKit™)* suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina (antibióticos). As células tronco mesenquimais (hMSC – passagem o6) provenientes do terceiro molar de pacientes entre 20 e 22 anos (aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade de Campinas – FOP, UNICAMP, sob a inscrição: CAAE 55588816.4.0000.5418) foram mantidas em meio RPMI 1640 (Nutricell – Campinas, SP) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina, 100 UI/mL de penicilina (antibióticos) e todas alocadas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂. Para manutenção as células foram cultivadas em frascos de cultura celular com repiques periódicos a cada 72 h.

Geração dos Esferóides e Coleta de meio condicionado

Esferóides de células endotelial e muscular foram gerados em meio recomendado pela Lonza. As células de musculatura lisa (AoSMC) e endoteliais de veia umbilical (HUVEC) e artéria aorta (HCAEC) foram semeadas, proporcionalmente iguais (1×10^5 células) em tubos cônicos (falcons) de 15 mL e centrifugadas à 3000 xg por 4 minutos. Um esferóide contendo apenas células musculares foi gerado para ser utilizado como controle do experimento. Nestas condições, todas as células em suspensão foram realocadas para o fundo em “U” do tubo, onde manteve-se a tampa entre aberta para tamponamento do meio e mantidas em estufa úmida a 37°C contendo 5% de CO₂ por 72h contribuindo assim para a formação de um esferóide único. Após a formação dos esferóides, o meio de cultura foi substituído por meio

DMEM suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino) e mantidos em cultura por tempo adicional de 72h para coleta e armazenamento à -80°C do meio condicionado.

Caracterizaçãodos Esferoides:

Depois de obtidos, os esferóides foram fixados em PFA 4%, solução de Karnovsky e glutaraldeído 2,5% e em seguida submetidos aos protocolos de caracterização estrutural por microscopia de luz, confocal e microscopia eletrônica de transmissão.

- a) Microscopia de luz: as amostras fixadas em PFA 4% foram incluídas em resina. Para as análises histoquímicas o bloco foi seccionado em micrótomo com cortes de 5 µm e corados com azul de toluidina.
- b) Microscopia confocal: os esferóides fixados com glutaraldeído 2,5% por 24h foram submetidos à ação de uma solução permeabilizante (0,1% saponina, 0,1% Triton-X 100, 1% BSA em PBS) e em seguida incubados com anticorpos primários específicos para marcação de célula muscular (α -smooth), endotelial (CD31) e fator de hipóxia (HIF-1 α) e secundários com fluoróforo Alexa Fluor 488 e analisados em microscópio confocal no Centro de Microscopia Eletrônica CME – do Instituto de Biociência do Campus da UNESP de Botucatu;
- c) Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET): depois de fixados em solução de Karnovsky os esferoides foram incubados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato 0,1 mol/L pH 7,3 por 2h, lavadas e posteriormente expostas ao acetato de uranila 0,5% por 2h. Depois da desidratação as amostras de MET foram infiltradas com resina Araldite, emblocadas e processadas. Brevemente, secções ultrafinas (50-80 nm) foram montadas em *grids* de cobre e analisadas em microscópio eletrônico no Centro de Microscopia Eletrônica CME – do Instituto de Biociência do Campus da UNESP de Botucatu.

d) Imunocitoquímica com ouro coloidal: Depois de fixadas as amostras foram processadas, infiltradas com resina araldite, emblocadas e as secções ultrafinas (50-70 nm) montadas em grids de cobre. Em seguida em uma câmara umidificada e protegida da luz, as amostras foram bloqueadas com BSA 5% por 30 min em temperatura ambiente, incubadas com anticorpo específico para cada marcação por 1h à 37°C e após, overnight à 4°C. Posteriormente foram lavadas 3x com PBS 1x e incubadas por 1h em temperatura ambiente com anticorpo secundário específico (coelho/camundongo) contendo ouro coloidal 15nm e então realizou a contra-coloração com acetato de uranila aquoso (0,5%). A análise foi realizada em microscópio eletrônico – Centro de Microscopia Eletrônica na Universidade Nacional de Córdoba – Argentina.

Ensaio de Viabilidade Celular (MTT):

As células foram semeadas em placas de 96 poços (1×10^4 células) e após 24h de adesão tratadas com diferentes concentrações de agonista (DMOG) e antagonista (Crhysin) de HIF-1 α (concentração variando de 100 μ g a 0.390 μ g) no período de 72h. Posterior a esse período, o meio de cultura celular foi removido, e imediatamente adicionou-se o MTT (1 mg mL⁻¹) mantendo-se os tempos necessários para a redução do sal. Em seguida, o meio contendo MTT foi removido e 1 mL de etanol absoluto foi adicionado para solubilização do corante azul formado por células viáveis. Depois, a absorbância foi medida a 570 nm usando um leitor de microplaca (leitor multi-modo SYNERGY-HTX, Biotek, EUA) (T. Mosmann, 1983).

Tratamento com meio condicionado pelos esferóides:

Células tronco mesenquimais (CTM) foram mantidas em cultura em RPMI 1640 até semi-confluência. Após esta etapa, foram plaqueadas (5×10^4 células) separadas em grupos e tratadas com meio condicionado pelos esferóides controle (AoS), venoso (Vem) e arterial (Art) contendo 50 μ M de agonista (DMOG) e antagonista (Chrysin) de HIF-1 α por um período de 72h. Um controle positivo (OM) do experimento foi realizado tratando um grupo com fatores indutores de diferenciação osteoblástica clássica: [β -glicerofosfato (10 mM) + dexametasona (0,03 g / mL) + ácido ascórbico (50 μ g / mL)]. Em seguida, realizou-se a coleta das amostras para extração de RNA e Western blotting.

Western Blotting:

Após a formação do tecido equivalente e tratamento das células mesenquimais, as amostras foram coletadas e lisadas com tampão de lise [Tris-HCl 50 mmol/L (pH 7,4); Tween 20 1%; deoxicolato de sódio 0,25%; NaCl 150 mmol/L; EDTA 1 mmol/L; o-vanadato 1 mmol/L; NaF 1 mmol/L; inibidores de proteases (aprotinina 1 μ g/mL, leupeptina 10 μ g/mL e PMSF 1 mmol/L) em banho de gelo por 1 h e sonicadas nestes período para otimizar a desorganização dos mesmos. A seguir o extrato foi clarificado por centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos e a concentração de proteína determinada pelo método de Lowry (Lowry et al., 1951). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris-HCl 120 mmol/L pH 6,8; ditioneitol (DTT) 200 mmol/L; dodecil sulfato de sódio (SDS) 4%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 20%]. As amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em gel de poliacrilamida (10%) contendo SDS (SDS-PAGE). A seguir, as amostras foram transferidas para membranas de PVDF, as quais foram bloqueadas com leite desnatado (2,5%) preparado em tampão Tris contendo 0,05% de Tween 20 (TBST) por 1 h. As membranas foram então incubadas *overnight* com os anticorpos primários diluídos 1:1000 em TBST contendo BSA 2,5% (TBST/BSA). As membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários 1:2000 em TBST/BSA por 2 h. As membranas foram lavadas com TBS e analisadas por quimioluminescência (ECL).

Expressão Gênica:

a) Extração de RNA: As amostras dos esferóides formados e das CTM tratadas com meio meio condicionado foram coletados, homogeneizados em TRIzol® e armazenadas em biofreezer a -80 °C. Para isolar o RNA total foi utilizado o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol, de acordo com as especificações do fabricante. A quantidade e pureza do RNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience). A transcrição reversa dos RNAs extraídos, realizada com kit SuperScript First Strand;

b) Quantificação da Expressão Gênica por Tempo Real (q-PCR): As reações para o estudo do padrão de expressão dos possíveis genes e miRNA's relacionados à angiogênese e diferenciação osteoblástica foram realizadas em triplicata utilizando SYBR Green Master Mix (q-PCR®, Promega) e iniciadores específicos (Primers) mostrados nas tabela 2 e 3.. Para o cálculo da quantidade relativa utilizou-se o método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta Ct}$ (Tong, et. al. 2015), sendo os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata e como os controles internos, os genes GAPDH, β -ACTINA e 18S, para normalização dos dados.

Gene	Sequência (F)	Sequência (R)	Ciclagem qPCR
18 S	CGGACAGGATTGACAGATTGATAGC	TGCCAGAGTCTCGTTCTTATCG	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
β-ACTINA	ACAGAGCCTCGCCTTTGC	GCGGCGATATCATCATCC	95°C – 15s; 59°C – 30s; 72°C – 30s
ALP	CGGGACCATGAAGGAAA	GGCCAGACCAAGATAGAGTT	95°C – 15s; 60°C – 30s; 72°C – 30s
DICER	GTCAGCCGTCAGAACTCACTC	ACAGTCAAGGCGACATAGCAA	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
DROSHA	CGGCGACGACCCATTGGAAC	GAATCGAACCCTGATCCCCGTC	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
GAPDH	GACTCATGACCACAGTCCATGC	AGAGGCAGGGATGATGTTCTG	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
HIF 1 α	CATAAAGTCTGCAACATGGAAGGT	ATTTGATGGGTGAGGAATGGGTT	95°C – 15s; 59.5°C – 30s; 72°C – 30s
OTX	CCAGGCAACACTCCTACTCC	GCCTTGCCATACACCTTGC	95°C – 15s; 60°C – 30s; 72°C – 30s
RUNX 2	CCGTCCATCCACTTACCAC	ATGAAATGCTTGGGAACTGC	95°C – 15s; 60°C – 30s; 72°C – 30s
RNU	CTCGCTTCGGCAGCACA	AACGCTTCACGAATTTGCGT	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
VEGF	TGCAGATTATGCGGATCAAAACC	TGCATTACATTTGTTGTGCTGTAG	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
VEGFR	CAGGCCAGTTTCTGCCATT	TTCCAGCTCAGCGTGGTCGTA	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
XPO5	AAGAGATGCTGGAGGAGCAA	TGCCAGGTCTGTAAGCTCT	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s

Tabela 2. Sequência de primers dos genes utilizados durante o desenvolvimento deste projeto.

Gene	Sequência (F)	Sequência (R)	Ciclagem qPCR
hsa-miR 10b	CCAGAGGTGTAACTGTCTATATATACCCGTAG	TGAAGTTTTGTCATCGACCATATATCCCCTAG	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 15a	CCTTGGAGTAAAGTAGCA	CCTTGATTTTTGAGGCAGCAC	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 16	GTCAGCAGTGCCTTAGCAGC	GTCACCTTCSTTCAGCAGC	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 17	TCAGAATAATGTCAAAGTGCTTACAGTGCAGG	GTCACCATAATGTACAAGTGCCTTCACTC	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 21	GTCGGGTAGCTTACAGACTGATGTTGAC	TTGTGACAGACCCCATCGACTGG	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 23a	CCGGCTGGGTTCTCTG	GGTCGGTTGGAAATCCCTGGC	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 23b	CTCAGGTGCTCTGGCTGC	GCCAAGGTCTGGTTGCGTG	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 101	TGCCCTGGCTCAGTTATCAG	TGCCATCCTTCAGTTATC	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 132	GGGCAACCGTGGCTTTCGA	GGGCGACCATGGCTCTAG	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 143	CGCAGCGCCCTGTCTC	GCTGCAGAACAACCTCTCTCTCTGAG	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 145	ACCTTGCTCTCAGGTCCAGTTTTT	AACCATGACCTCAAGAACAGTATTCCAGG	95°C – 15s; 58.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 335	TCTTTTGGCGGGGTCA	TGGCTATAACCCATGAG	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 365	CCGCAGGGAATGAGGGACTTTTG	TGCAAGAGCAATAAGGATTTTAGGGGCAATTG	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 485	ACTTGAGAGAGGCTGGC	ACTAGAAGAGAGGAGAGC	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s
hsa-miR 1293	AGGTTGTTCTGGGTGGTCTGGAG	TAAAGACTAAGTGGTCCGGAGATTTGTGC	95°C – 15s; 56.5°C – 30s; 72°C – 30s

Tabela 3. Sequência de primers dos microRNA's envolvidos nos processos de angiogênese e osteogênese.

Análise de dados:

A ocorrência de diferenças significativas entre os grupos estudados foi verificada empregando-se a análise de variância (ANOVA). Nos casos em que a diferença estatística foi significativa, o teste de Dunnetts foi utilizado para testar as diferenças mínimas existentes entre os grupos estudados, sendo todos correlacionados com o controle experimental. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal, ou seja, significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Formação e caracterização morfológica dos tecidos equivalentes: venoso e arterial

Vasos sanguíneos medeiam o transporte de células circulantes, oxigênio, nutrientes e metabólitos, além de fornecerem sinais angiócrinos, capazes de controlar o crescimento tecidual e a homeostase do organismo. Sendo assim, a formação de novos vasos é um processo fundamental na renovação dos tecidos do corpo durante toda a vida, como o osso (Kusumbe, et. al. 2014). Buscando gerar tecidos equivalentes de endotélio, com propriedades funcionais, células humanas endoteliais e musculares lisas foram tripsinizadas e semeadas na mesma densidade em tubos cônicos (tubos Falcon®) e submetidas ao protocolo de centrifugação, conforme detalhado antes e, posteriormente, coletadas, fixadas, incluídas em resina e analisadas com protocolos histológicos. Os resultados mostraram que, seguindo o protocolo adotado neste estudo, os esferóides (tecido equivalente) foram obtidos, arranjando-se em uma estrutura esférica apontada pela seta na **Figura3**, onde observou-se o tecido equivalente formado. Na **Figura4** mostramos caracterização morfológica parcial do esferóide gerado, através da coloração de azul de toluidina. Estes cortes histológicos já destacam um possível arranjo espacial dessas células, sugerindo uma localização periférica das células de musculatura lisa (AoSMC), mais alongadas e fusiformes, apontadas pelas setas em amarelo, enquanto as células HUVEC e HCAEC, venoso e arterial, respectivamente, colocam-se no centro da estrutura. No entanto, estas observações necessitam de análises mais detalhadas para maiores conclusões acerca destas estruturas.

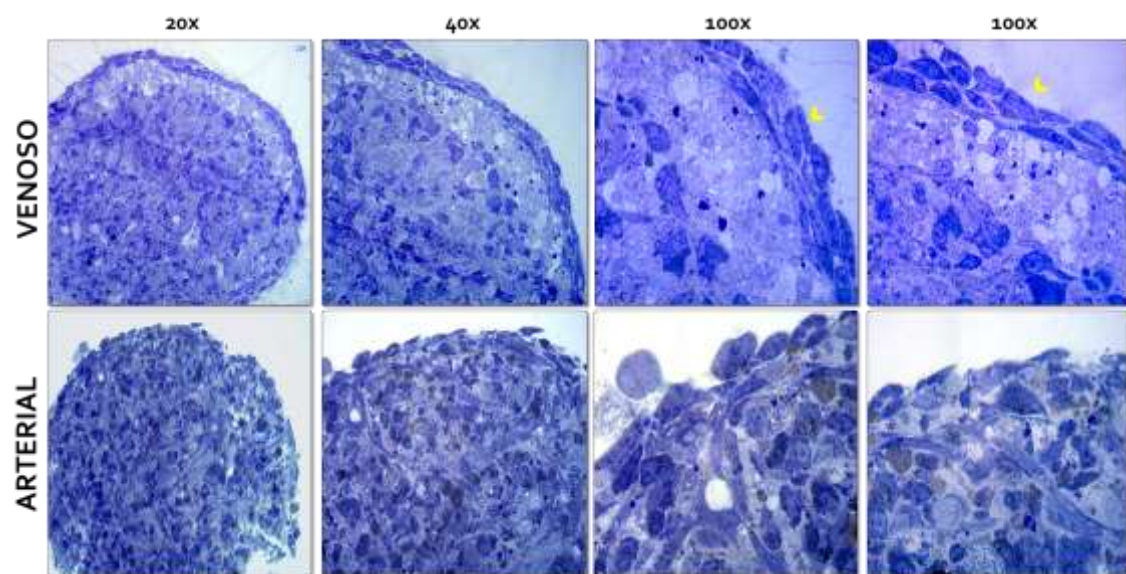


Figura 4. Caracterização Histológica. Fotomicrografia representativa de cortes histológicos de 5 μ m das estruturas de tecido equivalente (esferoide) venoso e arterial corados com azul de toluidina mostrando a organização dos dois tipos celulares em cada modelo. Observa-se um arranjo celular mais definido no tecido venoso onde um cordão de células na camada mais externa assemelha-se com a morfologia das células musculares (indicado pela cabeça de seta). Magnificação de 20x, 40x e 100x.

Caracterização ultra-estrutural e bioquímica dosesferóides de tecido endotelial através de microscopia eletrônica de transmissão e confocal

Após caracterização prévia morfológica mostrada anteriormente, buscamos entender eventos ultra-estruturais e bioquímicos, capazes de trazer informações importantes no tocante a caracterização do esferóide, sobretudo nos trazendo dados de localização espacial e distribuição dos tipos celulares diante ao cultivo misto e formação do esferóide tridimensionalmente. Inicialmente, submetemos os esferóides formados ao processamento histotécnico para análise ultra-estrutural através de microscopia eletrônica. Referente ao esferóide de tecido endotelial venoso, a **Figura 5** mostra características ultra-estruturais da interação entre HUVEC e AoSMC. Através das eletromicrografias apresentadas fica clara a distribuição de células mais alongadas na periferia do esferóide (**Figura 5a, b**), com células mais arredondadas ao centro. Pelas características morfológicas já conhecidas destas células em estudo, sugerimos então uma organização celular do esferóide onde as AoSMCs estejam na periferia do tecido equivalente e as endoteliais ao centro. Além disso, foi possível pontos de interação célula- célula através de junções especializadas na membrana plasmática (**Figura 5d, e, f**; seta).

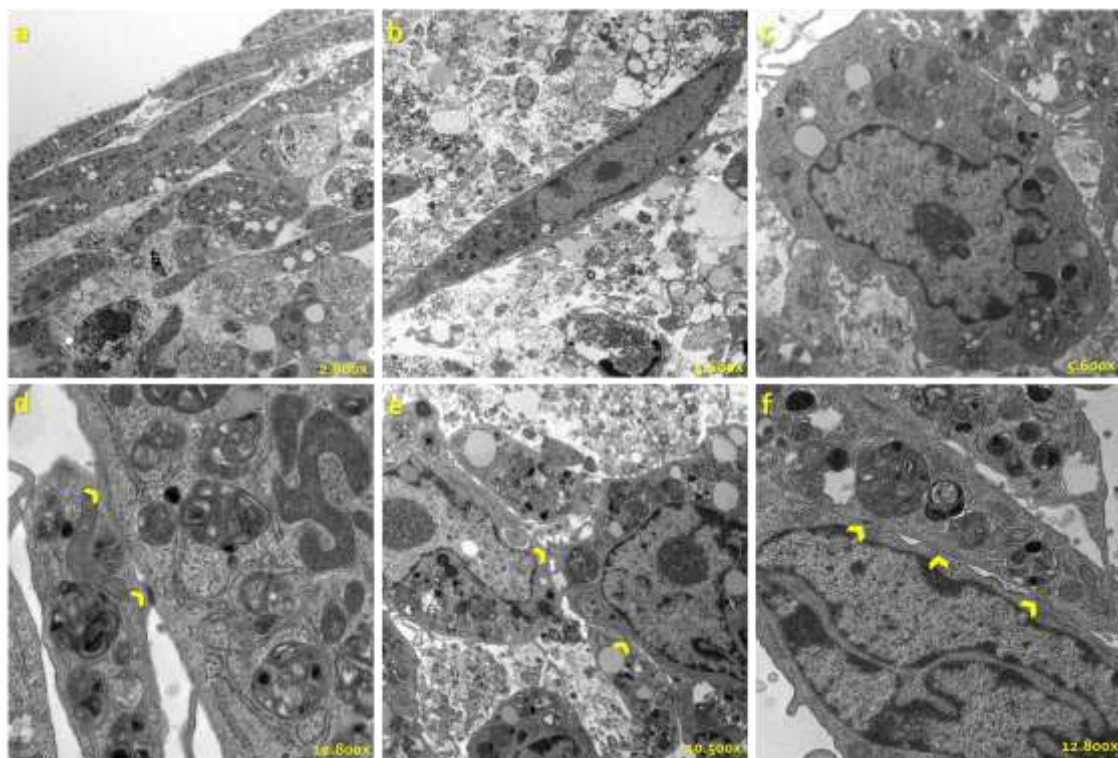


Figura 5. Caracterização ultra-estrutural. Eletromicrografias do esferóide venoso, obtidas a partir de microscopia eletrônica de transmissão. Em (a), visão panorâmica de células musculares (AoSMC) e endoteliais (HUVEC). Em (b) e (c), morfologia das células muscular (AoSMC) e endotelial de veia umbilical (HUVEC) respectivamente. (d) junção celular entre duas células musculares (AoSMC), (e) junção celular entre duas células endoteliais (HUVEC) e (f) junção celular entre as linhagens muscular (AoSMC) e endotelial de veia umbilical (HUVEC), todas indicadas por cabeça de seta.

