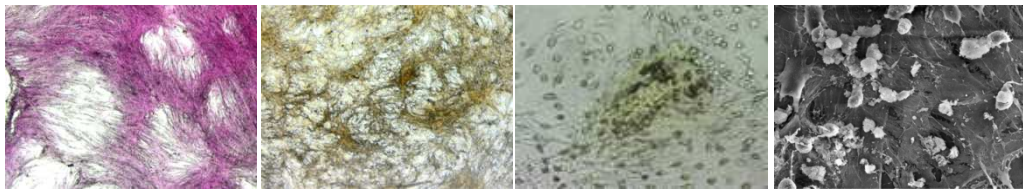




Universidade de Coimbra



**Diferenciação Osteoblástica de Células
Mesenquimatosas do Tecido Adiposo de Rato
na presença de Purmorfamina**

Patrícia Sofia Pinhanços Batista

Coimbra, 2009

**Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra,
2009**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre, sob orientação da Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes e co-orientação do Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita. Apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, para dar cumprimento ao ponto b do nº2 do artigo 5º do Decreto-Lei Nº 216/92 de 13 de Outubro de 2005 (portaria Nº 107/97 de 17 de Fevereiro).

Trabalho experimental efectuado no Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

AGRADECIMENTOS

Cumpre-me expressar a minha gratidão a todos aqueles que contribuíram para a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Senhora Professora Doutora Maria Helena Raposo Fernandes, por todos os imprescindíveis ensinamentos que me facultou, bem como, o apoio incondicional prestado ao longo do decorrer desta aprendizagem. Agradeço-lhe a disponibilidade e prontidão que sempre me dispensou, a análise rigorosa, a exigência, os conselhos, a sabedoria e a amizade, foram muito gratificantes ao longo de toda esta caminhada.

Ao Senhor Professor Doutor António Manuel Silvério Cabrita, co-orientador desta tese, agradeço os inúmeros conhecimentos que me transmitiu ao longo destes dois anos de trabalho, o apoio científico, a disponibilidade, o incentivo, o encorajamento e a amizade. Sem o seu entusiasmo dificilmente este projecto se teria concretizado.

Agradeço aos meus pais e irmão pelo apoio, carinho e paciência.

Ao Professor Doutor Bruno Colaço, pelos seus ensinamentos, apoio, disponibilidade e amizade.

À Dra. Maria de Lurdes Pereira, pelo seu carinho e atenção.

À minha colega Catarina Bessa pela ajuda incondicional e amizade. Assim como, a todos os meus amigos que de alguma forma estiveram presentes ao longo deste percurso.

ÍNDICE

I – RESUMO	1
ABSTRACT	2
II – INTRODUÇÃO	3
1. Células Precursoras	3
2. Tecido Adiposo	6
3. Tecido Ósseo e Osteogénese	10
4. Moléculas Indutoras Osteogénicas: Dexametasona e Purmorfamina	17
III – OBJECTIVOS	24
IV – MATERIAL E MÉTODOS	24
1. Obtenção das culturas celulares	24
2. Efeito da dexametasona e da purmorfamina no comportamento celular	25
3. Caracterização do comportamento celular	28
4. Análise estatística	31
V – RESULTADOS	32
1. Comportamento das culturas estabelecidas com uma densidade de 5×10^3 células/cm²	32
2. Comportamento das culturas estabelecidas com uma densidade de 10^4 células/cm²	45
VI – DISCUSSÃO	55
VII – CONCLUSÃO	61
VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Lista de Figuras

Figura 1. Esquematização da diferenciação das células precursoras.

Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental.

Figura 3. Aspecto macroscópico das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais, dias 7, 14 e 21. Coloração com hematoxilina-eosina.

Figura 4. Padrão de crescimento das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais, dias 7 e 21. Coloração com hematoxilina-eosina. Lupa, ampliação, x6.8.

Figura 5. Padrão de crescimento das culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas, dias 7, 14 e 21. Coloração com hematoxilina-eosina. Microscopia de luz, x50.

Figura 6. Morfologia celular de culturas efectuadas em situações experimentais representativas: AA+ β GP, AA+ β GP+Dex, AA+ β GP+P3 e AA+ β GP+Dex+P3, dia 21. Microscopia electrónica de varrimento. A, C, E, G: x200; B, D, F, H: x1000.

Figura 7. Viabilidade/Proliferação celular (ensaio do MTT) das culturas efectuadas nas diferentes condições experimentais. A: AA+ β GP (situação controlo); AA+ β GP+Dex; AA+ β GP+P1; AA+ β GP+P2 e AA+ β GP+P3. B: AA+ β GP (situação controlo); AA+ β GP+Dex+P1; AA+ β GP+Dex+P2 e AA+ β GP+Dex+P3. *Significativamente diferente da situação AA+ β GP.

Figura 8. Culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais. Reacção histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. a) Aspecto macroscópico, no dia 21; b) Microscopia de luz, x50, dias 14 e 21.

Figura 9. Culturas efectuadas em situações experimentais representativas: AA+ β GP (controlo), AA+ β GF+Dex, AA+ β GP+P3 e AA+ β GP+Dex+P3, dia 21. Reacção histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. Microscopia de luz, x200.

Figura 10. Culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas: AA+ β GP (controlo), AA+ β GP+Dex, AA+ β GP+P3 e AA+ β GP+Dex+P3, dia 21. Reacção de von Kossa. Microscopia de luz. A, C, E, G: ampliação 50x; B, D, F, H: ampliação x200.

Figura 11. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP (controlo), dia 21. Microscopia electrónica de varrimento (A, x500); B: espectro de difracção de raios X.

Figura 12. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+Dex, dia 21. Microscopia electrónica de varrimento (A, x500; C, x2500); B e D: espectros de difracção de raios X.

Figura 13. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+P3, dia 21. A e C: microscopia electrónica de varrimento (A, x50; C, x1000); B: reacção de von Kossa (x200); D e E: espectros de difracção de raios X.

Figura 14. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+Dex+P3, dia 21. A e B: microscopia electrónica de varrimento (A, x100; B, x1000); C: espectro de difracção de raios X.

Figura 15. Aspecto macroscópico das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais, dias 7 e 21. a) Coloração para a hematoxilina eosina; b) Coloração para a fosfatase alcalina.

Figura 16. Culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas: AA+ β GP (controlo) (A, x50; B, x1000), AA+ β GP+Dex (C, x50; D, x1000), AA+ β GP+P3 (E, x100; F, x500) e AA+ β GP+Dex+P3 (G, x50; H, x1000), dia 21. Microscopia electrónica de varrimento.

Figura 17. Viabilidade/Proliferação celular (ensaio do MTT) e conteúdo em proteína total das culturas efectuadas nas diferentes condições experimentais. A: AA+βGP (situação controlo); AA+βGP+Dex; AA+βGP+P1; AA+βGP+P2 e AA+βGP+P3. B: AA+βGP (situação controlo); AA+βGP+Dex+P1; AA+βGP+Dex+P2 e AA+βGP+Dex+P3. *Significativamente diferente da situação AA+βGP.

Figura 18. Actividade de fosfatase alcalina das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais. A: AA+βGP (situação controlo); AA+βGP+Dex; AA+βGP+P1; AA+βGP+P2 e AA+βGP+P3. B: AA+βGP (situação controlo); AA+βGP+Dex+P1; AA+βGP+Dex+P2 e AA+βGP+Dex+P3. *Significativamente diferente da situação AA+βGP.

Figura 19. Culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas, dias 7, 14 e 21. Reacção histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. Microscopia de luz, x50.

Figura 20. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B: microscopia electrónica de varrimento, x2500; C: espectro de difracção de raios X.

Figura 21. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP+Dex, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B, C: microscopia electrónica de varrimento, (B: 2500; C: x5000); D, E: espectros de difracção de raios X.

Figura 22. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP+P3, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B: microscopia electrónica de varrimento, x500; C: espectro de difracção de raios X.

Figura 23. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP+Dex+P3, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B: microscopia electrónica de varrimento, x1000; C: espectro de difracção de raios X.

I - Resumo

O tecido adiposo, tal como o tecido ósseo, é derivado do mesênquima e contém estroma de suporte que pode ser facilmente isolado. Este estroma é uma fonte alternativa de células precursoras do mesênquima que possuem capacidade de renovação e diferenciação em diferentes tipos celulares, incluindo adipócitos, osteoblastos, condrócitos e mioblastos. Estas células têm um comportamento semelhante ao das células mesenquimatosas presentes na medula óssea e, assim, apresentam muitas aplicações clínicas potenciais, nomeadamente relacionadas com terapêuticas celulares de regeneração do tecido mesodérmico.

O trabalho desenvolvido no âmbito deste estudo teve como objectivo estudar o padrão de proliferação e diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas isoladas de tecido adiposo de rato na presença de purmorfamina (2-(1-Naphthoxy)-6-(4-morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurina), composto recente que parece estimular a diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas e, também, de células da linhagem osteoblástica. Em paralelo, o comportamento celular foi também estudado na presença de dexametasona, um indutor osteogénico clássico em sistemas *in vitro*.

As células mesenquimatosas foram isoladas do tecido adiposo de ratos Wistar e cultivadas na presença de ácido ascórbico (50 µg/ml), β-glicerofosfato (10 mM) e purmorfamina (1 – 3 µM) ou dexametasona (10 nM). O comportamento celular foi estudado pela avaliação da viabilidade/proliferação e de parâmetros de diferenciação osteoblástica, como a actividade da fosfatase alcalina e a capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. Foram utilizados métodos bioquímicos e histoquímicos e observação das culturas por microscopia de luz e microscopia electrónica de varrimento.

A purmorfamina causou um aumento da proliferação celular e uma indução muito significativa da actividade de fosfatase alcalina, mas não se observou deposição mineral. As culturas mostraram a presença de uma camada de células alongadas e organizadas em zonas de maior densidade celular. A presença de dexametasona resultou numa diminuição significativa da taxa de proliferação celular, formação de agrupamentos celulares bem definidos que apresentaram reacção histoquímica intensa para a fosfatase alcalina e, alguns deles, presença de depósitos mineralizados de fosfato de cálcio.

A purmorfamina parece actuar como agonista da via de sinalização "Hedgehog", que tem um papel importante no desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos, incluindo o tecido ósseo. Assim, a modulação desta via pode, potencialmente, revestir-se de interesse terapêutico. Também, a purmorfamina pode constituir uma ferramenta farmacológica adicional na elucidação dos mecanismos envolvidos na diferenciação do tecido ósseo.

Palavras Chave: Células mesenquimatosas, Tecido adiposo, Diferenciação osteoblástica, Purmorfamina, Dexametasona, Regeneração óssea.

Abstract

Adipose tissue, such as bone, is derived from the mesenchyma and contains stromal of support that can be easily isolated. This stroma is an alternative source of stem cells which has the capacity for renewal and differentiation into different cells types, including adipocytes, osteoblasts, chondrocytes and myoblasts. These cells have a behaviour similar to that of mesenchymal cells from the bone marrow and, thus, have many potential clinical applications, in particular related to cellular therapies for tissue regeneration.

The aim of this work was to study the proliferation and osteoblastic differentiation of mesenchymal cells from rat adipose tissue in the presence of purmorphamine (2-(1-Naphthoxy)-6-(4-morpholinoanilino)-9-cyclohexylpurina), a recent compound that appears to stimulate the osteoblastic differentiation of mesenchymal cells and, also, cells of the osteoblastic lineage. In parallel, the cellular behaviour was also studied in the presence of dexamethasone, a classic *in vitro* osteogenic inducer.

The mesenchymal cells were isolated from the adipose tissue of Wistar rats and cultured in the presence of ascorbic acid (50 µg/ml), β-glycerophosphate (10 mM) and purmorphamine (1 – 3 µM) or dexamethasone (10 nM). The cellular behaviour was assessed for cell viability/proliferation and osteoblastic parameters, such as alkaline phosphatase activity and ability to form a mineralized extracellular matrix, by biochemical and histochemical methods and observation by light and scanning electronic microscopy.

Purmorphamine caused an increase of the cell proliferation and a significant induction of alkaline phosphatase activity, but mineral deposition was not observed. The cultures showed the presence of a layer of elongated cells organized in areas of higher density. The presence of dexamethasone resulted in a significant decrease of the cell growth rate, formation of well-defined cellular groupments which presented an intense staining for alkaline phosphatase and, some of them, the presence of calcium phosphate mineralized deposits.

Key words: Mesenchymal cells, Adipose tissue, Osteoblastic differentiation, Purmorphamine, Dexamethasone, Bone regeneration.

II – Introdução

Está hoje bem estabelecido que em muitos tipos histológicos diferentes, em tecidos maduros, é possível identificar e isolar células precursoras, capazes de apresentarem diferenciação em diferentes tipos celulares, incluindo adipócitos, osteoblastos, condrócitos e mioblastos (Zuk *et al.*, 2002; Rodriguez *et al.*, 2005). Estas células têm um grande potencial para aplicação clínica numa grande variedade de patologias e eventualmente vir a substituir com vantagens o uso de células precursoras embrionárias, por questões políticas ou éticas (Kern *et al.*, 2006).

No casos das células precursoras isoladas do tecido adiposo, estas podem ser mantidas em cultura, apresentam grande capacidade de auto-renovação *in vitro* e mantêm a capacidade de diferenciação em várias linhas celulares quando submetidas a estímulos específicos (Gimble e Guilak, 2003). A cultura na presença de dexametasona (ou 1,25-dihidroxivitamina D₃), ácido ascórbico e β-glicerofosfato promove o crescimento e diferenciação de células de linha osteoblástica (Hattori *et al.*, 2006). Existe uma outra molécula que parece ter capacidade de induzir a diferenciação osteoblástica em vários modelos celulares, designada por purmorfamina (Wu *et al.*, 2002; Beloti *et al.*, 2005a).

1. Células Precursoras

As células precursoras são células que têm a capacidade de se autorenovarem e sofrerem diferenciação celular completa em condições fisiológicas (Weissman *et al.*, 2001; Smith, 2001; Ballas *et al.*, 2002).

As células precursoras podem ser classificadas de acordo com a sua potência em vários tipos. As células totipotentes, resultam de óvulos fertilizados nos primeiros dias a seguir à fertilização, sendo células totalmente indiferenciadas que podem dar origem a todas as variedades de células de um organismo, bem como a anexos embrionários. As células pluripotentes ou multipotentes, que originar diversos tipos de células diferenciadas, contudo são desprovidas da capacidade de originar anexos embrionários. As células unipotentes, que se diferenciam num único tipo de células, originando descendentes semelhantes aos progenitores, restringindo o potencial de

diferenciação e a capacidade de renovação (Regateiro *et al.*, 2005; Gearhart *et al.*, 2006).

Uma outra característica presente nestas células é a plasticidade, permitindo a sua manipulação em laboratório sem perder as suas capacidades funcionais, possibilitando a evolução no sentido da aquisição de propriedades fenotípicas que são específicas de células adultas de outros tecidos, ou seja, a possibilidade do fenómeno de transdiferenciação (Murry *et al.*, 2004; Verfaillie, 2006; Tarnowski e Sieron, 2006; Yang *et al.*, 2007).

As células precursoras estão presentes nos estádios do desenvolvimento de um ser vivo, desde o embrião ao adulto e, nesses sucessivos estádios, reflectem-se as modulações das suas características e das suas potencialidades evolutivas. Podem ser obtidas de várias fontes (tecido embrionário, medula óssea, tecido adiposo e cérebro) para regeneração ou reparação de tecidos (Vats *et al.*, 2002; Conrad e Huss, 2005). As células precursoras podem ser identificadas, isoladas e caracterizadas em células precursoras embrionárias e células precursoras adultas.

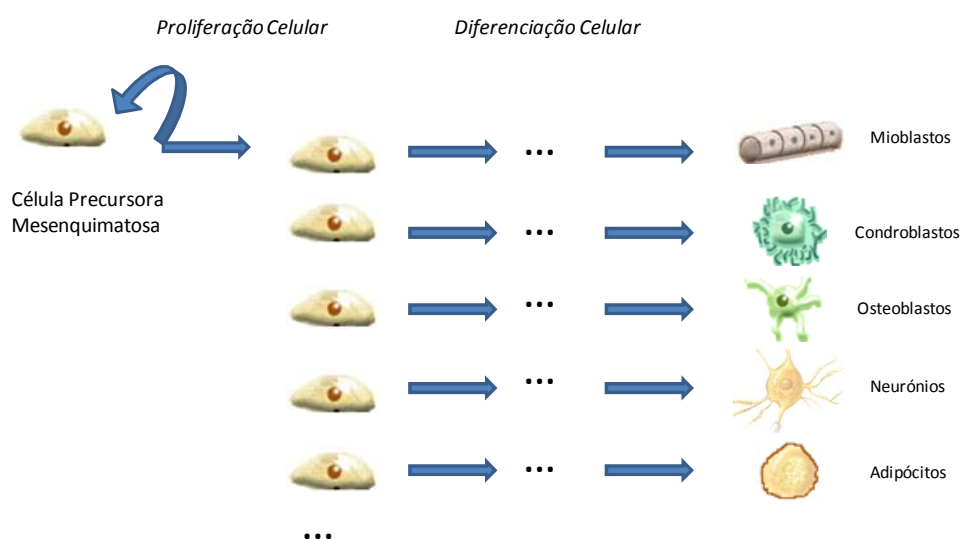


Figura 1. Esquematização da diferenciação das células precursoras.

