UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia db-secretaria@ffclrp.usp.br **USP**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Caracterização de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea e do osso compacto".

Rafaela Rossetti

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Biologia db-secretaria@ffclrp.usp.br **USP**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

"Caracterização de células-tronco mesenquimais murinas da medula óssea e do osso compacto".

Rafaela Rossetti

Monografia apresentada ao Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas
Dr. Lucas Eduardo Botelho de Souza

RIBEIRÃO PRETO – SP

2016

Dedico este trabalho à minha mãe Arilda e à minha avó Neuza, que sempre me apoiam, participam fortemente das minhas conquistas e as fazem mais satisfatórias.

RESUMO

A idéia de um nicho perivascular para as células-tronco mesenquimais (CTMs) da medula óssea vem sendo amplamente aceita por muito tempo. No entanto, estudos recentes indicam que estas células ocupam o endósteo em camundongos jovens e originam tecido ósseo, cartilagem e estroma, mas não originam tecido adiposo, diferente do que é proposto para as CTMs perivasculares. Sendo assim, visando-se acomodar as novas evidências aos conhecimentos já obtidos anteriormente a respeito das CTMs, foi postulada a existência de duas populações de CTMs. Essas populações ocupariam dois nichos distintos, sendo uma população endosteal e a outra perivascular, e não coincidiriam no tempo, ao passo que a primeira, denominada população de CTMs osteo-condro-reticulares, seria responsável pela geração e homeostase dos tecidos esqueléticos durante a junventude, e a segunda, população de CTMs perisinusoidais, seria capaz de gerar tecido adiposo, tendo uma participação mais significativa no reparo tecidual em indivíduos mais velhos. Como tal hipótese ainda não foi testada diretamente, o objetivo deste trabalho foi isolar CTMs da medula óssea (MO-CTM - população perisinusoidal) e do osso compacto (OC-CTM - população osteo-condro-reticular) e caracterizá-las *in vitro* quanto à frequência de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F), morfologia, capacidade de proliferação clonal, capacidade de diferenciação e perfil imunofenotípico. Foi observado que a frequência de CFU-F é maior no osso compacto em relação à medula óssea, que as MO-CTMs apresentam uma baixa capacidade de proliferação clonal e que ambas CTMs estudadas foram capazes de se diferenciar em adipócitos e osteócitos após a indução. Além disso, a análise do perfil imunofenotípico dessas células confirmou a identidade das OC-CTMs e mostrou uma elevada expressão do marcador de células hematopoéticas CD45 nas MO-CTMs. Nossos resultados corroboram a co-existência de populações de CTMs na medula óssea e no osso compacto e sugerem o osso compacto como uma possível fonte promissora para a obtenção de CTMs para uso clínico.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, medula óssea e osso compacto.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frequência de CFU-F dentre as células da medula óssea e do osso compacto de animais adultos 22

Figura 2. Morfologia das CTMs (1ª passagem) 23

Figura 3. Quantidade de células obtidas a partir da medula óssea e do osso compacto através das técnicas de *flushing* e do *crushing*..... 25

Figura 4.Frequência de células hematopoéticas $CD45^+$ e endoteliais $CD31^+$ nas amostras obtidas da medula óssea e osso compacto 26

Figura 5. Frequência de CFU-F obtidas a partir das células isoladas da medula óssea cultivadas com ou sem a citocina bFGF 27

Figura 6. Frequência de CFU-F dentre as células da medula óssea e do osso compacto de animais jovens 28

Figura 7. Diferença entre as frequências de CFU-F nas MO-CTMs e OC-CTMs nos animais jovens e adultos 29

Figura 8. Diferenciação das OC-CTMs..... 30

Figura 9. Diferenciação das MO-CTMs..... 31

Figura 10. Potencial de diferenciação *in vitro* das MO-CTMs e OC-CTMs..... 31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequência de clones de CTMs dos animais adultos que proliferaram após subcultivo em baixa densidade 24

Tabela 2. Expressão de marcadores de superfície nas OC-CTMs 32

Tabela 3. Expressão de marcadores de superfície nas MO-CTMs 32

SUMÁRIO

1. Introdução 8

2. Objetivos 12

2.1. Objetivo geral 13

2.2. Objetivos específicos 13

3. Material e Métodos 14

3.1. Ética e Biossegurança 15

3.2. Animais 15

3.3. Isolamento das células-tronco mesenquimais 15

3.4. Cultivo das células-tronco mesenquimais 16

3.5. Caracterização das CTMs: frequência de CFU-F e morfologia 17

3.6. Caracterização das CTMs: potencial de expansão clonal - subcultivo em baixa densidade 17

3.7. Caracterização das CTMs: diferenciação *in vitro* 17

3.8. Caracterização das CTMs: perfil imunofenotípico 19

3.9. Análises estatísticas 19

4. Resultados 21

4.1. Animais adultos: frequência de CFU-F na medula óssea e no osso compacto 22

4.2. Animais adultos: morfologia das MO-CTMs e OC-CTMs.. 23

4.3. Animais adultos: potencial de expansão clonal das CTMs. 24

4.4. Animais jovens: estratégias de isolamento das CTMs (*flushing* x *crushing*) 24

4.5. Animais jovens: efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) na eficiência clonogênica das MO-CTMs 27

4.6. Animais jovens: frequência de CFU-F na medula óssea e no osso compacto 28

4.7. Animais jovens: diferenciação *in vitro* das MO-CTMs e OC-CTMs 29

4.8. Animais jovens: perfil imunofenotípico das CTMs cultivadas 32

5. Discussão 33

6. Conclusões 39

7. Referências Bibliográficas 41

1. *Introdução*

Estudos realizados em 1968, por Tavassoli e Crosby (Tavassoli & Crosby, 1968) forneceram os primeiros indícios da existência de células-tronco não hematopoéticas na medula óssea. Realizando transplante ectópico de fragmentos da medula óssea em ratos, os autores demonstraram que a população de células reticulares (não hematopoéticas) era capaz de reconstituir um ossículo ectópico composto por estroma e de dar suporte à hematopoese. Então, em estudos posteriores, Friedenstein e colaboradores identificaram a população de células estromais responsáveis pelo potencial osteogênico da medula óssea (Friedenstein *et al*, 1970). Foi observado que essas células eram aderentes à superfície da placa de cultivo, representavam apenas 0,0004% do total de células nucleadas da medula óssea e formavam colônias compostas de células fibroblásticas quando cultivadas, característica que as diferenciavam das células hematopoéticas e que contribuiu para a denominação inicial dessas células, uma vez que passaram a serem chamadas de unidades formadoras de colônias fibroblásticas (CFU-F, do inglês *colony forming units-fibroblastic*).

No entanto, com o avanço nos estudos e no conhecimento a respeito dessas células, a denominação utilizada foi alterada gradativamente. Experimentos mostraram que a progênie de uma única CFU-F da medula óssea era capaz de originar diferentes tipos de tecido conjuntivo, como adipóticos e condrócitos (Friedenstein, 1990) e, então, as CFU-Fs foram chamadas de células-tronco estromais da medula óssea (Owen e Fridenstein, 1988). Posteriormente, o termo células-tronco mesenquimais (CTMs) foi adotado (Caplan, 1991), pois acreditava-se que essas células seriam os precursores de todas as linhagens mesenquimais presentes no organismos.

A descoberta do potencial de diferenciação dessas células e, assim, sua possível utilização na medicina regenerativa e na terapia celular, despertou um grande interesse em elucidar seu potencial terapêutico. Assim, foram conduzidos diversos estudos sobre as CTMs, os quais contribuíram para o avanço no conhecimento de suas propriedades *in vitro*. Porém, os trabalhos publicados empregavam diferentes métodos de isolamento, cultivo e caracterização dessas células, levando a Sociedade Internacional de Terapia Celular estabelecer critérios para se definir uma população de CTMs. Sendo assim, sugeriu-se que as CTMs apresentam aderência ao plástico em condições de cultura, expressam os marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90 e não expressam CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD7α ou CD19 e HLA-DR (Dominici *et al*, 2006). No entanto, se por um lado houve um avanço na caracterização *in vitro* dessas células, o uso de propriedades *in vitro* para a identificação das

CTMs atrasou significativamente a elucidação da identidade e função destas células *in vivo* e estudos com informações a esse respeito começaram a ser publicados apenas recentemente.

Em seus estudos, Gronthos e colaboradores, relataram que as CTMs da medula óssea apresentavam alta expressão de STRO-1 e estavam presentes na microvasculatura do seu tecido de origem (Shi & Gronthos, 2003). Além disso, também demonstraram *in vivo* o potencial osteogênico característico dessas células (Gronthos *et al*, 2003). Posterirormente, células com características *in vitro* similares às das CTMs da medula óssea foram isoladas de vários órgãos e tecidos murinos, e puderam ser obtidas a partir de grandes e pequenos vasos sanguíneos, porém não foram encontradas no sangue periférico (Meirelles *et al*, 2006). Tais resultados serviram como evidências indiretas para a elaboração da hipótese de que a ampla distribuição apresentada pelas CTMs no organismo era decorrência de sua localização perivascular.

A partir de então, outros estudos forneceram evidências diretas a respeito da localização das CTMs na medula óssea e reforçaram a hipótese de que elas ocupariam o nicho perivascular. Um desses estudos foi realizado por Covas e colaboradores, os quais reportaram que células estromais mesenquimais da medula óssea e pericitos apresentam similaridades em relação à morfologia, expressão de marcadores de superfície e capacidade de diferenciação (Covas *et al*, 2008). Adicionalmente, Crisan e colaboradores observaram que células perivasculares isoladas de diferentes tecidos quando eram cultivadas expressavam marcadores de superfície celular associados às CTMs (Crisan *et al*, 2008).

Sendo assim, a idéia de um nicho perivascular para as CTMs foi amplamente aceita pelos pesquisadores na época. Porém, foi observado que CTMs da medula óssea $CD146^{-}$ $CD271^{+}$ compunham o tecido de revestimento interno da cavidade óssea, o endósteo, enquanto CTMs $CD146^{+}CD271^{+}$ localizavam-se na região perivascular do estroma medular (Tormin *et al*, 2011), o que contribuiu para a idéia inovadora de que as CTMs também poderiam estar presentes fora da região perivascular.