No sentido de elaborar metodologias capazes de nos auxiliarem neste processo de caracterização dos esferóides obtidos, decidimos submetê-los a marcação de proteínas conhecidamente biomarcadores de células musculares e endoteliais. Assim, decidimos fazer uso de microscopia confocal e eletrônica para analisar a distribuição das proteínas α -SMA e CD31, marcadores de células musculares lisas e endotelial, respectivamente. Para análise, fazendo uso de microscopia eletrônica partimos da tecnologia de anticorpos conjugados com ouro coloidal para localização subcelular das proteínas em teste. Assim, as **Figuras 6 e 7** trazem microscopias referentes a estas estratégias de análises, onde afirmamos nossa hipótese de que as células de musculatura lisa estão distribuídas periféricamente, confirmadas aqui pelas 2 metodologias de microscopia desenvolvidas com localização de α -SMA.

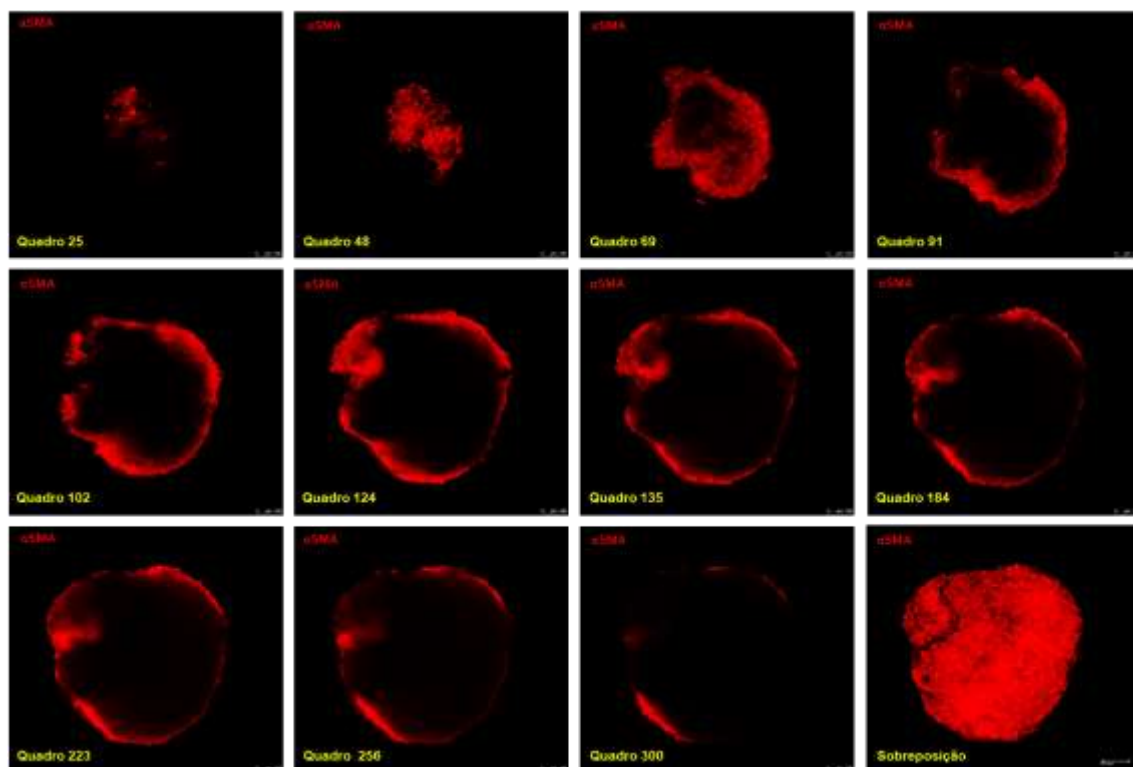


Figura 6. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente venoso. Imunofenotipagem de células de musculatura lisa (AOSMC) na estrutura tridimensional marcadas com anticorpo específico para α -SMA conjugado com Cy3. Imagens representativas da avaliação tridimensional de 288 quadros adquiridos com intervalo de $1\mu\text{m}$ (barra = $100\mu\text{m}$).

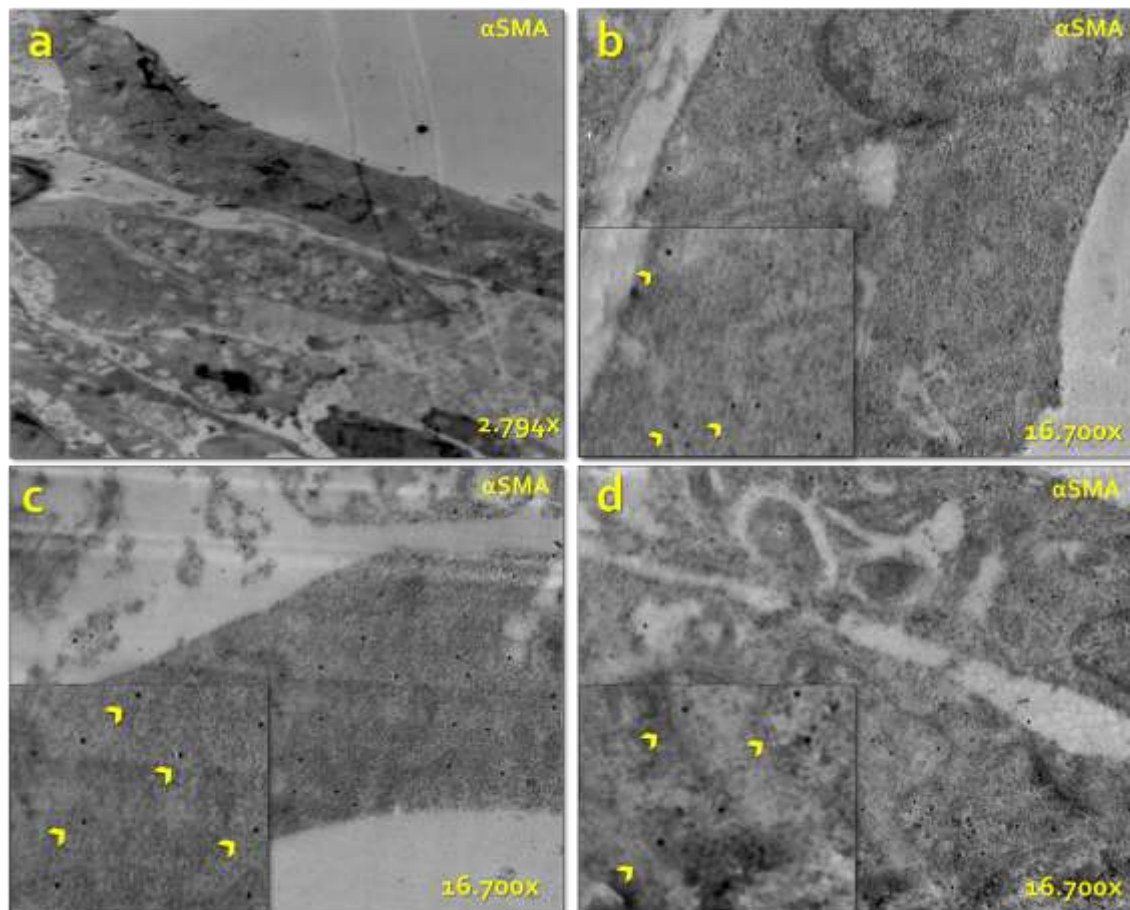


Figura 7. Análise imunocitoquímica em tecido equivalente (esferoide) venoso. Marcação de células de musculatura lisa (AoSMC) realizada por microscopia eletrônica de transmissão. (a) vista panorâmica da porção externa do esferoide. (b), (c) e (d) imunocoloração dos agregados positivos de α-SMA utilizando anticorpo secundário contendo ouro coloidal (15nm) indicados pelas cabeças de setas.

Complementarmente, as **Figuras 8 e 9** trazem microscopias referente às imunomarcações da proteína CD31, fazendo uso das mesmas metodologias. Nossos resultados mostram que as células positivas para CD31 estão predominantemente localizadas ao centro dos esferóides, estabelecendo uma distribuição específica das 2 linhagens primárias em questão: musculatura lisa distribuídas na periferia e células endoteliais ao centro.

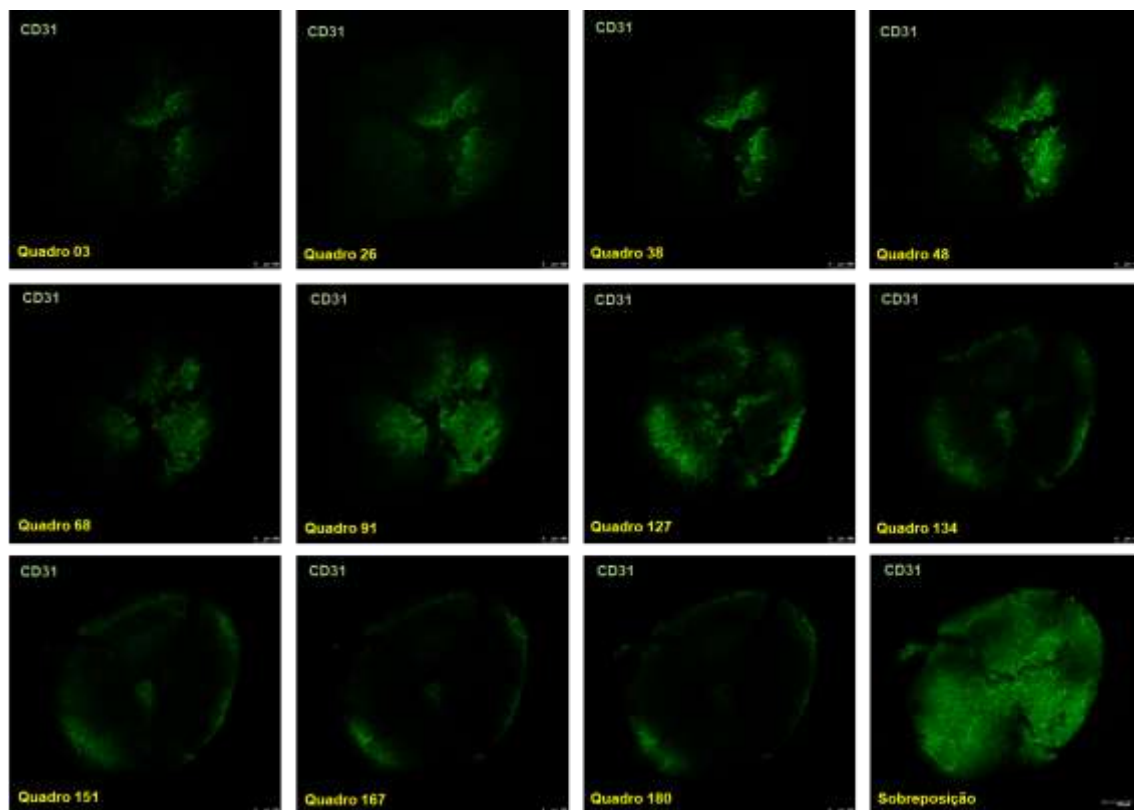


Figura 8. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente (esferoide) venoso. Imunofenotipagem de células endoteliais de veia umbilical (HUVEC) na estrutura tridimensional marcadas com anticorpo específico para CD 31, seguido de secundário anti-*rabbit* conjugado com Alexa Flúor 488. Imagens representativas da avaliação tridimensional de 265 quadros adquiridos com intervalo de 1μm (barra = 100 μm).

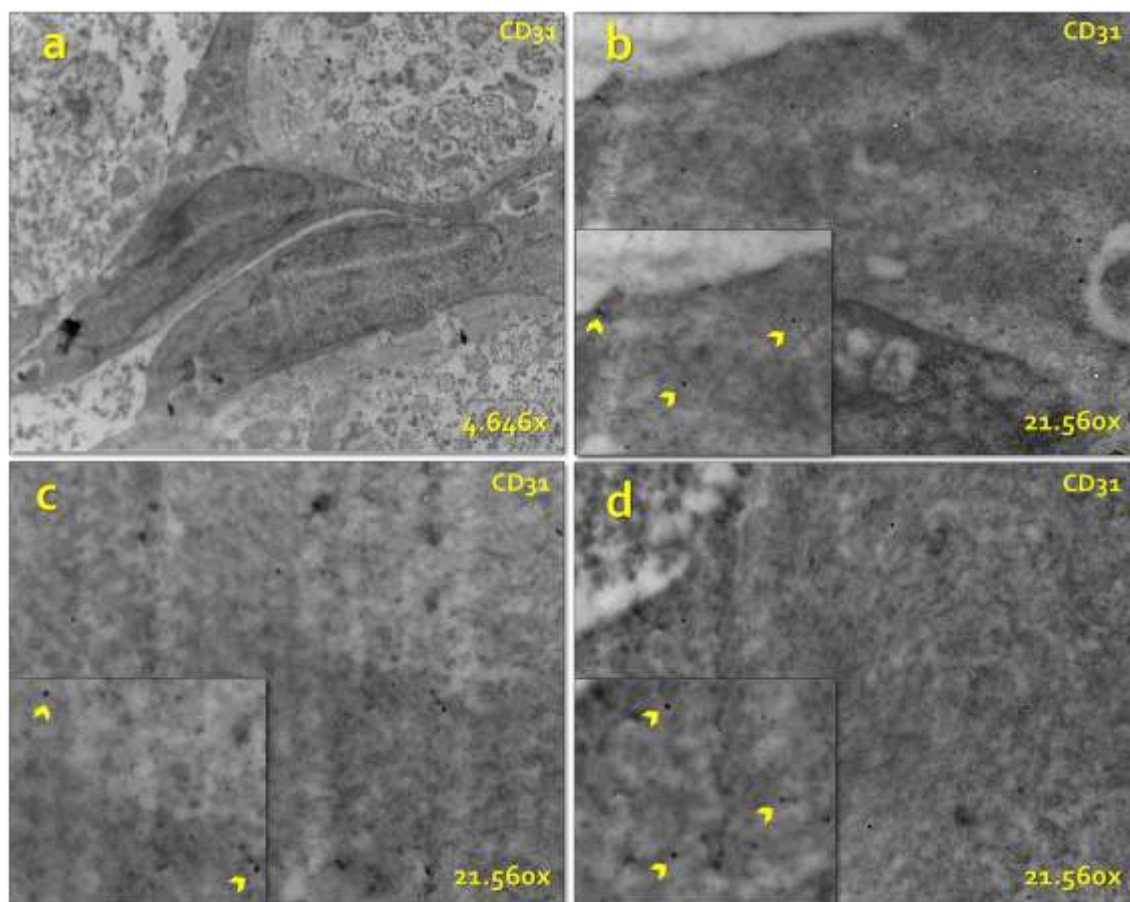


Figura 9. Análise imunocitoquímica em tecido equivalente (esferoide) venoso. Marcação de células endoteliais de veia umbilical (HUVEC) realizada por microscopia eletrônica de transmissão. (a) vista panorâmica da porção interna do esferoide destacando células endoteliais. (b), (c) e (d) imunocoloração dos agregados positivos de CD₃₁ utilizando anticorpo secundário contendo ouro coloidal (15nm) indicados pelas cabeças de setas.

Da mesma maneira, submetemos esferóides arteriais às mesmas metodologias e mostramos resultados semelhantes àqueles encontrados com o tecido venoso, quanto à distribuição das células, onde células musculares lisas (AoSMCs) estão localizadas externamente (**Figuras 10 e 11**), na periferia do esferóide, e células endoteliais localizadas predominantemente ao centro (**Figuras 12 e 13**).

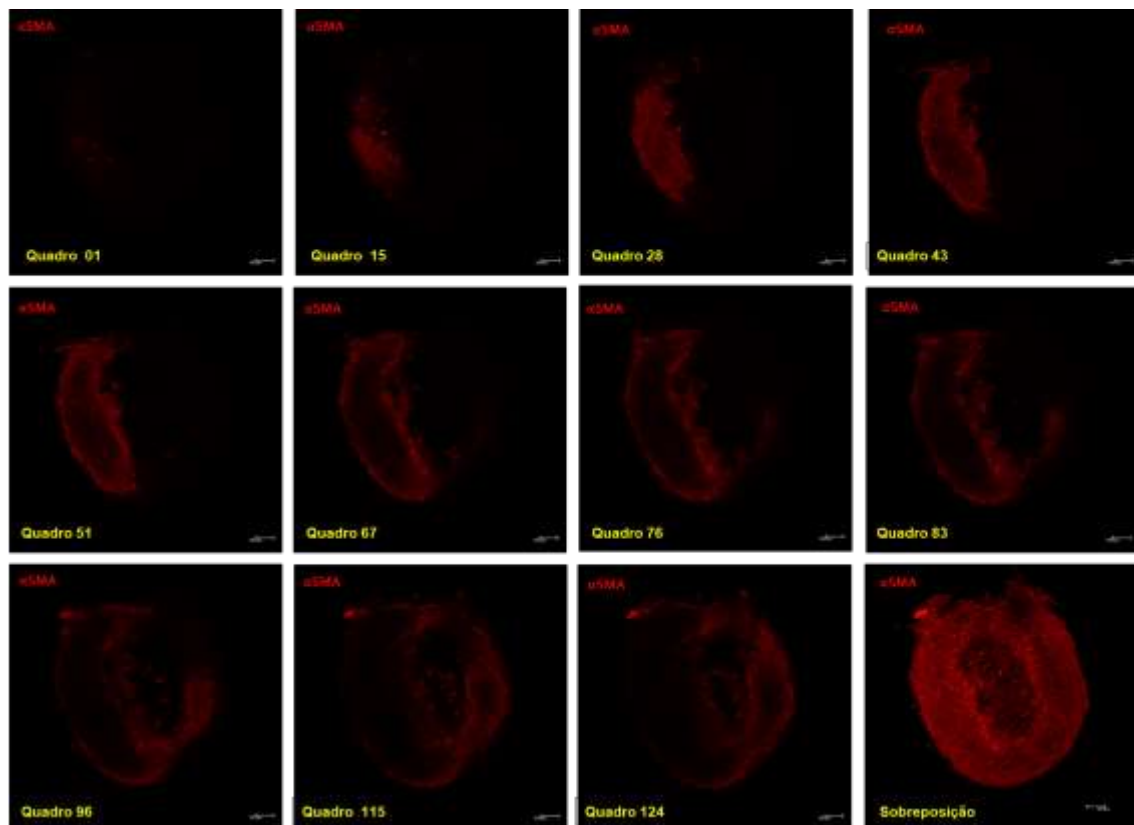


Figura 10. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente (esferoide) arterial. Imunofenotipagem de células de musculatura lisa (AOSMC) na estrutura tridimensional marcadas com anticorpo específico para α -SMA conjugado com Cy3. Imagens representativas da avaliação tridimensional de 219 quadros adquiridos com intervalo de $1\mu\text{m}$ (barra = $100\mu\text{m}$).