As características básicas das células precursoras embrionárias incluem a própria renovação, a diferenciação numa multilinhagem *in vitro* e *in vivo*; a clonagem, originando um cariótipo normal; a proliferação extensiva *in vitro* perante boas condições de cultura (Gearhart *et al.*, 2006). Estas células

primitivas do embrião, que se encontram na massa interior do blastocisto, apresentam um potencial de se poderem transformar em todos os tipos de células. Por sua vez, as células precursoras adultas caracterizam-se por serem células simples, indiferenciadas que formam um tecido ou órgão específico, que têm a capacidade de se auto-renovarem e são capazes de se diferenciar em diversos tipos especializados de células, possibilitando a manutenção da integridade e a reparação dos tecidos (Habib, 2005; Ballas *et al.*, 2002; Minguell *et al.*, 2001; Barry e Murphy, 2004; Winter *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005; Zuk *et al.*, 2002; Zuk *et al.*, 2001; Guilak *et al.*, 2006; Aust *et al.*, 2004; Gronthos *et al.*, 2001).

Estas células precursoras dos tecidos adultos apresentam algumas limitações, tais como: isolamento difícil, uma vez que muitas vezes estão presentes em pequenas quantidades; não conseguem originar todos os tipos celulares; devido ao seu longo tempo de vida, podem acumular anomalias no DNA. Assim sendo, as células precursoras mais usadas são as embrionárias, no entanto, a utilização destas células na investigação biomédica tem encontrado posições controversas relativamente às fontes de obtenção destas.

Os opositores da utilização de células precursoras embrionárias levantam questões de moralidade na obtenção das células pela destruição de embriões, considerando este acto, como equivalente à destruição de vidas humanas (Snow, 2003; Zoloth, 2006). Investigações recentes têm sido encaminhadas no sentido do desenvolvimento de métodos que permitam eliminar estas preocupações, tais como, métodos para obter células precursoras humanas sem destruir embriões (Prentice, 2004; Alameda, 2006). Contudo, as questões éticas continuam a ser um ponto de debate. Assim, o uso de células precursoras derivadas de tecidos adultos evitaria muitas das preocupações éticas que se podem levantar no uso de células precursoras em aplicações biomédicas. Estas células podem diferenciar-se em múltiplas linhagens, tais como: osteócitos, adipócitos, condrócitos, miócitos, células nervosas (neurónios, astrócitos, oligodendrócitos), células adiposas, células sanguíneas células endoteliais (Gomillion e Burg, 2006). Outras fontes de células precursoras com potencial mesênquimatoso incluem o perióstio, osso esponjoso, músculo esquelético, pulmão e cavidade oral (Barry e Murphy, 2004). A disponibilização de linhas celulares derivadas das células precursoras pode servir para testar fármacos, o que possibilitaria a individualização de tratamentos, melhorando a sua eficiência e reduzindo o risco de efeitos indesejáveis. Poderiam também ser

usadas como matrizes de tratamentos para substituição de partes de tecidos e de órgãos que se encontram lesados, por exemplo devido a doenças degenerativas do sistema nervoso central, de órgãos afectados por tumores malignos; de tecidos e/ou órgãos parcialmente destruídos por agressões traumáticas, térmicas; tratamentos de fibroses pulmonares; reparação óssea e cartilaginosa, bem como, tratamento de doenças coronárias (Barry e Murphy, 2004). No entanto, a aplicação de células precursoras para tratar doenças só poderá ser concretizada após a compreensão de um complexo conjunto de mecanismos biológicos e a operacionalização de procedimentos técnicos. Assim, é necessário isolar as células precursoras e mantê-las em cultura num estágio biomolecular indiferenciado, para serem submetidas a manipulações laboratoriais que induzam a sua diferenciação no tipo celular pretendido, e posteriormente inoculá-las nas regiões lesadas para que aí possam finalmente regenerar os tecidos doentes (Kukekov, 1999; Bjorklund e Lindvall, 2000; Assady *et al.*, 2001; Ghostine *et al.*, 2002; Hagege *et al.*, 2003; Brivanlou *et al.*, 2003; Cortesini, 2005). Deste modo, poder-se-iam diminuir as dificuldades em obter órgãos para transplantação, suficientes para as necessidades actuais e futuras, e colmatar este problema de saúde pública; tornar-se-iam menos relevantes as questões de natureza ética e abrir-se-ia a possibilidade do transplante autólogo ou autotransplante, eliminando-se todos os problemas de compatibilidade imunológica e de rejeição (Vescovi, 2002).

2. Tecido Adiposo

O tecido adiposo humano é uma fonte abundante e acessível de células precursoras adultas, sendo um elemento fundamental para a aquisição de um elevado número de células para potenciais aplicações clínicas (Zuk *et al.*, 2002; Gimble e Guilak, 2003; Aust *et al.*, 2004; Boquest *et al.*, 2005; Kern *et al.*, 2006; Colaço, 2008).

Este tecido deriva da mesoderme e contém um estroma de suporte, constituído por uma mistura heterogénea de células endoteliais do músculo liso, periócitos, fibroblastos, pré-adipócitos e células precursoras (Strem *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2005; Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006). É um tipo especial de tecido conjuntivo onde se observam predominantemente células adiposas – adipócitos, que podem ser encontradas isoladas ou em pequenos grupos.

Apresentando-se a maioria agrupada e na presença de fibras de colagénio (Patrick, 2004; Gomillion e Burg, 2006). Este tecido é altamente especializado na produção de polipeptídeos activos e controlo do metabolismo, e apresenta duas variedades morfológicas, que se diferenciam a nível da distribuição no corpo, estrutura, fisiologia e patologia: o tecido adiposo comum, amarelo ou unilocular, e o tecido adiposo castanho, ou multilocular (Junqueira e Carneiro, 1999).

Relativamente à sua função, o tecido adiposo é considerado o maior depósito de energia do corpo, para além do papel energético, tem ainda outras funções, tais como: contribuir para o isolamento térmico do organismo, preenchimento de espaços entre outros tecidos, auxiliar a manutenção de certos órgãos em posições normais, bem como, funções endócrinas, imunológicas, cardiovasculares e metabólicas. Estas últimas funções são desenvolvidas pelas adipocinas (interleucina 6, o factor de necrose tumoral, adiposina, adiponectina, resistina, visfatina, leptina) (Costa e Duarte, 2006).

Para além das funções referidas, o tecido adiposo apresenta ainda a particularidade de através das suas células precursoras se poder diferenciar em múltiplas linhas: adipócitos, condrócitos, mioblastos, neurónios, osteoblastos (Sen *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2001; Halvorsen *et al.*, 2001a; Shore *et al.*, 2002; Hattori *et al.*, 2005). Deste modo, devido à sua reprodutibilidade, consistência e acessibilidade, vários estudos têm sido efectuados no sentido de isolar e diferenciar estas células precursoras do tecido adiposo para estudar a sua potencial utilidade clínica na regeneração e engenharia de tecidos (Aust *et al.*, 2004).

2.1 Isolamento e Diferenciação das Células Precursoras do Tecido Adiposo

O tecido adiposo contém um estroma de suporte que apresenta células precursoras, que pode ser facilmente isolado (tal como o da medula óssea). Num estudo efectuado por Rodbell (1964), foi apresentado o primeiro método de isolamento *in vitro* de adipócitos maduros e progenitores de gordura epididimal de rato. O tecido foi fragmentado em pequenas fracções, digerido a 37º com colagenase tipo I, e posteriormente foram separados os componentes celulares por centrifugação. O sobrenadante continha adipócitos maduros com pedaços a flutuar no conteúdo lipídico. O sedimento continha componentes do estroma vascular, com progenitores adipócitos incluídos numa linhagem

adicional de células hematopoiéticas. Outros investigadores modificaram este método, para isolar progenitores adipócitos humanos, cultivando componentes do estroma vascular na presença de factores indutores (dexametasona, biotina, insulina) (Van *et al.*, 1976; Deslex *et al.*, 1986).

Posteriormente, surgiram novos métodos, tais como a lipoaspiração, que permite obter um excelente material para isolamento de células precursoras do tecido adiposo, não sendo alterada a viabilidade das células (Moore *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1999; Zuk *et al.*, 2001; De Ugarte, 2003). Também Oedayrajsingh-Varma e seus colaboradores (2006) colheram tecido adiposo e isolaram-no por três tipos de procedimentos cirúrgicos: recessão, lipoaspiração de tumescência e lipoaspiração assistida por energia. Verificou-se que o tecido adiposo obtido por recessão e lipoaspiração apresentava uma taxa de crescimento elevada, ao contrário do obtido por lipoaspiração assistida por energia, em que as células precursoras do tecido adiposo exibiam uma baixa capacidade de proliferação. Verificou-se também que estes procedimentos não afectavam a viabilidade das células do estroma vascular. A elevada intensidade da energia usada na lipoaspiração assistida por energia, ou a filtração do fluído, usada para colher o tecido adiposo por lipoaspiração, poderia destruir as células do estroma vascular, resultando num decréscimo da viabilidade das células. Deste modo, concluiu-se que os procedimentos cirúrgicos usados na colheita afectam as propriedades das células, características de crescimento, bem como o rendimento. Dos três métodos analisados, verificou-se que os métodos de recessão e lipoaspiração são os preferíveis para a engenharia de tecidos.

Contudo, outros estudos salientam o insucesso obtido na recolha de tecido adiposo por procedimentos de lipoaspiração, na restauração do volume de tecido, devido a uma angiogénese insuficiente nos tecidos transplantados. As gotículas lipídicas são susceptíveis de destruição durante procedimentos de lipoaspiração (Patrick, 2004; Atala e Lanza, 2002; Beahm *et al.*, 2003).

Após isoladas, as células precursoras do tecido adiposo proliferam e diferenciam-se. Estas células apresentam alterações morfológicas e bioquímicas, onde adquirem uma forma redonda e começam a acumular triacilglicerol e vacúolos lipídicos (Patrick, 2000; Beahm *et al.*, 2003). Na presença de ácido-ascórbico, ácido β -glicerofosfato, dexametasona e 1,25 vitamina D3 (existem estudos que não referem esta substância), diferenciam-se em células semelhantes a osteoblastos (células osteoblásticas) (Halvorsen *et al.*, 2000; Halvorsen *et al.*, 2001a; Aust *et al.*, 2004). Num período entre 2 a 4 semanas *in*

vitro, as células precursoras do tecido adiposo humano e de rato depositam um mineral de fosfato de cálcio na sua matrix extracelular, expressam marcadores de mRNA e proteínas indicativas de linhagens osteoblásticas (Halvorsen *et al.*, 2001b), incluindo fosfatase alcalina, proteínas morfogenéticas ósseas e seus receptores, osteocalcina, osteonectina e osteopontina (Zuk *et al.*, 2002; Gimble e Guilak, 2003). *In vivo*, quando implantadas em ratinhos imunodeficientes, as células precursoras de tecido adiposo quando embebidas com hidroxiapatite/fosfato de tricálcio formam osso (Hattori *et al.*, 2005). Após 6 semanas, observa-se a formação de um novo osteóide, derivado de células precursoras do tecido adiposo de rato ou humano. Os resultados sugerem que as células precursoras de tecido adiposo poderão ter aplicações terapêuticas na reparação do tecido ósseo. Por exemplo, as células precursoras do tecido adiposo humano podem vir a beneficiar osteoporóticos e outros pacientes com reduzido número de precursores osteoblásticos nativos.

A possibilidade de usar células precursoras do tecido adiposo poderia ter um significativo impacto ao nível económico e prático. A partir de um simples dador de tecido adiposo poder-se-ia recolher uma grande quantidade de células precursoras do tecido adiposo, diminuindo o custo de produção e a acessibilidade. Estudos animais poderão determinar a exequibilidade da transplantação de células precursoras do tecido adiposo alógeno, uma vez que as células precursoras humanas podem não iniciar uma resposta imunitária em condições apropriadas *in vivo*. Com tal, devem ser efectuados mais estudos em hospedeiros, de modo a garantir a resposta imunitária na diferenciação e indiferenciação das células precursoras do tecido adiposo, uma vez que estas células poderiam reduzir o risco de imunorejeição para o hospedeiro e transferência de agentes infecciosos, propriedades só apresentadas pelas células autólogas.

O tecido adiposo pode então constituir uma fonte para a aquisição de células precursoras, visto apresentar poucas desvantagens (Zuk *et al.*, 2001). Relativamente à medula óssea pode mesmo trazer vantagens: (i) mínima morbidade na colheita; (ii) um número de células precursoras, clinicamente relevante, possibilitando propagação *in vitro*; (iii) a frequência de células precursoras é significativamente elevada no tecido adiposo comparada com a medula óssea (2% vs 0,002%); e (iv) elevada taxa de proliferação relativamente à medula óssea (Strem e Hedrick, 2005; Boquest *et al.*, 2005). Relativamente aos humanos, acrescenta-se ainda o facto de estes terem

abundante gordura subcutânea depositada, e o tecido adiposo ser facilmente removido e aspirado por baixo da pele (Tholpady *et al.*, 2003). Estas células devido à sua capacidade de diferenciação poderão ser usadas em estudos farmacológicos, biotecnológicos e médicos, possibilitando deste modo o avanço da medicina regenerativa (Rahaman e Mao, 2005; Rodriguez *et al.*, 2005; Fraser *et al.*, 2006).

Tendo em conta os potenciais benefícios das células precursoras derivadas de células adiposas, estas são uma fonte promissora do desenvolvimento de estratégias na engenharia de tecidos (Thirumala *et al.*, 2005). Tendo vindo a ser utilizada a transplantação de pré-adipócitos e adipócitos, por exemplo, para repor o volume de tecido diminuído nos locais de defeito ou para formar tecido ósseo (Brey e Patrick, 2000; Fuchs *et al.*, 2001; von Heimburg, 2003; Masuda *et al.*, 2004; Gomillion e Burg, 2006). Deste modo, verifica-se o crescente aumento da investigação a nível da engenharia de tecido adiposo, e o alargamento de estudos a nível da relação entre o tecido adiposo e engenharia do tecido ósseo.

3. Tecido Ósseo e Osteogénese

O tecido ósseo pode ser classificado de acordo com as suas características macroscópicas em compacto (cortical) e esponjoso (trabecular). O tecido ósseo compacto apresenta funções mecânicas e de protecção, enquanto que o tecido ósseo esponjoso se ocupa das funções metabólicas e funções de suporte relativamente ao osso compacto (Silvério Cabrita, 1993). O tecido ósseo existente é maioritariamente compacto (cerca de 70%). O tecido ósseo compacto diz respeito à diáfise dos ossos longos e a zona externa da maioria dos ossos, situando-se o osso esponjoso no seu interior, a nível das metáfises e epífises dos ossos longos e na região central da maioria dos ossos planos e irregulares, formando uma rede de trabéculas ósseas.

Os ossos longos encontram-se subdivididos em três zonas: (i) epífises, que são as extremidades dos ossos longos, constituídas por tecido ósseo esponjoso rodeado por uma fina camada de tecido ósseo compacto, normalmente revestido por cartilagem articular; (ii) metáfises, que se encontram entre estas e a zona intermédia, sendo constituídas por abundante tecido ósseo esponjoso rodeado por tecido ósseo compacto (durante a fase de

crescimento encontram-se separadas das epífises pela placa epifisária de crescimento); (iii) diáfise, uma estrutura cilíndrica, onde o córtex é constituído por tecido ósseo compacto e a cavidade medular central por medula óssea e algum tecido ósseo esponjoso (Dias, 2004). A superfície externa do osso é revestida por uma camada fibrocelular constituída por uma membrana de tecido conjuntivo osteogénico, denominada perióstio, apresentando a sua superfície interna uma estrutura semelhante, denominada endóstio. A principal função do endóstio e do perióstio é a nutrição do tecido ósseo e estão presentes osteoblastos, osteoclastos e outras células importantes do metabolismo ósseo, que contribuem significativamente para o processo regenerativo e remodelativo do osso (Afonso, 1998; Junqueira e Carneiro, 1999).