Então, trabalhos mais recentes utilizando rastreamento de linhagens celulares por recombinação gênica demonstraram que CTMs ocupam o endósteo em camundongos jovens (até 6 semanas de idade). Foi observado que a linhagem de células-tronco/progenitoras que origina o osso, a cartilagem e os tecidos do estroma não originam a gordura ao se realizar experimentos *in vivo* com regiões clonais do osso de ratos, principalmente da placa de crescimento. Esses resultados são contrários ao que é comumente proposto para as CTMs

perivasculares. Além disso, ao se isolar células da região da placa de crescimento do fêmur, foram identificadas oito subpopulações de células imunofenotipicamente distintas as quais também apresentaram diferenças quanto à capacidade de diferenciação, de modo que foi concluído que uma das populações correspondia às CTMs genuínas em tecidos esqueléticos pós-natais e que as demais subpopulações seriam células progenitoras com capacidade de diferenciação mais restrita (Chan *et al*, 2015). Em concordância com estes resultados, Whortley e colaboradores observaram que CTMs que expressam Grem-1 localizam-se exclusivamente na região endosteal e são responsáveis por gerar tecido ósseo, cartilagem e o sistema reticular da medula óssea, mas não tecido adiposo (Whortley *et al*, 2015). Além disso, os autores também reportaram que células perissinusoidais positivas para nestina não contribuem para a geração dos tecidos esqueléticos, contrariando a idéia anteriormente proposta de que esta população celular corresponderia às CTMs genuínas da medula óssea de camundongos (Méndez-Ferrer *et al*, 2010).

A partir desses trabalhos e dos anteriores que postulavam que as CTMs são perivasculares e capazes de originar, inclusive, tecido adiposo, a hipótese da existência de duas populações de CTMs foi proposta. Essas não coincidiriam em tempo e espaço, uma vez que a população de CTMs osteo-condro-reticulares estaria localizada no endósteo e seria responsável pela geração e homeostase dos tecidos esqueléticos durante a juventude, enquanto a população de CTMs perisinusoidais ocuparia o nicho perivascular da medula óssea e seria capaz de gerar tecido adiposo, tendo uma participação no reparo tecidual mais significativa na fase adulta (Worthley *et al*., Kassem *et al*, 2015).

Essa hipótese conciliaria os achados recentes com os estudos anteriores e, como não havia sido testada anteriormente, foi a base desse trabalho. Para avaliar a possível existência das duas populações, CTMs foram isoladas da medula óssea, correspondendo à população perissinusoidal, e do osso compacto, população osteo-condro-reticular, e posteriormente foram caracterizadas *in vitro*, quanto à morfologia, ao potencial de proliferação clonal, à eficiência na formação de CFU-F, expressão de marcadores de superfície e capacidade de diferenciação.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Comparar células-tronco mesenquimais (CTMs) provenientes da medula óssea (MO-CTMs) e do osso compacto (OC-CTMs) de camundongos (*Mus muscuclus*) da linhagem C57BL/6^{GFP} quanto às suas características *in vitro.*

2.2. Objetivos específicos

- Isolar MO-CTMs e OC-CTMs de camundongos da linhagem C57BL/6^{GFP}.
- Estabelecer as condições para isolamento e cultivo das CTMs por meio da 1) comparação de duas estratégias de isolamento de CTMs, *flushing* e *crushing*, quanto ao número de células obtidas e ao perfil imunofenotípico das células isoladas e da 2) avaliação do efeito do fator de crescimento de fibroblastos-2 (FGF-2 ou bFGF) na proliferação das CTMs *in vitro*.
- Caracterizar as MO-CTMs e OC-CTMs quanto à morfologia, potencial de proliferação, potencial clonogênico, potencial de diferenciação e perfil imunofenotípico.

3. Material e Métodos

3.1. Ética e Biossegurança

Os procedimentos envolvendo experimentação animal foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA – FMRP – USP) (protocolo nº: 123-2015). Além disso, todos os procedimentos realizados seguiram as normas da Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e foi aprovado pela mesma (processo nº: 297/2015.011-01).

3.2. Animais

Para a obtenção das CTMs foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem C57BL/6^{GFP}, fornecidos pelo Laboratório para Estudos em Experimentação em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde permaneceram durante a realização deste trabalho. Os animais utilizados foram separados em dois grupos considerando-se a idade. Assim, o grupo denominado "animais jovens" foi composto por indivíduos que apresentavam 8-12 semanas de idade e o grupo chamado "animais adultos" por camundongos com 18-25 semanas de vida.

Os animais a serem utilizados foram transferidos para a sala de aclimatação do LEEA no mínimo três dias antes da realização dos experimentos, a qual apresenta ciclo claro/escuro (12h/12h) e controle de temperatura (23˚C). Nesta, os animais foram mantidos em caixas de polipropileno autoclavadas (30 cm x 20 cm x 13 cm – comprimento x largura x altura), que apresentam grade superior e filtro de ar e são acondicionadas em estantes ventiladas, sendo mantidos no máximo cinco indivíduos por caixa. Os animais tiveram acesso à água e ração autoclavadas *ad libitum*.

A eutanásia dos animais foi realizada pela administração de doses excessivas de anestésico, sendo aplicados inicialmente 5 mg/kg de lidocaína, seguidos por 150 mg/kg de tiopental por via intraperitoneal.

3.3. Isolamento das células-tronco mesenquimais

As CTMs foram isoladas de fêmures e tíbias de camundongos C57BL/6^{GFP}. Duas técnicas distintas foram utilizadas neste trabalho para o isolamento das CTMs, o *flushing* e o *crushing*.

Para a realização de ambas, os ossos foram removidos cirurgicamente com material estéril e reservados em tampão de coleta (solução tamponada de fosfato [PBS] com 2% de soro fetal bovino [SFB] e 1 mM de EDTA).

Na primeira técnica (*flushing*), o tampão de coleta foi utilizado para a realização do *flushing* da medula óssea, a fim de se isolar as MO-CTMs. Em seguida, os ossos remanescentes foram cortados em fragmentos menores e macerados, utilizando-se pistilo e cadinho estéreis e tampão de coleta, para o isolamento das OC-CTMs.

No *crushing*, após serem removidos, os ossos foram gentilmente esmagados, utilizando-se pistilo e cadinho estéreis e tampão de coleta, até que a medula óssea estivesse separada dos ossos. Então, a medula óssea foi removida e filtrada, juntamente com o meio de coleta, em filtro de 70 µm, para o isolamento das MO-CTMs. Os ossos foram lavados com o tampão de coleta e macerados para o isolamento das OC-CTMs.

Posteriormente, em ambas as técnicas, as células obtidas da medula óssea foram centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a 5˚C, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em tampão ACK para a lise dos eritrócitros durante 5 minutos. Após esse período foi adicionado meio αMEM suplementado com 15% em volume de SFB e realizada uma nova centrifugação com as mesmas condições da anterior. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em PBS 1x para a contagem com Azul de Trypan.

Os fragmentos de ossos compactos obtidos foram centrifugados e o sobrenadante descartado. Para a sua digestão foram incubados durante 1 hora em tampão de digestão (solução de meio RPMI com 20% de SFB e 0,25% de colagenase tipo I), sendo agitados a cada 20 minutos. Posteriormente, meio αMEM com 15% de SFB foi adicionado e a solução foi filtrada em filtros de 100 µm e de 45 µm. Em seguida, foi realizada uma nova centrifugação, o sobrenadante descartado e a solução ACK adicionada. A partir dessa etapa foi seguido o mesmo protocolo anteriormente descrito para a medula óssea.

3.4. Cultivo das células-tronco mesenquimais

As CTMs isoladas foram plaqueadas em placas de Petri de 100 mm de diâmetro (MO-CTMs: $1{,}6.10^4$ – $3{,}3.\ 10^5$ células/cm^2 ; OC-CTMs: $2{,}9.10^2$ – $1{,}6.\ 10^4$ células/cm^2). As células

foram cultivadas em meio αMEM suplementado com 15% em volume de SFB durante 14-21 para a geração das colônias de CTMs, sendo realizada a troca do meio a cada 3-4 dias.

A fim de se obter uma aceleração no desenvolvimento das CTMs cultivadas, principalmente das MO-CTMs que apresentaram uma baixa taxa de proliferação, que poderia limitar ou dificultar a continuidade dos estudos, foi testada a utilização da citocina bFGF como complemento do meio de cultivo das MO-CTMs . Assim, foi adicionado bFGF ao meio de cultivo das CTMs a uma concentração final de 10 ng/mL. A quantidade de CFU-F obtidas após 15 dias foi contada e comparada com os resultados obtidos do cultivo sem a citocina bFGF.

3.5. Caracterização das CTMs: frequência de CFU-F e morfologia

As colônias contendo mais do que 50 células foram contadas no 14° dia de cultivo após o isolamento para se obter a frequência de CFU-F. Adicionalmente, durante o tempo em que foram mantidas em cultura foram obtidas imagens das células para a sua caracterização quanto à morfologia.

3.6. Caracterização das CTMs: potencial de expansão clonal – subcultivo em baixa densidade

Após o período de expansão de 15 dias depois do isolamento, colônias de MO-CTM e OC-CTM contendo mais do que 50 células foram removidas por incubação em tripsina e plaqueadas individualmente em poços de placas de 6 poços (n=10-12 colônias). Para análise da capacidade de proliferação em densidade clonal dessas células foi anotada a quantidade de clones que proliferaram após esse primeiro repique.

3.7.Caracterização das CTMs: diferenciação *in vitro*

As MO-CTMs e OC-CTMs isoladas e cultivadas foram induzidas à adipogênese e osteogênese. Para a indução da adipogênese, $4x10^4$ células foram plaqueadas em placas de 24 poços (n=3 poços) e cultivadas durante 15 dias em meio indutor de adipogênese (meio αMEM

+ 10% SFB, 1 µm de dexametasona, 10 µg/mL de insulina e 100 µM de indometacina), sendo o meio trocado a cada 3-4 dias.

Após esse período, foi realizada a coloração com *oil red O* para a visualização de vesículas lipídicas. Para tal as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em formalina 10% por 1 hora à TA. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com água deionizada e, então, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em solução aquosa contendo 60% de isopropanol e coradas com solução de oil red O por 1 hora. Em seguida, as amostras foram lavadas em água deionizada por 4 vezes para o excesso de corante ser removido e foi realizado o registro fotográfico.