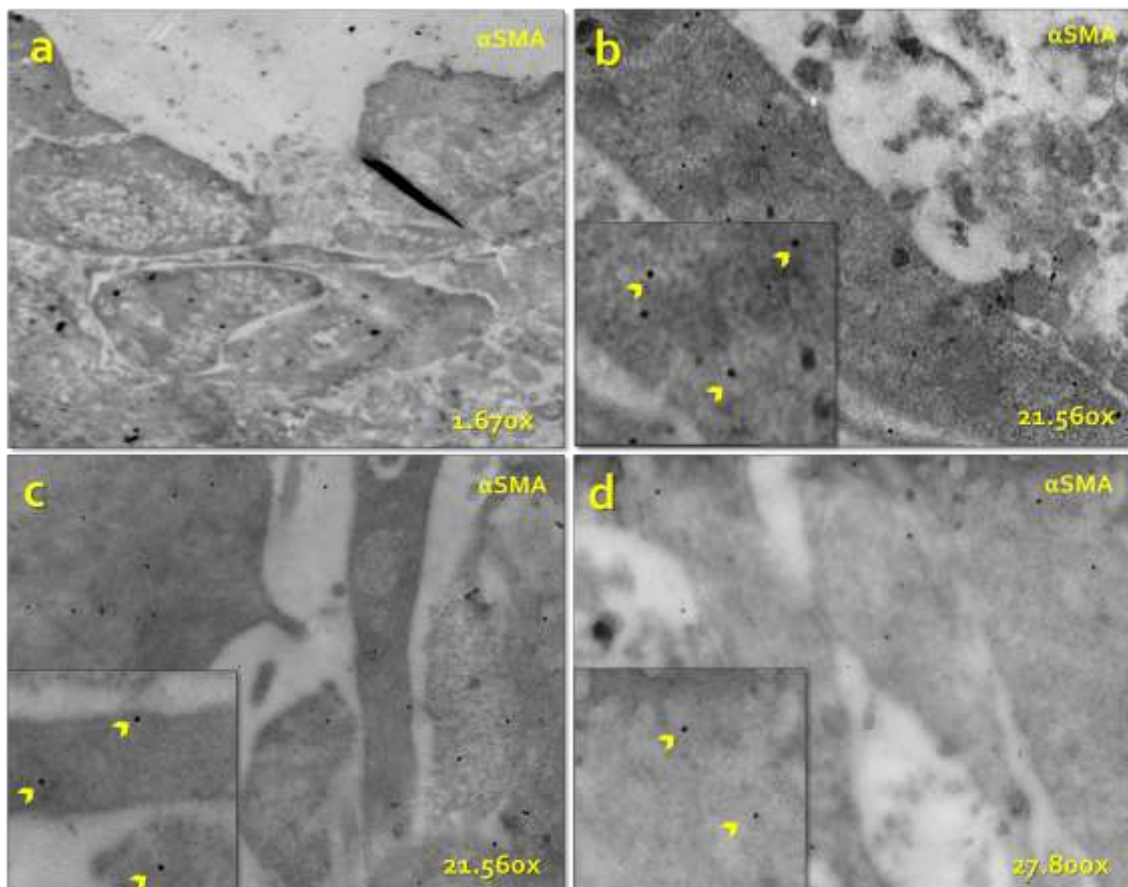


Figura 11. Análise imunocitoquímica em tecido equivalente (esferoide) arterial. Marcação de células de musculatura lisa (AoSMC) realizada por microscopia eletrônica de transmissão. (a) vista de parte da região externa do esferoide. (b), (c) e (d) imunocoloração dos agregados positivos de α -SMA utilizando anticorpo secundário contendo ouro coloidal (15nm) indicados pelas cabeças de setas.

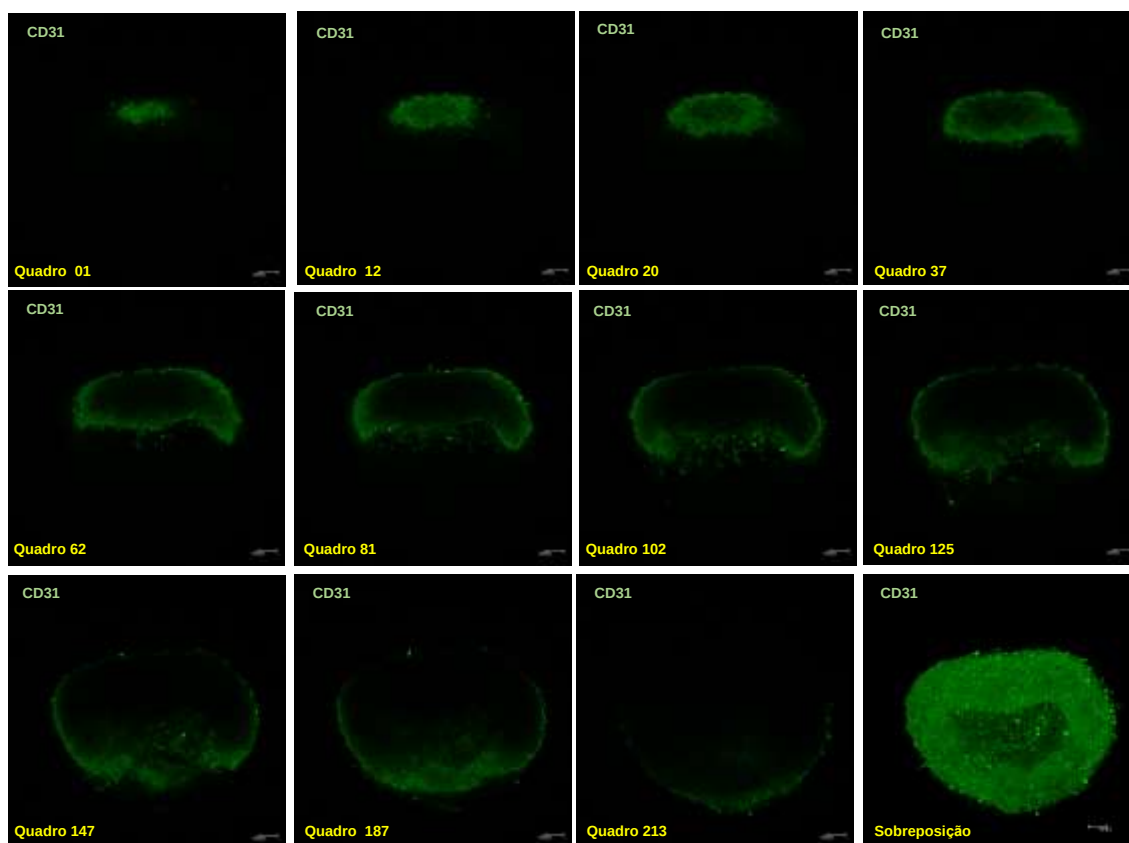


Figura 12. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente (esferoide) arterial. Imunofenotipagem de células endoteliais de artéria aorta (HCAEC) na estrutura tridimensional marcadas com anticorpo específico para CD 31, seguido de secundário anti-*rabbit* conjugado com Alexa Flúor 488. Imagens representativas da avaliação tridimensional de 246 quadros adquiridos com intervalo de 1 μ m (barra = 100 μ m).

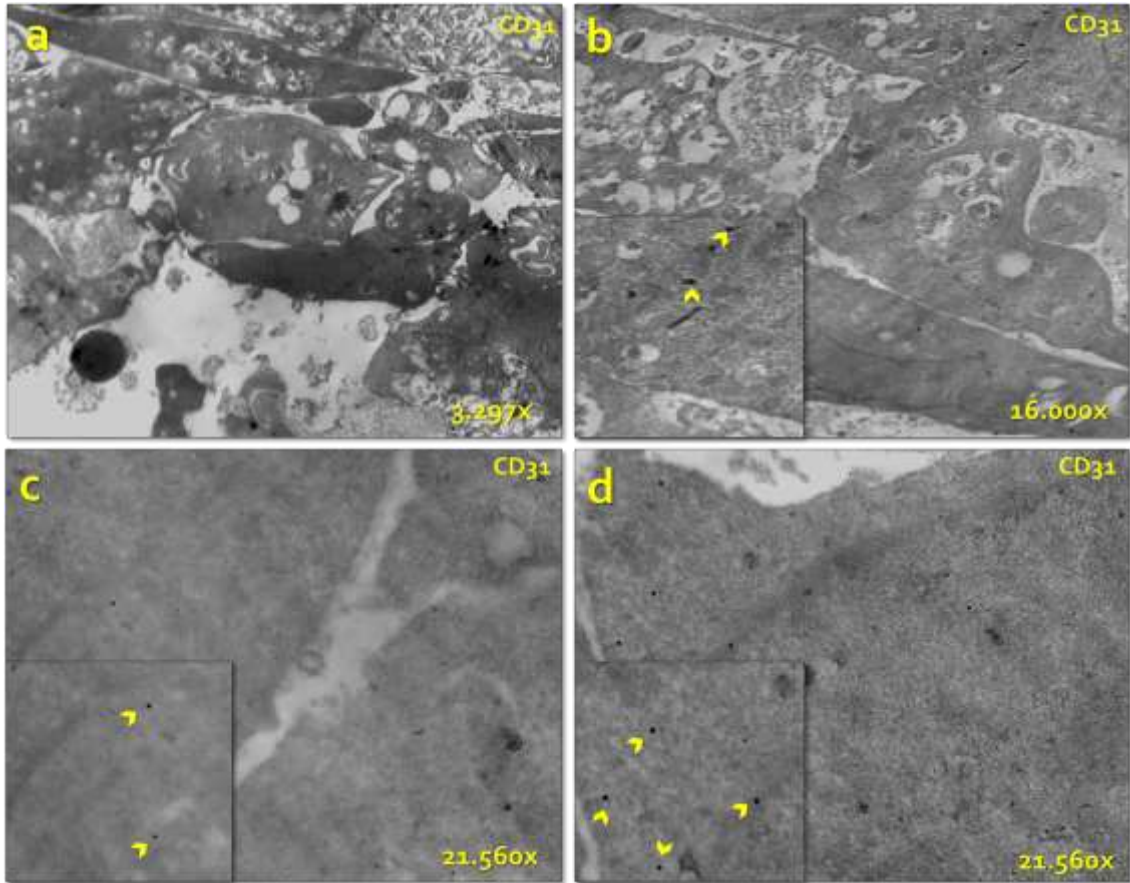


Figura 13. Análise imunocitoquímica em tecido equivalente (esferóide) arterial. Marcação de células endoteliais de artéria aorta (HCAEC) realizada por microscopia eletrônica de transmissão. (a) vista panorâmica da porção interna do esferóide. (b), (c) e (d) imunomarcação dos agregados positivos de CD 31 utilizando anticorpo secundário contendo ouro coloidal (15nm) indicados pelas cabeças de setas.

Testes funcionais revelam envolvimento diferencial de HIF1 α

Ao concluir a etapa de caracterização, mostramos que os esferóides gerados apresentavam as 2 linhagens primárias cultivadas de maneira mista, durante sua formação, além de distinguir organização celular, sendo as células de musculares lisas residentes agora na periferia do esferóide, enquanto as células endoteliais posicionaram no centro. Passamos agora a buscar entender potenciais mecanismos moleculares/bioquímicos que possam governar estes eventos celulares. Neste contexto, partimos de 2 abordagens importantes: a primeira delas, verificar a capacidade destes esferóides em expressar VEGF e seu receptor, VEGFR; e a segunda, em analisar potencial mecanismo de hipóxia neste tecido equivalente, visto que o tecido 3D formado potencialmente diminui a difusão de oxigênio e nutrientes ao centro do mesmo, provavelmente interferindo no desempenho celular. Neste cenário, mostramos uma expressão diferencial de ambos os genes VEGF e VEGFR, nos diferentes esferóides gerados, sendo que a expressão de VEGF foi significante menor nos esferóides venoso e arterial, comparados ao controle direto, esferóides formados apenas por células de musculatura lisa (**Figura 14a**). Por outro lado, a expressão do gene VEGFR foi super-expresso significativamente em ambos os esferóides, comparados ao grupo controle, alcançando aproximadamente 20 vezes mais no esferóide arterial (**Figura 14b**).

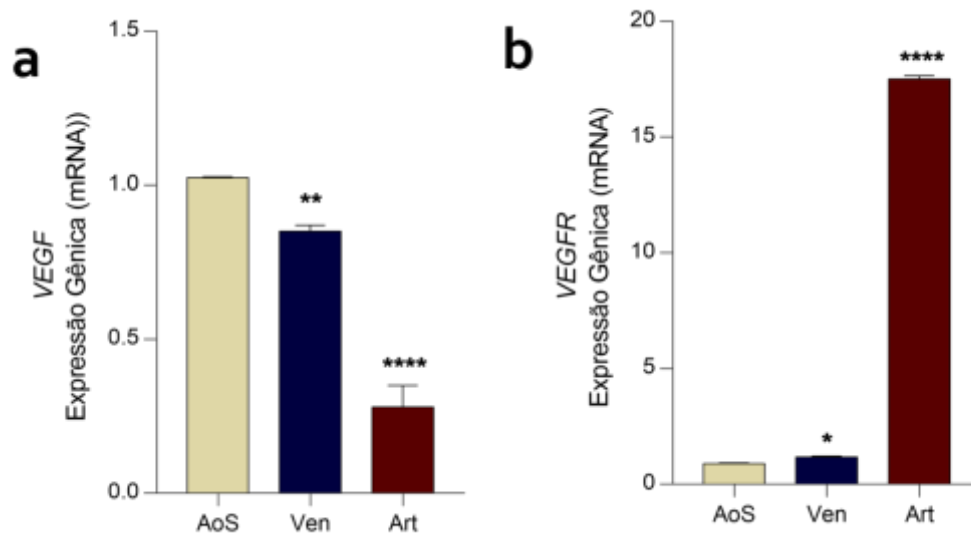


Figura 14. Níveis de expressão gênica de marcadores de angiogênese (VEGF; VEGFr). Análise quantitativa por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S) e obtidas pelo programa PRISM7. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$). ANOVA, teste de Dunnett's.

Posteriormente, verificamos se estes esferóides estavam sofrendo condições de hipóxia investigando o comportamento da expressão gênica e conteúdo proteico de HIF1 α . Nossos resultados mostram uma diminuição significativa na atividade deste gene em esferóides venoso e arterial (**Figura 15a**). Na análise do conteúdo proteico por *western blotting*, mostramos uma performance diferencial desta proteína, sendo diferencialmente expressa nos esferóides arteriais (**Figura 15b,c**). Em nota, destacamos que a sinalização do Fator Induzido por Hipóxia (HIF) está intrinsecamente envolvida em diversos processos celulares em vertebrados, estando diretamente ligado ao acoplamento angio-osteogênico, além do desenvolvimento e reparação ósseos. A ativação de HIFs em resposta a um microambiente ósseo hipóxico estimula a transcrição de múltiplos genes com efeitos na angiogênese (Drager, et. al. 2015).

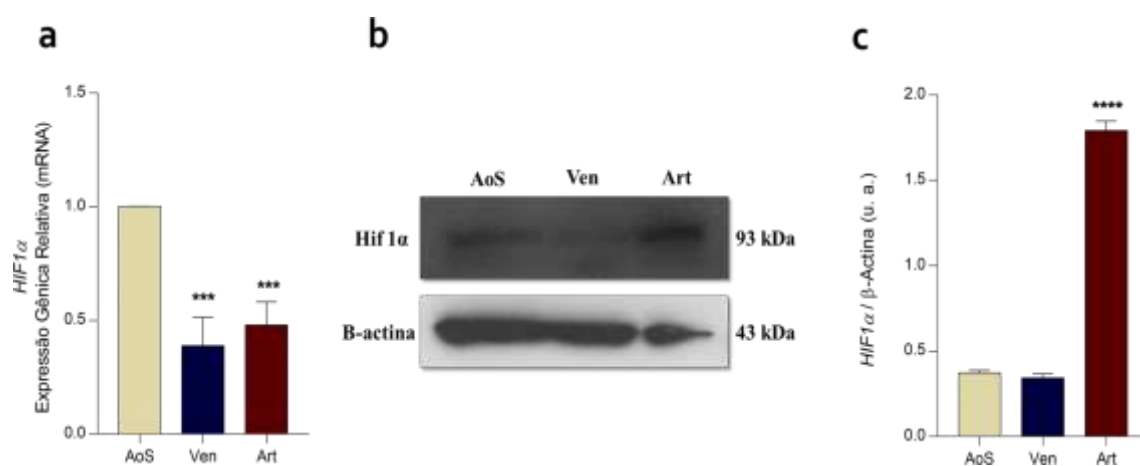


Figura 15. Expressão gênica e proteica do fator de hipóxia (HIF-1 α). (a) Análise quantitativa por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (b) Imunoblotting representativo de HIF-1 α , onde 75 ug de proteína foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (c) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função da β -Actina e a intensidade relativa da razão proteína/ β -actina expressa em relação ao esferoide controle (AoS). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); ** ($p < 0,01$); **** ($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

Posteriormente, avaliamos a distribuição de HIF-1 α nos esferóides venoso (**Figuras 16, 17**) e arterial (**Figura 18, 19**), utilizando abordagens de microscopia laser confocal e microscopia eletrônica, aqui aplicando a metodologia através de anticorpo conjugado ao ouro coloidal. Surpreendentemente, nossos resultados mostram que, independente do esferóide, venoso ou arterial, o HIF-1 α é expresso exclusivamente pelas células musculares lisas (AoSMC).

Nas **Figuras 17 e 19**, onde trazemos eletromicrografias da análise de distribuição do anticorpo conjugado ao ouro coloidal, as letras **a** e **b** correspondem às células AoSMC, localizadas externamente, e as figuras correspondentes as letras **c** e **d** são células endoteliais. Destaca-se aqui a ausência de marcação nas células endoteliais, independente se de origem arterial ou venosa.

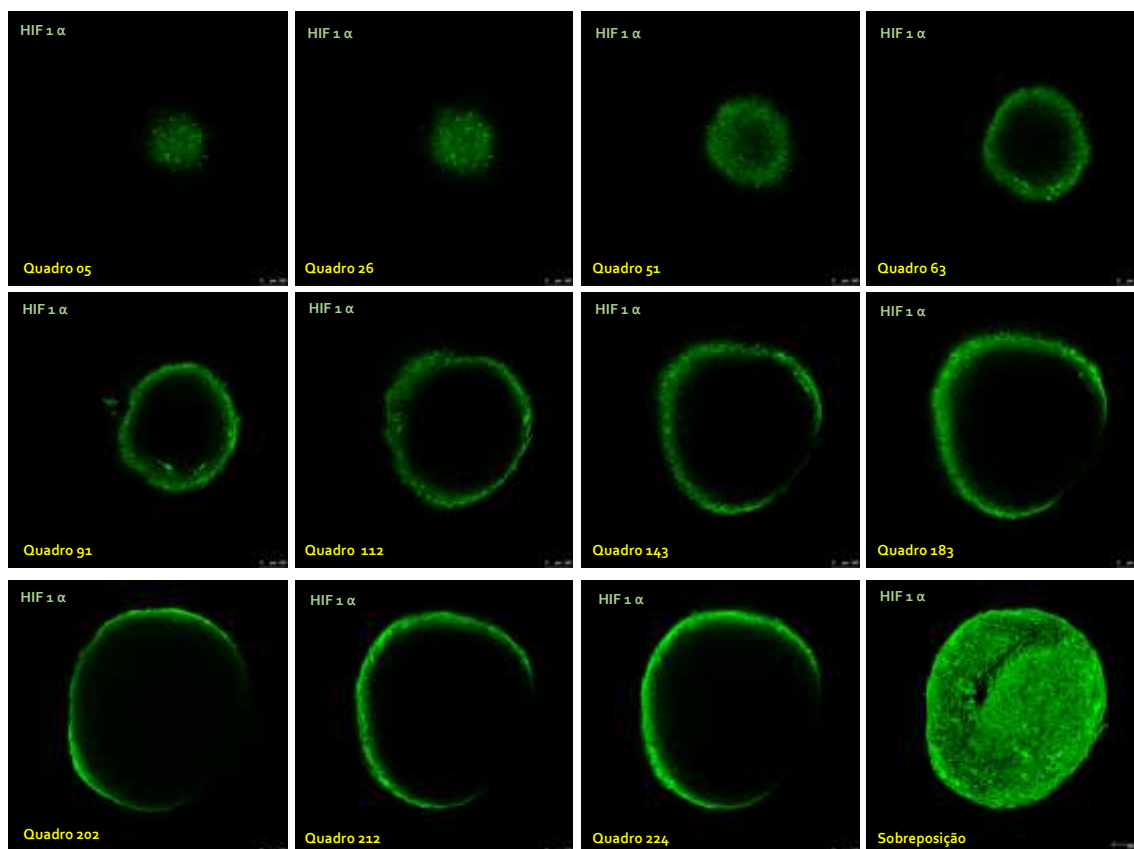


Figura 16. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente (esferóide) venoso. Imunofenotipagem do fator indutor de hipóxia na estrutura tridimensional marcada com anticorpo específico para HIF – 1 α , seguido de secundário anti-mouse conjugado com Alexa Flúor 488. Imagens representativas da avaliação tridimensional de 229 quadros adquiridos com intervalo de 1 μ m (barra = 100 μ m).