Em termos microscópicos, o perióstio é formado por uma membrana de tecido conjuntivo vascularizada que apresenta uma camada externa fibrosa, com uma função de suporte e aporte sanguíneo e nervoso à superfície do tecido ósseo compacto; e uma camada interna osteogénica, formada por células osteoprogenitoras, com especial importância no crescimento e regeneração ósseos. O endóstio pode ser considerado como uma camada periférica condensada do estroma da medula óssea e, tal como o perióstio também possui células osteoprogenitoras e o seu próprio sistema vascular. Apresenta um potencial osteogénico e hematopoiético, encontra-se envolvido na regeneração, sendo uma fonte de células osteoprogenitoras capazes de se diferenciarem em osteoblastos; e tem ainda a função de restabelecer o suprimento sanguíneo à área em regeneração (Dias, 2004).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo altamente vascularizado que é constituído por células e por uma matriz orgânica firme, enriquecida por depósitos de sais de cálcio, com a característica exclusiva de mineralizar. A matriz extracelular óssea constitui cerca de 90% do peso total do osso compacto, e é formada por matéria orgânica (30 a 35%) e matéria inorgânica (65 a 70%) (Martin *et al.*, 1988; Eurel e Van Sickle, 1998). Para além das células do tecido ósseo, a matriz apresenta constituintes orgânicos principais tais como, colagénio tipo I, V, osteocalcina, proteínas não colagénicas da matriz e constituintes inorgânicos, tais como, compostos de cálcio (Ca^{2+}) e de fosfato (PO_4^{3-}) que se depositam sob a forma de cristais de hidroxiapatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, bem como, compostos amorfos de fosfato de cálcio (hidrogenofosfato de cálcio (CaHPO_4)) (Parfitt, 1993; Puzas, 1993; Fernandes, 1998). São exemplos de proteínas não colagénicas, as glicoproteínas (fosfatase

alcalina, osteonectina, ...), os proteoglicanos (biglicano e a decorina) e os factores de crescimento, tais como: o factor de transformação de crescimento β (TGF- β), as várias proteínas morfogenéticas ósseas (BMP), o factor de crescimento tipo insulina (IGF), o factor de crescimento fibroblástico (FGF) e o factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (Dias, 2004).

Deste modo, o número de células presente no tecido ósseo é relativamente pequeno quando comparado com o grande volume de matriz extracelular óssea (Silvério Cabrita, 1993). A população celular activa presente neste tecido, deriva de duas linhas celulares distintas: células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima que se diferenciam em células de linhagem osteoblástica (osteoblastos, osteócitos e células de revestimento) e células hematopoiéticas da medula óssea (células progenitoras de granulócitos e macrófagos, "granulocyte-macrophage colony-forming unit: GM-CFU") que dão origem aos osteoclastos (Aubin e Liu, 1996; Halsey *et al.*, 1997).

Os osteoblastos, osteócitos e células de revestimento encontram-se localizados a nível da camada interna do perióstio e da medula óssea, na linha osteoprogenitora (Marks e Popoff, 1988; Waller *et al.*, 1995). Estas células de linhagem osteoblástica são responsáveis pela formação do tecido ósseo, durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, remodelação, reparação de fracturas ou de qualquer outro defeito ósseo (mesmo quando induzido experimentalmente) (Cabral, 2004). Têm origem em células pluripotentes indiferenciadas do mesênquima, também designadas por células pluripotentes do estroma fibroblástico da medula óssea, e possuem grande capacidade de diferenciação, podendo originar vários tipos celulares, tais como: osteoblastos, condroblastos, mioblastos, fibroblastos e adipócitos, dependendo de vários mecanismos de regulação, nomeadamente de factores de crescimento (Owen, 1988; Aubin *et al.*, 1993; Triffitt, 1996). O factor de transformação de crescimento β (TGF- β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP) têm uma importante função na diferenciação em osteoblastos (Aubin e Triffitt, 2002; Vergara *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2005).

A linhagem osteoblástica inicia-se com o osteoprogenitor, observando-se uma diferenciação progressiva em pré-osteoblasto, osteoblasto e osteócito. Vários estudos sugerem que o pré-osteoblasto é o precursor do osteoblasto nas regiões de crescimento ósseo (Owen, 1988). O osteoblasto activo é caracterizado por possuir uma membrana citoplasmática rica em fosfatase alcalina (FA), receptores para uma variedade de hormonas e factores de

crescimento, sendo responsável pela formação da matriz orgânica, bem como, produção de colagénio e proteínas não colagénicas da matriz extracelular óssea, para além da síntese da enzima fosfatase alcalina (FA), necessária para o processo de mineralização (Aubin *et al.*, 1993). Por sua vez, o osteócito é considerado a célula terminal e mais madura da diferenciação celular da linhagem osteoblástica. Esta célula fica rodeada pela matriz óssea, ocupando pequenos espaços no interior do osso, e está ligada às células adjacentes por prolongamentos citoplasmáticos que se situam dentro de canais através da matriz mineralizada. Outras células derivadas dos osteoblastos, são as células de revestimento do tecido ósseo, contudo estas não foram envolvidas na matriz extracelular óssea. Estas células podem ter um papel importante na diferenciação de células mesenquimatosas, na regulação da homeostasia mineral, inibem a actividade anabólica dos osteoblastos e também parecem influenciar a actividade dos osteoclastos (Halsey *et al.*, 1997). Segundo alguns autores, estas células podem produzir colagenase, enzima com capacidade de digerir a matriz orgânica, e preparar a reabsorção osteoclástica (Martin *et al.*, 1993).

Os osteoclastos são células que diferem da linhagem celular dos osteoblastos, uma vez que as suas células precursoras presentes a nível da medula óssea são também as responsáveis pela diferenciação nas várias linhas das células hematopoiéticas (monócitos, macrófagos e outros leucócitos presentes no sangue periférico) (Takahashi *et al.*, 2002). Estas células apresentam a função de reabsorção do tecido ósseo, em áreas de remodelação activa, pela degradação enzimática da matriz proteica e dissolução ácida dos minerais da matriz extracelular óssea (Eurell e Van Sickle, 1998; Fernandes, 1998; Junqueira e Carneiro, 1999). Para que o processo de reabsorção ocorra é fundamental que os osteoclastos repousem directamente sobre a matriz extracelular óssea mineralizada. É de salientar, que o processo pelo qual os locais de reabsorção óssea são seleccionados ainda não é bem conhecido, contudo sabe-se que o primeiro sinal de um futuro local de reabsorção na superfície do endóstio é a retracção das células de revestimento do tecido ósseo pela influência de factores sistémicos (como por exemplo a hormona da paratiroide (PTH)). O estímulo que induz os osteoclastos na reabsorção é mediado por osteoblastos (Dias, 2004). Para além da reabsorção óssea, os osteoclastos participam na manutenção a longo prazo da homeostasia do cálcio sanguíneo, através da sua resposta à hormona da paratiróide e à calcitonina,

desempenhando um papel importante no desenvolvimento e crescimento ósseos, através da libertação de factores de crescimento a partir da matriz extracelular mineralizada (Baron *et al.*, 1993). Deste modo, o tecido ósseo está continuamente num processo de remodelação, adaptando-se e criando uma estrutura otimizada de forma a suportar as cargas habituais a que se encontra sujeito ou a reparar lesões que possam surgir.

As propriedades plásticas deste tecido tornam-no capaz de se remodelar em resposta a forças externas, apesar da resistência e dureza que o caracterizam. Contudo, o tecido ósseo apresenta outras funções de extrema importância no corpo humano, tais como:

- Sustentação e protecção – constitui o esqueleto que serve de apoio às partes moles e órgãos internos vitais e onde se inserem os músculos, ligamentos, tendões necessários à cinética da locomoção (Silvério Cabrita, 1993); tem função de protecção para o sistema nervoso central (cérebro e canal medular) e para a medula óssea. Esta função torna-se possível devido à existência de uma matriz extracelular mineralizada (matriz orgânica impregnada por cristais inorgânicos de hidroxapatite), que lhe confere dureza e resistência necessárias, bem como, elasticidade. A protecção da medula óssea (constituída por adipócitos e células da linhagem hematopoiética) deve-se ao facto de ela se situar no interior das cavidades medulares dos ossos.

- Reserva de Ca^{2+} e PO_4^{3-} – uma vez que a manutenção da calcemia dentro de determinados limites é essencial à realização de grande parte das reacções fisiológicas do organismo vivo (Silvério Cabrita, 1993). O tecido ósseo contém 99% do cálcio do organismo e funciona como reserva deste elemento, havendo um intercâmbio constante entre o cálcio do plasma sanguíneo e os ossos. O ião cálcio é essencial em diversos sistemas enzimáticos, como os responsáveis pela contracção muscular e pela transmissão do impulso nervoso, assim como em todo o sistema de coagulação.

3.1 Regeneração óssea

Por todas estas funções de extrema importância para o nosso organismo, o processo de regeneração óssea é fundamental. Para tal é necessária a indução de células precursoras osteogénicas (presentes na medula óssea), para que exista um número de células capazes de formar o osteoide, uma vez que o seu

nível de actividade no momento da ocorrência de uma fractura, seriam incapazes de produzir a quantidade de tecido ósseo necessário para a regeneração nessa área. A regeneração óssea, desde a fase da lesão à remodelação final, envolve uma série de fenómenos (migração, diferenciação, proliferação celular e síntese da matriz extracelular óssea) que se encontram controlados e coordenados pela expressão de genes específicos, por sua vez, induzida por factores de crescimento e citocinas. Os factores de crescimento são péptidos ou glicoproteínas que organizam e coordenam os processos de mitose, quimiotaxia, diferenciação, crescimento e produção de matriz extracelular óssea pelas células. Podem actuar como factores endócrinos, paracrinos ou autócrinos de forma a activar receptores específicos da superfície celular e estimular a actividade celular (Herndon *et al.*, 1992). Os que actuam a nível do tecido ósseo podem ser produzidos por células do próprio tecido ósseo ou por células que se encontram situadas em locais do organismo distantes daquele em que actuam ou que se encontram em estreita associação com a zona do tecido ósseo afectado.

A maioria dos estudos *in vitro* referem que o TGF- β aumenta a expressão dos marcadores de diferenciação osteoblástica, tais como a fosfatase alcalina, colagénio tipo I e osteonectina. A importancia do TGF- β na regulação da formação do tecido ósseo está demonstrada pela promoção da proliferação dos osteoblastos, estimulação da síntese de colagénio e potente acção de quimiotaxia (Bonewald, 2002; Dias, 2004). No que diz respeito às proteínas morfogenéticas ósseas, vários estudos demonstraram que estas proteínas estão presentes nas fases iniciais do processo de cicatrização das fracturas (Nakase *et al.*, 1994), difundindo-se na matriz extracelular óssea reabsorvida e induzindo a diferenciação de células osteoprogenitoras na linha osteoblástica. São assim importantes factores de regulação na diferenciação osteogénica durante o processo de cicatrização do tecido ósseo. Num estudo efectuado por Wang e seus colaboradores (1993), demonstrou-se que uma linhagem de células progenitoras da mesoderme de murganho (células C3H10T1/2), após diferenciação, apresentava um fenótipo adipocítico, condrocítico ou osteoblástico, dependendo das diferentes doses de BMP-2 ou BMP-4. O fenótipo adipocítico foi induzido por baixas concentrações de BMP-2, enquanto que altas concentrações induziam a diferenciação na linha osteoblástica.

Nos últimos tempos, o tecido adiposo surgiu como uma importante fonte alternativa de células precursoras, essencialmente pela sua abundância e

acessibilidade (Mitchell *et al.*, 2005; Oedayrajsingh-Varma *et al.*, 2006). Como tal, torna-se um potencial de investigação para a engenharia do tecido ósseo, tendo em vista a reparação óssea e o desenvolvimento de fármacos para o tratamento de determinadas doenças ósseas. As células precursoras derivadas do tecido adiposo são muito semelhantes às células precursoras derivadas da medula óssea, tanto a nível da morfologia como do fenótipo (Lee *et al.*, 2004; Yoshimura *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2006). Relativamente à sua multipotência, vários marcadores antigénicos CD encontrados na superfície das células precursoras da medula, também foram encontrados na superfície das células mesenquimatosas derivadas do tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2002; Gronthos *et al.*, 2001; Tholpady *et al.*, 2006). Strem e colaboradores (2005) verificaram que o fenótipo de superfície de células precursoras de tecido adiposo humano era similar ao das células precursoras mesenquimatosas da medula óssea. Identificaram marcadores comuns: CD105, STRO-1 e CD166, usados para identificar células com potencial de diferenciação em múltiplas linhagens, e com consistente expressão nestes dois tipos de células. Também o marcador CD117 apareceu expresso no ensaio para células totipotentes e pluripotentes, incluindo células precursoras embrionárias, hematopoiéticas, da medula óssea e do tecido adiposo. Para além destes marcadores multipotentes, estas células apresentavam semelhanças a nível de outras moléculas, tais como CD29, CD44 e CD49. As células precursoras do tecido adiposo, expressaram elevados níveis de CD54 (ICAM-1) quando comparadas com as células precursoras da medula. O ICAM-1 é um gene que pertence à família das imunoglobulinas e pode ser regulado em resposta a numerosos mediadores inflamatórios e citocinas (Strem *et al.*, 2005).

Num outro estudo efectuado por Hattori e seus colaboradores (2005), foram utilizadas células do estroma derivadas do tecido adiposo, numa matriz artificial, numa implantação ectópica, concluindo-se acerca da sua capacidade para formar osso. Neste estudo, comprovou-se a capacidade de diferenciação osteogénica destas células *in vitro*, através da determinação da secreção de osteocalcina, microscopia electrónica de varrimento e análise histológica. Foi também efectuada uma comparação com as células precursoras do mesênquima derivadas da medula óssea. Fraser e seus colaboradores (2006) também utilizaram células precursoras derivadas do tecido adiposo, numa matriz reabsorvível, num defeito calcárico de murino. Verificou-se que o defeito fechava ao fim de 12 semanas na ordem dos 70-90%, com radiografia-opaca

equivalente a 90% de osso ileso em 8 semanas. Estudos de fluorescência *in situ* e de hibridação nos transplantes demonstraram que 92-99% das células no interior do novo osso eram do dador de origem (adiposas). Mais recentemente, Girolamo e colaboradores (2007) efectuaram um estudo tendo por objectivo a análise do fenótipo de células precursoras derivadas do tecido adiposo e a sua comparação relativamente à diferenciação osteogénica. As células de tecido adiposo recolhidas por lipoaspiração foram enzimaticamente isoladas e cultivadas. Foi obtida uma cultura abundante, tendo-se verificado uma proliferação bastante activa e a eficiente diferenciação na linhagem osteoblástica. Deste modo, os estudos que têm vindo a ser efectuados comprovam a formação de tecido ósseo através da utilização de células mesenquimatosas do tecido adiposo. Contudo, para que ocorra tal diferenciação é necessária a presença de moléculas indutoras osteogénicas.

4. Moléculas Indutoras Osteogénicas: Dexametasona e Purmorfamina

A dexametasona pertence ao grupo dos glucocorticóides sintéticos que são capazes de induzir a diferenciação em células do estroma da medula óssea humana em fenótipo osteoblástico (Cheng *et al.*, 1994; Gronthos *et al.*, 1994; Deliloglu-Gurhan *et al.*, 2006). Resultados similares foram observados em células da medula óssea de rato. Assim, esta molécula apresenta um papel fundamental na indução da proliferação de células com fenótipo osteoblástico em vários sistemas (culturas de células de medula óssea e osso esponjoso - humanas e roedores). Culturas de células ósseas obtidas de explantes de osso alveolar humano, na presença de dexametasona, apresentam níveis elevados de fosfatase alcalina e formação de áreas mineralizadas (Fernandes, 1998). Na ausência deste composto, as culturas referidas apresentam uma actividade de fosfatase alcalina significativamente mais baixa e ausência de mineralização (Fernandes *et al.*, 1995; Fernandes *et al.*, 1997).