Para a quantificação da diferenciação adipogênica, os poços corados com *oil red O*, após terem todo seu líquido removido, foram incubados com 500 µL de isopropanol absoluto sob agitação constante (250 RPM) durante 15 minutos à TA para que o corante fosse recuperado. Posteriormente, alíquotas do sobrenadante (150 µL) foram submetidas à quantificação da densidade óptica (DO) a 500 nm para estimar a quantidade de corante recuperado.

Para a indução da osteogênese, $1x10^4$ células foram plaqueadas em placas de 24 poços (n= 3 poços) e cultivadas durante 30 dias em meio indutor de osteogênese (meio αMEM + 10% SFB, 0,1 µm de dexametasona, 10 mM de beta-glicerolfosfato e 200 µM de ácido ascórbico), trocando-se o meio a cada 3-4 dias.

Para a coloração com vermelho da alizarina, que cora depósitos de cálcio em vermelho, após a indução da osteogênese as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas em formalina 10% por 30 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com água deionizada e incubadas em solução de vermelho de alizarina 2% (pH 4,1 - 4,3) por 45 minutos no escuro à TA. Posteriormente as amostras foram lavadas 4 vezes com água deionizada e mantidas em PBS para o registro fotográfico.

A fim de se realizar a quantificação da diferenciação osteogênica, os poços submetidos à coloração, após terem todo seu líquido removido, foram incubados com ácido acético 10% durante 30 minutos sob agitação constante (250 RPM) à TA. Após esse período, a monocamada celular foi removida mecanicamente utilizando-se ponteiras de 1 mL. As suspensões resultantes foram transferidas para tubos de 1,5 mL, homogeneizadas em vórtex e recobertas com óleo mineral. As amostras foram aquecidas a 85˚C durante 10 minutos e transferidas para o gelo por 5 minutos. Foi realizada uma centrifugação a 20.000 *g* por 5

minutos da suspensão e o sobrenadante obtido foi transferido para tubos de 1,5 mL. O pH das amostras foi ajustado para 4,1-4,5 adicionando-se hidróxido de amônio 10%. Para finalizar, as alíquotas foram submetidas à quantificação da densidade óptica a 405 nm a fim de se estimar a quantidade de vermelho de alizarina recuperado das células.

Para ambos os testes de diferenciação foram plaqueadas $1x10^3$ células em placas de 24 poços (n=3 poços), as quais também passaram pelos processos de coloração já descritos acima.

3.8.Caracterização das CTMs: perfil imunofenotípico

Após a expansão, as MO-CTMs e OC-CTMs foram analisadas quanto à expressão dos marcadores de células hematopoéticas CD45, de células endoteliais CD31 e dos típicos de células mesenquimais murinas Sca-1, CD44 e CD90.2. Para tanto, suspensões contendo $1x10^5$ MO-CTMs ou OC-CTMs foram incubadas com 0,15 µg de anticorpos, anticorpo conjugado com aloficocianina (APC) anti-CD31 e anticorpos conjugados com ficoeritrina (PE) anti-CD45, anti- Sca-1, anti-CD90.2 e anti-CD44 por 15 minutos no escuro e à TA. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e analisadas no citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD Biosciences), sendo analisados 10 mil eventos para cada marcador. Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo vX.0.7.

Para a comparação das duas técnicas de isolamento de CTMs utilizadas nesse trabalho, *flushing* e *crushing*, células isoladas por ambas as técnicas foram analisadas quanto à expressão dos marcadores CD31 e CD45 logo após a realização do isolamento. Para isso, foram seguidos os mesmo procedimentos já descritos acima.

3.9.Análises estatísticas

Os experimentos foram avaliados quantitativamente e qualitativamente, de modo que a frequência de unidades formadoras de colônias fibroblástica (CFU-F), a frequência de clones capazes de se proliferar após o primeiro repique, a quantidade de células obtidas a partir de cada técnica de isolamento, os resultados de citometria de fluxo e a quantificação dos corantes utilizados para avaliar a diferenciação *in vitro* forneceram dados para a avaliação quantitativa.

Enquanto, a fotodocumentação das células em cultura serviu como base para a avaliação qualitativa.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software Graphpad Prism 6 e foi assumido um nível de significância igual a 0,05. Os testes utilizados foram teste t de Student e teste Exato de Fisher, os quais estão informados na descrição dos resultados.

4. Resultados

4.1.Animais adultos: frequência de CFU-F na medula óssea e osso compacto

A hipótese testada neste trabalho é a de que camundongos na idade adulta possuiriam duas subpopulações de CTMs nos ossos longos: perisinusoidal e endosteal, sendo que as primeiras seriam mais abundantes. Assim, utilizamos a frequência de CFU-F como parâmetro para acessar a abundância de CTMs na medula óssea (MO-CTMs) e no osso compacto (OC-CTMs) de 3 camundongos adultos, referidos como animais 1, 2 e 3, os quais apresentavam 18, 22 e 25 semanas de vida, respectivamente.

Após o cultivo em baixa densidade das células obtidas da medula óssea e osso compacto, as colônias de células fibroblásticas foram contabilizadas e os valores foram empregados para estimar a frequência de CFU-F em ambas as frações. Em todos os animais analisados houve diferenças entre as frequências de CFU-F na medula óssea e no osso compacto (Teste t de Student; animal 1: $p < 0,0001$; animal 2: $p < 0,0001$; animal 3: $p < 0,0001$), de modo que no animal 1 a frequência de CFU-F obtida do osso compacto foi aproximadamente 40 vezes maior do que a obtida da medula óssea, no animal 2 aproximadamente 87 vezes maior e no animal 3 aproximadamente 20 vezes maior (**figura 1**). Assim, observa-se que a frequência de CFU-F obtida do osso compacto é maior do que a obtida da medula óssea mesmo em animais com idade adulta.

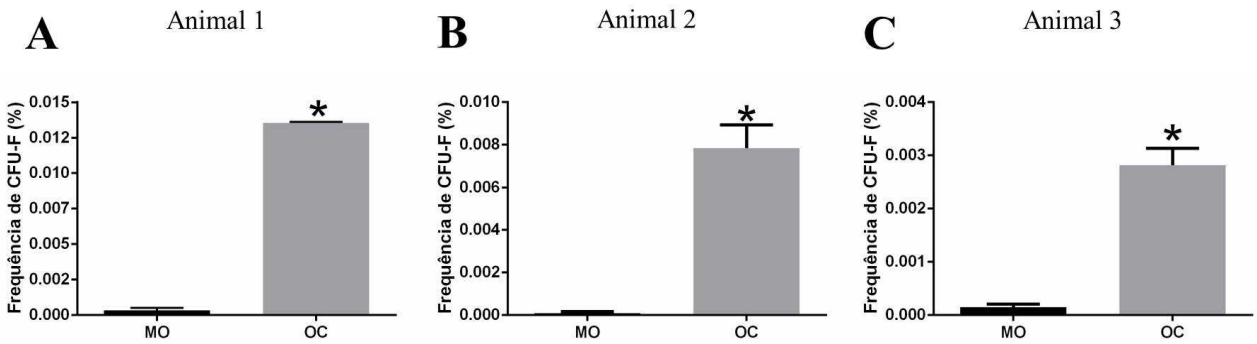

Figura 1. Frequência de CFU-F dentre as células da medula óssea e do osso compacto de animais adultos. A. Porcentagem de CFU-F na medula óssea e no osso compacto do animal 1. **B.** Porcentagem de CFU-F na medula óssea e no osso compacto do animal 2. **C**. Porcentagem de CFU-F na medula óssea e no osso compacto do animal 3. **MO**: medula óssea; **OC**: osso compacto. *$p < 0,0001$, n= 2-6 por grupo; teste t de Student.

4.2.Animais adultos: morfologia das MO-CTMs e OC-CTMs

Durante o cultivo foi possível observar diferenças nas morfologias das colônias, principalmente em relação ao tamanho das células e à densidade celular das colônias. A maioria das colônias de MO-CTMs era composta por células multipolares, achatadas e com uma maior relação citoplasma/núcleo (**figura 2A**). Por outro lado, a maior parte das colônias de OC-CTMs era composta de um maior número de células as quais eram fusiformes e pequenas (relação citoplasma/núcleo inferior à das MO-CTMs) (**figura 2B**). No entanto, ressalta-se que este padrão morfológico não era unanimidade em ambas as populações, sendo possível encontrar colônias de células grandes e poligonais na população de OC-CTMs e vice-versa. Ademais, todas as colônias observadas expressavam a proteína repórter GFP (**figura 2**, painéis à direita)**.**