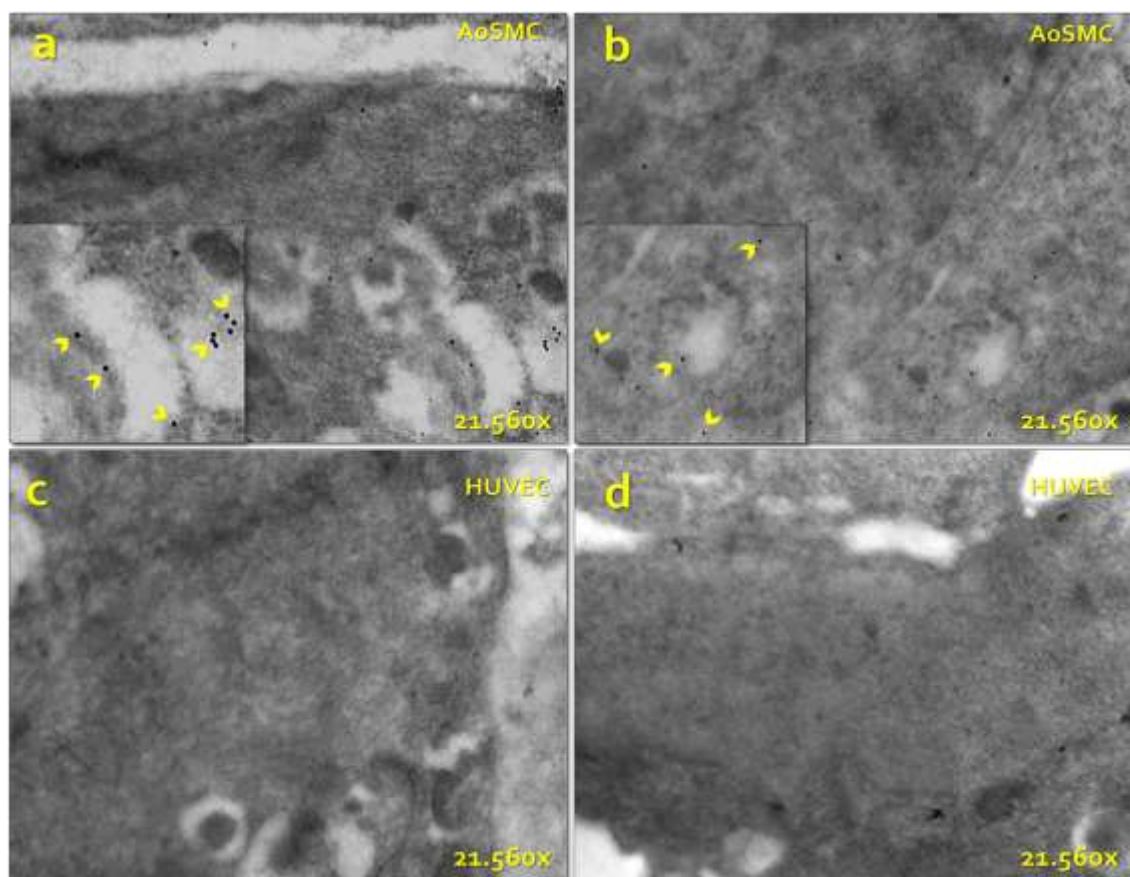


Figura 17. Análise imunocitoquímica em tecido equivalente (esferóide) venoso. Marcação do fator indutor de hipóxia (HIF -1α) realizada por microscopia eletrônica de transmissão. (a) e (b) imunocoloração dos agregados positivos de HIF -1α em células de musculatura lisa (AoSMC) utilizando anticorpo secundário contendo ouro coloidal (15nm) indicados pelas cabeças de setas. (c) e (d) eletromicrografias da célula endotelial de veia umbilical (HUVEC) onde não se observou positividade para o marcador.

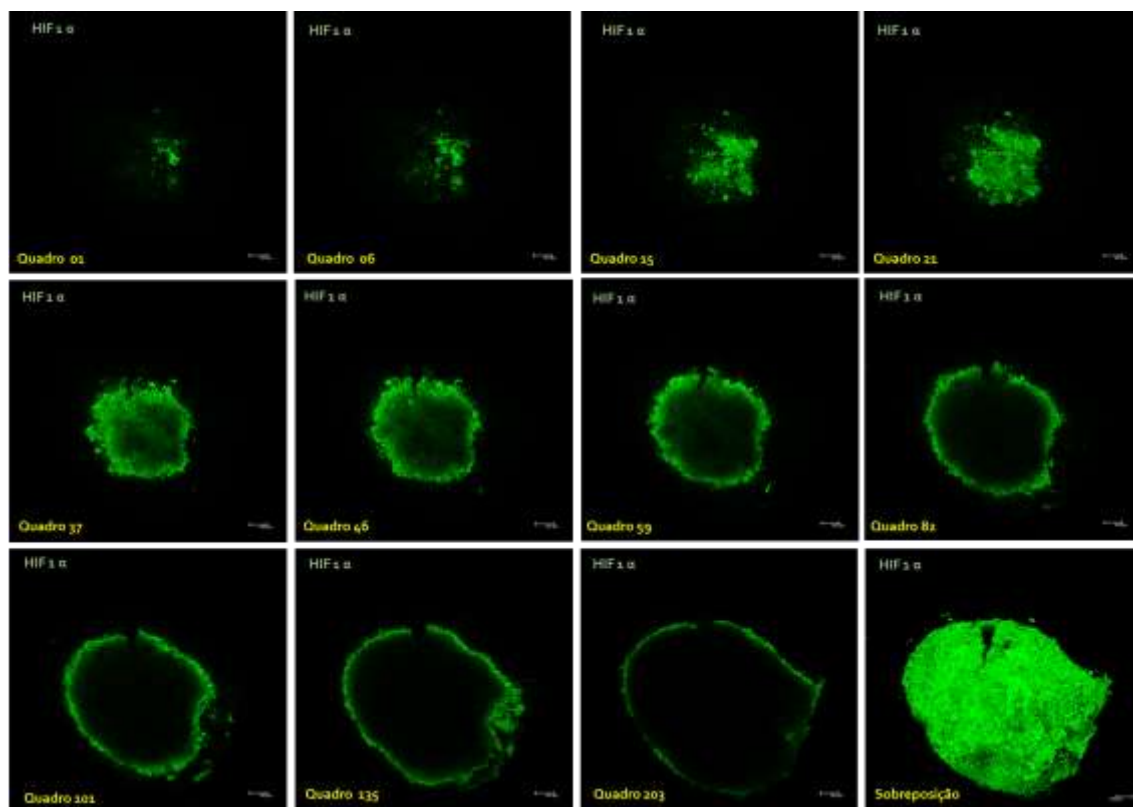


Figura 18. Caracterização por microscopia confocal do tecido equivalente (esferóide) arterial. Imunofenotipagem do fator indutor de hipóxia na estrutura tridimensional marcada com anticorpo específico para HIF – 1 α , seguido de secundário anti-mouse conjugado com Alexa Flúor 488. Imagens representativas da avaliação tridimensional de 256 quadros adquiridos com intervalo de 1 μ m (barra = 100 μ m).

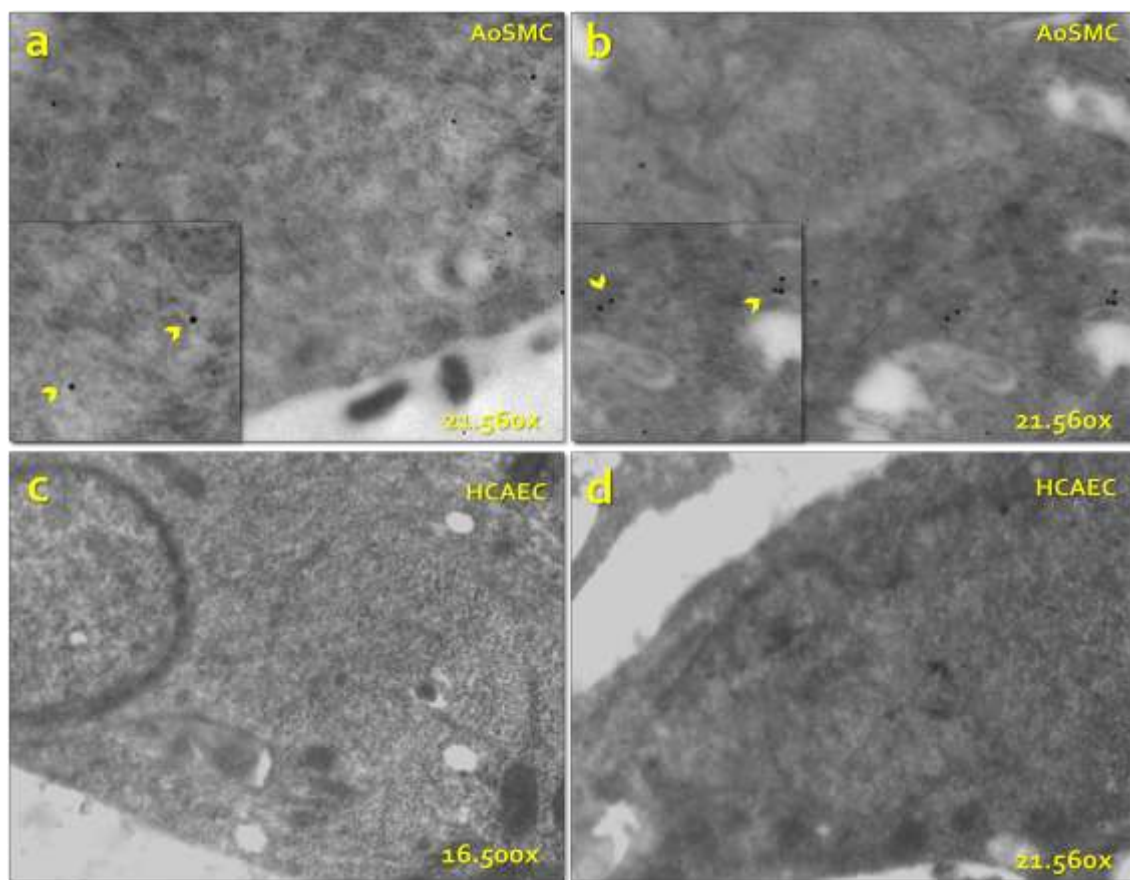


Figura 19. Análise imunocitoquímica em tecido equivalente (esferóide) arterial. Marcação do fator indutor de hipóxia (HIF -1α) realizada por microscopia eletrônica de transmissão. (a) e (b) imunocoloração dos agregados positivos de HIF -1α em células de musculatura lisa (AoSMC) utilizando anticorpo secundário contendo ouro coloidal (15nm) indicados pelas cabeças de setas. (c) e (d) eletromicrografias da célula endotelial de artéria aorta (HCAEC) onde não se observou positividade para o marcador.

Análise da maquinaria de processamento de miRs e potenciais miRs envolvidos na geração de esferóides endoteliais

A análise anterior do comportamento da expressão gênica e proteica de HIF1 α fez-nos investir em potencial envolvimento de miRs nestes eventos de geração de esferóides endoteliais, uma vez que um número crescente de estudos tem demonstrado o importante papel dos microRNAs (miRs), sendo cruciais em numerosos processos celulares (Liu et. al .2018). Assim, buscamos compreender o envolvimento fenotípico referente ao processamento de miRs nos diferentes modelos de tecido equivalente de endotélio e seu potencial angiogênico.

Estrategicamente, partiu-se de uma investigação de genes codificantes de enzimas envolvidas com o processamento molecular de miRs, como os genes DROSHA, EXPO5 e DICER (**Figura 20 a**). A **Figura 20** mostra significativa redução da expressão de DROSHA nos esferóides venoso e arterial, quando comparados ao grupo controle, onde geramos esferóides apenas de células de musculatura lisa (**Figura 20 b**); enquanto os outros 2 genes, EXPO5 (**Figura 20 c**) e DICER (**Figura 20 d**) estavam significativamente mais expressos nos esferóides venoso e arterial, quando comparados aos esferóides controle.

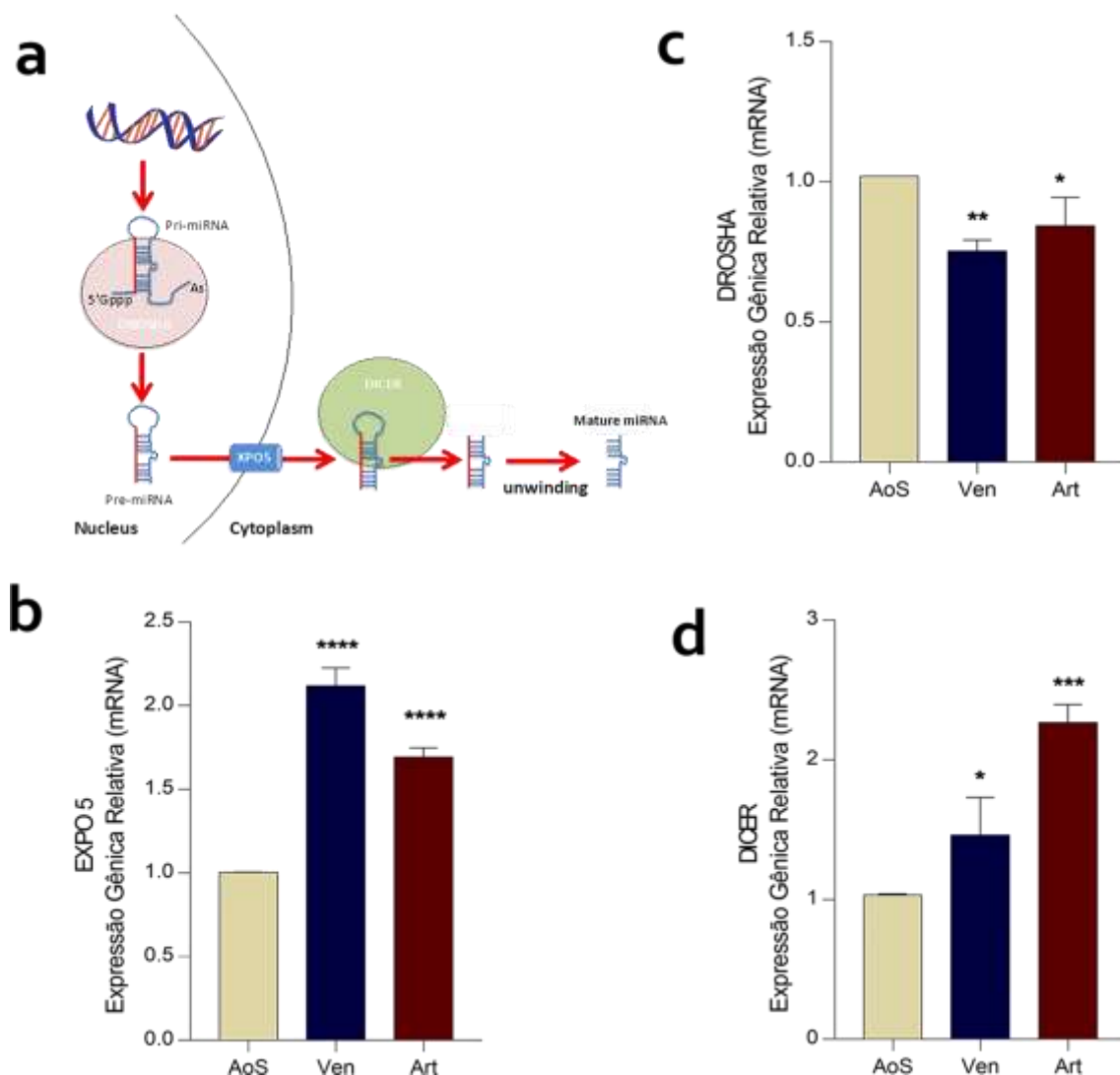


Figura 20. Análise da expressão gênica da maquinaria de processamento de miR's. (a) esquema representativo do processamento dos miR's – adaptado de Silva, R. A. (2018), (b) expressão gênica de EXPO 5, (c) expressão gênica de Drosha e (d) expressão gênica de Dicer. A análise quantitativa em tempo real (q-PCR) de cada gene foi corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -ACTINA e 18S) e obtidas pelo programa PRISM7. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); ** ($p < 0,01$); **** ($p < 0,0001$). ANOVA, teste de Dunnett's.

Uma vez verificado a identidade destes esferóides em expressar genes envolvidos com a maquinaria de processamento de miRs, analisou-se genes conhecidamente envolvidos com processamento pós-transcricional de mRNA requeridos na angiogênese. As **Figuras 21** e **22** trazem conjunto dos miRs analisados. Destes, destaca-se o envolvimento dos miR15a (**Figura 21b**), miR16 (**Figura 21c**), miR23 (**Figura 21g**), e miR32 (**Figura 21h**), em eventos funcionais de esferóides arteriais; enquanto o miR17 estava down-modulado nestas condições (**Figura 21d**).

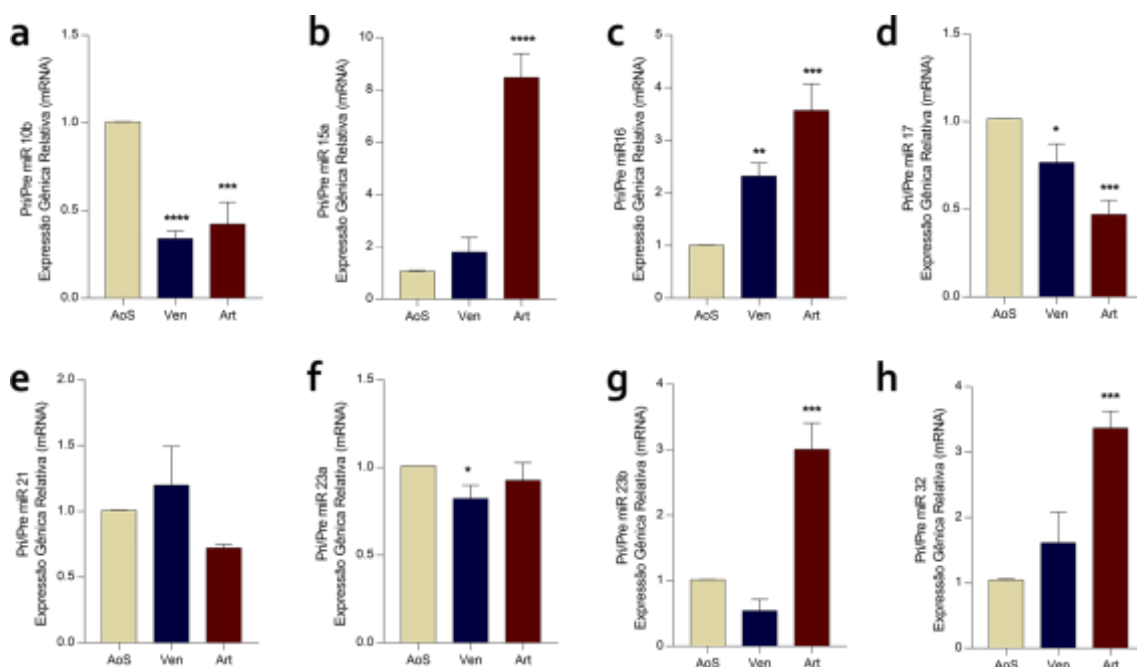


Figura 21. Análise da expressão gênica dos microRNAs envolvidos na angiogênese. A análise quantitativa por tempo real (q-PCR) dos microRNA's foi corrigida pelo controle endógeno RNU6 e obtidas pelo programa PRISM7. (a) miR 10b, (b) miR 15a, (c) miR 16, (d) miR 17, (e) miR 21, (f) miR 23a, (g) miR 23b, (h) miR 32. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

Além desses já citados, a **Figura 22** mostra uma lista de outros potenciais miRs envolvidos e avaliados neste trabalho; dos quais destacam-se os miRs 145 (**Figura 22d**) e miR1293 (**Figura 22h**), os quais estavam super-expressos em esferóides venosos. Surpreendentemente, o miR 101 foi aproximadamente 40 vezes mais expresso nos esferóides arteriais (**Figura 22a**), enquanto o miR 335 estava significativamente super-expresso em ambos os tecidos equivalentes gerados (**Figura 22e**).