Ter Brugge e Jansen (2002) efectuaram um estudo cujo objectivo era investigar o potencial osteogénico de subculturas de células de medula óssea de rato. Foram então cultivados dois tipos de culturas celulares, umas suplementadas com dexametasona, outras sem, sendo posteriormente estudada a diferenciação e expressão osteogénica. Os resultados obtidos corroboraram os de outros estudos anteriores. Quando as células eram cultivadas continuamente

com a presença de dexametasona, as culturas mostravam inicialmente alta expressão da fosfatase alcalina e abundante mineralização. Com as sucessivas passagens, a expressão dos marcadores de diferenciação diminuía. Passados três tempos, não era encontrada actividade de fosfatase alcalina nem calcificação. Em contrapartida, as primeiras células cultivadas sem dexametasona mostravam baixa fosfatase alcalina e sem calcificação, assemelhando-se as células a fibroblastos. Contudo, quando estas células eram subcultivadas na presença de dexametasona, as células mostravam diferenciação osteogénica. No entanto, esta ocorrência era de baixo nível quando as células continuavam a ser cultivadas com dexametasona; não sendo encontrada diferenciação depois da segunda passagem.

Relativamente às células que são cultivadas continuamente com dexametasona, as células da medula óssea de rato perdem o potencial osteogénico depois de várias passagens. Beloti e seus colaboradores (2005a) investigaram o efeito do tratamento contínuo e descontínuo com dexametasona sobre a diferenciação de células de medula óssea humana. Foi efectuada uma cultura de células primária e da primeira passagem foram cultivadas em meio de cultura com e sem dexametasona 10^{-7} M (37°C e 5% CO₂ / 95% ar atmosférico). No 7º, 14º e 21º dia de cultura foram avaliados os seguintes parâmetros: proliferação e viabilidade celulares, conteúdo de proteína total, actividade da fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada. Dos resultados obtidos, verificou-se que a dexametasona não afectou a viabilidade celular, nem o conteúdo de proteína total, mas reduziu o número de células. A actividade da fosfatase alcalina aumentou, bem como, a formação de matriz mineralizada, comparando os grupos nos quais tinha sido administrada dexametasona com os que não tinham sido tratados com a mesma. Estes resultados indicam que, para células mesenquimatosas da medula óssea humana, a presença contínua de dexametasona não parece ser necessária para o desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Contudo, a dexametasona deve estar presente após a primeira passagem para permitir a diferenciação osteoblástica expressa por proliferação celular reduzida e aumento da actividade de fosfatase alcalina e da formação de matriz mineralizada.

Mais recentemente Mikami e colaboradores (2007) examinaram os efeitos desta molécula na formação da mineralização de nódulos ósseos e a expressão genética de marcadores osteoblásticos, sialoproteína óssea, osteocalcina (OC) e osteopontina (OPN) em células ROS17/2.8. Tendo-se verificado que em

tratamentos destas células com dexametasona ocorria indução de mineralização acompanhada de aumento da expressão de sialoproteína óssea e osteocalcina. Neste estudo, não foram observados efeitos ao nível do mRNA, nem da expressão de proteínas por Runx2. Contudo, a actividade de transcrição por Runx2 foi realçada em tratamento com dexametasona, sugerindo-se o seu seguimento para a activação de marcadores genéticos osteoblásticos, tal como as sialoproteínas e a osteocalcina na produção de matrizes ósseas específicas que posteriormente mineralizavam.

Apesar dos conhecidos efeitos da dexametasona como indutor da diferenciação osteoblástica, assim como da interferência da sua concentração e tempo de exposição em culturas de células (Mikiami *et al.*, 2007), têm no entanto, vindo a ser efectuados alguns estudos para averiguar a importância desta molécula como estimuladora da diferenciação de adipócitos. Atmani e seus colaboradores (2003) usaram culturas de células do estroma medular, isoladas dos ossos longos do rato (fémur), para examinar os efeitos do calcitrol e da dexametasona na proliferação e diferenciação de adipócitos e células osteoblásticas. As células do estroma da medula óssea são as células alvo das hormonas esteróides e glucocorticóides. Estas hormonas regulam a proliferação celular osteoblástica, diferenciação e apoptose (Cooper *et al.*, 1999). Neste estudo as células do estroma da medula óssea de rato cresceram no meio suplementado com dexametasona e ácido ascórbico (na primeira cultura), criando populações de células semelhantes a osteoblastos e adipócitos. Verificou-se também que a dexametasona aumentou a síntese de DNA, como demonstrado através da análise resultante da incorporação da timidina ^3H , contudo o calcitrol diminuiu a síntese de DNA e inibiu a estimulação dos efeitos da dexametasona. Tratamentos com hormonas, isoladas ou combinadas com outras, aumentam o número de adipócitos e têm um efeito estimulador na diferenciação de adipócitos. Similarmente, o número de células osteoblásticas, caracterizadas pela actividade da fosfatase alcalina, aumenta na presença de dexametasona, mas diminui com $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, porque bloqueia os efeitos de estimulação da dexametasona. Estes resultados indicam que a dexametasona, em contraste com o calcitrol, estimula a diferenciação osteoblástica, aumentando as duas populações celulares, enquanto que o calcitrol, apenas aumenta a população de adipócitos. Assim sendo, a dexametasona promove a diferenciação de ambas as populações.

Pode então concluir-se que os glucocorticóides promovem a diferenciação de percursos adiposos em células maduras do tecido adiposo para várias espécies, semelhantes ao homem, rato, ratinho, coelho e culturas de células derivadas do estroma da medula óssea. Bem como, estimulam células osteoprogenitoras na proliferação e diferenciação em populações de células osteoblásticas obtidas de rato na fase de proliferação, mas aumentam a diferenciação osteoblástica por marcadores de expressão osteogénica. Assim, foram também efectuados estudos comparando a expressão genética de determinadas células, utilizando como indutores a dexametasona e o ácido β -glicerofosfato, tendo-se verificado que quando as células osteoprogenitoras são expostas a estes compostos em simultâneo, induzem o aumento da expressão genética. No entanto, quando a indução é apenas efectuada com dexametasona, passadas algumas semanas verifica-se um decréscimo da proliferação celular (Titorencu *et al.*, 2003).

Girolamo e seus colaboradores (2007) num estudo mais recente, compararam dois meios de indução osteogénica. Estes meios diferiam na concentração de dexametasona e ácido ascórbico. O meio 1 era constituído por: meio CTRL suplementado com 10mM ácido β -glicerofosfato; 100nM dexametasona e 50 μ M ácido ascórbico-2-fosfato, e o meio 2 era constituído por: meio CTRL suplementado com 10mM ácido β -glicerofosfato; 10nM dexametasona e 150 μ M ácido ascórbico-2-fosfato. A diferenciação celular foi avaliada através da morfologia, expressão da osteopontina, actividade de fosfatase alcalina, e deposição de cálcio. Assim, verificou-se que havia uma maior deposição de cálcio nas culturas onde foi utilizado o meio 2, bem como uma maior actividade de fosfatase alcalina. Também se concluiu que na presença de estímulos adequados, a diferenciação em osteoblastos, através da baixa concentração de dexametasona e aumento da concentração de ácido ascórbico, parecem ser os mais rápidos e melhores indutores osteogénicos (Kim *et al.*, 2003).

Outros estudos têm vindo a ser efectuados com o intuito de averiguar a diferenciação osteogénica a partir de células precursoras derivadas do tecido adiposo, por exemplo identificando o microRNA regulador desta diferenciação (Luzi *et al.*, 2008). Neste estudo, foi analisado o papel do microRNA 26A (miR-26) durante a diferenciação de células precursoras do tecido adiposo. Esta diferenciação foi mais uma vez induzida por tratamento com dexametasona, ácido ascórbico e ácido β -glicerofosfato; tendo a expressão do fenótipo

osteoblástico sido avaliada, através da actividade da fosfatase alcalina, a expressão de genes envolvidos na diferenciação por osteoblásticas por RT-PCR em tempo real e mineralização. A expressão microRNA foi determinada por Northern blot. Deste modo, conclui-se que a propriedade fundamental desta molécula consiste em promover a diferenciação osteoblástica de células progenitoras mesenquimatosas, sendo de uso corrente a utilização da dexametasona, ácido ascórbico e ácido β -glicerofosfato como indutores da diferenciação osteoblástica (Maniatopoulos *et al.*, 1988; Maegawa *et al.*, 2007).

Contudo, outros estudos têm vindo a ser efectuados, no sentido de se encontrarem outras moléculas capazes de promover a diferenciação osteogénica. A purmorfamina é uma pequena molécula, de descoberta relativamente recente, com actividade de indução osteogénica para a multipotência de células progenitoras mesenquimatosas (Wu *et al.*, 2004; Beloti *et al.*, 2005a; Beloti *et al.*, 2005b). A utilização desta molécula em investigações ainda não é muito usual, contudo, já existem alguns estudos efectuados. Wu e seus colaboradores (2002) reportaram uma variedade de combinações heterocíclicas consistindo em aproximadamente 50 mil compostos, com purina, pirimidina, quinazolina, pirazina, ptalazina, e matrizes artificiais baseadas em quinoxalina. Assim, relacionando estruturalmente os compostos, analisaram-se as suas diversas funções biológicas e a sua combinação química, resultando a molécula 2-(1-Naphthoxy)-6-(morpholinoanilino)-9-cyclohexilpurina. A molécula descoberta aumenta a actividade osteogénica de células osteoprogenitoras, sendo capaz de induzir a osteogénese em células progenitoras mesenquimatosas de rato (Wu *et al.*, 2004). Estas células (C3H10T1/2) são multipotentes e têm um potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos, condrócitos e miócitos, sendo usadas como modelos de estudo de diferenciação em osteoblastos.

Este composto com uma substituição morfolinoanilina na posição C6 no núcleo de purina foi designado, purmorfamina (Sinha e Chen, 2006), induz a fosfatase alcalina e a expressão genética Cbfa1/Runx em células C3H10T1/2 com concentração efectiva média (EC50) para 1 μ M. Também induz a osteogénese em pré-osteoblastos (MC3T3-E1) e quando combinada com a BMP-4 pode trans-diferenciar pré-adipócitos e mioblastos em osteoblastos. Estudos recentes indicam que a concentração efectiva média em células C3H10T1/2 pode aumentar cerca de 50%, depois de um tratamento de 4 dias com ALP, quando comparadas com um tratamento de DMSO 1%. A purmorfamina tem uma menor

citotoxicidade em células C3H10T1/2 quando as concentrações aumentam até 20 μ M (Wu *et al.*, 2002).

Ensaio histoquímico da fosfatase alcalina (FA) endógena indicam que mais de 80% das células, são expressas depois do tratamento com purmorfamina (20 μ M por 4 dias), verificando-se que apenas 40% das células tratadas com BMP-4 apresentam ensaios de FA positivos. Apesar do reduzido número de células induzidas pela BMP-4, as induzidas têm um alto nível de expressão de FA comparadas com as células tratadas com purmorfamina. Quando as células C3H10T1/2 são tratadas com BMP, a maioria das células diferencia-se em osteoblastos, no entanto, um significativo número de células também pode ser diferenciado em adipócitos, indicando que a indução da diferenciação da BMP não é numa linhagem específica. Contudo, a purmorfamina induz a maioria da população celular, a obter uma linhagem osteoblástica. Apresentando também um efeito sinérgico com a BMP-4 na indução da diferenciação das células C3H10T1/2. Quando as células são tratadas com ambas (BMP-4 e purmorfamina), a indução da actividade da FA apresenta aproximadamente o triplo do aumento do efeito, relativamente à adição de cada molécula individualmente, sugerindo que a purmorfamina não age de modo análogo à BMP-4 (Wu *et al.*, 2002).

Devido ao complexo processo que é a osteogénese, outras moléculas - Wnt e Hedgehog, podem modular a sua acção (Wu *et al.*, 2004). Outras proteínas como as Wnt, incluindo a Wnt3a, ou as vias de sinalização Hedgehog (semelhantes as Wnt), induzem a expressão de marcadores osteoblásticos, aumentando a selectividade na diferenciação de células mesenquimatosas em linhagens osteoblásticas e a fosfatase alcalina em células C3H10T1/2 (Yuasa *et al.*, 2002).

Também através de uma análise transcripcional por microarrays para células C3H10T1/2 após tratamento com purmorfamina e a proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), verificou-se que a expressão genética nos tratamentos com purmorfamina diferia significativamente dos da BMP-4. Foi encontrado um grupo de genes apenas regulado para tratamentos com purmorfamina, revelando que a via de sinalização Hedgehog é activada por esse mesmo tratamento. Bem como, foi detectada através da análise por RT-PCR a expressão dos genes Gli 1 e Patched. Além disso, a purmorfamina bloqueia completamente a osteogénese em antagonistas da via de sinalização Hedgehog,

ciclopaminas e forskolin, e induz a transcrição mediada por Gli (Wu *et al.*, 2004).

É de salientar que tratamentos com purmorfamina estimulam a proliferação celular em estados iniciais. Atingindo a confluência, a proliferação cessa e inicia-se a diferenciação em osteoblastos. Passados cerca de 2 dias após tratamento com purmorfamina existem muitos genes de osteogénese regulados, incluindo a essencial transcrição osteogénica do factor *Cbfa1/Runx2* e outros marcadores genéticos osteoblásticos incluindo a fosfatase alcalina e a osteomodulina. O tratamento com purmorfamina também aboliu a adipogénese espontânea das células C3H10T1/2. Consistente com a observação os genes envolvidos na adipogénese, incluindo a alipoproteína E, adiponectina/Acrp30, lipoproteína lipase e proteínas relacionadas com a diferenciação adiposa, baixam a regulação depois de 24 horas com tratamento de purmorfamina (Wu *et al.*, 2004). Assim como, o tratamento com a proteína morfogenética óssea-4 (BMP-4) induz a proliferação celular em estados iniciais. Contudo, a purmorfamina não induz a expressão genética dos mesmos genes, sugerindo que esta molécula tem uma actividade biológica distinta em células C3H10T1/2 relativamente à proteína morfogenética óssea. A purmorfamina também induz a osteogénese em pré-adipócitos (MC3T3-E1) e quando combinadas com a proteína BMP-4 pode trans-diferenciar pré-adipócitos (3T3-L1) e mioblastos (C2C12) em osteoblastos (Wu *et al.*, 2002).

Estudos recentes têm vindo a ser efectuados para descobrir a importância desta nova molécula, da qual pouco se conhece. Beloti e seus colaboradores (2005a) também efectuaram um estudo cujo objectivo era investigar a indução da actividade osteogénica com purmorfamina na diferenciação de osteoblastos humanos a partir de células mesenquimatosas da medula óssea. Tendo concluído que a purmorfamina não afectava a proliferação celular ou viabilidade, mas aumentava a actividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos semelhantes ao osso após 21 dias de cultivo. Do mesmo modo, Sinha e Chen (2006) também se debruçaram sobre o estudo deste composto relativamente ao seu efeito nas células Shh-LIGHT2 e a sua relação com a actividade da proteína transmembranar Patched1. Concluindo-se que a purmorfamina activa a via de sinalização Hedgehog e afecta a diferenciação osteoblástica. Assim sendo, a pesquisa desta nova molécula tem como intuito estudar mecanismos moleculares de diferenciação celular, e conduzir a sua

utilização em novas terapias de regulação, nomeadamente, do crescimento ósseo ou doenças relacionadas com o osso.

III - Objectivos

Estudar o padrão de proliferação e diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas isoladas de tecido adiposo de rato na presença de dexametasona, substância osteoindutora utilizada por rotina em vários modelos celulares, e da purmorfamina, composto recente que parece estimular a diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas multipotentes e, também, de células da linhagem osteoblástica. O comportamento celular foi estudado pela avaliação da viabilidade/proliferação celular e de parâmetros de diferenciação osteoblástica, nomeadamente a actividade da fosfatase alcalina e a capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. Foram utilizados métodos bioquímicos e histoquímicos e observação das culturas por microscopia de luz e microscopia electrónica de varrimento.

IV - Material e Métodos

1. Obtenção das culturas celulares

As culturas de células mesenquimatosas foram estabelecidas a partir de tecido adiposo de rato adulto Wistar com 2 meses e massa aproximada de 250g, utilizando métodos descritos na literatura (Dicker *et al.*, 2005). Foram observadas as normas estabelecidas relativamente à experimentação animal (NIH) e seguidos os procedimentos necessários e recomendados para a manipulação de tecidos biológicos.