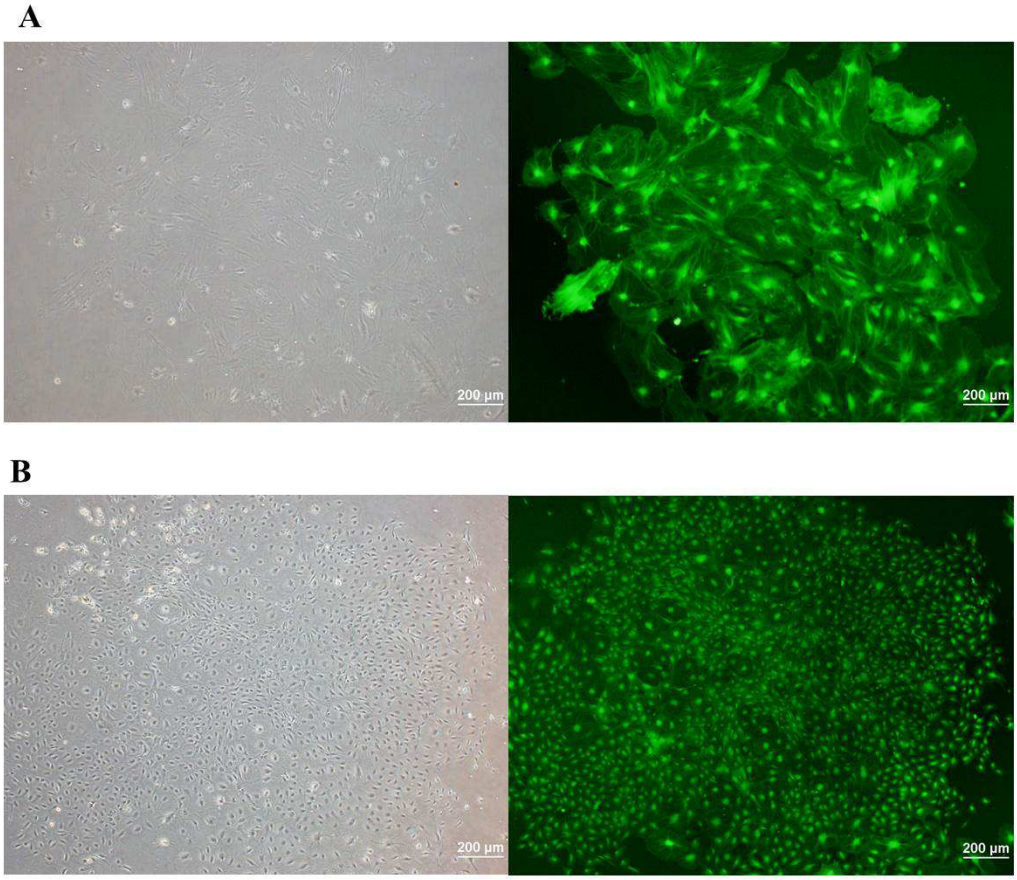

Figura 2. Morfologia das CTMs (1ª passagem). A. Fotografias das MO-CTMs obtidas por microscopia de contraste de fase (esquerda) e por microscopia de fluorescência (direita). **B.** Fotografias das OC-CTMs obtidas por microscopia de contraste de fase (esquerda) e por microscopia de fluorescência (direita). As imagens apresentadas são fotografias representativas das colônias obtidas do animal 2. Barra = 200µm.

4.3.Animais adultos: potencial de expansão clonal das CTMs

A fim de avaliar o potencial proliferativo das CTMs, colônias obtidas após o plaqueamento de MO-CTMs e de OC-CTMs em densidade clonal foram tripsinizadas e plaqueadas separadamente em placas de 6 poços. Em seguida, contabilizamos os clones capazes de proliferar a ponto de atingir a confluência.

O subcultivo em baixa densidade mostrou que os clones de OC-CTMs apresentaram maior capacidade de proliferação em relação aos clones de MO-CTMs em todos os animais estudados (**tabela 1**).

Considerando-se todos os clones analisados (34 clones de OC-CTMs e 32 clones de MO-CTMs), apenas 16% dos clones obtidos a partir da medula óssea foram capazes de proliferar após o subcultivo em baixa densidade, ao passo que aproximadamente 94% dos clones do osso compacto proliferaram (teste exato de Fisher; $p < 0{,}0001$). Esses resultados indicam que as OC-CTMs apresentam um potencial proliferativo superior ao das MO-CTMs.

Tabela 1. Frequência de clones de CTMs dos animais adultos que proliferaram após subcultivo em baixa densidade. A porcentagem de clones obtidos do osso compacto que foram capazes de se proliferar após o primeiro repique foi maior do que a porcentagem de clones da medula óssea que se proliferaram nos três animais estudados. Teste Exato de Fisher. **MO**: medula óssea. **OC**: osso compacto.

	Fonte	Proliferação após o primeiro repique	
Animal 1	**MO**	20% (2/10 clones)	p = 0,0007
	OC	100% (10/10 clones)	
Animal 2	**MO**	~8% (1/12 clones)	p < 0,0001
	OC	100% (12/12 clones)	
Animal 3	**MO**	20% (2/10 clones)	p = 0,0083
	OC	~83% (10/12 clones)	

4.4.Animais jovens: estratégias de isolamento das CTMs (*flushing x crushing*)

Antes de investigarmos as propriedades biológicas das subpopulações de CTMs nos animais jovens, realizamos uma investigação preliminar sobre o rendimento celular e a composição das populações celulares obtidas após os procedimentos de obtenção de MO-CTMs e OC-CTMs utilizando duas técnicas reportadas na literatura: *flushing* e *crushing*.

O isolamento precedido pelo *flushing* foi realizado com 3 animais jovens, denominados 4, 5 e 6, enquanto que o procedimento de *crushing* foi utilizado no isolamento de células de 6 animais jovens, sendo eles os animais 7, 8, 9, 10, 11 e 12.

Em relação ao número de células obtidas a partir da medula óssea e do osso compacto, observamos variações quando se comparam os isolamentos realizados com animais diferentes utilizando-se a mesma estratégia (**Figura 3**). Quando comparados os números de células obtidas da medula óssea utilizando-se o *flushing* e o *crushing*, não foram encontradas diferenças (Teste t de Student; p = 0,26) e o mesmo ocorreu para as células obtidas do osso compacto (Teste t de Student; p = 0,43).

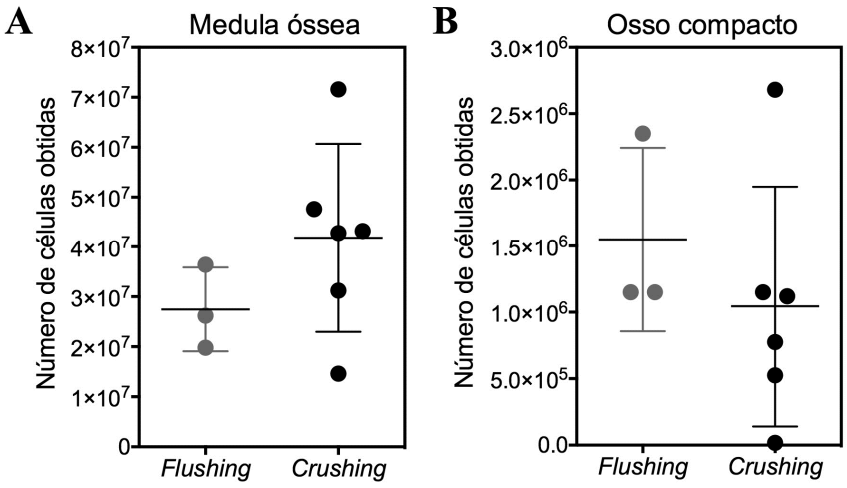

Figura 3. Quantidade de células obtidas a partir da medula óssea e do osso compacto através das técnicas de *flushing* e do *crushing*. A. Número de células obtidas a partir da medula óssea utilizando-se o *flushing* (células isoladas dos animais 4,5 e 6) e o *crushing* (células isoladas dos animais 7, 8, 9, 10, 11 e 12). **B.** Número de células obtidas a partir do osso compacto utilizando-se o *flushing* (células isoladas dos animais 4,5 e 6) e o *crushing* (células isoladas dos animais 7, 8, 9, 10, 11 e 12). Não foram encontradas diferenças entre os números de células obtidas utilizando-se as duas técnicas de isolamento analisadas para a medula óssea (p = 0,26) e para o osso compacto (p = 0,43), teste t de Student.

Em seguida avaliamos a composição das populações celulares obtidas após o processamento dos ossos quanto à frequência de células hematopoéticas ($CD45^+$) e células endoteliais ($CD31^+$).

As frequências de células hematopoéticas $CD45^+$ e $CD31^+$ não diferiram quando comparadas as técnicas de *flushing* ou *crushing* para o isolamento de células da medula óssea

(MO/*flushing* = 84,1% $CD45^+$ e 38,6% $CD31^+$; MO/*crushing* = 85,1% $CD45^+$ e 39% $CD31^+$) ou do osso compacto (OC/*flushing* = 88,5% $CD45^+$ e 17,7% $CD31^+$; OC/*crushing* = 78,5% $CD45^+$ e 10,8% $CD31^+$) (**figura 4A**), demonstrando que as técnicas de *flushing* ou *crushing* não depletam ou enriquecem diferencialmente as populações de células hematopoéticas e endoteliais, tampouco a população de células estromais, que é negativa para ambos os marcadores.

Em seguida, comparamos a composição celular das populações obtidas da medula óssea e do osso compacto. Ao passo que a frequência de células hematopoéticas $CD45^+$ foi equivalente nas frações celulares obtidas da medula óssea e do osso compacto (MO = 84,55% ± 0,64% vs. OC = 83,50% ± 7,07%, p = 0,85, teste t de Student), a frequência de células endoteliais $CD31^+$ nas amostras obtidas do osso compacto correspondeu à aproximadamente 35% do total de células endoteliais presentes na população da medula óssea (MO = 38,80% ± 0,28% vs. OC = 13,85% ± 5,44%, p = 0,02, teste t de Student). Estes dados indicam que a medula óssea é enriquecida em elementos celulares que compõe o nicho vascular em comparação com o osso compacto.

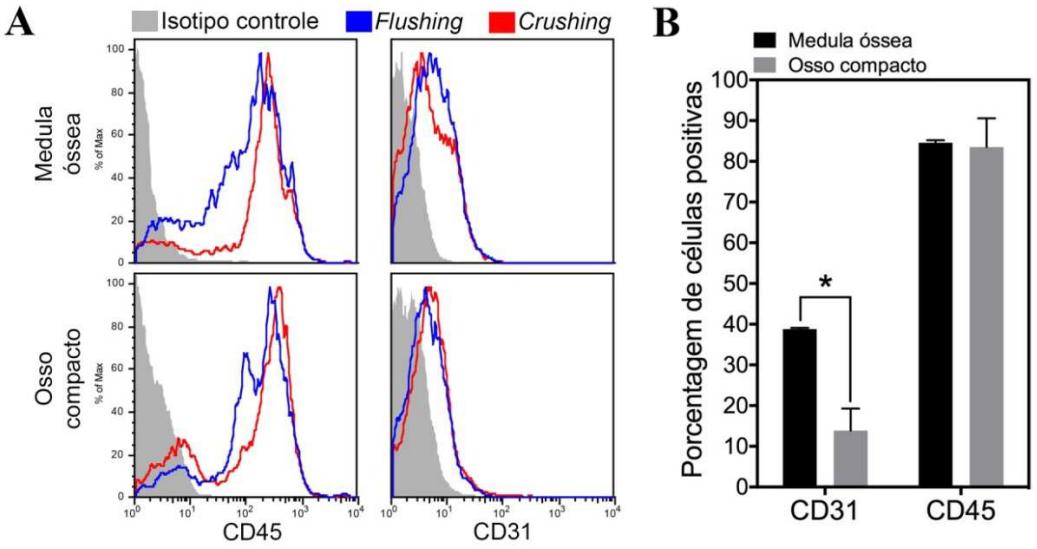

Figura 4. Frequência de células hematopoéticas $CD45^+$ e endoteliais $CD31^+$ nas amostras obtidas da medula óssea e osso compacto. A. Histogramas de citometria de fluxo demonstrando a frequência de células $CD45^+$ e $CD31^+$ em amostras da medula óssea e osso compacto obtidas pelas técnicas de *flushing* (histograma azul) e *crushing* (histograma vermelho). Ambas as técnicas não depletaram ou enriqueceram diferencialmente a população de células hematopoéticas e endoteliais obtidas da medula óssea (painéis superiores) ou do osso compacto (painéis inferiores). **B**. Frequência de células $CD45^+$ e $CD31^+$ nas amostras obtidas da medula óssea e do osso compacto. A população celular obtida do osso compacto apresentava apenas cerca de 1/3 da frequência de células $CD31^+$ encontrada na medula óssea . *p = 0,02; n = 2; teste t de Student.