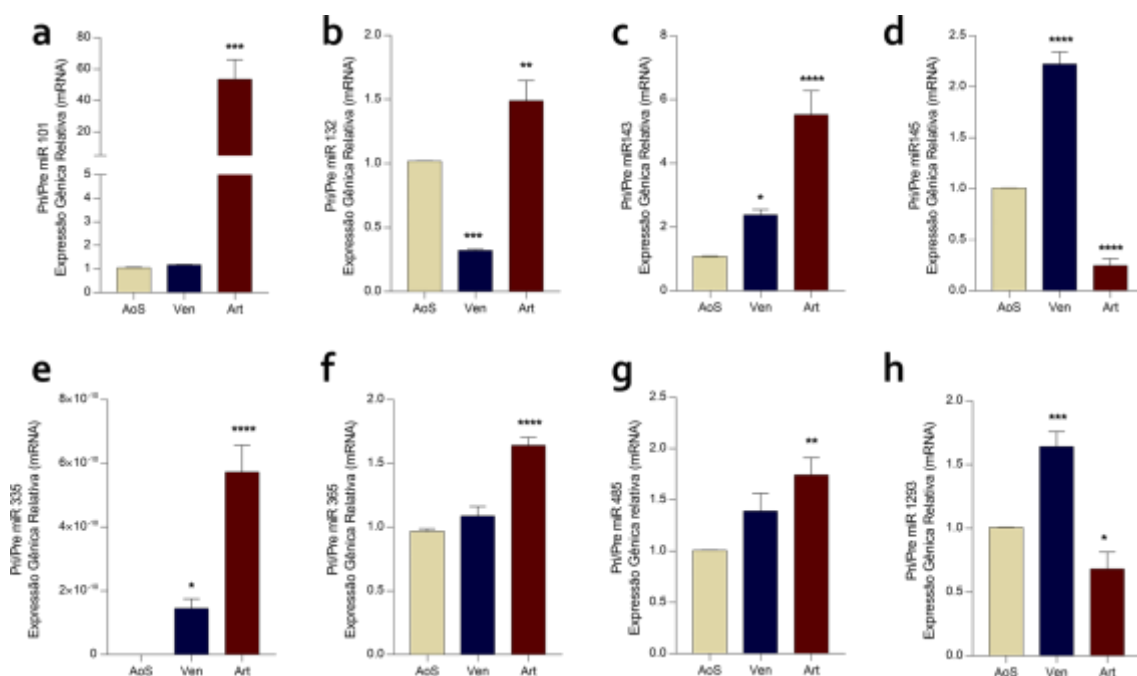


Figura 22. Análise da expressão gênica dos microRNAs envolvidos na angiogênese. A análise quantitativa por tempo real (q-PCR) dos microRNA's foi corrigida pelo controle endógeno RNU6 e obtidas pelo programa PRISM7. (a) miR 101, (b) miR 132, (c) miR 143, (d) miR 145, (e) miR 335, (f) miR 365, (g) miR 485, (h) miR 1293. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$). ANOVA, teste de Dunnett's.

Seria o tecido endotelial uma fonte de marcadores osteogênicos?

Dados da literatura e os obtidos neste trabalho (ainda não publicados) mostram um envolvimento muito próximo entre células que compõem o endotélio e células ósseas (Kusumbe, et. al. 2014), culminando em um controle da osteogênese e angiogênese. Assim, iniciamos estudos na busca de uma melhor compreensão destes mecanismos moleculares. Ainda neste aspecto, avançamos na compreensão se estes esferóides, gerados e já caracterizados, eram capazes de expressar biomarcadores osteogênicos, como SP7, Runx2 e Fosfatase Alcalina (ALP), os quais poderiam, de alguma forma de “delivery”, contribuir parácrina e/ou endócrinamente com mecanismos de osteogênese; suspeitamos por exemplo de mecanismos envolvendo exossomos e/ou microvesículas. Curiosamente, nossos resultados mostram claramente um aumento significativo na expressão destes 3 marcadores analisados, distinguindo tecido endotelial arterial e venoso, mostrando que o tecido endotelial detém características osteogênicas em seu fenótipo (**Figura 23**) e poderiam interferir em mecanismos osteogênicos a partir de “crosstalk” com células ainda indiferenciadas.

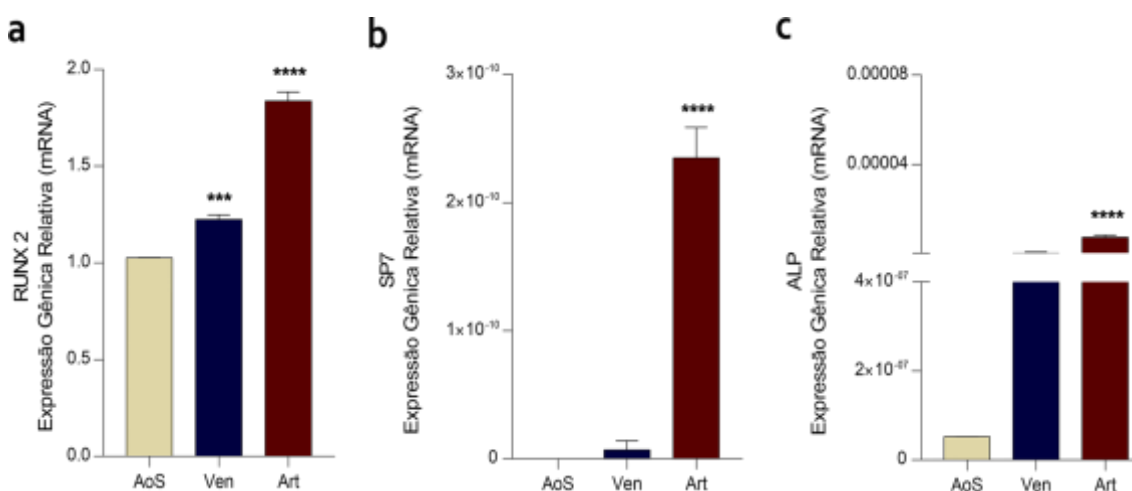


Figura 23. Níveis de expressão gênica dos principais marcadores de diferenciação osteoblástica. Análise quantitativa por tempo real (q-PCR) dos genes (a) RUNX 2, (b) SP7 e (c) ALP corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S) e obtidas pelo programa PRISM7. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); ** ($p < 0,01$); **** ($p < 0,0001$). ANOVA, teste de Dunnett's.

Capacidade osteogênica dos tecidos equivalentes de endotélio, em uma provável sinalização parácrina com envolvimento de HIF1 α .

Afim de melhor compreender potenciais efeitos parácrinos entre tecidos endoteliais e osteogênese, propusemos um novo design experimental, onde o meio condicionado dos esferóides foi usado para tratar células tronco indiferenciadas, por 3 dias (**Figura 24**). Com esta nova proposta, dividimos nossos objetivos finais em 2 frentes, desenvolvidas aqui, como segue:

1. Analisar se o meio condicionado interfere na expressão de genes conhecidamente envolvidos no fenótipo osteogênico;
2. Investigar o provável envolvimento da hipóxia nestes eventos, fazendo aqui uso de experimentação funcional, com agonista e antagonista de HIF1 α .

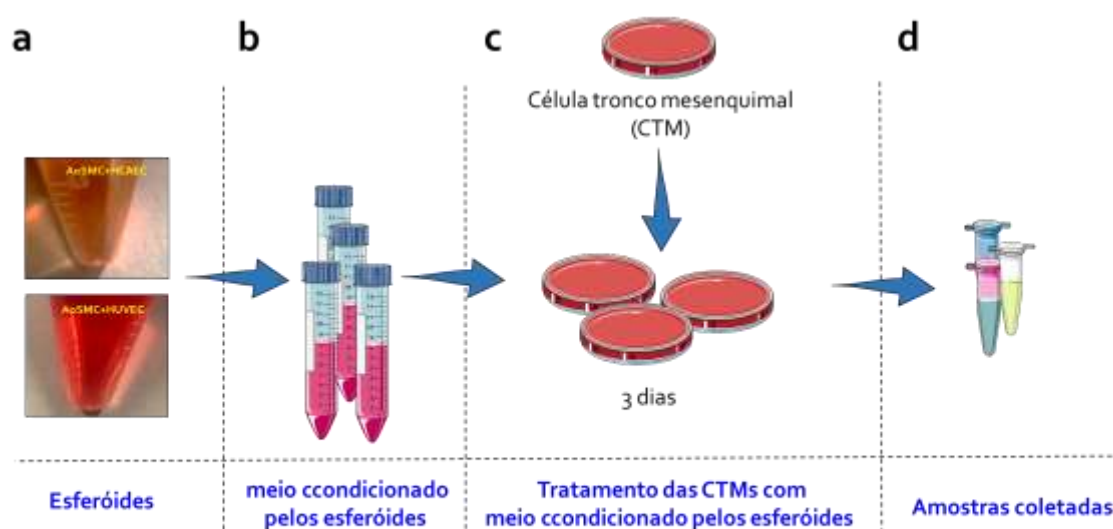


Figura 24. Modelo Experimental. Esquema da metodologia utilizada durante o protocolo de diferenciação das células tronco mesenquimais tratadas com meio condicionado por cada tecido equivalente gerado. Em (a) formação de tecido equivalente, (b) condicionamento do meio pelas estruturas formadas durante 72h, (c) crescimento e tratamento de células mesenquimais indiferenciadas por 72h com o meio condicionado pelos tecidos equivalentes, (d) coleta de amostras e processamento do material.

Quanto ao desenvolvimento da **Frente 1**, destacamos o efeito parácrino do meio condicionado dos esferóides estudados na capacidade de estimular a atividade do gene do fator de transcrição Runx2, o qual foi avaliado por qPCR e *western blotting*. Vale lembrar que foi adicionado um grupo, designado como grupo controle positivo, o qual as células eram tratadas com compostos químicos conhecidamente estimulantes da diferenciação osteogênica [β -glicerofosfato (10 mM) + dexametasona (0,03 g / mL) + ácido ascórbico (50 μ g / mL)], o qual chamou-se de Meio Osteogênico (OM).

Assim, como proposto na **Figura 24**, tratamos células tronco mesenquimais indiferenciadas com o meio condicionado dos esferóides, além de considerar os controles negativo e positivo. Inicialmente, nossos resultados de expressão gênica mostram efeito positivo dos esferóides na atividade do gene Runx2 (**Figura 25a**), onde se destaca efeito significativo do esferóide endotelial venoso neste evento (valores aproximadamente 20x maiores que o controle negativo). O efeito do OM neste gene já é conhecido e valida nosso modelo experimental, com expressão superior a 150x, quando comparado ao grupo controle negativo, onde as células tronco foram mantidas com meio de cultivo convencional. Em adição, o esferóide controle (esferóide de células musculares apenas - AoS) também mostrou efeito próximo a 5x, quando comparados ao controle, enquanto os esferóides endoteliais arteriais não apresentaram resultados significativos.

Complementarmente, mostrou-se o efeito do meio condicionado na quantidade proteica de Runx2, onde todos os tratamentos estimularam significativamente a tradução deste fator de transcrição osteogênico (**Figura 25b,c**); quando utilizamos o GAPDH como controle interno de carregamento dos poços dos géis e para normalização da expressão, mostrado na **Figura 25c**. Pelas diferenças de grandeza nas respostas gênica e proteica, sugere-se um mecanismo de regulação fino, provavelmente pós-transcricional, com potenciais microRNAs e/ou Lnc-RNA, ou mesmo pós-traducional com atividade de sistema proteassômico.

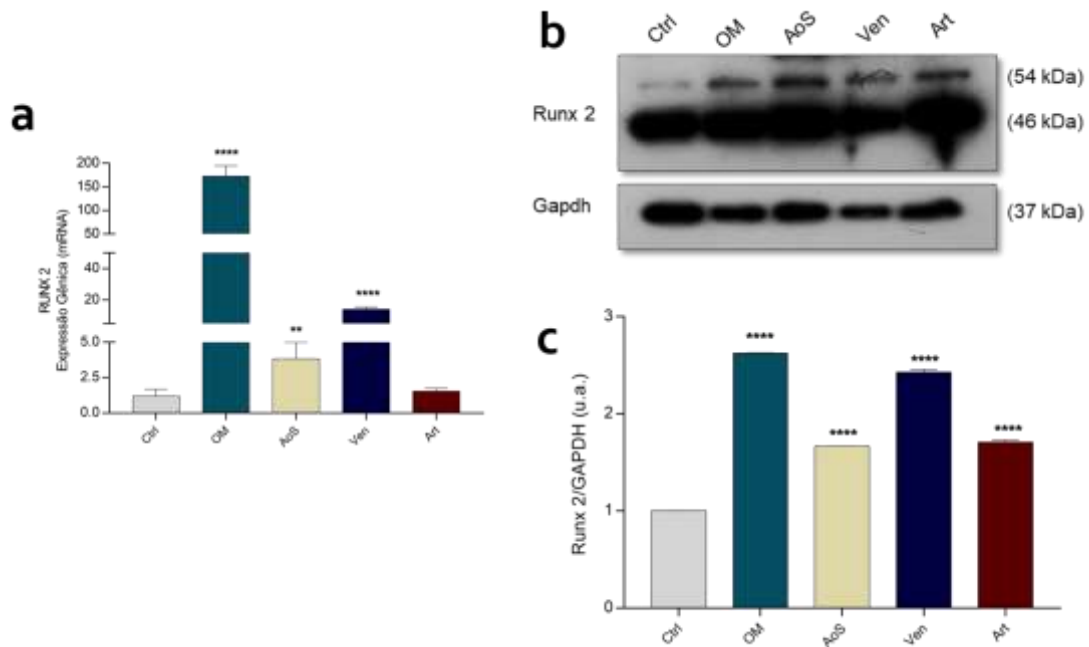


Figura 25. Expressão gênica e proteica do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelos tecidos equivalentes. (a) Análise quantitativa por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (b) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 μ g de proteína foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (c) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl) * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$). ANOVA, teste de Dunnett's.

Participação de HIF1 α no fenótipo osteogênico disparado por sinalização parácrina ao tecido endotelial

Para o desenvolvimento da **Frente 2**, foi investigado o provável envolvimento da hipóxia nestes eventos. Para isso, investigamos a participação da proteína HIF1 α através de algumas estratégias metodológicas, como qPCR e ensaios funcionais com agonista e antagonista químicos de HIF1 α . Inicialmente, avaliamos o perfil de expressão de HIF1 α em mecanismos moleculares de mudança fenotípica, em células indiferenciadas e células comprometidas com o tecido ósseo, os osteoblastos. A **Figura 26** mostra o perfil de expressão de HIF1 α – note que houve aumento significativo da atividade deste gene durante eventos de osteogênese, como mostrado pelo grupo OM, o qual elevou-se próximo aos 100x, comparados ao controle (Ctrl). Além disso, esses dados também mostram significativo estímulo à expressão do gene HIF1 α em resposta aos esferóides venosos (aproximadamente 3 dias de cultivo).

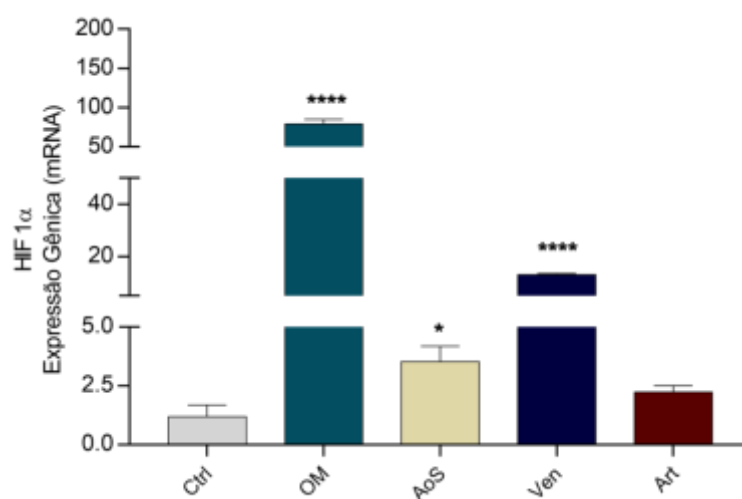


Figura 26. Níveis de expressão gênica do marcador indutor de hipóxia (HIF – 1 α) em CTM tratadas com meio condicionado. Análise quantitativa por tempo real (q-PCR) de HIF – 1 α corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S) e obtidas pelo programa PRISM7. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao esferoide controle (AoS). * ($p < 0,005$); ** ($p < 0,01$); **** ($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

Posteriormente, fez-se uso de agonista e antagonista, capazes de modular atividade de HIF – 1 α , para entender seu envolvimento. A **Figura 27a** mostra a sinalização de HIF – 1 α e prováveis desfechos celulares, como metabolismo, metástase, apoptose, e formação de vaso, destacando eventos de hipóxia, normóxia e sinalização compartilhada nas 2 condições. Para uma melhor compreensão dos eventos coordenados pelo HIF – 1 α , tratamos células tronco indiferenciadas previamente ao tratamento com o meio condicionado pelos diferentes esferóides. Para estabelecer a concentração ótima, submetemos estas células a diferentes concentrações destes químicos, e avaliamos sua citotoxicidade, e foi mostrado não haver citotoxicidade até 100 $\mu\text{g/mL}$, para ambos os compostos: Chrysin (**Figura 27b, d**) e DMOG (**Figura 27c, e**).

Primeiro, os efeitos dos compostos químicos foram analisados pela própria capacidade de expressão gênica de HIF1 α . Dividimos os resultados em 3 Figuras, sendo:

1. **Figura 28** mostra o efeito dos compostos na expressão de HIF1 α , bem como seus efeitos sinérgicos ao tratamento com meio condicionado com esferóides de músculo apenas (utilizado antes como um controle). Utilizando o agonista DMOG, mostramos que este significativamente diminui a expressão de HIF1 α , enquanto este gene foi 60x maior em resposta ao OM (**Figura 28a**), reiterando a importância de HIF1 α em mecanismos que regem a diferenciação osteoblástica. Importante destacar que o DMOG diminui a capacidade do OM em estimular sua expressão; o mesmo acontece com HIF1 α em resposta ao meio condicionado pelo AoS, onde o DMOG significativamente perturba o efeito parácrino de AoS. Complementarmente, a **Figura 28b** traz um panorama da capacidade de Chrysin em promover ação sinérgica aos fatores tróficos liberados pelos tecidos equivalentes. Mais uma vez, OM promoveu um aumento aproximado de 100x, quando comparado ao grupo controle. Chrysin promoveu aumento significativo na expressão de HIF1 α (**Figura 28b**).

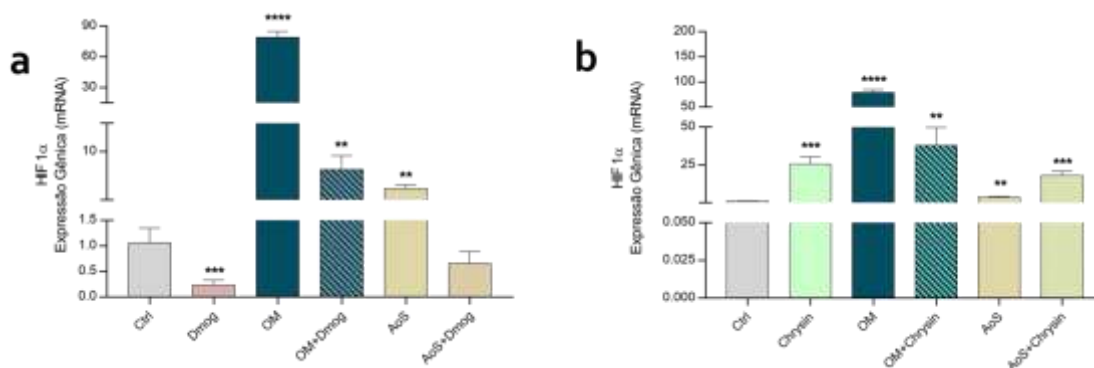


Figura 28. Ação da presença de DMOG (agonista) e Chrysin (antagonista) no perfil gênico de HIF em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente controle (AoS). (a) Análise da expressão do mRNA de HIF 1 α por tempo real (q-PCR) dos grupos Ctrl, Dmog, OM, OM+Dmog, AoS e AoS+Dmog corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (b) Expressão do mRNA de HIF 1 α por tempo real (q-PCR) dos grupos Ctrl, Chrysin, OM, OM+Chrysin, AoS e AoS+Chrysin corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle (Ctrl) * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$). ANOVA, teste de Dunnett's.