Os animais foram anestesiados e o tecido adiposo obtido da região subcutânea foi submetido ao seguinte protocolo experimental, para obtenção da cultura primária:

- Lavagem com PBS ("Phosphate Buffered Saline") e, seguidamente, com meio de cultura (α -minimal essential medium, α -MEM), contendo 300 UI/ml de penicilina e 300 μ g/ml de estreptomicina, para descontaminação do material biológico;

- Fraccionamento do tecido adiposo e digestão numa solução de colagenase tipo I (0,075% em PBS) durante 1 h, a 37°C, com agitação moderada. Bloqueio da actividade enzimática pela adição de meio de cultura, contendo 10% de soro bovino fetal;
- Centrifugação da suspensão celular (300 g, 10 min);
- Lavagem do "pellet" celular com PBS e centrifugação (300 g, 10 min);
- Ressuspensão do "pellet" celular no seguinte meio de cultura: α -MEM, 10% soro bovino fetal, 100 UI/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina, 2.5 μ g/ml anfotericina B e 50 μ g/ml ácido ascórbico;
- Cultura da suspensão celular, 37°C, estufa de 5% CO₂/ar;
- Lavagem da cultura com PBS no dia seguinte, para remoção das células em suspensão;
- Mudança do meio de cultura, 2 vezes por semana;
- Cultura das células aderentes à placa até 70–80% de confluência.

As células mesenquimatosas foram isoladas da suspensão celular obtida por digestão proteolítica do tecido adiposo devido à sua capacidade de adesão à superfície da placa de cultura. As células aderentes apresentaram elevada taxa de proliferação celular, observando-se 70–80% de confluência após 5-6 dias de cultura. Nesta fase, as células foram libertadas enzimaticamente (tratamento com uma solução de 0,04% tripsina em 0,25% EDTA, 5 min) e subcultivadas a uma densidade celular de 10⁴ células/cm² – 1ª subcultura - em condições semelhantes às utilizadas na obtenção da cultura primária.

A 1ª subcultura foi mantida até próximo da confluência (70–80%, 7 dias) e as células submetidas a nova passagem (tratamento com uma solução de 0,04% tripsina em 0,25% EDTA, 5 min) para a obtenção da 2ª subcultura.

2. Efeito da Dexametasona e da Purmorfamina no comportamento celular

A 2ª subcultura, obtida nas condições descritas na secção anterior, foi utilizada para a realização de duas experiências:

- Experiência 1: Comportamento de proliferação e diferenciação osteoblástica de culturas estabelecidas com uma densidade celular de 5x10³ células/cm²

- Experiência 2: Comportamento de proliferação e diferenciação osteoblástica de culturas estabelecidas com uma densidade celular de 10^4 células/cm²

Em ambas as situações, as culturas foram mantidas por 21 dias no meio de cultura descrito na secção anterior, em estufa de 5% CO₂/ar, 37°C, e nas seguintes condições experimentais:

- a) ácido ascórbico 50 µg/ml; (AA)
- b) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM; (AA+βGP)
- c) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + dexametasona 10 nM; (AA+βGP+Dex)
- d) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + purmorfamina 1µM; (AA+βGP+P1)
- e) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + purmorfamina 2µM; (AA+βGP+P2)
- f) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + purmorfamina 3µM; (AA+βGP+P3)
- g) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + dexametasona 10 nM + purmorfamina 1 µM; (AA+βGP+Dex+P1)
- h) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + dexametasona 10 nM + purmorfamina 2 µM; (AA+βGP+Dex+P2)
- i) ácido ascórbico 50 µg/ml + β-glicerofosfato 10 mM + dexametasona 10 nM + purmorfamina 3 µM; (AA+βGP+Dex+P3)

O comportamento celular foi analisado ao longo dos 21 dias de cultura relativamente ao padrão de proliferação celular, morfologia celular, viabilidade/proliferação celular, conteúdo em proteína total e parâmetros de expressão osteoblástica, nomeadamente síntese de fosfatase alcalina e capacidade de formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz celular.

A Figura 2 resume o procedimento experimental utilizado.

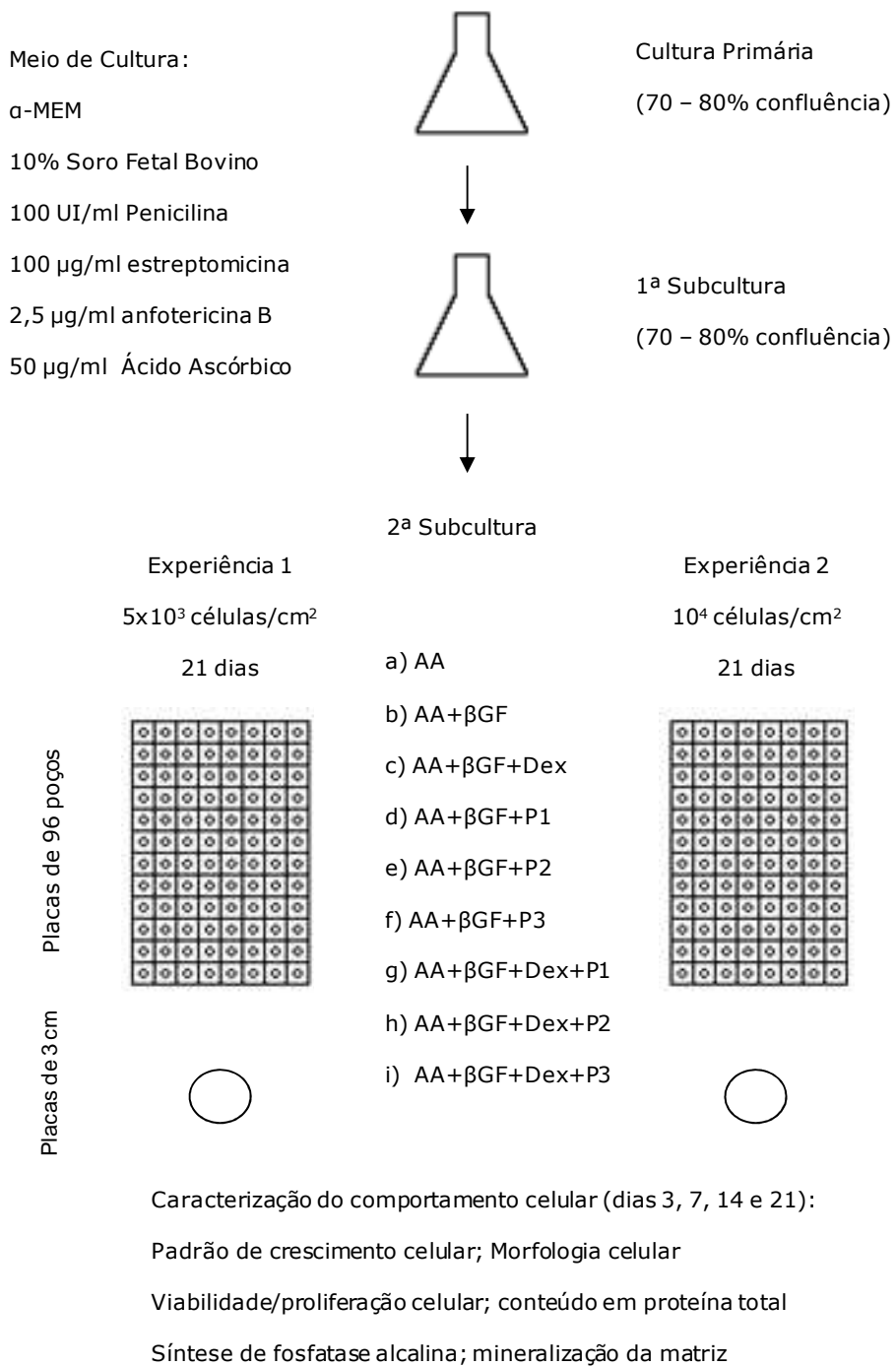


Figura 2. Representação esquemática do protocolo experimental.

3. Caracterização do comportamento celular

As culturas celulares efectuadas nas condições descritas na secção anterior foram caracterizadas ao longo do tempo de cultura (3, 7, 14 e 21 dias) relativamente aos seguintes parâmetros:

- Padrão de proliferação celular; Morfologia celular
- Viabilidade/Proliferação celular
 - Ensaio do MTT
- Proteína total
- Parâmetros de diferenciação osteoblástica
 - Síntese de fosfatase alcalina
 - Mineralização da matriz

A avaliação destes parâmetros foi efectuada por métodos bioquímicos e histoquímicos e observação das culturas por microscopia de luz e microscopia electrónica de varrimento, utilizando uma metodologia bem estabelecida (Coelho e Fernandes, 2000).

3.1 Avaliação Bioquímica

- Viabilidade/Proliferação celular

A proliferação/viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT que se baseia na redução do sal de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado. Nos dias seleccionados para avaliação (dias 3, 7, 14 e 21), as culturas foram incubadas com 5 mg/ml de MTT durante 4 h, a 37°C, em estufa de 5% CO₂/ar. Durante este período, o MTT é incorporado nas células viáveis (células metabolicamente activas) e reduzido com formação de cristais de formazam que se acumulam no citoplasma. Após dissolução dos cristais com DMSO (dimetilsulfóxido), a absorvância (A) da solução foi determinada a 600 nm num leitor ELISA (Denley, modelo Wellscan WS 050).

- Proteína total

O conteúdo em proteína total da camada celular foi avaliado pelo método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), nos dias 3, 7, 14 e 21. Este método baseia-se na reacção do reagente de Folin-Ciocalteu com os aminoácidos

aromáticos (tirosina e fenilalanina), com formação de um produto corado que é medido por espectrofotometria.

Após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com tampão PBS e incubadas com NaOH 0,1 M durante 1 h a 37°C. Seguidamente, foram tratadas durante 10 min com uma solução alcalina de cobre (solução de 0,01 g/ml tartarato de sódio e 0,005 g/ml $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ em água destilada com 1 gota de H_2SO_4 concentrado, adicionada à solução de 20 g/l Na_2CO_3 em NaOH 0,1 M, numa proporção de 1:9). Adicionou-se depois reagente de fenol (reagente de Folin-Ciocalteu diluído em água destilada, 1:1) durante 1 h. A reacção deu origem à formação de um produto de cor azul que foi doseado a 750 nm (espectrofotómetro de fluxo contínuo JENWAY 6405), relativamente a uma curva padrão de albumina sérica bovina. Os resultados foram expressos em μg de proteína total.

- Actividade de fosfatase alcalina

A actividade da fosfatase alcalina foi avaliada pela hidrólise do p-nitrofenilfosfato dissódico pela fosfatase alcalina e determinação do p-nitrofenol formado por espectrofotometria.

Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com tampão PBS e submetidas a lise com triton X-100 a 0,1%. Seguidamente, adicionou-se o substrato (solução de p-nitrofenilfosfato 25 mM em tampão alcalino, pH 10,3) e incubou-se a 37°C durante 60 min. A reacção foi interrompida pela adição de NaOH 5 M. A absorvância foi determinada a 405 nm num leitor ELISA (Denley, Modelo Wellscan WS 050) e comparada com os valores obtidos numa série de soluções padrão de p-nitrofenol. Os resultados foram expressos em nanomoles de p-nitrofenol produzido por hora e por micrograma de proteína (nmol/h. μg proteína).

3.2 Avaliação Histoquímica

- Coloração com Hematoxilina-Eosina

As culturas foram fixadas com glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,14 M, durante 10 min e, seguidamente, submetidas à coloração hematoxilina/eosina: reacção com uma solução de hematoxilina durante 4 min, lavagem sob água corrente durante 10 min, reacção com uma solução de eosina durante 30 s, e lavagem com álcool absoluto.

- Coloração para a presença de fosfatase alcalina

As culturas celulares foram coradas histoquimicamente para a presença de fosfatase alcalina. O método utilizado baseou-se na hidrólise do naftilfosfato de sódio pela fosfatase alcalina e precipitação do fosfato libertado por reacção com um sal diazónico, dando origem à formação de um produto corado. A reacção positiva é identificada por uma coloração amarela, castanha ou preta de acordo com a quantidade da enzima.

As culturas fixadas (glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,14 M, 10 min) foram mantidas durante 1 h no escuro com uma solução preparada em tampão Tris 0,1 M, pH 10, contendo 2 mg/ml de naftilfosfato de sódio e 2 mg/ml de "fast blue RR salt". A reacção foi interrompida por lavagem das amostras com água destilada.

- Coloração para a presença de depósitos de fosfato

Os depósitos de fosfato presentes na matriz foram identificados pelo método de von Kossa (McGee-Russell, 1958). Os depósitos de fosfato de cálcio dão origem a fosfato de prata por reacção com o nitrato de prata, que é posteriormente reduzido pela radiação UV, com formação de prata metálica. A reacção positiva traduz-se no aparecimento de depósitos negros na camada celular.

Após fixação (glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,14 M, 10 min), as culturas foram cobertas com uma solução de nitrato de prata a 1% e submetidas a radiação UV durante 1 h (lâmpada UV, VILBER LOURMAT, modelo VL 4L). Depois de lavadas com água destilada, foram recobertas com uma solução de tiosulfato de sódio a 5%, durante 2 min, sendo novamente lavadas com água destilada.

3.3 Microscopia de luz

As culturas celulares – durante o período de cultura e após fixação e coloração histoquímica – foram observadas por microscopia de luz (Microscópio Nikon TMC) para avaliação da morfologia celular, padrão de crescimento celular e controlo qualitativo da proliferação celular e expressão de parâmetros osteoblásticos (presença de fosfatase alcalina; formação de depósitos de fosfato de cálcio na matriz).

3.4 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento foi utilizada para estudar a superfície das culturas celulares, permitindo obter informação sobre a morfologia celular, o aspecto da matriz extracelular, o padrão de crescimento celular e a presença de depósitos mineralizados de fosfato de cálcio na matriz. Este método utiliza o “varrimento” de um feixe de electrões sobre a amostra originando imagens da superfície, por emissão de electrões a partir da amostra. A associação com espectroscopia de raios X permite efectuar uma análise química da amostra.

As culturas foram fixadas com glutaraldeído 1,5% em tampão cacodilato de sódio 0,14 M, durante 10 min. Seguidamente foram desidratadas com álcool etílico de graduação crescente (70, 80, 90 e 100%), submetidas a secagem por ponto crítico de CO₂ e montadas em suportes adequados. Foram cobertas com um filme de ouro, observadas num microscópio electrónico de varrimento (Jeol JSM 6310F) e analisadas por espectroscopia de raios X (Voyager XRMA System, Norn Instruments).

4. Análise estatística

Foram efectuadas quatro experiências independentes, sendo as culturas celulares estabelecidas a partir de material biológico proveniente de animais diferentes. Em cada experiência, foram efectuadas 6 réplicas nos ensaios bioquímicos e três réplicas nos ensaios qualitativos.

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo método ANOVA. As diferenças observadas entre as culturas controlo (AA+βGP) e as culturas efectuadas nas diferentes condições experimentais foram determinadas pelo método de Bonferroni, em que os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

V - Resultados

Apresentam-se os resultados relativos à capacidade de diferenciação osteoblástica de culturas de células mesenquimatosas isoladas de tecido adiposo de rato. As culturas efectuadas na presença de AA+βGP foram consideradas como situação controlo. A dexametasona e a purmorfamina, isoladamente ou em combinação, foram utilizadas como indutores do fenótipo osteoblástico (Wu *et al.*, 2002; Tholpady *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2004; Beloti *et al.*, 2005a; Beloti *et al.*, 2005b; Shen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006; Sinha e Chen, 2006; Deng *et al.*, 2008).

O estudo foi efectuado na 2ª subcultura, em culturas estabelecidas com uma densidade celular de 5×10^3 células/cm² e 10^4 células/cm² e mantidas por 21 dias. As culturas foram avaliadas ao longo do tempo de incubação, relativamente ao padrão de crescimento celular, morfologia celular, viabilidade/proliferação celular e parâmetros de diferenciação osteoblástica (síntese de fosfatase alcalina e formação de uma matriz mineralizada).

1. Comportamento das culturas estabelecidas com uma densidade de 5×10^3 células/cm²

1.1 Padrão de crescimento celular

As Figuras 3-5 mostram o padrão de crescimento celular das culturas efectuadas nas situações experimentais estudadas: AA, AA+βGP, AA+βGP+Dex, AA+βGP+P1, AA+βGP+P2, AA+βGP+P3, AA+βGP+Dex+P1, AA+βGP+Dex+P2 e AA+βGP+Dex+P3.

Observou-se um aumento gradual da camada celular com o tempo de incubação, em todas as situações, mas com diferenças significativas relativamente ao padrão de proliferação e número de células. As culturas efectuadas na presença de AA e AA+βGP apresentaram uma proliferação celular elevada e uniforme ao longo do tempo. Na presença de AA+βGP+Dex, as culturas mostraram menor taxa de proliferação e evidenciaram a formação de agrupamentos celulares distribuídos pela placa de cultura, logo desde os primeiros dias. As culturas tratadas com purmorfamina, nas concentrações 1, 2 e 3 μM (AA+βGP+P) apresentaram elevada proliferação e tendência para

formação de agrupamentos celulares a partir da 2ª semana, no entanto com aspecto diferente dos observados nas culturas tratadas com dexametasona. As culturas efectuadas na presença simultânea de dexametasona e purmorfamina (AA+βGP+Dex+P) apresentaram um crescimento modesto, quando comparadas com as outras situações experimentais, tendo também evidenciado tendência para formação de agrupamentos celulares.