4.5. Animais jovens: efeito do fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) na eficiência clonogênica das MO-CTMs

Devido ao baixo potencial de proliferação dos clones de MO-CTMs e a necessidade de se obter um número suficiente dessas células para sua caracterização *in vitro*, avaliamos se a suplementação do meio de cultivo com bFGF seria capaz de estimular a proliferação das MO-CTMs cultivadas em densidade clonal. Assim, células obtidas a partir da medula óssea dos isolamentos realizados com os animais 4 e 5 foram cultivadas em meio de cultura com ou sem a citocina bFGF durante 15 dias após o isolamento.

Após o cultivo em baixa densidade e contagem das colônias, não observamos diferenças no número de CFU-F entre as MO-CTMs cultivadas com a citocina bFGF e as cultivadas sem a citocina nos dois animais estudados (Test t Student; animal 4: p= 0,48; animal 5: p= 0,33) (**Figura 5**). Desse modo, a utilização de bFGF para suplementar o meio de cultivo não foi adotada na metodologia deste trabalho e as demais CTMs caracterizadas *in vitro* não foram cultivadas na presença dessa citocina.

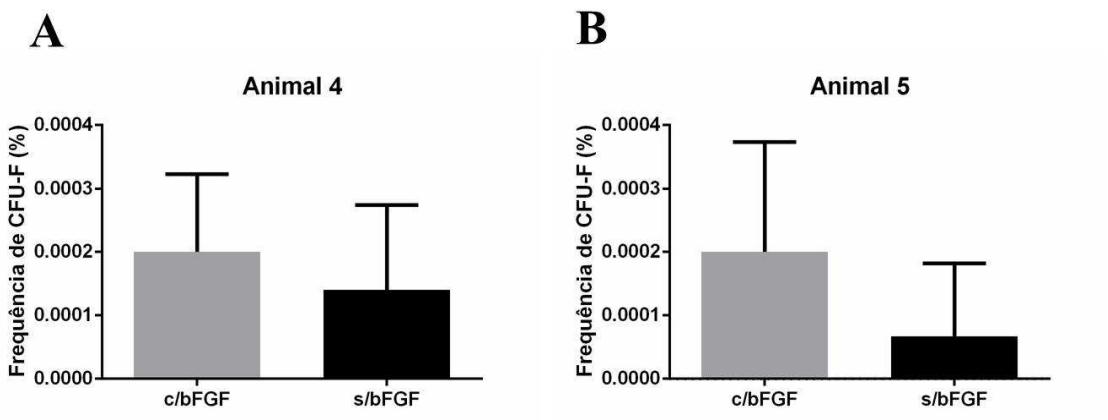

Figura 5. Frequência de CFU-F obtidas a partir das células isoladas da medula óssea cultivadas com ou sem a citocina bFGF. **A**. Porcentagem de CFU-F nas MO-CMTs obtidas do animal 4 cultivadas com ou sem bFGF. **B**. Porcentagem de CFU-F nas MO-CTMs obtidas do animal 5 cultivadas com ou sem bFGF. Nos dois casos não foram encontradas diferenças nas frequências de CFU-F das MO-CTMs entre as células cultivadas com e sem a citocina . **c/bFGF**: cultivo com bFGF. **s/bFGF**: cultivo sem bFGF; animal 4: p= 0,48; animal 5: p= 0,33; n= 3-5 por grupo; teste t de Student.

4.6.Animais jovens: frequência de CFU-F na medula óssea e no osso compacto

Assim como observado na caracterização das CTMs obtidas dos animais adultos, nos experimentos realizados com os animais jovens (animais 6 e 9) a frequência de CFU-F na população celular obtida do osso compacto foi maior que na obtida da medula óssea (Teste t de Student; animal 6: p< 0,0001; animal 9: p = 0,0001) (**Figura 6**). No animal 6, a frequência de CFU-F nas OC-CTMs foi 496 vezes maior do que nas MO-CTMs e no animal 9 foi 265 vezes superior.

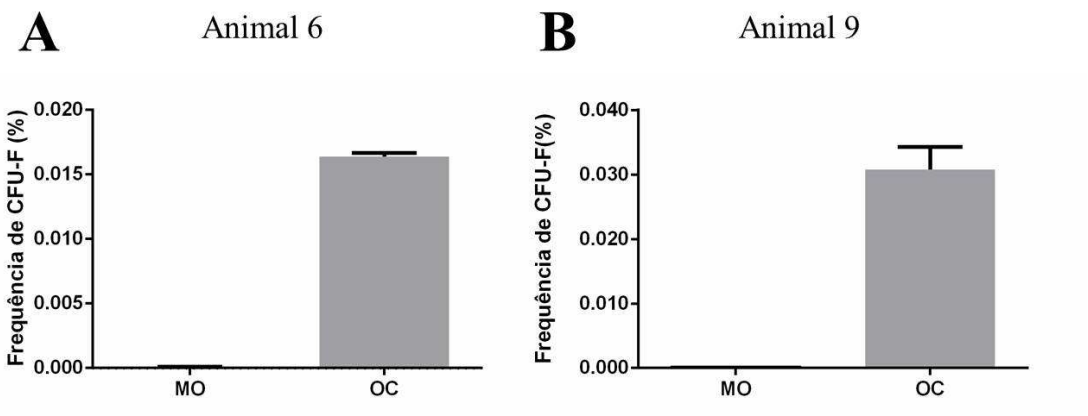

Figura 6. Frequência de CFU-F dentre as células da medula óssea e do osso compacto de animais jovens. A. Porcentagem de CFU-F na medula óssea e no osso compacto do animal 6. **B.** Porcentagem de CFU-F na medula óssea e no osso compacto do animal 9. **MO**: medula óssea; **OC**: osso compacto. *p ≤ 0,0001; n= 2-3 por grupo; teste t de Student.

Desse modo, comparando os resultados obtidos com os animais jovens e os adultos encontra-se uma maior diferença na frequência de CFU-F das duas CTMs estudadas nos animais jovens (Teste t de Student; p= 0,0345) (**Figura 7C**). Considerando que não foram encontradas diferenças nas frequências de CFU-F nas MO-CTMs de animais jovens e adultos (Teste t de Student; p= 0,0586) (**Figura 7A**) e que a frequência de CFU-F nas OC-CTMs foi diferente entre as duas idades (Test t de Student; p< 0,0001) (**Figura 7B**), podemos concluir que a maior frequência de CFU-F nas OC-CTMs observada nos animais jovens foi o principal contribuinte para o aumento na diferença entre as frequências de CFU-F das duas CTMs nesse grupo. Portanto, o osso compacto contém uma maior frequência de CFU-F do que a medula óssea e é a população de CTMs do osso compacto que é depletada durante o envelhecimento.

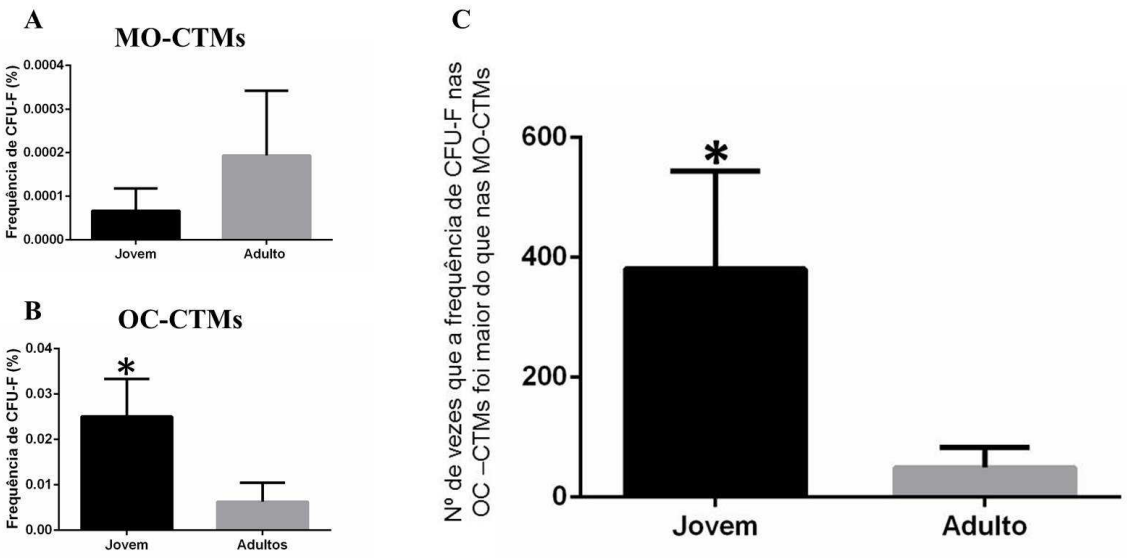

Figura 7. Diferença entre as frequências de CFU-F nas MO-CTMs e OC-CTMs nos animais jovens e adultos. A. Frequência de CFU-F nas MO-CTMs encontrada nos animais jovens e adultos. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos (p= 0,0586). **B.** Frequência de CFU-F nas OC-CTMs encontrada nos animais jovens e adultos. Os resultados obtidos foram diferentes entre os grupos (p= <0,0001). **C.** Relação entre as frequência de CFU-F nas MO-CTMs e OC-CTMs nos animais jovens e adultos. No grupo de animais jovens foi encontrada uma maior diferença entre a frequência de CFU-F nas OC-CTMs e MO-CTMs (p= 0,0345). *p <0,05; n=2-6 por grupo; teste t de Student.