2. Posteriormente, replicamos este modelo experimental, agora tratando sinergicamente com o meio condicionado pelos esferóides de tecido equivalente ao endotélio venoso. Em relação ao DMOG (**Figura 29a**), foi mostrado que esta substância afeta a resposta ao meio condicionado de esferóides venosos, reduzindo cerca de 10x a expressão de HIF1 α e um perfil muito similar fora encontrado em resposta o Chrysin (**Figura 29b**); exceto quando as células foram tratadas individualmente com as moléculas.

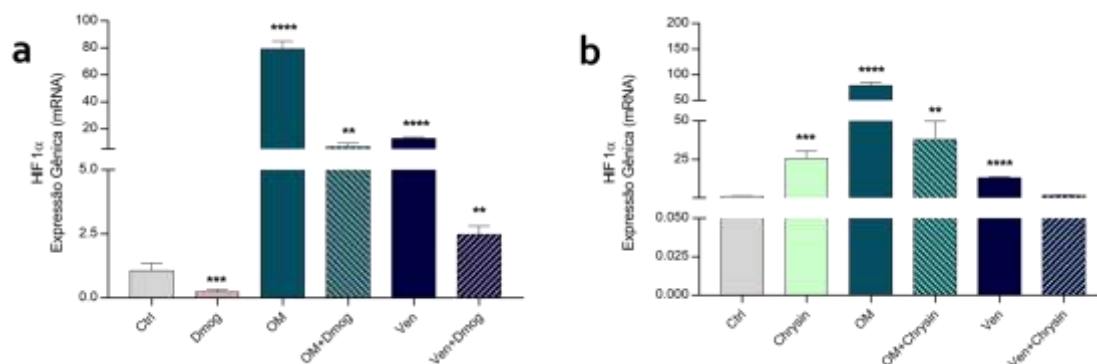


Figura 29. Ação da presença de DMOG (agonista) e Chrysin (antagonista) no perfil gênico de HIF em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente venoso (Ven). (a) Análise da expressão do mRNA de HIF 1 α por tempo real (q-PCR) dos grupos Ctrl, Dmög, OM, OM+Dmög, Ven e Ven+Dmög corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (b) Expressão do mRNA de HIF1 α por tempo real (q-PCR) dos grupos Ctrl, Chrysin, OM, OM+Chrysin, Ven e Ven+Chrysin corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle (Ctrl) * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

3. Considerando esferóides arteriais, o agonista DMOG estimulou a expressão de HIF1 α , o qual alcançou valores próximos à 100x, quando comparado ao grupo controle (**Figura 30a**). Por outro lado, Crhysin promoveu um panorama muito similar, sendo fator de estímulo à resposta ao meio condicionado de esferóide endotelial arterial (**Figura 30b**).

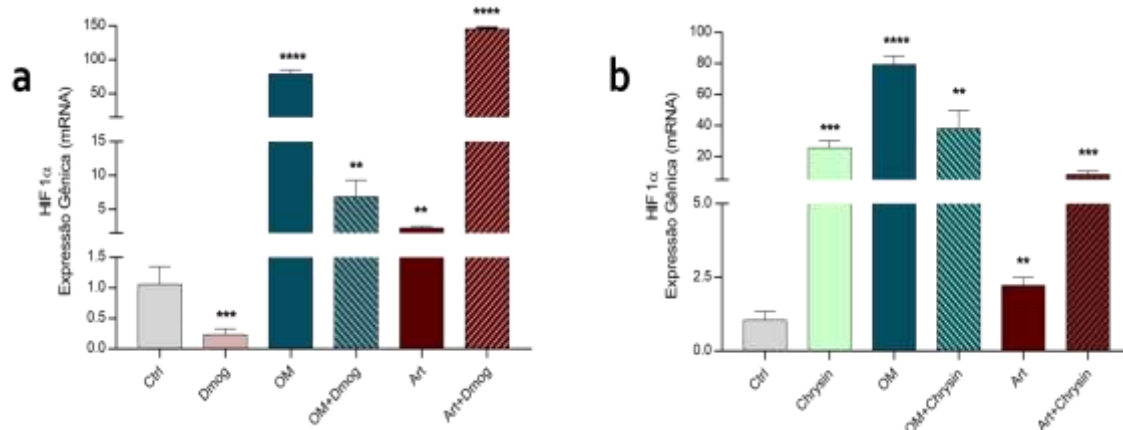


Figura 30. Ação da presença de DMOG (agonista) e Chrysin (antagonista) no perfil gênico de HIF em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente arterial (Art). (a) Análise da expressão do mRNA de HIF 1 α por tempo real (q-PCR) dos grupos Ctrl, Dmög, OM, OM+Dmög, Art e Art+Dmög corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (b) Expressão do mRNA de HIF 1 α por tempo real (q-PCR) dos grupos Ctrl, Chrysin, OM, OM+Chrysin, Art e Art+Chrysin corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle (Ctrl) * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

Afim de melhor compreender o efeito de HIF1 α em mecanismos de aquisição de fenótipo osteogênico em resposta parácrina ao tecido endotelial, decidiu-se submeter às células aos procedimentos já relatados anteriormente, onde partindo do tratamento destas com agonista e antagonista da atividade de HIF1 α , e posteriormente avaliando a capacidade destas em expressar (mRNA e proteína) Runx2 em resposta ao meio condicionado pelos esferóides. Para melhor apresentação destes resultados, as próximas 3 Figuras reportam estes efeitos, destacando individualmente cada esferóide, a saber: **Figura 31** reporta o efeito sinérgico do meio condicionado por AoS; **Figura 32** reporta o efeito do esferóide venoso; e a **Figura 33**, o efeito do meio condicionado pelo esferóide arterial.

Neste cenário, a **Figura 31** reforça a validação do modelo proposto, ao verificar a expressão aumentada de Runx2 em resposta ao OM. Inicialmente, levando em consideração a expressão de Runx2 em nível de mRNA, destacamos que DMOG atenuou o efeito do meio condicionado, reduzindo de aproximadamente 150x para aproximadamente 25x, assim como também o efeito de AoS, porém com menos significância (**Figura 31c**). Destaca-se que o tratamento com DMOG sozinho promoveu diminuição significativa na expressão de Runx2. Por outro lado, o tratamento com Chrysin, um inibidor de HIF1 α , promoveu mudanças metabólicas importantes, as quais foram detectáveis no nível de expressão de Runx2. A **Figura 31f** mostra um efeito positivo na expressão de Runx2, quando considerado sozinho, resultado inverso ao DMOG, que promoveu significativa redução na atividade deste gene. A inibição de HIF1 α em sinergia à diferenciação osteoblástica promovida pelo OM acarretou em uma significativa redução de Runx2. No entanto, Chrysin aumentou a expressão deste gene em sinergia com o meio condicionado pelo esferóide AoS.

Estes eventos mostrados em nível de mRNA foi posteriormente confrontados com a quantidade real de proteína Runx2, traduzida nos diferentes grupos. Os dados mostrados na **Figuras 31 a e b** relatam que não houve diferenças significativas entre os grupos testes, com nenhum efeito do DMOG neste contexto; salienta-se que todos estes grupos apresentaram quantidade de Runx2 inferiores ao grupo controle negativo, onde as células foram mantidas sem nenhum tratamento. Por outro lado, o Chrysin mostrou eficiência na compreensão do envolvimento de HIF1 α neste contexto. Os resultados mostrados nas **Figuras 31 d e e** revelam que a inibição de HIF1 α aumenta o efeito osteogênico do meio condicionado pelo esferóide AoS, distinguindo esse mecanismo àquele promovido pelo OM, onde mostrou-se um efeito oposto nesta condição (**Figuras 31d, e**). Aqui, pode-se aventar que há vias metabólicas distintas que levam à diferenciação osteoblástica, podendo atender níveis de oferta de oxigênio, trabalhando em normóxia ou hipóxia. Uma análise do metabolismo energético nestes casos faz-se necessário para melhor compreensão dos desvios metabólicos envolvidos.

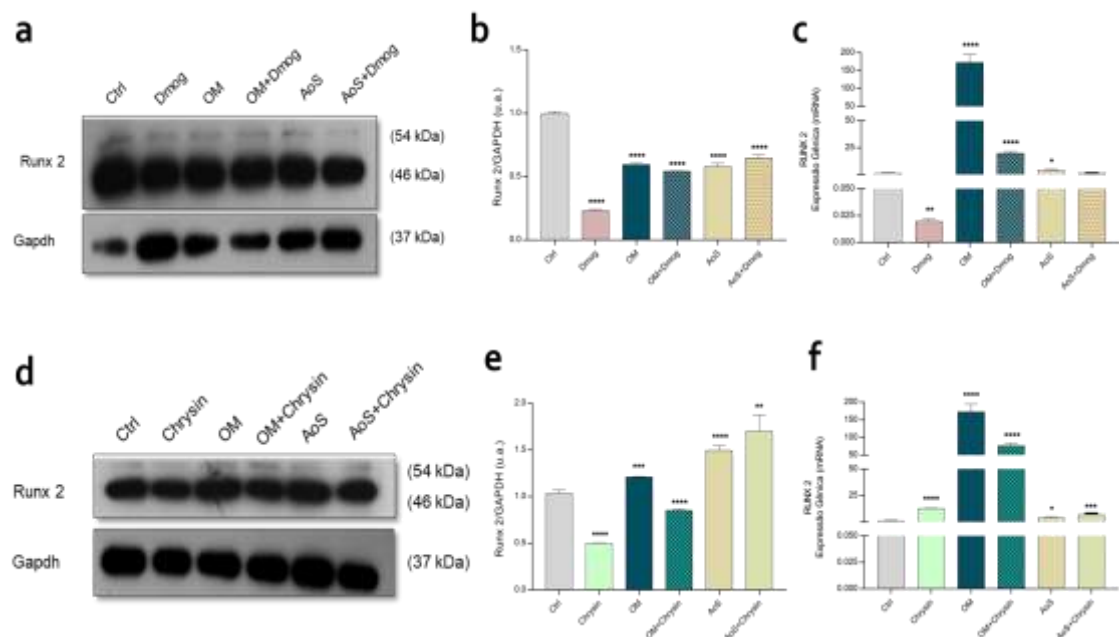


Figura 31. Efeito de agonista e antagonista de HIF no perfil proteico e gênico do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente controle (AoS). (a) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 µg de proteína dos grupos Ctrl, Dmog, OM, OM+Dmog, AoS e AoS+Dmog foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (b) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl). (c) Análise da expressão do mRNA de RUNX 2 por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β-Actina e 18S). (d) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 µg de proteína dos grupos Ctrl, Chrysin, OM, OM+Chrysin, AoS e AoS+Chrysin foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (e) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl). (f) Análise da expressão do mRNA de RUNX 2 por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β-Actina e 18S). Os resultados representam a média ± desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle (Ctrl) * (p<0,005); ** (p<0,01); **** (p<0,0001) (ANOVA, teste de Dunnett's).

Importante, mais uma vez reforçamos a validação do modelo de diferenciação osteoblástica, bem como a capacidade desta célula em expressar Runx2. Os resultados referentes ao esferóide venoso destacam um efeito negativo do DMOG (**Figuras 32a-c**), e reforça os dados anteriores apresentados para resposta ao esferóide AoS, onde o Chrysin aumenta a eficiência de diferenciação osteogênica do tecido endotelial. A **Figura 32d e e** mostra claramente a eficiência do Chrysin em sinergia com o meio condicionado pelo esferóide na expressão (proteína) de Runx2, embora houvesse efeito negativo deste composto na expressão (mRNA) deste gene, o que sugere um efeito direto aos componentes de regulação desta via, como eventos epigenéticos e de processamento pós-traducional.

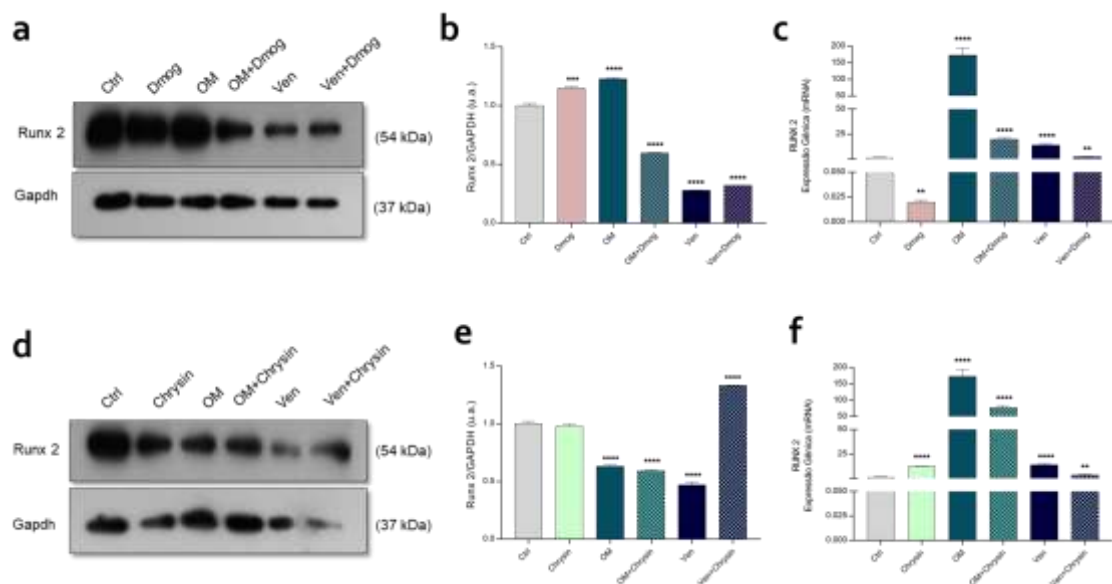


Figura 32. Efeito de agonista e antagonista de HIF no perfil proteico e gênico do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente venoso (Ven). (a) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 µg de proteína dos grupos Ctrl, Dmog, OM, OM+Dmog, Ven e Ven+Dmog foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (b) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl). (c) Análise da expressão do mRNA de RUNX 2 por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (d) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 µg de proteína dos grupos Ctrl, Chrysin, OM, OM+Chrysin, Ven e Ven+Chrysin foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (e) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl). (f) Análise da expressão do mRNA de RUNX 2 por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle (Ctrl) * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

Curiosamente, o efeito do esferóide arterial neste cenário requer mecanismos diferenciados, quando trata-se do envolvimento do HIF1 α . Ao contrário do que se reporta anteriormente, a sinergia do DMOG com o meio condicionado pelo esferóide arterial aumenta significativamente a expressão de Runx2 em mais de 7x (**Figura 33c**), enquanto o ligeiro aumento da proteína Runx2 não apresentou significância (**Figura 33a,b**). Chrysin também apresentou um efeito contrário quando associado ao meio condicionado pelos esferóides arteriais – enquanto um aumento significativo foi notado na **Figura 32**, que aponta uma diminuição, sugerindo efeitos opostos e predominantes disparados pelas células endoteliais de origem arterial.

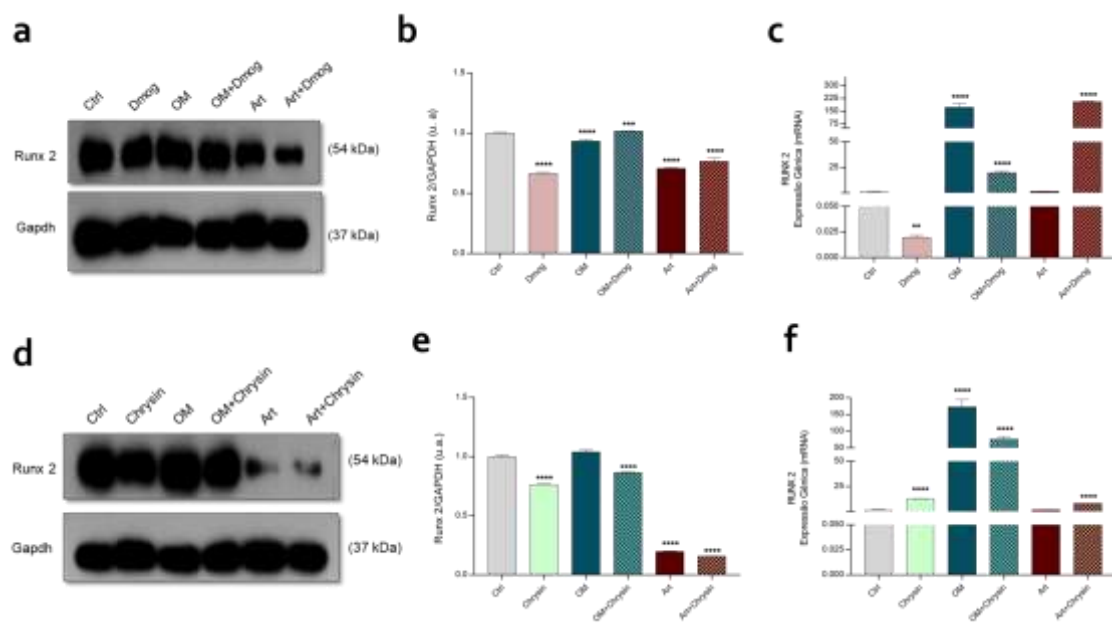


Figura 33. Efeito de agonista e antagonista de HIF no perfil proteico e gênico do marcador de diferenciação osteoblástica RUNX 2 em CTM tratadas com meio condicionado pelo tecido equivalente arterial (Art). (a) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 ug de proteína dos grupos Ctrl, Dmogi, OM, OM+Dmogi, Art e Art+Dmogi foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (b) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl). (c) Análise da expressão do mRNA de RUNX 2 por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). (d) Imunoblotting representativo de Runx 2, onde 75 ug de proteína dos grupos Ctrl, Chrysin, OM, OM+Chrysin, Art e Art+Chrysin foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE. (e) Análise densitométrica das bandas normalizadas em função do GAPDH e a intensidade relativa da razão proteína/ GAPDH expressa em relação ao grupo controle (Ctrl). (f) Análise da expressão do mRNA de RUNX 2 por tempo real (q-PCR) corrigida pelos três controles endógenos (GAPDH, β -Actina e 18S). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes expressos em relação ao grupo controle (Ctrl) * ($p < 0,005$); **($p < 0,01$); ****($p < 0,0001$) (ANOVA, teste de Dunnett's).

5. DISCUSSÃO

O sistema esquelético de mamíferos abriga um conjunto de células que, de maneira hierárquica, sustentam a renovação óssea ao longo da vida (van der Eerden BC. et. al 2014). Neste contexto, é sabido que a osteogênese é um processo dinâmico e que participa de eventos importantes como àqueles envolvidos com eventos regenerativos que consolidam fraturas (Gemini-Pipemi s, et. al. 2014). Como se é discutido junto à literatura na área, o estudo da biologia óssea e seus envolvimento fisiológicos é imperativo à compreensão de seus eventos biológicos, a qual tem se tornado cada vez mais necessário, sobretudo considerando o crescente crescimento da população idosa, concomitante ao aumento da incidência de fraturas em idades mais precoces, sobretudo presumindo o aumento populacional em centros urbanos, tratando-se de problemas de saúde pública de grandes proporções. No tocante à aplicação técnica dos avanços biotecnológicos, sobretudo àqueles de bioanálise e desenvolvimento de biomateriais, buscou-se com este trabalho desenvolver ferramentas que permitam gerar tecido equivalente (3D) ao tecido endotelial original, a fim de investigar seu potencial efeito osteogênico, já que os sistemas de cultura 3D (Esferóides) têm chamado atenção especial, caracterizando-se como uma importante alternativa à cultura 2D e ao uso de animais, recapitulando o microambiente fisiológico original (Imamura et. al., 2015). Inicialmente, como mostrado aqui, progresso importante foi alcançado acerca de sua geração e caracterização; sendo seu potencial osteogênico ainda pouco conhecido.

Esferóides são *clusters* multicelulares tridimensionais que se formam através da agregação e proliferação celular, com potencial crescimento também pela capacidade em sintetizar matriz extracelular (Cho, CF. et. al. 2017) (Blancher, S. et. al. 2014). Com diâmetros entre 400 e 500 μm , os esferóides desenvolvem uma camada de células concêntricas, em que um núcleo necrótico é cercado por uma camada de células quiescentes e uma borda externa por células metabolicamente ativas e predominantemente em proliferação. Muitos esferóides exibem propriedades características de seus tecidos ancestrais (originais), como é o caso do tecido endotelial que se caracteriza por revestir internamente os vasos e artérias, além de possuir múltiplos papéis em eventos fisiológicos e fisiopatológicos no organismo (Carvalho, et. al. 2001).