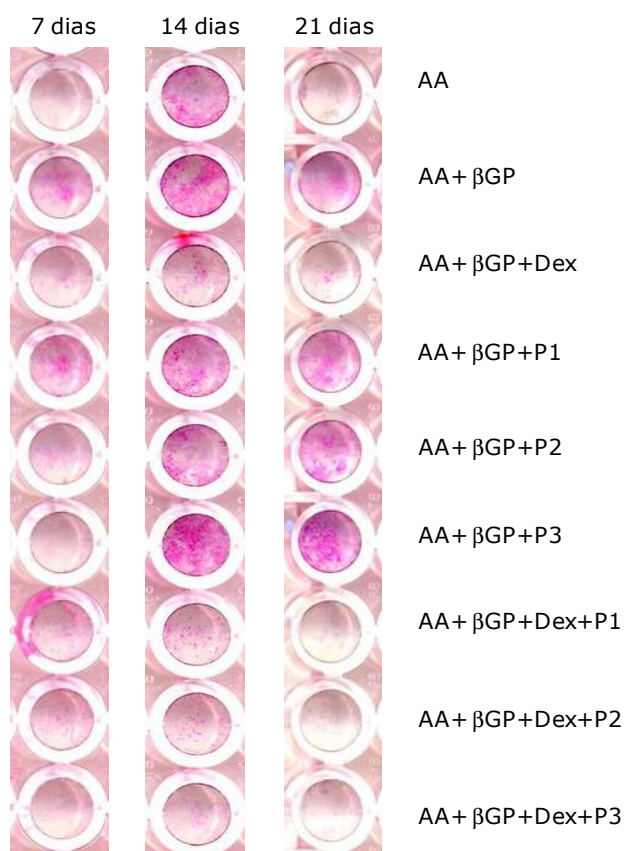


Figura 3. Aspecto macroscópico das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais, dias 7, 14 e 21. Coloração com hematoxilina-eosina.

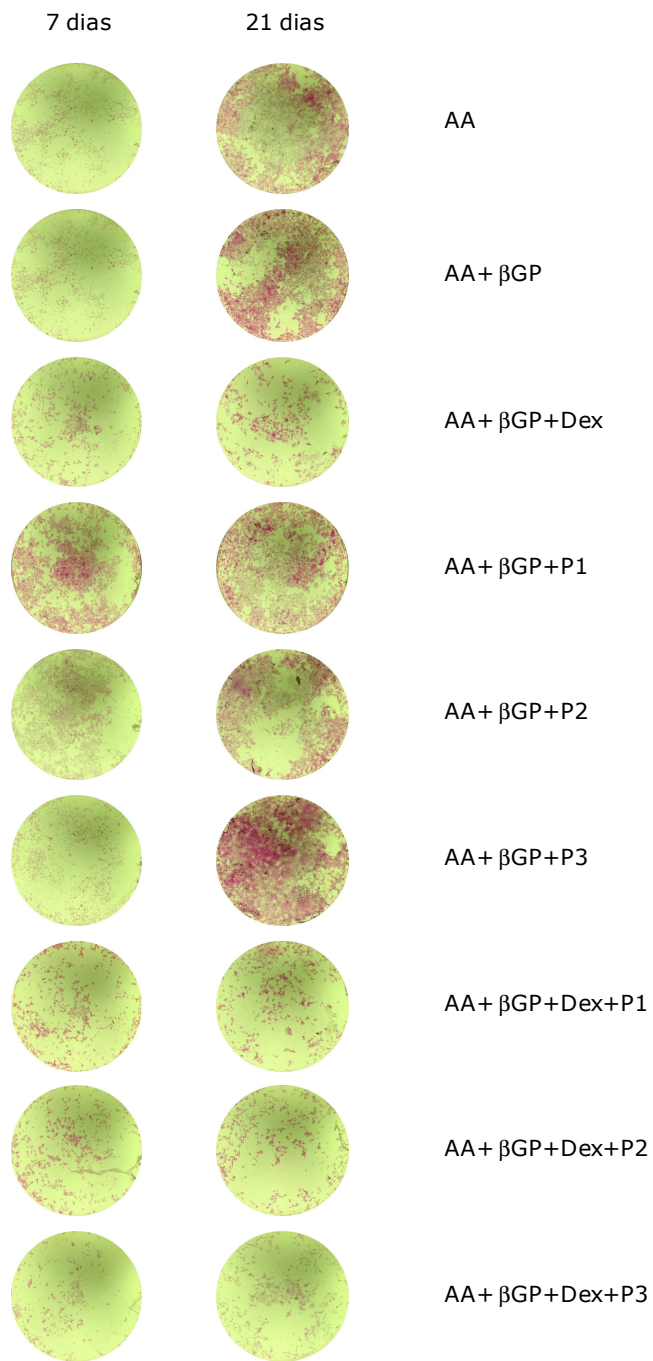


Figura 4. Padrão de crescimento das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais, dias 7 e 21. Coloração com hematoxilina-eosina. Lupa, ampliação, x6.8.

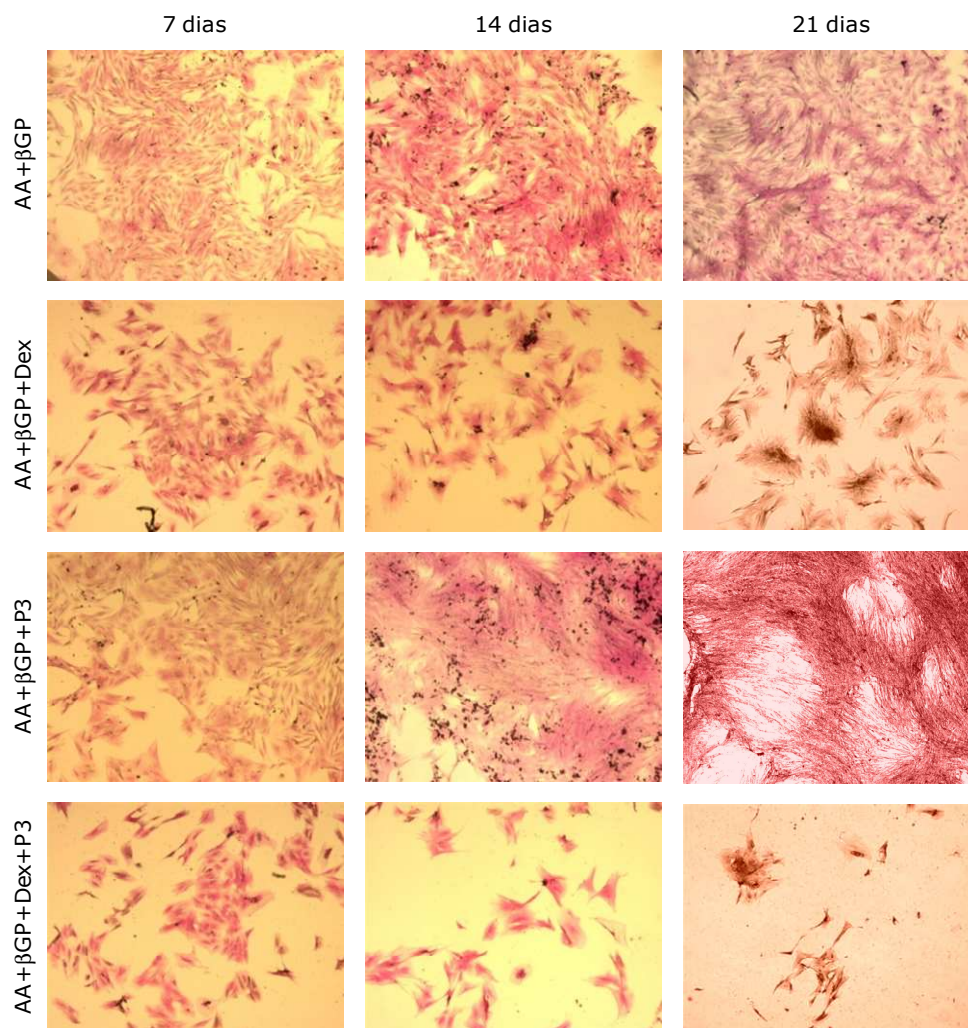


Figura 5. Padrão de crescimento das culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas, dias 7, 14 e 21. Coloração com hematoxilina-eosina. Microscopia de luz, x50.

1.2 Morfologia celular

A Figura 6 mostra imagens de microscopia electrónica de varrimento das culturas celulares com 21 dias, para caracterização da morfologia celular.

As culturas efectuadas na presença de AA+ β GP apresentaram uma camada uniforme de células alongadas que cobria toda a superfície de cultura. Mostraram também a presença de células de pequenas dimensões de morfologia semelhante à das células neuroniais/osteócitos em algumas zonas da cultura. Estas células formavam uma espécie de rede que, em alguns locais, estava sobreposta à camada de células de maiores dimensões que cobria a superfície de cultura.

Nas culturas suplementadas com dexametasona (AA+ β GP+Dex e AA+ β GP+Dex+P), observou-se a formação de agrupamentos de células alongadas dispersos pela placa de cultura, não se observando a presença de células tipo "neuronal"/"osteócito". Nestas culturas, verificou-se uma alteração gradual da morfologia celular e, no dia 21, observaram-se zonas de extensa rugosidade celular.

As culturas tratadas com purmorfamina, nas concentrações de 1, 2 e 3 μ M (AA+ β GP+P) mostraram uma camada de células alongadas que cobria a placa de cultura e se organizava em zonas de maior densidade. Mostravam também uma rede extensa de células de pequenas dimensões e morfologia tipo "neuronal"/"osteócito" que cobria toda a cultura. A observação das culturas a uma grande ampliação sugeriu uma estreita inter-relação entre os dois tipos celulares.

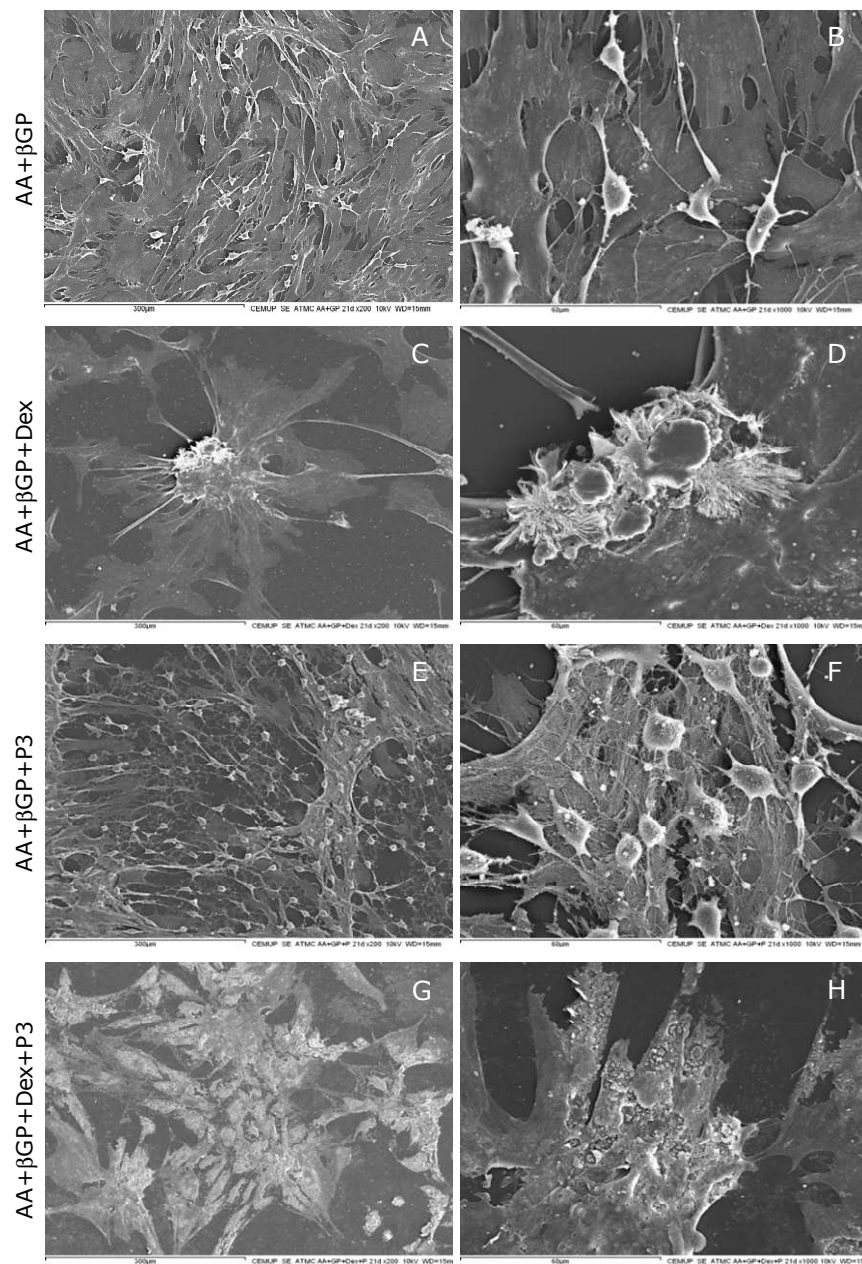


Figura 6. Morfologia celular de culturas efectuadas em situações experimentais representativas: AA+βGP, AA+βGP+Dex, AA+βGP+P3 e AA+βGP+Dex+P3, dia 21. Microscopia electrónica de varrimento. A, C, E, G: x200; B, D, F, H: x1000.

1.3 Viabilidade/Proliferação Celular

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. A Figura 7A apresenta o efeito da dexametasona e da purmorfamina na proliferação celular e a Figura 7B os resultados relativos ao efeito simultâneo dos dois indutores.

Na situação controlo (AA+ β GP), observou-se um aumento da proliferação celular com o tempo de cultura. As culturas tratadas com AA+ β GP+Dex apresentaram valores muito baixos no ensaio do MTT, significativamente menores que no controlo. Na presença de purmorfamina, observou-se um crescimento acentuado, principalmente na presença de 3 μ M (AA+ β GP+P3). As culturas suplementadas com as duas substâncias indutoras, Figura 7B, apresentaram valores muito baixos de proliferação celular.

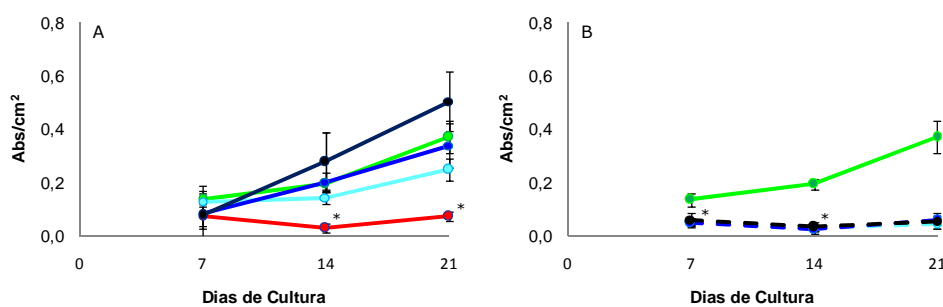


Figura 7. Viabilidade/Proliferação celular (ensaio do MTT) das culturas efectuadas nas diferentes condições experimentais. A: AA+ β GP (—, situação controlo); AA+ β GP+Dex (—); AA+ β GP+P1 (—); AA+ β GP+P2 (—) e AA+ β GP+P3 (—). B: AA+ β GP (—, situação controlo); AA+ β GP+Dex+P1 (---); AA+ β GP+Dex+P2 (---) e AA+ β GP+Dex+P3 (---). *Significativamente diferente da situação AA+ β GP.

1.4 Síntese de Fosfatase Alcalina

As culturas celulares apresentaram uma reacção histoquímica positiva para a presença de fosfatase alcalina cuja intensidade aumentou significativamente do dia 14 para o dia 21, Figura 8.