4.7.Animais jovens: diferenciação *in vitro* das MO-CTMs e OC-CTMs

Como parte da caracterização funcional, MO-CTMs e OC-CTMs obtidas dos isolamentos com animais jovens foram caracterizadas quanto à sua capacidade de diferenciação *in vitro*. Após a indução da adipogênese durante 15 dias, ambas as populações acumularam vesículas lipídicas intracelulares coradas em vermelho após incubação com *oil red O* (**Figuras 8A e 9A**). Ambas as populações de CTMs também foram capazes de secretar matriz extracelular calcificada após a indução da osteogênese por 30 dias. As regiões de calcificação foram coradas em vermelho após incubação com vermelho de alizarina (**Figuras 8B e 9B**). As MO-CTMs e OC-CTMs que não foram cultivadas com os compostos indutores de diferenciação não se diferenciaram após esse período de cultivo. Esses resultados confirmam a multipotencialidade *in vitro* das CTMs estudadas.

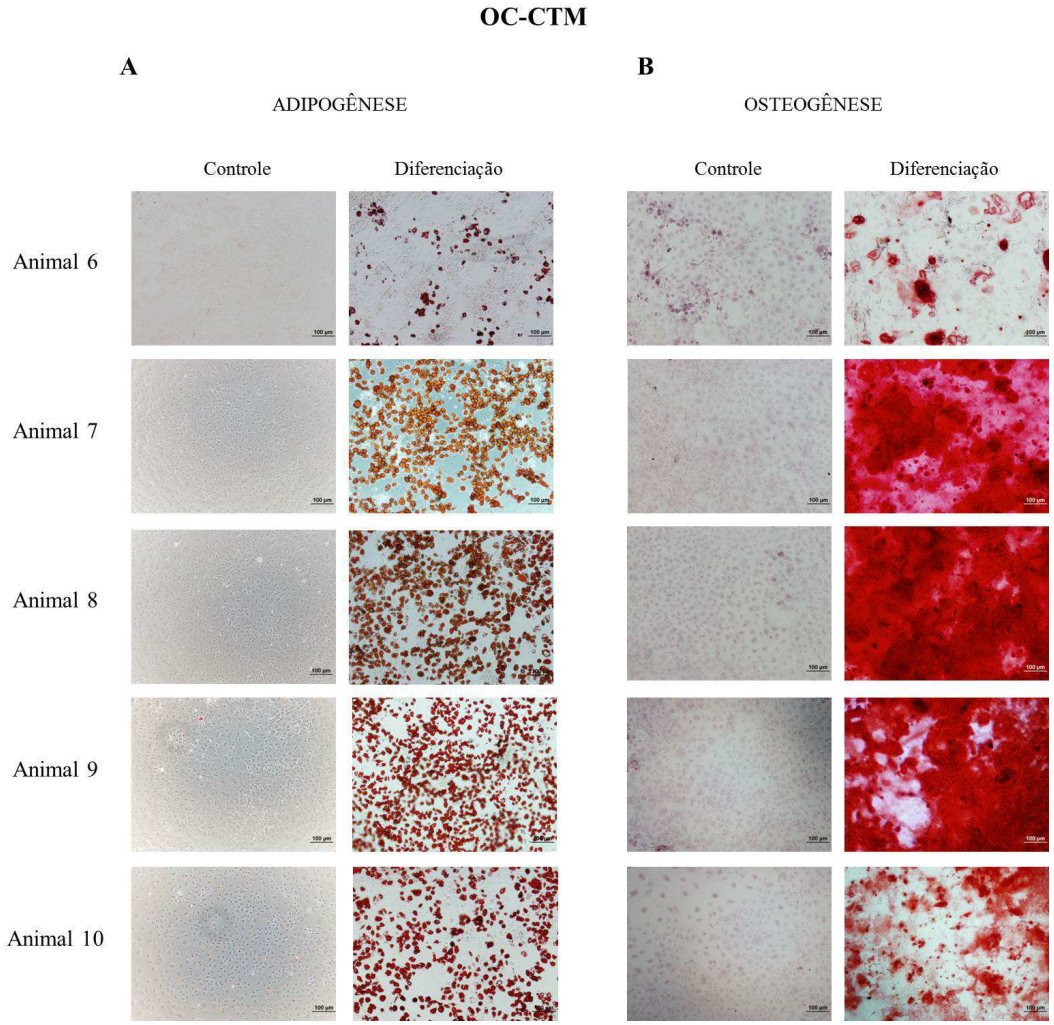

Figura 8. Diferenciação das OC-CTMs. A. Diferenciação adipogênica das OC-CTMs de animais jovens. **B.** Diferenciação osteogênica das OC-CTMs de animais jovens. Em todos os experimentos realizados as OC-CTMs foram capazes de se diferenciar após a indução. Barra= 100µm.

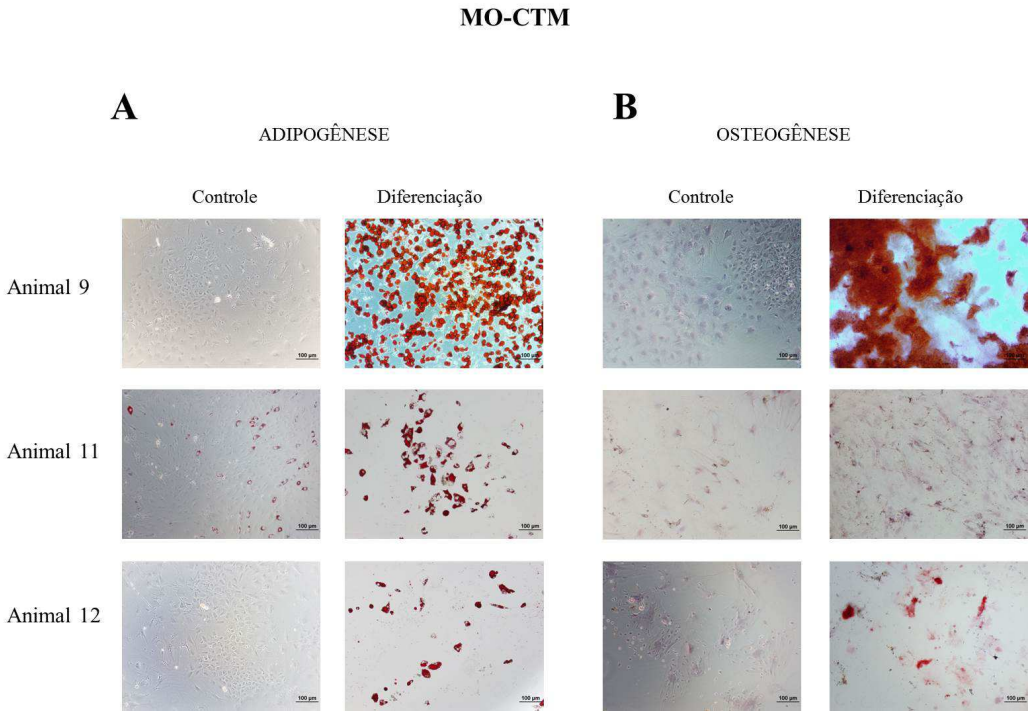

Figura 9. Diferenciação das MO-CTMs. A. Diferenciação adipogênica das MO-CTMs de animais jovens. **B.** Diferenciação osteogênica das MO-CTMs de animais jovens. Em todos os experimentos realizados as MO-CTMs foram capazes de se diferenciar após a indução. Barra= 100µm.

A quantificação da diferenciação mostrou que ocorreram diferenças entre as MO-CTMs e OC-CTMs na adipogênese (Teste t de Student; p=0,0002) e na osteogênese (Teste t de Student; p=0,0005) (**figura 10**), de modo que as OC-CTMs apresentaram valores 2 vezes maiores que as MO-CTMs na diferenciação adipogênica e 4 vezes maiores na osteogênica.

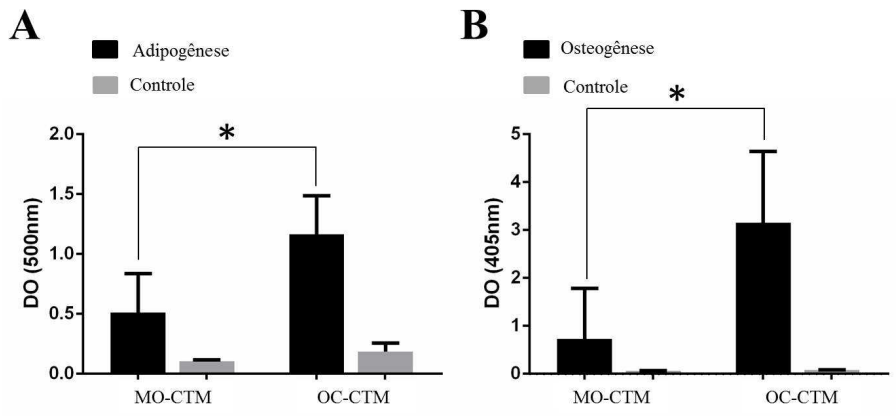

Figura 10. Potencial de diferenciação *in vitro* das MO-CTMs e OC-CTMs. A. Quantificação do corante *oil red* O por densitometria óptica. As OC-CTMs apresentaram diferenciação adipogênica mais eficiente. *p= 0,0002, teste t de Student. **B.** Quantificação do corante vermelho de alizarina por densitometria óptica. As OC-CTMs apresentaram diferenciação osteogênica mais eficiente. *p= 0,0005; n= 6-12 por grupo; teste t de Student.

4.8.Animais jovens: perfil imunofenotípico das CTMs cultivadas

As OC-CTMs obtidas dos isolamentos com os animais 6, 7, 9 e 10 foram caracterizadas quanto ao seu perfil imunofenotípico (**tabela 2**). Os resultados confirmaram que a maior parte das células expressava os marcadores típicos de células mesenquimais murinas Sca-1, CD44 e CD90.2 (**tabela 2**). Além disso, em todas as amostras analisadas a população de OC-CTMs continha uma baixa quantidade de células hematopoéticas (0% - 14,50%) e de células endoteliais contaminantes (0% - 3,21%) após 3-4 passagens.

Tabela 2. Expressão de marcadores de superfície nas OC-CTMs. Os valores representam a frequência de células positivas para cada marcador.