Segundo Li et. al. (2012), células musculares apresentam forma fusiforme, com núcleo grande e cromatina nuclear dispersa, enquanto células endoteliais caracterizam-se pela morfologia plana e poligonal, com limite bem definido e citoplasma abundante. Estas informações foram importantes para as análises iniciais dos esferóides gerados nas análises das colorações de azul de toluidina realizadas neste trabalho, onde foi possível observar a morfologia de cada tipo celular. Importante, um esferóide é considerado viável e funcional a partir do momento em que há a união célula-célula por junções e essas geram uma matriz extracelular se tornando aptas a proliferar-se e diferenciar-se (Jha et. al., 2016). Visando validar o modelo gerado em relação à viabilidade e função, as análises ultraestruturais por microscopia eletrônica de transmissão, evidenciaram junções celulares entre as diferentes linhagens envolvidas no processo.

Dados prévios reportados na literatura descrevem que estruturalmente um vaso caracteriza-se pela união de células musculares, localizadas na túnica média e células endoteliais localizadas na túnica interna voltada para o lúmen, salientando a importância destas junções como especialidades da membrana plasmática destas células (Carvalho, et. al. 2001). Ainda no âmbito da validação destes esferóides, as amostras fixadas e incubadas com anticorpos específicos para cada linhagem (CD31 – células endoteliais (Lertkiatmongkol, P. et. al. 2016) e α -SMA – células musculares) (Chasseigneaux, S. 2018) e, analisadas através de microscopia confocal, confirmam a localização de cada tipo celular. As células musculares encontravam-se presentes na periferia da estrutura (externamente), enquanto as endoteliais agrupadas e dispostas ao centro (*core*), reafirmando os dados encontrados na literatura (Carvalho, et. al. 2001 e Saleh, et. al. 2011). Além desses aspectos, mostramos que estes esferóides eram capazes de expressar VEGF e VEGFR, como já demonstrado anteriormente (dela Paz, NG & D'Amore, PA. 2009) (Heiss. M et. al. 2015).

O papel dos vasos sanguíneos é servir como um canal para a entrega de sangue desoxigenado do coração para os pulmões, onde a troca de oxigênio e dióxido de carbono ocorre ao nível alveolar e sua rede capilar associada, e o retorno do sangue oxigenado ao coração, que o distribui para todos os tecidos do corpo. Enquanto as artérias transportam sangue “para longe” do coração, as veias levam sangue “em direção ao coração”. De um modo geral, as artérias contêm sangue oxigenado, e os

vasos venosos carregam sangue com baixo teor de oxigênio. A única exceção é o sistema vascular pulmonar, em que as artérias pulmonares levam sangue desoxigenado para os pulmões e as veias pulmonares retornam o sangue oxigenado dos pulmões para o átrio esquerdo do coração. Estes mecanismos devem ser considerados quando trata-se de efeitos parácrinos promovidos pelo tecido endotelial. Como mecanismos de hipóxia estão intimamente ligados à função do endotélio, bem como a eventos de angiogênese, decidimos investigar o fator HIF nos modelos desenvolvidos.

Inúmeros tipos celulares adaptam-se diferentemente à hipóxia, modulando a expressão gênica através do fator de transcrição (HIF) -1 para superar a escassez de oxigênio (Pugh, CW. et. al. 2017) (Filippi, et. al. 2018). O HIF-1 é um heterodímero $\alpha\beta$ e as subunidades HIF- α e HIF- β existem como uma série de isoformas codificadas por locus genéticos distintos (Nizet V, et. al. 2009). Das três isoformas de HIF- α , o HIF-1 α é a principal fonte de transcrição em resposta a hipóxia (Park et., 2003; Scortegagna M et., al. 2008). Além disso, reforça nosso interesse neste evento, o fato de HIF-1 α estar intrinsecamente envolvido no acoplamento da angiogênese e osteogênese (Nauta, TD. et. al. 2014) (Schipani et al., 2009), evento que desenvolveremos mais adiante nesta seção. Assim, foi avaliado o comportamento de HIF-1 α nos esferóides venoso e arterial através de imuno-marcação e posterior análise por microscopia confocal e, além disso, análise das expressões proteica e gênica, por tecnologias de *western blotting* e qPCR, respectivamente. Os dados analisados de expressão proteica e gênica reafirmam os encontrados na literatura quanto à importância da atividade desse fator na obtenção do tecido endotelial.

Curiosamente, os resultados aqui apresentados revelam que HIF-1 α está presente em maiores concentrações nas células musculares ao invés de células endoteliais, localizadas no core dos esferóides, como previsto, já que mais internamente ao esferóide fica dificultado qualquer difusão de gases e nutrientes. No entanto, estes dados corroboram com Masaki Imanishi et. al. (2014), quem demonstraram que vias responsáveis pela remodelação e formação vascular são ativadas pelo fator indutor de hipóxia liberado pelas células musculares, destacando ainda a funcionalidade dos tecidos equivalentes obtidos naquele estudo. Mais adiante, mostraremos a função de HIF-1 α na performance osteogênica em células

indiferenciadas respondendo a estímulos e crosstalk com esferóides de tecido endotelial.

Em adição, analisou-se também a expressão de alguns microRNAs (miRs) já preditos na literatura como possíveis reguladores de eventos relatados com angiogênese (Kane, NM. et. al. 2014). Os miRs são moléculas de RNA não-codificantes altamente conservadas capazes de regular a expressão gênica em nível pós-transcricional via degradação ou repressão traducional de um mRNA alvo (Sun et. al., 2018) e sua biogênese envolve eventos de clivagem nuclear e subsequente citoplasmática realizados por duas endonucleases de ribonuclease III, DROSHA e DICER (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004; Hutvagner, 2001, Kim, YK. Et. al. 2016), produzindo um miRNA primário (pri-miRNA) que é processado em um miRNA precursor (pre-miRNA) e, finalmente, libera miRNA maduro (Bartel e Chen, 2004). Essas moléculas desempenham papel importante e insubstituível na angiogênese, regulando o mecanismo de hipóxia, proliferação, diferenciação, apoptose, migração e formação de tubo de células relacionadas à angiogênese, que são necessários a numerosos processos fisiopatológicos, especialmente para a ocorrência e desenvolvimento de doenças vasculares (Sun et. al., 2018).

Buscando compreender melhor a regulação de todos esses eventos e principalmente o de *crosstalk* entre as diferentes linhagens celulares durante o processo de angiogênese, avaliamos a expressão gênica de um set de miRNAs através da tecnologia de qPCR. Os resultados alcançados atestam que a expressão diferencial de genes em resposta a formação do tecido equivalente venoso e arterial exigem um importante processamento pós-transcricional envolvendo microRNAs, como miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-17, miR-23b, miR-101, miR-132, miR-143, miR-145, miR-335 e miR-365, sugerindo um papel fundamental no desenvolvimento do tecido endotelial. Segundo Wang, et. al 2016, o miR 10b está intimamente ligado ao comportamento angiogênico atuando dependentemente da via Notch sobre o gene *mib 1*, também conhecido como Ki67, componente este indispensável no processo de proliferação celular.

Sinalização de Notch tem ganhado destaque em mecanismos de angiogênese, atuando downstream à ativação de VEGFR (Tetzlaff, F. Fischer, A. 2018). Os miRs 143 e 145 formam um complexo e atuam como moléculas de

comunicação entre células musculares e células endoteliais, modulando propriedades angiogênicas e de estabilização dos vasos; em outras palavras, atuam de forma direta na regulação funcional das estruturas responsáveis pela junção celular entre linhagens (Climent et. al. 2015), como mostrado, inclusive, em nossas eletromicrografias em análises ultraestruturais e neste mesmo contexto encontramos o miR 23b, que também é relatado em processos de junção célula-célula endotelial. De acordo com Li et. al. (2016), após uma análise de bioinformática, este microRNA foi apontado como alvo potencial para esta função. Como mencionado anteriormente, HIF-1 α está diretamente envolvido no processo de angiogênese. Um possível alvo regulador desse fator durante a angiogênese é o miR335. Este por sua vez, apresenta um perfil de expressão inversamente proporcional ao gene regulado podendo ser um alvo chave na terapia de algumas doenças vasculares e neurovasculares e ainda no desenvolvimento vascular (Liu, et. al. 2015).

Cimmino et. al. 2005 apontou em seu trabalho a importância que os miRs 15a e 16 apresentam durante a angiogênese. Esses dois genes estão ligados ao processo de apoptose, atuando como gatilhos das proteínas envolvidas na morte celular. Para a formação do lúmen tubular é necessário que as células endoteliais localizadas ao centro entrem em morte programada disparando uma cascata de sinalização para que as células subsequentes, destacando as células musculares, se desloquem de forma a reorganizar a estrutura para a nova cavidade (Majesky, et. al. 2011, Riascos-Bernal, et. al. 2016, Geangel, et. al. 2009). Para que todo esse processo de formação tubular ocorra, os miRs 17, 101 e 132 podem funcionar como alvos, propiciando o acontecimento biológico esperado. Aqui destacamos eventos moleculares conhecidamente encontrados in vivo e potencialmente mostrados no esferóide endotelial aqui apresentado.

Cabe uma reflexão importante neste momento: os esferóides gerados apresentam-se de modo organizado, células musculares para fora e endoteliais para dentro, funcionalmente expressam VEGF e VEGFR e, através do envolvimento de miRs em processamentos pós-transcricionais, parecem recapitular eventos embrionários de formação dos vasos, o que faz nosso esferóide ganhar ainda mais destaque, sobretudo em eventos biológicos que regem a formação de vasos sanguíneos – conhecimento necessário para compreensão de malignidade de certos

tumores, os quais orquestram mecanismos de angiogênese.

Desde os trabalhos de R. Adams e colaboradores, quem demonstrou o envolvimento de um subtipo de células endoteliais em mecanismos de osteogênese (Ramamany, SK. et. al. 2016; Itkin-T. et. al. 2016; Kusumbe, AP. et. al. 2016), alguns grupos têm voltado mais esforços na compreensão destes eventos. Neste estudo, buscando explorar nosso modelo de tecido endotelial equivalente, coletamos o meio condicionado dos diferentes esferóides para tratar células indiferenciadas e com potencial perfil osteogênico. Preliminarmente, verificou-se a possibilidade daqueles esferóides em expressar genes envolvidos com o fenótipo osteogênico, como Runx2, SP7 e fosfatase alcalina (ALP) (biomarcadores da diferenciação osteoblástica) e os resultados comprovaram a ativação desses genes nos esferóides, sugerindo que não somente contribuem com nutriente e oxigênio, mas também com transcritos sinalizadores e necessários ao processo de osteogênese, e provavelmente em eventos de reparo/regeneração ósseos. De fato, um componente crítico neste processo de reparo é o aparecimento oportuno dos vasos sanguíneos no tecido reacional da fratura (Filipowska, J. et. al. 2017) e sua vascularização não apenas fornece oxigênio e nutrientes, mas também células-tronco capazes de se diferenciar em osteoblastos e, posteriormente, também os íons necessários à mineralização (Stegen et. al., 2015).

Importante salientar que este é o primeiro estudo na literatura que mostra esta função do endotélio em expressar genes envolvidos com fenótipo osteogênico, provavelmente alimentando os adjetivos do tecido endotelial em mecanismos de reparo ósseo, recapitulando eventos celulares e moleculares conhecidos ao desenvolvimento do esqueleto (Krishnan, L. et. al. 2014). Uma limitação importante deste trabalho foi não aprofundar em eventuais mecanismos de “*delivery*” destes mRNA osteogênicos, o que eventualmente podem ocorrer através de vesículas, exossomos, etc.

Por fim, destacando a importância do Runx2 na diferenciação osteoblástica (Komori, T. 2017) e do envolvimento do HIF-1 α nestes eventos (Tomlinson, RE. Silva, MJ. 2015), buscou-se melhor compreender se a sinalização de HIF-1 α se correlaciona com ativação de Runx2 em resposta sinérgica ao meio condicionado pelos diferentes esferóides. Para tal, visou-se ensaios funcionais, partindo de compostos capazes de modular o envolvimento de HIF-1 α : DMOG (Zhdanow, AV. et. al. 2015) e Chrysin (Fu,

B. et. al. 2007). Os resultados aqui expostos mostraram existir um papel de HIF-1 α em mecanismos de diferenciação osteoblástica, regido pela expressão de Runx2 e distinguindo os diferentes tecidos endoteliais, arterial e venoso. Embora com diferenças significativas em perfis de expressão gênica (mRNA), chamou-nos muito a atenção o perfil de proteína traduzida: nossos resultados demonstraram que o inibidor de HIF-1 α , Chrysin, potencializou a quantidade de proteína RUNX2, sobretudo em sinergia aos fatores tróficos liberados pelos esferóides venoso e formado por células musculares lisa somente (AoS), enquanto uma diminuição nestes eventos foi observado em resposta sinérgica ao esferóide arterial.

Aqui, nos parece prudente pensar e propor que a inibição de HIF-1 α compromete o fenótipo diferencial destas células, sendo a célula endotelial venosa aquela com uma expressão constitutiva maior deste gene; uma explicação desta diferença também advém de aspectos fisiológicos, células endoteliais de origem arterial estão continuamente em contato com maiores concentrações de oxigênio e nutrientes, facilitando sua difusão e provavelmente sinalizando para baixas concentrações de constitutivas de HIF-1 α ; provavelmente para manter sinalização mínima de manutenção de seu fenótipo endotelial, com disparo de vias de sinalização celular que levam a ativação de vias de sobrevivência, como Akt, MAPK (Dimmeler, S. et. al. 1998; Sumpio, BE. et. al. 2005) e VEGF (Wang, XL. et. al. 2007). Se HIF-1 α compromete a diferenciação osteoblástica, mostramos que esta sinalização pode ser multifatorial e distinguida pelo tipo de tecido endotelial: venoso ou arterial. Além disso, é provável que células de musculatura lisa desempenhem funções de destaque neste cenário, incrementando esse mecanismo com óxido nítrico modulando atividade de HIF-1 α , como proposto anteriormente por outros autores (Agani, FH. et. al. 2002).

6. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a metodologia desenvolvida neste estudo fornece um fluxo experimental capaz de gerar um modelo de cultura 3D de tecido equivalente endotelial venoso e arterial, com propriedades celulares, bioquímicas e ultra-estruturais definidas, capaz de contribuir paracrinamente com o fenótipo osteogênico, destacando o envolvimento dinâmico e diferencial de HIF-1 α , onde sugere-se que uma quantidade ideal desta molécula é necessária para o acontecimento do evento relatado.

7. INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES:

Apêndice A - Artigos publicados durante o período do mestrado

1. **Feltran, Georgia Da S.**; Bezerra, Fábio; Fernandes, Célio Júnior Da Costa; Ferreira, Marcel Rodrigues; Zambuzzi, Willian F. Differential inflammatory landscape stimulus during titanium surfaces-obtained osteogenic phenotype. JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A., v.107, p.01 - 22, 2019.
2. Oliveira, Lucas Pires Garcia; Conte, Fernanda Lopes; De Oliveira Cardoso, Eliza; Conti, Bruno José; Santiago, Karina Basso; De Assis Golim, Marjorie; **Da Silva Feltran, Geórgia**; Zambuzzi, Willian Fernando; Sforcin, José Maurício A new chemotherapeutic approach using doxorubicin simultaneously with geopropolis favoring monocyte functions. LIFE SCIENCES., v.217, p.81 - 90, 2018.
3. Da Silva, Rodrigo A.; Fernandes, Célio Jr Da C.; **Feltran, Geórgia Da S.**; Gomes, Anderson M.; De Camargo Andrade, Amanda Fantini; Andia, Denise C.; Peppelenbosch, Maikel P.; Zambuzzi, Willian F. Laminar shear stress-provoked cytoskeletal changes are mediated by epigenetic reprogramming of in human primary smooth muscle cells. JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY., v.233, p.1 - 15, 2018.
4. Assis, Rahyza I. F.; Wiench, Malgorzata; Silvério, Karina G.; Da Silva, Rodrigo A.; **Feltran, Geórgia Da Silva**; Sallum, Enilson A.; Casati, Marcio Z.; Nociti, Francisco H.; Andia, Denise C. RG108 increases NANOG and OCT4 in bone marrow-derived mesenchymal cells through global changes in DNA modifications and epigenetic activation. PLoS One., v.13, p.e0207873 - , 2018.
5. **Da Silva Feltran, Geórgia**; Da Costa Fernandes, Célio Junior; Rodrigues Ferreira, Marcel; Kang, Ha Ram; De Carvalho Bovolato, Ana Livia; De Assis Golim, Márjorie; Deffune, Elenice; Koh, Ivan Hong Jun; Constantino, Vera Regina Leopoldo; Zambuzzi, Willian F. Sonic hedgehog drives layered double hydroxides-induced acute inflammatory landscape. COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES., v.174, p.467 - 475, 2018.
6. Da Silva, Rodrigo A.; De Camargo Andrade, Amanda Fantini; **Da Silva Feltran, Geórgia**; Fernandes, Célio Júnior Da C.; De Assis, Rahyza Inacio F.; Ferreira, Marcel Rodrigues; Andia, Denise C.; Zambuzzi, Willian F. The role of triiodothyronine hormone and mechanically-stressed endothelial cell paracrine signalling synergism in gene reprogramming during hBMSC-stimulated osteogenic phenotype in vitro. MOLECULAR AND CELLULAR ENDOCRINOLOGY., v.XX, p.X - , 2018.
7. Fernandes, Célio J. C.; Bezerra, Fabio; Do Carmo, Maiara Das D.; **Feltran, Georgia**; Rossi, Mariana C.; Da Silva, Rodrigo A.; Padilha, Pedro De M.; Zambuzzi, Willian F. CoCr enriched medium modulates integrin-based downstream signaling and requires a set of inflammatory genes reprogramming

vitro. JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH PART A., v.A00, p.1 - 11, 2017.

8. Da Silva, R. A.; Fuhler, G. M.; Janmaat, V. T.; DA C. FERNANDES, C. J.; **Da Silva Feltran, G.**; Oliveira, F. A. ; Matos, A. A.; Oliveira R. C.; Ferreira, M. R.; Zambuzzi, W. F.; Peppelenbosch, M. P. HOXA cluster gene expression during osteoblast differentiation involves epigenetic control. BONE v. XX, p. 1-15, 2019.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agani FH, Puchowicz M, Chavez JC, Pichiule P, LaManna J. Role of nitric oxide in the regulation of HIF-1alpha expression during hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 Jul;283(1):C178-86
- Balls M, 19. Russell and Burch after 1959. *Altern Lab Anim*. 2015 Nov;43(5):P59-60.
- Barou O, Mekraldi S, Vico L, Boivin G, Alexandre C, Lafage-Proust MH. - Relationships between trabecular bone remodeling and bone vascularization: a quantitative study. *Bone*. 2002 Apr;30(4):604-12.
- Bartel, D.P., Chen, C.-Z., 2004. Micromanagers of gene expression: the potentially widespread influence of metazoan microRNAs. *Nat. Rev. Genet*. 5, 396–400.
- Blacher S, Erpicum C, Lenoir B, Paupert J, Moraes G, Ormenese S, Bullinger E, Noel A. Cell invasion in the spheroids sprouting assay: a spatial organisation analysis adaptable to cell behaviour. *PLoS One*. 2014 May 7;9(5):e97019. doi: 10.1371/journal.pone.0097019.
- Brandi ML, Collin-Osdoby P. - Vascular Biology and the Skeleton. *J Bone Miner Res*. 2006 Feb;21(2):183-92
- Carreira AC, Alves GG, Zambuzzi WF, Sogayar MC, Granjeiro JM. - Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:64-73.
- Carvalho MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. - Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. *Rev Bras Hipertens* 8: 76-88, 2001
- CAZARIN, K.C.C. ; CORREA, C. L. ; ZAMBRONE, F. A. D. . Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *RBCF. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, p. 289-299, 2004.
- Chasseigneaux S, Moraca Y, Cochois-Guégan V, Boulay AC, Gilbert A, Le Crom S, Blugeon C, Firmo C, Cisternino S, Laplanche JL, Curis E, Declèves X, Saubaméa B. Isolation and differential transcriptome of vascular smooth muscle cells and mid-capillary pericytes from the rat brain. *Sci Rep*. 2018 Aug 16;8(1):12272.
- Chen CO, Smith A, Liu Y, Du P, Blumberg JB, Garlick J. Photoprotection by pistachio bioactives in a 3-dimensional human skin equivalent tissue model. *Int J Food Sci Nutr*. 2017 Sep;68(6):712-718. doi: 10.1080/09637486.2017.1282437. Epub 2017 Jan 25.

- Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J. - Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Jun;24(3):297-310;
- Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J. - Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2013 Jun;24(3):297-310;
- Cho CF, Wolfe JM, Fadzen CM, Calligaris D, Hornburg K, Chiocca EA, Agar NYR, Pentelute BL, Lawler SE. Blood-brain-barrier spheroids as an in vitro screening platform for brain-penetrating agents *Nat Commun.* 2017 Jun 6;8:15623. doi: 10.1038/ncomms15623
- Cimmino, Amelia Calin, George Adrian Fabbri, Muller Iorio, Marilena V Ferracin, Manuela Shimizu, Masayoshi Wojcik, Sylwia E Aqeilan, Rami I Zupo, Simona Dono, Mariella Rassenti, Laura Alder, Hansjuerg Volinia, Stefano Liu, Chang-Gong Kipps, Thomas J Negrini, Massimo Croce, Carlo M. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Sep 27;102(39):13944-9. Epub 2005 Sep 15.
- Clemens TL. Vasoactive Agents and Bone metabolism. In: *Principles of Bone Biology.* (1996) BilezikianJP, Raisz LG, Rodan GA (eds). Academic Press, San Diego. pp. 597–605.
- Climent M, Manuela Quintavalle, Michele Miragoli, Ju Chen, Gianluigi Condorelli, Leonardo Elia - TGF β Triggers miR-143/145 Transfer From Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells, Thereby Modulating Vessel Stabilization. *Circ Res.* 2015;116:1753-1764.
- dela Paz, NG & D'Amore, PA. Arterial versus venous endotelial cells. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan; 335(1): 5–16.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., Hannon, G.J., 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235.
- Di Toro, R., Betti, V., Spampinato, S. - Biocompatibility and integrin-mediated adhesion of human osteoblasts to poly(DL-lactide-co-glycolide) copolymers. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* Volume 21, Issues 2–3, February 2004, Pages 161-169
- Dimmeler S, Assmus B, Hermann C, Haendeler J, Zeiher AM. Fluid shear stress stimulates phosphorylation of Akt in human endothelial cells: involvement in suppression of apoptosis. *Circ Res.* 1998 Aug 10; 83(3):334-41.

- Dirckx N, Van Hul M, Maes C. - Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2013 Sep;99(3):170-91
- Drager J, Harvery E J, Barralet J. - Hypoxia signalling manipulation for bone regeneration. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, Vol. 17; e6; 1 of 16. Cambridge University Press, 2015.
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G - Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. 1997 *Cell* 89: 747-754.
- Dyce PW, Zhu H, Craig J, Li J. - Stem cells with multilineage potential derived from porcine skin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Apr 9;316(3):651-8.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 2001 Oct 5;107(1):43-54.
- Eshkar-Oren, Viukov SV, Salameh S, Krief S, Oh CD, Akiyama H, Gerber HP, Ferrara N, Zelzer E. - The forming limb skeleton serves as a signaling center for limb vasculature patterning via regulation of Vegf. *Development*. 2009 Apr;136(8):1263-72.
- Fennema E, Rivron N, Rouwkema J, van Blitterswijk C, de Boer J. - Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. *Trends Biotechnol*. 2013 Feb;31(2):108-15.
- Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*. 2017 Aug;20(3):291-302.
- Filippi I, Saltarella I, Aldinucci C, Carraro F, Ria R, Vacca A, Naldini A. - Different Adaptive Responses to Hypoxia in Normal and Multiple Myeloma Endothelial Cells. *Cell Physiol Biochem*. 2018;46(1):203-212
- Fu B, Xue J, Li Z, Shi X, Jiang BH, Fang J. Chrysin inhibits expression of hypoxia-inducible factor-1 α through reducing hypoxia-inducible factor-1 α stability and inhibiting its protein synthesis. *Mol Cancer Ther*. 2007 Jan;6(1):220-6.
- Gaengel, Konstantin Genove, Guillem Armulik, Annika Betsholtz, Christer. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 May;29(5):630-8. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.161521. Epub 2009 Jan 22

- Gansburgskii AN, Yal'tsev AV. - Structural Organization of Arterial Vessels in Placental Hypoplasia. *Bull Exp Biol Med.* 2015 Jun;159(2):282-4.
- Gemini-Piperni S, Takamori ER, Sartoretto SC, Paiva KB, Granjeiro JM, de Oliveira RC, Zambuzzi WF. Cellular behavior as a dynamic field for exploring bone bioengineering: a closer look at cell-biomaterial interface. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Nov 1;561:88-98. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.019. Epub 2014 Jun 27. Review.
- Gerber HP, Ferrara N. - Angiogenesis and bone growth. *Trends Cardiovasc Med.* 2000 Jul;10(5):223-8.
- Granjeiro, José Mauro; Alves, Gutemberg G.; Calasans-Maia, M; Antunes, L; Zambuzzi, Willian F. Entendendo as Proteínas Morfogenéticas Ósseas: Da Estrutura às Aplicações Clínicas. In: Cláudio Fernandes.. (Org.). Uma Odontologia de Classe Mundial - FDI 2010 Brasil. 1 ed. São Paulo:. São Paulo: Santos, 2010, v., p. 109-140.
- Gregory, R.I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., Shiekhattar, R., 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Grivas KN, Vavva MG, Polyzos D, Carlier A, Geris L, Van Oosterwyck H, Fotiadis DI. Effect of ultrasound on bone fracture healing: A computational mechanobioregulatory model. *Acoust Soc Am.* 2019 Feb;145(2):1048. doi: 10.1121/1.5089221.
- Gupta, Manoj Kumar Qin, Ren-Yi. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2003 Jun;9(6):1144-55
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K., Kim, Y., Jin, H., Kim, V.N., 2004. The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 3016–3027.
- Hayashi K. - Three-dimensional organization of the cartilage canal--a scanning electron-microscopic study by vascular cast of the rabbit's femoral head. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi.* 1992 May;66(5):548-59.
- Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, Augustin HG, Korff T. Endothelial cells spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J.* 2015 Jul;29(7):3076-84. doi: 10.1096/fj.14-267633. *Cell Tissue Res.* 2009 Jan; 335(1): 5–16.
- Henriksen K, Neutzsky-Wulff AV, Bonewald LF, Karsdal MA. - Local communication on and within bone controls bone remodeling. *Bone.* 2009 Jun;44(6):1026-33
- Hutvagner, G., 2001. A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the let-7 Small Temporal RNA. *Science* (80-.). 293, 834–838.

- Imai K, Kobayashi M, Wang J, Ohiro Y, Hamada J, Cho Y, Imamura M, Musashi M, Kondo T, Hosokawa M, Asaka M. - Selective transendothelial migration of hematopoietic progenitor cells: a role in homing of progenitor cells. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):149-56
- Imai K, Kobayashi M, Wang J, Shinobu N, Yoshida H, Hamada J, Shindo M, Higashino F, Tanaka J, Asaka M, Hosokawa M. - Selective secretion of chemoattractants for haemopoietic progenitor cells by bone marrow endothelial cells: a possible role in homing of haemopoietic progenitor cells to bone marrow. *Br J Haematol*. 1999 Sep;106(4):905-11
- Imamura Y, Mukohara T, Shimono Y, Funakoshi Y, Chayahara N, Toyoda M, Kiyota N, Takao S, Kono S, Nakatsura T, Minami H. - Comparison of 2D- and 3D-culture models as drug-testing platforms in breast cancer. Published online on: January 29, 2015. *Oncology reports*.
- Itkin T, Gur-Cohen S, Spencer JA, Schajnovitz A, Ramasamy SK, Kusumbe AP, Ledergor G, Jung Y, Milo I, Poulos MG, Kalinkovich A, Ludin A, Kollet O, Shakhar G, Butler JM, Rafii S, Adams RH, Scadden DT, Lin CP, Lapidot T. Distinct bone marrow blood vessels differentially regulate haematopoiesis. *Nature*. 2016 Apr 21;532(7599):323-8. doi: 10.1038/nature17624. Epub 2016 Apr 13
- Jha R, Wu Q, Singh M, Preininger MK, Han P, Ding G, Cho HC, Jo H, Maher KO, Wagner MB, Xu C. - Simulated Microgravity and 3D Culture Enhance Induction, Viability, Proliferation and Differentiation of Cardiac Progenitors from Human Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*. 2016; 6: 30956.
- Jian Zhou and Jian Dong. - *Vascularization in the Bone Repair, Osteogenesis*, (2012) Prof. Yunfeng Lin (Ed.), ISBN: 978-953-51-0030-0, InTech
- Kanczler JM, Oreffo RO. - Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008 May 2;15:100-14
- Kane NM, Thrasher AJ, Angelini GD, Emanuelli C. Concise review: MicroRNAs as modulators of stem cells and angiogenesis. *Stem Cells*. 2014 May;32(5):1059-66. doi: 10.1002/stem.1629.
- Karsenty G. - How many factors are required to remodel bone? *Nat Med*. 2000 Sep;6(9):970-1
- Kim YK, Kim B, Kim VN. Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Mar 29;113(13):E1881-9.

- Kim, SHJ, Park, S, Mostov, K, Debnath, J, Hunt, A. Computational investigation of epithelial cell dynamic phenotype in vitro. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2009; 6 (8): 10-6.
- Kir D, Schnettler E, Modi S, Ramakrishnan S. - Regulation of angiogenesis by microRNAs in cardiovascular diseases. *Angiogenesis*. 2018 Jun 28.
- Koç Demir A, Elçin AE, Elçin YM - Osteogenic differentiation of encapsulated rat mesenchymal stem cells inside a rotating microgravity bioreactor: in vitro and in vivo evaluation. *Cytotechnology*. 2018 Jun 25.
- Komori T. Roles of Runx2 in Skeletal Development. *Adv Exp Med Biol*. 2017;962:83-93.
- Krishnan L, Willett NJ, Guldberg RE. Vascularization strategies for bone regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2014 Feb;42(2):432-44.
- Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):332-6.
- Kusumbe AP, Adams RH. - Osteoclast progenitors promote bone vascularization and osteogenesis. *Nat Med*. 2014 Nov;20(11):1238-40.
- Kusumbe AP, Ramasamy SK, Adams RH. - Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone; *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492), pp. 323–8.
- Kusumbe AP, Ramasamy SK, Itkin T, Mäe MA, Langen UH, Betsholtz C, Lapidot T, Adams RH. Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2016 Apr 21;532(7599):380-4. doi: 10.1038/nature17638. Epub 2016 Apr 13
- Laroche M. - Intraosseous circulation from physiology to disease. *Joint Bone Spine*. 2002 May;69(3):262-9
- Lertkietmongkol P, Liao D, Mei H, Hu Y, Newman PJ. Endothelial functions of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *Curr Opin Hematol*. 2016 May;23(3):253-9.
- Li J, Yang Zhao, Ying Lu, William Ritchie, Georges Grau, Mathew A Vadas and Jennifer R Gamble. - The Poly-cistronic miR-23-27-24 Complexes Target Endothelial Cell Junctions: Differential Functional and Molecular Effects of miR-23a and miR-23b. *Official journal of the American Society of Gene & Cell Therapy. Molecular Therapy—Nucleic Acids* (2016) 5, e354
- Li Y, Wang H, Yang B, Yang J, Ruan X, Yang Y, Wakeland EK, Li Q, Fang X. – Influence of carbon monoxide on growth and apoptosis of

- human umbilical artery smooth muscle cells and vein endothelial cells. *Int J Biol Sci.* 2012;8(10):1431-46.
- Lin, R. Z, Chang, H-Y. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal*: 2008; 3 (9-10): 1172-84.
- Liu FJ, Kaur P, Karolina DS, Sepramaniam S, Armugam A, Wong PT, Jeyaseelan K. MiR-335 Regulates Hif-1 α to Reduce Cell Death in Both Mouse Cell Line and Rat Ischemic Models. *PLoS One.* 2015 Jun 1;10(6):e0128432. doi: 10.1371/journal.pone.0128432. eCollection 2015
- Liu S, Yang Y, Chen L, Liu D, Dong H. MicroRNA-154 functions as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer through directly targeting B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1, *Oncol Lett.* 2018 Jun;15(6):10098-10104.
- Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, Carmeliet G, Kronenberg HM. - Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Dev Cell.* 2010 Aug 17;19(2):329-44
- Maes C. - Role and regulation of vascularization processes in endochondral bones. *Calcif Tissue Int.* 2013 Apr;92(4):307-23.
- Majesky, Mark W Dong, Xiu Rong Regan, Jenna N Hoglund, Virginia J. Vascular smooth muscle progenitor cells: building and repairing blood vessels. *Circ Res.* 2011 Feb 4;108(3):365-77. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.223800
- Martin TJ, Seeman E. - Bone remodelling: its local regulation and the emergence of bone fragility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2008 Oct;22(5):701-22
- Masaki Imanishi, Shuhei Tomita, Keisuke Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Masaki Ueno, Yuki Izawa-Ishizawa, Yasumasa Ikeda, Noriko Yamano, Koichiro Tsuchiya and Toshiaki Tamaki. - Smooth muscle cell-specific Hif-1 α deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodelling in mice. *Cardiovascular Research* (2014) 102, 460–468.
- Nauta TD, van Hinsbergh VW, Koolwijk P. Hypoxic signaling during tissue repair and regenerative medicine. *Int J Mol Sci.* 2014 Oct 31;15(11):19791-815. doi: 10.3390/ijms151119791.
- Nizet V, Johnson RS: Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol* 2009;9:609-617.
- Park SK, Dadak AM, Haase VH, Fontana L, Giaccia AJ, Johnson RS: Hypoxia-induced gene expression occurs solely through the action of hypoxia-inducible factor

1alpha (HIF-1alpha): role of cytoplasmic trapping of HIF-2alpha. *Mol Cell Biol* 2003; 23:4959-4971

Profirovic, Jasmina, Strekalova, Elena, Urao, Norifumi, Krbanjevic, Aleksandar, Andreeva, Alexandra V, Varadarajan, Sudhakar, Fukai, Tooru Hen, Rene Ushio-Fukai, Masuko Voyno-Yasenetskaya, Tatyana A. A novel regulator of angiogenesis in endothelial cells: 5-hydroxytryptamine 4 receptor. *Angiogenesis*. 2013 Jan;16(1):15-28. doi: 10.1007/s10456-012-9296-7. Epub 2012 Aug 18.

Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Exp Cell Res*. 2017 Jul 15;356(2):116-121. doi: 10.1016/j.yexcr.2017.03.008. Epub 2017 Mar 15. Review.

Ramasamy SK, Kusumbe AP, Itkin T, Gur-Cohen S, Lapidot T, Adams RH. Regulation of Hematopoiesis and Osteogenesis by Blood Vessel-Derived Signals. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2016 Oct 6;32:649-675. Epub 2016 Aug 17. Review.

Ramasamy SK, Kusumbe AP, Wang L, Adams RH. - Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. *Nature*. 2014 Mar 20;507(7492), pp. 376-80.

Riascos-Bernal, Dario F Chinnasamy, Prameladevi Cao, Longyue Lily Dunaway, Charlene M Valenta, Tomas Basler, Konrad Sibinga, Nicholas E S. beta-Catenin C-terminal signals suppress p53 and are essential for artery formation. *Nat Commun*. 2016 Aug 8;7:12389. doi: 10.1038/ncomms12389.

Rivron NC, Raiss CC, Liu J, Nandakumar A, Sticht C, Gretz N, Truckenmüller R, Rouwkema J, van Blitterswijk CA. - Sonic Hedgehog-activated engineered blood vessels enhance bone tissue formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 109 (2012), pp. 4413-4418.

Rivron NC, Rouwkema J, Truckenmüller R, Karperien M, De Boer J, Van Blitterswijk CA. - Tissue assembly and organization: developmental mechanisms in microfabricated tissues. *Biomaterials*, 30 (2009), pp. 4851-4858.

RUSSELL, W. M. S.; BURCH, R. L. *The Principles of Humane Experimental Technique*. [s.l: s.n.]

Santos MI, Reis RL. - Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci*. 2010 Jan 11;10(1):12-27

Sanverdi SE, Ozgen B, Dolgun A, Sarac S Incomplete endochondral ossification of the otic capsule, a variation in children: evaluation of its prevalence and extent in children with and without sensorineural hearing loss. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2015 Jan;36(1):171-5. doi: 10.3174/ajnr.A4128. Epub 2014 Sep 18.

- Schipani E., Maes C, Carmeliet G, Semenza GL. - Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *Journal of Bone and Mineral Research* 2009, 24, 1347-1353.
- Scortegagna M, Cataisson C, Martin RJ, Hicklin DJ, Schreiber RD, Yuspa SH, Arbeit JM: HIF-1 α regulates epithelial inflammation by cell autonomous NF κ B activation and paracrine stromal remodeling. *Blood* 2008; 111:3343-3354
- Semenza, G L. HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985)
- Sims NA, Gooi JH. - Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Oct;19(5):444-51.
- Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. - Hydrogels in regenerative medicine. *Adv. Mater.*, 21 (2009), pp. 3307–3329.
- Stegen S, et al, Bringing new life to damaged bone: The importance of angiogenesis in bone repair and regeneration, *Bone* (2014), BON-10491; No. of pages: 9; 4C: 2, 4, 6.
- Sumpio BE, Yun S, Cordova AC, Haga M, Zhang J, Koh Y, Madri JA. MAPKs (ERK1/2, p38) and AKT can be phosphorylated by shear stress independently of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in vascular endothelial cells. *J Biol Chem.* 2005 Mar 25; 280(12):11185-91.
- Sun LL, Li WD, Lei FR, Li XQ. - The regulatory role of microRNAs in angiogenesis-related diseases. *J Cell Mol Med.* 2018 Jun 29
- T. Mosmann. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 1983, 65, 55.
- Tetzlaff F, Fischer A. Control of Blood Vessel Formation by Notch Signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1066:319-338
- Thamsborg SM, Hauge EM. - Osteopenia and reduced serum alkaline phosphatase activity in grazing lambs naturally infected with gastrointestinal nematodes. *J Comp Pathol.* 2001 Aug-Oct;125(2-3):192-203.
- Tomlinson RE, Silva MJ. HIF-1 α regulates bone formation after osteogenic mechanical loading. *Bone.* 2015 Apr;73:98-104
- Tomlinson, Ryan E Silva, Matthew J. HIF-1 α regulates bone formation after osteogenic mechanical loading. *Bone* 2015.

- Tong, L., Xue, H., Xiong, L., Xiao, J., & Zhou, Y. (2015). Improved RT-PCR assay to quantitate the Pri-, Pre-, and mature microRNAs with higher efficiency and accuracy. *Molecular Biotechnology*, 57(10), 939–946.
- Van der Eerden BC, Teti A, Zambuzzi WF. - Bone, a dynamic and integrating tissue. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:1
- van der Eerden BC, Teti A, Zambuzzi WF. Bone, a dynamic and integrating tissue. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:1-2. doi: 10.1016/j.abb.2014.08.012. Epub 2014 Aug 23.
- Wang X, Ling CC, Li L, Qin Y, Qi J, Liu X, You B, Shi Y, Zhang J, Jiang Q, Xu H, Sun C, You Y, Chai R, Liu D. MicroRNA-10a/10b represses a novel target gene *mib1* to regulate angiogenesis. *Cardiovasc Res*. 2016 May 1;110(1):140-50. doi: 10.1093/cvr/cvw023. Epub 2016 Jan 29.
- Wang XL, Fu A, Raghavakaimal S, Lee HC. Proteomic analysis of vascular endothelial cells in response to laminar shear stress. *Proteomics*. 2007 Feb; 7(4):588-596
- Wilson A, Trumpp A. - Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. 2006 Feb;6(2):93-106
- Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Tagawa N, Takahashi N, Suda T. - Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95 (7) (1998).
- Zhdanov AV, Okkelman IA, Collins FW, Melgar S, Papkovsky DB. A novel effect of DMOG on cell metabolism: direct inhibition of mitochondrial function precedes HIF target gene expression. *Biochim Biophys Acta*. 2015 Oct;1847(10):1254-66. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.06.016.