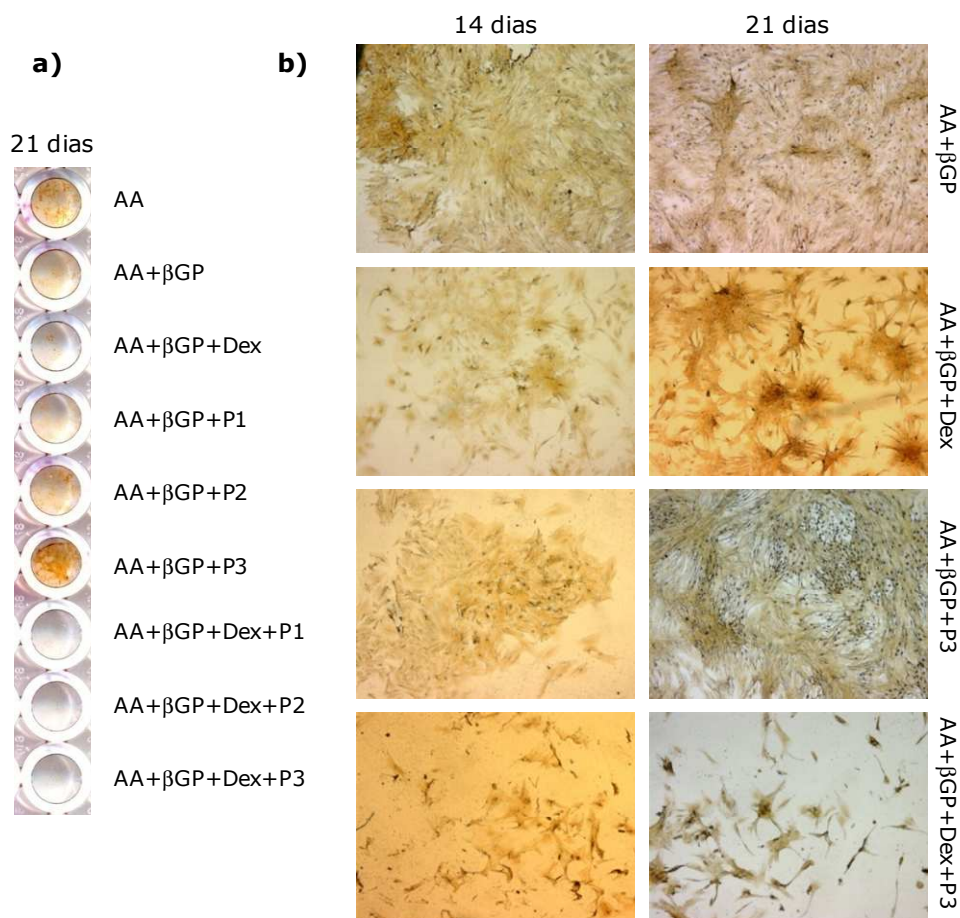


Figura 8. Culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais. Reacção histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. a) Aspecto macroscópico, no dia 21; b) Microscopia de luz, x50, dias 14 e 21.

As culturas tratadas com AA+βGP apresentaram uma coloração relativamente uniforme, embora com a presença de zonas mais coradas. As culturas suplementadas com AA+βGP+Dex mostraram zonas de elevada intensidade de coloração associadas com os agrupamentos celulares. Na presença de purmorfamina, a reacção também foi mais intensa nas zonas de

maior densidade celular. As culturas tratadas simultaneamente com dexametasona e purmorfamina apresentaram uma reacção positiva de elevada intensidade nos pequenos agrupamentos presentes na placa de cultura.

A Figura 9 mostra o aspecto de culturas celulares representativas das várias situações a uma ampliação mais elevada, 200x.

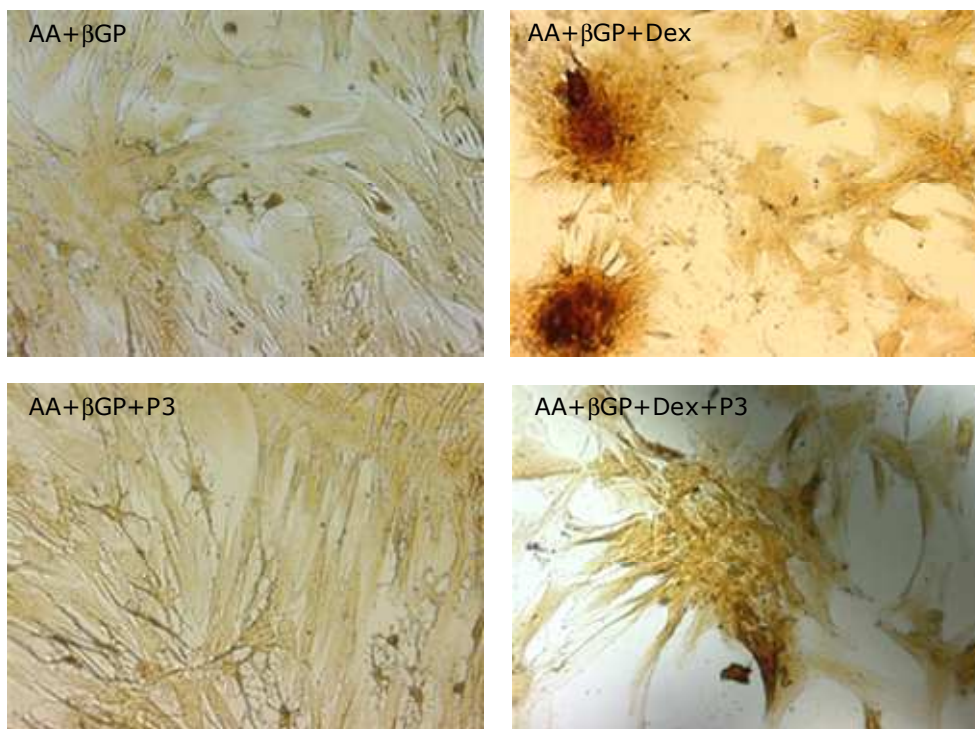


Figura 9. Culturas efectuadas em situações experimentais representativas: AA+βGP (controlo), AA+βGF+Dex, AA+βGP+P3 e AA+βGP+Dex+P3, dia 21. Reacção histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. Microscopia de luz, x200.

1.5 Formação de depósitos mineralizados na matriz

A presença de depósitos mineralizados de fosfato de cálcio na matriz celular foi avaliada histoquimicamente pela reacção de von Kossa (Figura 10) e observação por microscopia electrónica de varrimento com análise por espectroscopia de raios X (Figuras 11-14).

As culturas efectuadas na presença de AA+ β GP apresentaram reacção de von Kossa negativa e a ausência de áreas mineralizadas foi confirmada por microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia de raios X.

O tratamento com dexametasona resultou na formação de zonas nodulares associadas, algumas delas, a reacção de von Kossa positiva. A observação por microscopia electrónica de varrimento mostrou que estas estruturas correspondiam a zonas com uma morfologia celular característica, nomeadamente extensa rugosidade celular. Algumas das zonas nodulares apresentavam por vezes a presença de depósitos de cálcio e, também, de depósitos de fosfato de cálcio. No entanto, a maioria não mostrou qualquer conteúdo mineral na espectroscopia de raios X.

As culturas suplementadas com purmorfamina apresentaram uma organização da camada celular característica, com a formação de zonas de maior densidade celular, que mostraram, no geral, reacção de von Kossa negativa. Foram também visíveis algumas zonas pontuais que, aparentemente, apresentaram reacção de von Kossa positiva. A observação destas culturas por microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia de raios X mostrou pontualmente a presença de cálcio.

Na presença simultânea de dexametasona e purmorfamina, as culturas apresentaram agrupamentos celulares de pequenas dimensões em que foi notória uma intensa alteração da morfologia celular. A análise destas formações revelou ausência de depósitos minerais.

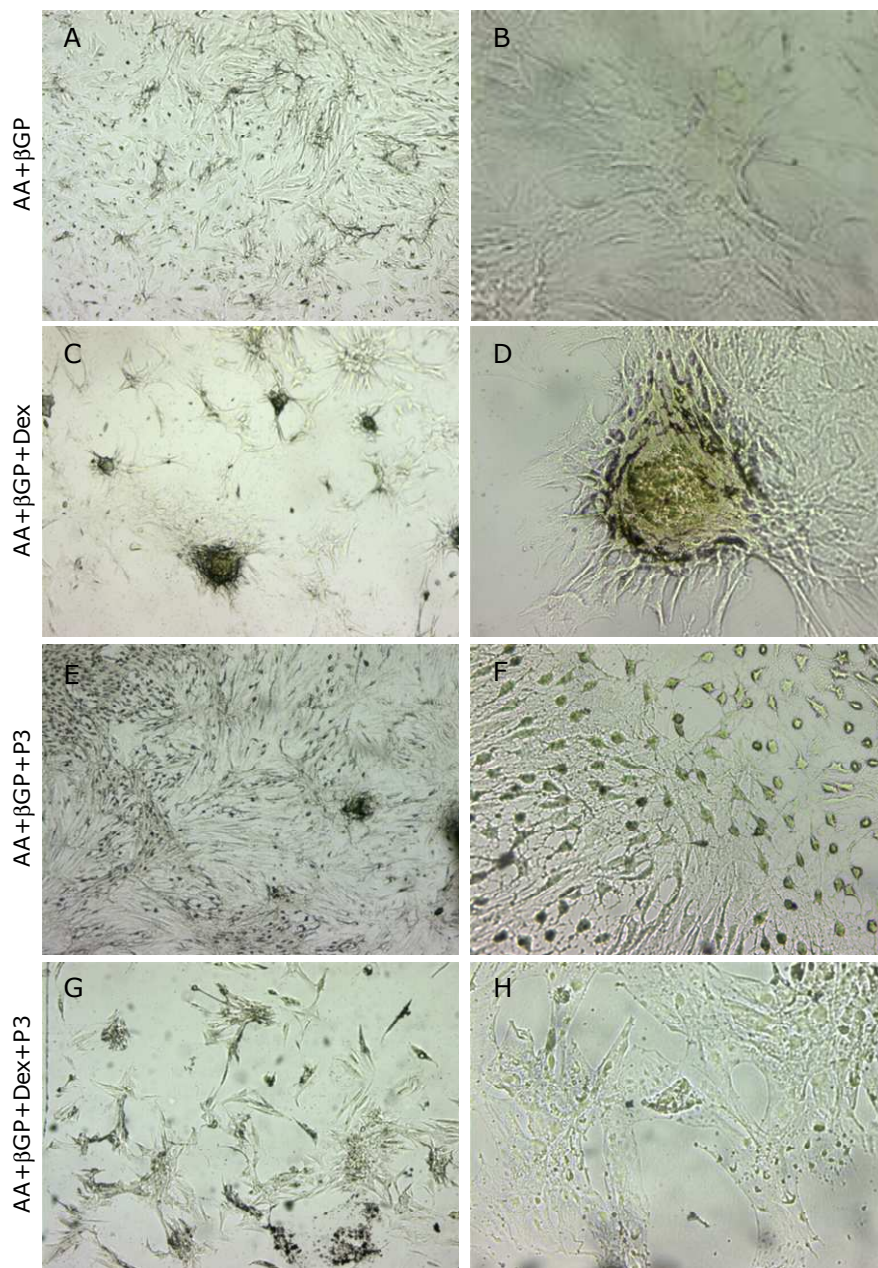


Figura 10. Culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas: AA+βGP (contolo), AA+βGP+Dex, AA+βGP+P3 e AA+βGP+Dex+P3, dia 21. Reacção de von Kossa. Microscopia de luz. A, C, E, G: ampliação 50x; B, D, F, H: ampliação x200.

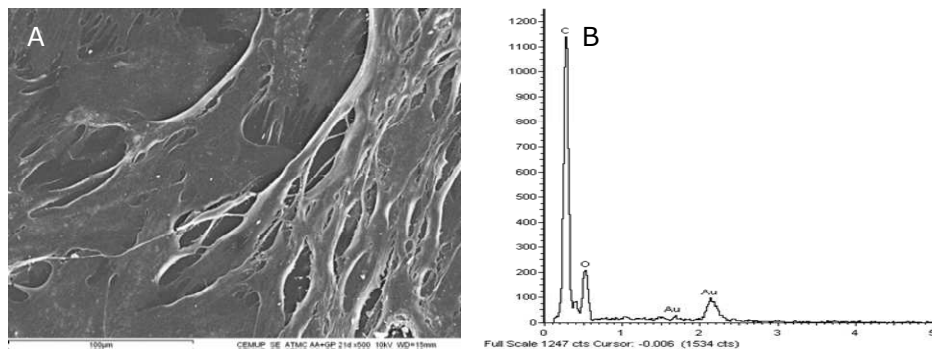


Figura 11. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP (controlo), dia 21. Microscopia electrónica de varrimento (A, x500); B: espectro de difracção de raios X.

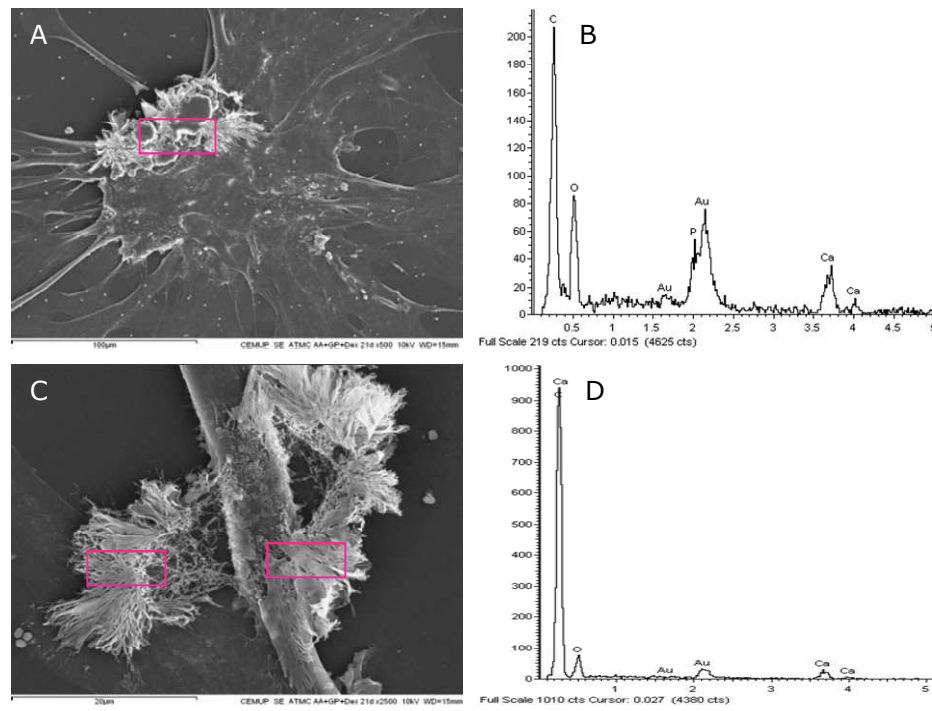


Figura 12. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP+Dex, dia 21. Microscopia electrónica de varrimento (A, x500; C, x2500); B e D: espectros de difracção de raios X.

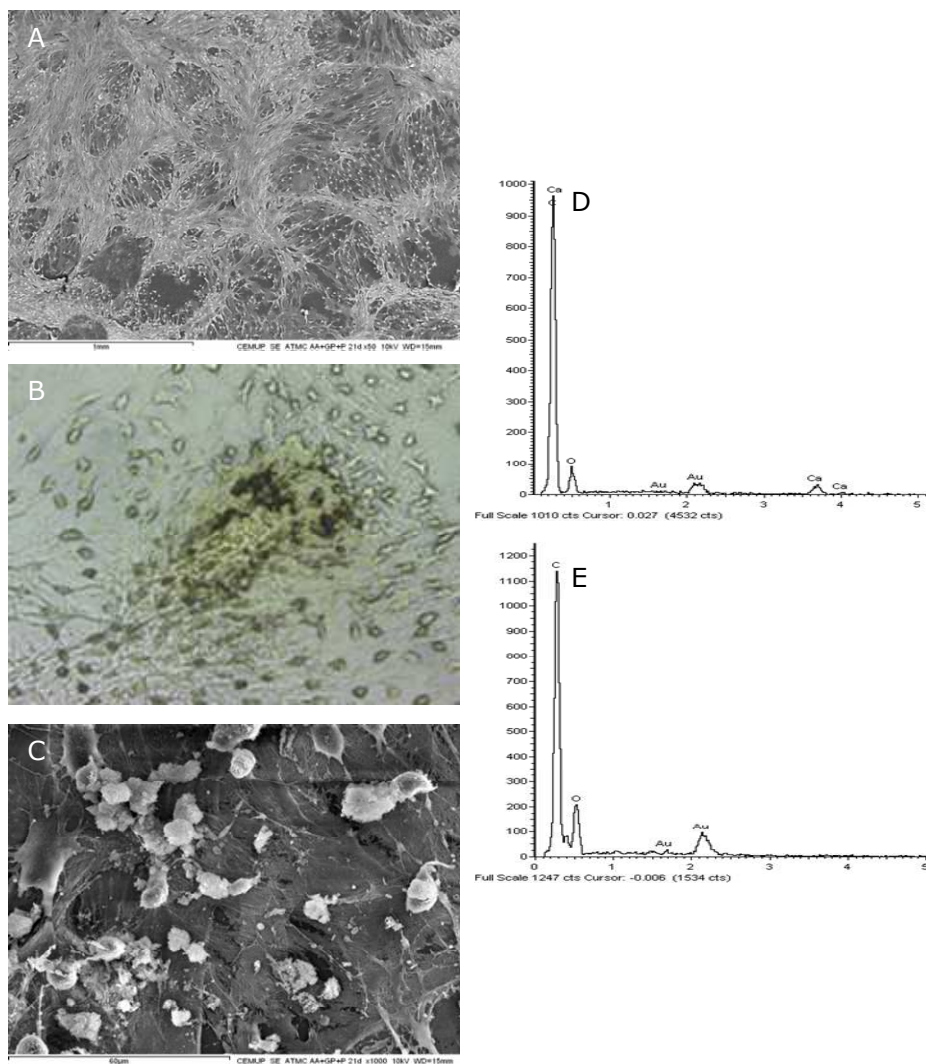


Figura 13. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+P3, dia 21. A e C: microscopia electrónica de varrimento (A, x50; C, x1000); B: reacção de von Kossa (x200); D e E: espectros de difracção de raios X.