Marcador	Animal 6	Animal 7	Animal 9	Animal 10	Média	Desvio Padrão
Sca-1	97,58%	92,01%	99,05%	98,10%	96,68%	3,17%
CD44	93,78%	79,61%	77,65%	74,00%	81,26%	8,66%
CD90.2	57,38%	68,61%	84,55%	57,30%	66,96%	12,87%
CD45	0,00%	1,09%	4,05%	14,50%	4,91%	6,61%
CD31	0,00%	0,20%	2,96%	3,21%	1,59%	1,72%

As MO-CTMs apresentaram um quadro diferente quanto à expressão dos marcadores de superfície analisados. Os resultados obtidos das análises com as células isoladas dos animais 11 e 12 mostraram que estas também eram positivas para os marcadores de células mesenquimais murinas, principalmente Sca-1 e CD44 e não continham quantidades significativas de células endoteliais $CD31^+$ contaminantes (<2%) (**tabela 3**). No entanto, a população de MO-CTMs apresentou uma alta incidência de células hematopoéticas $CD45^+$ contaminantes após 4-6 passagens (54,52% - 85,85%) (**tabela 3**).

Tabela 3. Expressão de marcadores de superfície nas MO-CTMs. Os valores representam a frequência de células positivas para cada marcador.

Marcador	Animal 11	Animal 12	Média	Desvio Padrão
Sca-1	77,22%	88,95%	83,08%	8,29%
CD44	73,52%	90,05%	81,79%	11,69%
CD90.2	51,22%	25,85%	38,54%	17,94%
CD45	54,52%	85,85%	68,69%	20,03%
CD31	0,56%	1,72%	1,14%	0,82%

5. Discussão

Neste trabalho, demonstramos que as CTMs da medula óssea e do osso compacto apresentam diferenças nas suas características *in vitro*, corroborando com a hipótese norteadora deste estudo da co-existência de populações de CTMs na medula óssea e no osso compacto.

Esperávamos uma depleção da população endosteal (osteo-condro-reticular) nos indivíduos adultos em relação aos mais jovens, uma vez que a hipótese inicial considera que esta atuaria mais durante a juventude, sendo responsável pela geração e homeostase dos tecidos esqueléticos (Worthley *et al*., Kassem *et al*, 2015). Foi observado que tanto nos animais jovens como nos adultos a frequência de CFU-F foi superior no osso compacto, quando comparada com a da medula óssea, porém, quando comparamos a diferença de CFU-F nas MO-CTMs e OC-CTMs dos animais jovens e dos adultos, percebe-se que esta diferença é maior nos jovens, o que indica que as CTMs do endósteo são depletadas em relação às da medula óssea com o envelhecimento do animal, como esperado.

Em um estudo realizado com 3 diferentes linhagens de camundongos, incluindo a C57BL/6, ao caracterizar *in vitro* CTMs obtidas a partir da medula óssea, do osso compacto e do tecido adiposo desses animais, observou-se uma baixa taxa de crescimento das CTMs da medula óssea, fator que contribuiu para a exclusão dessas células nas comparações realizadas. Adicionalmente, dentre as linhagens estudadas (C57BL/6, BALB/c e C3H) foi encontrado um maior número de CFU-F na C57BL-6 (Sung *et al*, 2008). Além deste, em outro estudo envolvendo CTMs da medula óssea e do osso compacto foi constatado que as células derivadas da medula óssea apresentavam baixa taxa de crescimento, a qual impossibilitou a sua expansão *in vitro* nas condições utilizadas, diferente do observado para as células do osso compacto, que foram capazes de se proliferar (Yamachika *et al*, 2012). No nosso trabalho, apesar de não ter sido necessária a exclusão das MO-CTMs da caracterização, também ocorreu uma dificuldade em se obter o número adequado dessas células, decorrente do baixo número de CFU-F obtidas e, principalmente, da baixa capacidade de proliferação que estas apresentaram.

O subcultivo em baixa densidade forneceu dados importantes sobre a capacidade de proliferação dessas CTMs, mostrando que mais uma vez as MO-CTMs e OC-CTMs estudadas são diferentes. A densidade de plaqueamento utilizada neste trabalho (diretamente em placas de 6 poços) é inferior ao praticado na literatura para expansão de clones, em que cada colônia é subcultivada em placas de 96 poços. Esta condição estringente nos permitiu

avaliar a capacidade limite de proliferação dos clones de MO-CTMs. Assim, a maioria dos clones de MO-CTMs não foi capaz de proliferar até recobrir toda a superfície de cultivo. No entanto, o mesmo não foi observado para as OC-CTMs que demonstraram uma alta capacidade de proliferação nas mesmas condições experimentais. Em um estudo sobre o isolamento e a caracterização de CTMs da medula óssea em camundongos NMRI e BALB/c, os clones de CTMs da medula óssea foram capazes de expandir em placa de 6 poços apenas devido à transferência de múltiplas colônias (múltiplos clones) em um mesmo poço. Portanto, a grande quantidade inicial de células neste subcultivo policlonal permitiu que estas fossem capazes de proliferar, permitindo o cultivo durante as passagens subsequentes (Eslaminejad *et al*, 2006). Desse modo, podemos considerar que o subcultivo clonal em baixa densidade realizado no nosso trabalho foi eficiente para evidenciar as diferenças existentes entre a capacidade de proliferação das células estudadas.

A dificuldade em se obter o número de MO-CTMs adequado para a caracterização, apesar de ser sugerido de que neste estudo está relacionada com a baixa capacidade de proliferação apresentada por essas células, em alguns casos pode ser minimizada com o refinamento das técnicas de isolamento das CTMs e condições de cultivo. Além das características dessas células, a metodologia utilizada para sua obtenção e manutenção em cultura também vem sendo alvo de diversas pesquisas, visando-se obter melhorias nos resultados e a manutenção ao máximo possível das características que essas células apresentam no organismo.

Neste trabalho, foram comparadas duas técnicas de isolamento de CTMs (*flushing* e *crushing*) e testado o uso da citocina bFGF durante o cultivo visando-se obter melhores resultados, principalmente com relação à contaminação por outros tipos celulares e ao número de células obtido. Comparando as duas técnicas com relação ao número de células obtido após o isolamento e ao perfil imunofenotípico dessas células, considerando a expressão dos marcadores de superfície CD31 e CD45, não foram encontradas diferenças, indicando que para o nosso estudo ambas seriam equivalentemente adequadas. Assim, os dados obtidos dos experimentos com CTMs isoladas pelos dois métodos foram comparados de forma conjunta. Além disso, o perfil imunofenotípico encontrado mostrou que utilizando-se as duas técnicas ocorreu uma contaminação por células hematopoéticas nas células isoladas. Outros métodos de isolamento vêm sendo explorados visando-se obter uma porção de CTMs livre de contaminação, principalmente de células endoteliais e hematopoéticas, e resultados diferentes dos nossos também vem sendo observados, onde após a terceira passagem as células cultivadas mostraram-se positivas para os marcadores de células mesenquimais murinas

CD44 e CD90 e negativas para os marcadores de células endoteliais e hematopoéticas, CD31 e CD45 respectivamente, viabilizando o uso do protocolo descrito (Huang *et al*, 2015).

A citocina bFGF (do inglês *"basic fibriblast growth fator"*) já é conhecida por contribuir no aumento da taxa de crescimento das CTMs *in vitro*. Utilizando-se essa citocina no cultivo de CTMs obtidas do osso compacto foi obtida uma maior taxa de crescimento em relação ao cultivo sem a citocina após 60 dias em cultura. Além disso, foi constatado que ela suporta a capacidade de auto-renovação dessas células e mantem seu potencial de diferenciação em condrócitos, osteócitos e adipócitos (Yamachika *et al*, 2012). No entanto, neste trabalho a citocina bFGF não contribuiu para uma melhora no crescimento das MO-CTMs, o que pode estar relacionado com o período pelo qual essas células foram tratadas com a citocina, visto que este foi relativamente inferior ao do trabalho citado acima (15 dias). Possivelmente resultados diferentes poderiam ser observados após um período maior de cultivo na presença da citocina, porém a maior parte dessas células não foi capaz de se proliferar já durante os primeiros dias após o isolamento. Dessa forma, o uso de bFGF não foi adotado para o cultivo das CTMs caracterizadas neste trabalho.

Outro resultado importante para a caracterização *in vitro* das CTMs estudadas foi a capacidade dessas células de se diferenciarem em osteócitos e adipócitos, a qual é característica de CTMs. Assim, a identidade das MO-CTMs e OC-CTMs estudadas pode ser comprovada também quando ambas foram capazes de se diferenciar após a indução da osteogênese e adipogênese, corroborando com estudos anteriores, tanto das CTMs da medula óssea (Huang *et al*, 2015) como das do osso compacto (Yamachika *et al*, 2012). Devido à hipótese considerada, esperava-se que as OC-CTMs obtidas dos animais jovens apresentassem maior capacidade de diferenciação osteogênica *in vitro* quando comparadas com as MO-CTMs, e a análise dos dados referentes às quantificações dos corantes mostraram que as OC-CTMs apresentaram uma diferenciação osteogênica mais eficiente, como esperado, e adicionalmente, também obtiveram uma diferenciação adipogênica mais eficiente que as MO-CTMs.

Quanto ao perfil imunofenotípico, foi observado que a população de OC-CTMs era composta por células que expressavam marcadores típicos de células mesenquimais murinas e por poucas células hematopoéticas e endoteliais contaminantes, confirmando, mais uma vez, a identidade das CTMs do osso compacto. Esses resultados mostram também que, apesar de logo após o isolamento ocorrer uma alta frequência de células hematopoéticas, após diversas

passagens essas células não persistem. Nossos dados são similares aos já encontrados em caracterizações de CTMs obtidas do osso compacto, onde também foi observado uma baixa expressão de CD45, que indica a ausência de células hematopoéticas, uma elevada expressão de Sca-1 (Mitra *et al*, 2015), células positivas para marcadores mesenquimais como CD44 e negativas para o marcador de células endoteliais CD31 (Zhu *et al*, 2010).

Já as MO-CTMs, apesar de compartilharem com as OC-CTMs a expressão dos marcadores de superfície de células mesenquimais murinas e a baixa expressão de CD31, apresentou uma elevada expressão do marcador de células hematopoéticas CD45, indicando que mesmo após o cultivo a presença de células hematopoéticas permaneceu. Esse resultado já foi anteriormente reportado por outros estudos (Anjos Afonso *et al*, 2004; Badoo *et al*, 2003), mostrando que dentre as células mononucleares aderentes provenientes da medula óssea de camundongos encontram-se células hematopoéticas que podem persistir por diversas passagens.

A morfologia das MO-CTMs e OC-CTMs também apresentou diferenças, ao passo que a maior parte das colônias de CTMs da medula óssea era composta por células multipolares, achatadas e grandes, enquanto as de CTMs do osso compacto continham um maior número de células, que eram fusiformes e pequenas. Esses dados representam mais uma diferença nas características *in vitro* das CTMs estudadas, apesar de não ter sido observado tal padrão na morfologia com unanimidade nas colônias analisadas.

Em conjunto, nossos dados indicam que as CTMs da medula óssea e do osso compacto podem representar duas populações distintas de CTMs, uma vez que apresentaram características *in vitro* significativamente diferentes e em ambas foram observadas características típicas de CTMs, como a aderência ao plástico em cultura, a capacidade de diferenciação em osteócitos e adipócitos e o perfil imunofenotípico, exceto pela elevada expressão de CD45 na população de MO-CTMs. Adicionalmente, nossos resultados sugerem que as OC-CTMs, principalmente devido a sua alta capacidade de proliferação e diferenciação osteogênica, possam ser importantes fontes de CTMs para o uso clínico, sendo interessante a continuidade da investigação da biologia dessas células, tanto pela caracterização *in vitro*, como *in vivo*.

Nos últimos anos o número de ensaios clínicos com as células-tronco mesenquimais vem crescendo e com o avanço nos estudos pré-clínicos tem sido observado que tais células são eficientes no tratamento de diversas doenças, além disso, são de fácil acesso, podendo ser

obtidas de diversas fontes no organismo, como medula óssea, tecido adiposo e cordão umbilical (Wei *et al*, 2013). A intensa investigação a respeito dessas células tem contribuído para que estejamos mais próximos do seu uso em aplicações médicas ou comerciais quando comparada com outros tipos de células-tronco (Armstrong *et al*, 2012).

Uma das finalidades do uso de células-tronco mesenquimais que também vem sendo estudada é a regeneração óssea, no entanto, apesar dos avanços obtidos na área, os mecanismos apresentados pelas CTMs relacionados com o reparo da fratura óssea ainda não são totalmente conhecidos. Mesmo sendo claro o efeito que essas células apresentam, quanto à capacidade de reparação dos tecidos, ainda não dominamos sobre o modo adequado de utilização clínica dessas células (Wang *et al*, 2013).

Os resultados obtidos nesse trabalho podem contribuir para ampliação do conhecimento a respeito da biologia e identidade das CTMs da medula óssea e do osso compacto e, consequentemente, para o refinamento no uso clínico dessas células, fornecendo um meio para a seleção da população celular mais adequada de acordo com sua capacidade de diferenciação.

6. Conclusões

Os dados obtidos neste trabalho corroboram a hipótese da co-existência de populações de CTMs na medula óssea e no osso compacto. Desse modo, nossos achados sugerem que as CTMs não ocupam exclusivamente o nicho perivascular da medula óssea. Foi constatado que no nicho endosteal ocorre uma maior frequência de CTMs, as quais mantiveram sua multipotência *in vitro* e expressão dos marcadores de superfície típicos das CTMs. Futuras avaliações funcionais de ambas populações de CTMs poderiam contribuir para um maior refinamento no uso clínico dessas células.

7. Referências Bibliográficas

Anjos- Afonso, F., Siapati, E. K. & Bonnet, D. (2004). *In vivo* contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *Journal of Cell Science*. 117, 5655-5664 doi:10.1242/jcs.01488.

Armstrong, L., Lako, M., Buckley, N., Lappin, T.R.J., Murphy, M. J, Nolta, J.A., Pittenger, M., Stojkovic, M. (2012). Editorial: Our top 10 developments in stem cell biology over the last 30 years. *Stem Cells*. 30. 2-9; doi:10.1002/stem.1007.

Badoo, M., Hill, K., Wilkinson, R., Gaupp, D., Hughes, C., Kopen, G.C. & Phinney, D.G. (2003). Characterization of Mesenchymal Stem Cells Isolated From Murine Bone Marrow by Negative Selection. *Journal of Cellular Biochemistry*. 89, 1235–1249. doi: 0.1002/jcb.10594.

Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, *9*, 641–650. doi:10.1002/jor.1100090504.

Chan, C. K. F., Seo, E. Y., Chen, J. Y., Lo, D., McArdle, A., Sinha, R., Tevlin, Seita, J., Vincent-Tompkins, J., Wearda, T., Lu, W-J., Senarath-Yapa, K., Chung, M. T., Marecic, O., Tran, M., Yan, K. S., Upton, R., Walmsley, G. G., Lee, A. S., Sahoo, D., Kuo, C. J., Weissman, I. L. & Longaker, M. T. (2015). Identification and Specification of the Mouse Skeletal Stem Cell. *Cell*. 160, 285–298. doi: 10.1016/j.cell.2014.12.002.

Covas, D. T., Panepucci, R. a, Fontes, A. M., Silva, W. a, Orellana, M. D., Freitas, M. C. C., Neder, L., Santos, A. R. D., Peres, L. C., Jamur, M, C. & Zago, M. a. (2008). Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Experimental hematology*, *36*(5), 642–54. doi:10.1016/j.exphem.2007.12.015.

Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H-J., Giacobino, J-P., Lazzari, L., Huard, J. & Péault, B. (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, *3*, 301–313. doi:10.1016/j.stem.2008.07.003.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, Dj & Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, *8*, 315–317. doi:10.1080/14653240600855905.

Eslaminejad, M.B., Nikmahzar, A., Taghiyar, L., Nadri, S. & Massumi, M. (2006). Blackwell Publishing Asia Murine mesenchymal stem cells isolated by low density primary culture system. *Develop. Growth Differ*. 48, 361–370. doi: 10.1111/j.1440-169x.2006.00874.x.

Friedenstein, A.J. (1990). Osteogenic stem cells in bone marrow. *In Bone and Mineral Research*, J.N.M. Heersche e J.A. Kanis, eds. (Amsterdam: Elsevier), 243–272.

Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and Tissue Kinetics*, 3, 393-403.

Gronthos, S., Zannettino, A. C. W., Hay, S. J., Shi, S., Graves, S. E., Kortesidis, A., & Simmons, P. J. (2003). Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *Journal of cell science*, *116*, 1827–1835. doi:10.1242/jcs.00369.

Huang, S., Xu, L., Sun, Y., Wu, T., Wang, K. & Li, G. (2015). An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *Journal of Orthopaedic Translation* 3, 26- 33. doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2014.07.005.

Meirelles, L.S., Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science*, *119*, 2204–2213. doi:10.1242/jcs.02932.

Mitra, N.K., Tan, C.Y., Bindal, U., Chua C.L.L., Wong, E.H., Parhar, I.S. & Soga, T. (2015). Investigating Cell Surface Markers and Differentiation Potential of Compact Bone-Derived Mesenchymal Stem Cells. *International Journal of Stem Cell Research and Transplantation*. 03(1), 91-95. doi: http://dx.doi.org/10.19070/2328-3548-1500015.

Kassem, M. & Bianco, P. (2015). Skeletal Stem Cells in Space and Time. *Cell*. 160. doi:10.1016/j.cell.2014.12.034.

Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V, Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N. & Frenette, P. S. (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, *466*, 829–834. doi:10.1038/nature09262.

Owen, M., & Friedenstein, A. J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Foundation symposium*, *136*, 42–60.

Shi, S., & Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, *18*, 696–704. doi:10.1359/jbmr.2003.18.4.696.

Sung, J. -H., Yang, J. B., Park, G. –S., Choi, J. –W., Joh, C. H., Kwon, J. M., Chun, S. –K. & Kim, S. –J.(2008). Isolation and Characterization of Mouse Mesenchymal Stem Cells. *Elsevier. Transplantation Proceedings*, 40, 2649–2654. doi:10.1016/j.transproceed.2008.08.009.

Tavassoli, M., & Crosby, W. H. (1968). Transplantation of marrow to extramedullary sites. *Science (New York, N.Y.)*, *161*, 54–56. doi:10.1126/science.161.3836.54.

Tormin, A., Li, Ou., Brune, J. C., Walsh, S., Schütz, B., Ehinger, M., Ditzel, N., Kassem, M. & Scheding, S. (2011). CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood*, *117*, 5067–5077. doi:10.1182/blood-2010-08-304287.

Wang, X., Wang, Y., Gou, W., Lu, Q., Peng, J. & Lu, S. (2013). Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *International Orthopaedics*. 37. 2491–2498; doi: 10.1007/s00264-013-2059-2.

Wei,X., Yang, X., Han, Z-P., Qu, F-F., Shao, L. & Shi, Y-F. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacologica Sinica*. 34. 747–754; doi: 10.1038/aps.2013.50.

Worthley, D. L, Churchill, M., Compton, J, T., Tailor, Y., Rao, M., Si, Y., Levin, D., Schwartz, M. G., Uygur, A., Hayakawa, Y., Gross, S., Renz, B. W., Setlik, W., Martinez, A. N., Chen, X., Nizami, S., Lee, H. G., …Wang, T. C. (2015). Gremlin 1 Identifies a Skeletal Stem Cell with Bone, Cartilage, and Reticular Stromal Potential. *Cell*. 160, 269–284. doi: 10.1016/j.cell.2014.11.042.

Yamachika, E., Tsujigiwa, H., Matsubara, M., Hirata, Y., Kita, H., Takabatake, K., Mizukawa, N., Kaneda, Y., Nagatsuka, H. & Iida, S.(2012). Basic fibroblast growth factor supports expansion of mouse compact bone-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and regeneration of bone from MSC *in vivo*. *J Mol Hist* .43:223–233. doi: 10.1007/s10735-011-9385-8

Zhu, H., Guo, Z-H., Jiang, X-X., Li, H., Wang, X-Y,.Yao, H-Y., Zhang, Y. & Mao, N. (2010). A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nature Protocols*. Vol.5 N.3. doi:10.1038/nprot.2009.238.