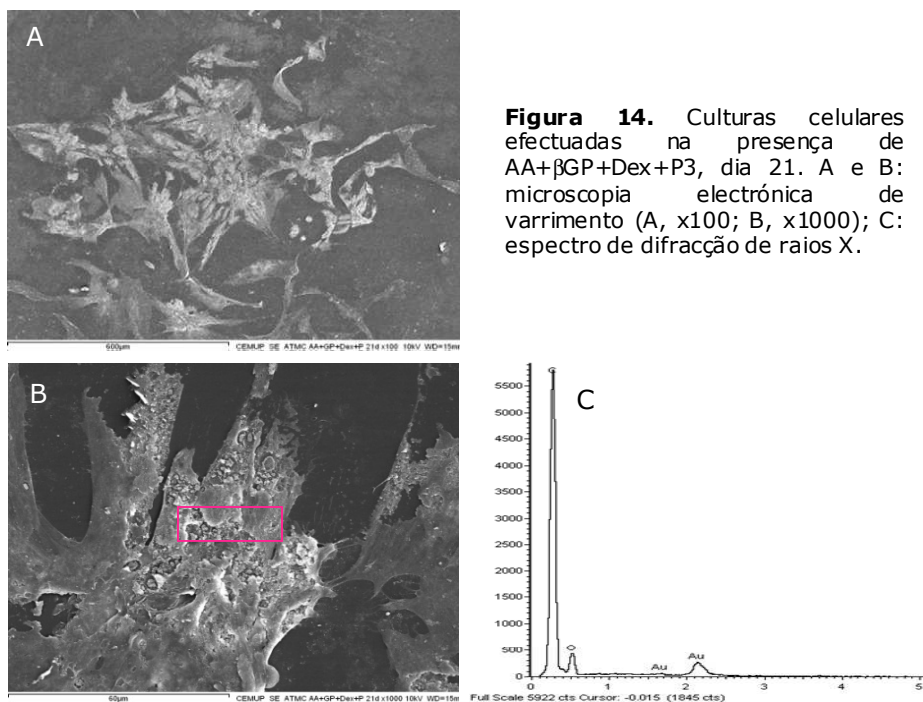


Figura 14. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+βGP+Dex+P3, dia 21. A e B: microscopia electrónica de varrimento (A, x100; B, x1000); C: espectro de difracção de raios X.

2. Comportamento das culturas estabelecidas com uma densidade de 10^4 células/cm²

2.1 Padrão de proliferação celular. Morfologia celular

As culturas celulares estabelecidas com uma densidade de 10^4 células/cm² apresentaram um comportamento semelhante ao descrito na secção anterior relativo às culturas iniciadas com uma densidade de 5×10^3 células/cm².

Relativamente ao padrão de crescimento celular, as características mais significativas foram as seguintes: proliferação uniforme na presença de AA+βGP (situação controlo), organização da camada celular em agrupamentos nas culturas suplementadas com dexametasona ou purmorfamina (embora com aspecto diferente) e formação de pequenos agregados celulares dispersos na placa nas culturas tratadas simultaneamente com dexametasona e purmorfamina. Estes resultados mostram-se na Figura 15.

Relativamente à morfologia celular, Figura 16, observou-se a presença de células alongadas em todas as situações experimentais, que gradualmente evoluíram para uma forma mais tetraédrica. As culturas suplementadas com purmorfamina apresentaram também a presença de uma rede extensa de células tipo "neuronal"/"osteócito" que cobria praticamente toda a cultura. Estas células também se observaram nas culturas controlo (AA+βGP), embora em pequeno número, mas não foram visíveis nas culturas tratadas com dexametasona, isoladamente ou em combinação com a purmorfamina.

À excepção das culturas tratadas com purmorfamina, todas as outras apresentaram alteração gradual da superfície celular, que se manifestou pela presença de uma rugosidade muito acentuada, bem evidente nas culturas com 21 dias.

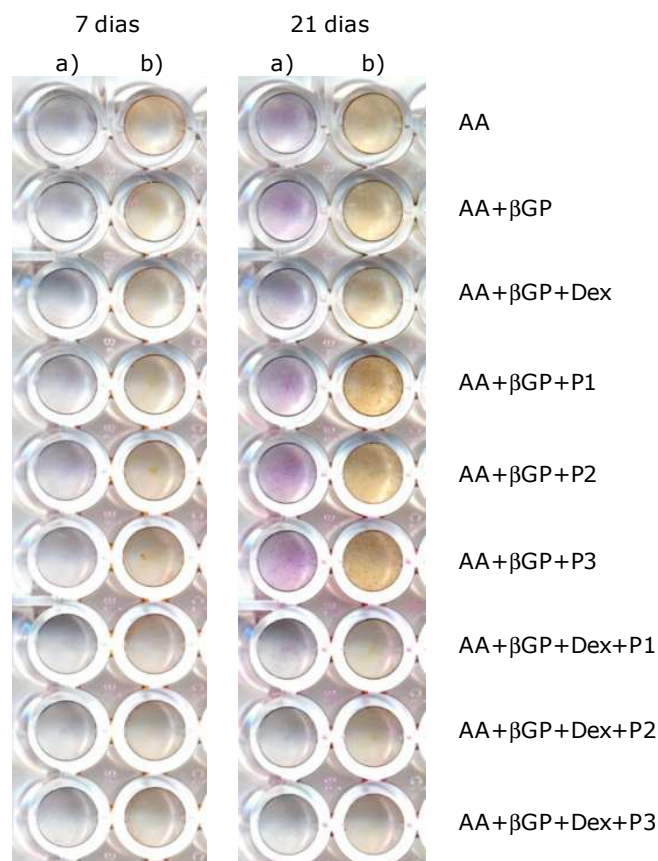


Figura 15. Aspecto macroscópico das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais, dias 7 e 21. a) Coloração para a hematoxilina-eosina; b) Coloração para a fosfatase alcalina.

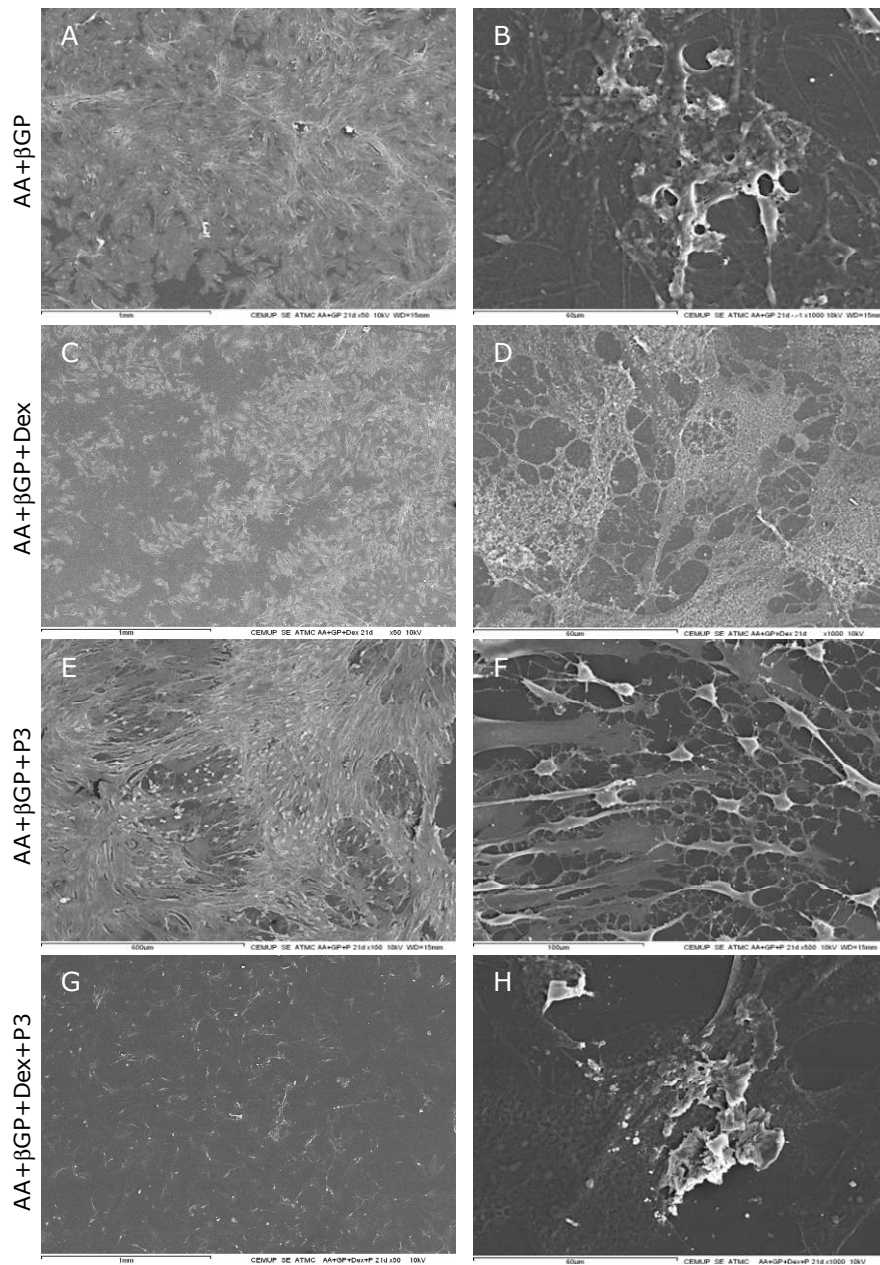


Figura 16. Culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas: AA+βGP (controlo) (A, x50; B, x1000), AA+βGP+Dex (C, x50; D, x1000), AA+βGP+P3 (E, x100; F, x500) e AA+βGP+Dex+P3 (G, x50; H, x1000), dia 21. Microscopia electrónica de varrimento.

2.2 Viabilidade/Proliferação Celular. Conteúdo em Proteína Total

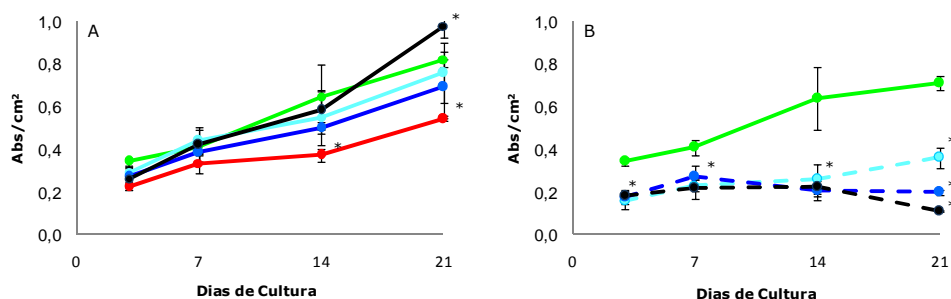
A Figura 17 a) mostra os resultados relativos à viabilidade/proliferação celular (ensaio do MTT).

Na situação controlo (culturas tratadas com AA+ β GP), observou-se um crescimento gradual ao longo do tempo de cultura, com tendência para estabilização na última semana. As culturas suplementadas com dexametasona apresentaram valores significativamente menores. Na presença de purmorfamina, 1 e 2 μ M, verificou-se uma taxa de proliferação ligeiramente inferior à da situação controlo (sem significado estatístico); as culturas tratadas com 3 μ M apresentaram um aumento da proliferação durante a última semana de cultura e, no dia 21, o valor observado foi significativamente superior ao do controlo. A presença simultânea de dexametasona e purmorfamina resultou numa diminuição muito acentuada da proliferação celular. Este efeito foi dependente da dose de purmorfamina e, assim, mais significativo na presença 3 μ M.

As culturas celulares foram também avaliadas relativamente ao conteúdo em proteína total, Figura 17 b). Observou-se um padrão de comportamento semelhante ao descrito para o ensaio do MTT, o que está de acordo com o facto do conteúdo em proteína total ser também um parâmetro informativo da proliferação celular.

Nas culturas que apresentaram elevada taxa de proliferação, observou-se desprendimento da camada celular após a confluência e, novamente, proliferação activa no espaço entretanto disponibilizado. Esta situação ocorreu durante a 2ª semana, o que pode explicar os desvios relativamente grandes que se observaram nos valores do dia 14, nas culturas controlo (AA+ β GP) e nas suplementadas com purmorfamina, Figura 17 a).

a) Ensaio do MTT



b) Proteína total

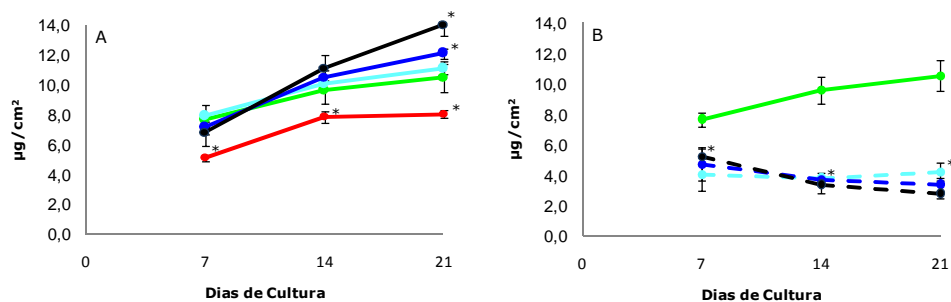


Figura 17. Viabilidade/Proliferação celular (ensaio do MTT) e conteúdo em proteína total das culturas efectuadas nas diferentes condições experimentais. A: AA+βGP (—, situação controlo); AA+βGP+Dex (—); AA+βGP+P1 (—); AA+βGP+P2 (—) e AA+βGP+P3 (—). B: AA+βGP (—, situação controlo); AA+βGP+Dex+P1 (—); AA+βGP+Dex+P2 (—) e AA+βGP+Dex+P3 (—). *Significativamente diferente da situação AA+βGP.

2.3 Síntese de fosfatase alcalina

A Figura 18 apresenta os resultados relativos à actividade da fosfatase alcalina, normalizada relativamente ao conteúdo de proteína total. Na situação controlo (AA+βGP), a actividade enzimática é baixa durante as duas primeiras semanas e aumenta ligeiramente durante a 3ª semana. Nas culturas tratadas com dexametasona verificou-se um aumento ligeiro da actividade de fosfatase alcalina, sobretudo durante a 2ª semana; no dia 14, a actividade enzimática foi estatisticamente superior à observada na situação controlo. A purmorfamina provocou um aumento muito significativo da actividade da fosfatase alcalina, observando-se valores cerca de 3 vezes superiores ao da situação controlo. Este efeito indutor foi dependente da dose, tendo as culturas suplementadas com 3 μM apresentado um valor superior ao das culturas tratadas com 1 e 2 μM de purmorfamina. As culturas tratadas simultaneamente com dexametasona e purmorfamina apresentaram valores muito baixos de actividade enzimática.

A Figura 19 mostra que a localização da fosfatase alcalina está principalmente associada com as zonas de maior densidade celular em qualquer das situações experimentais, dando um aspecto nodular à distribuição da enzima.

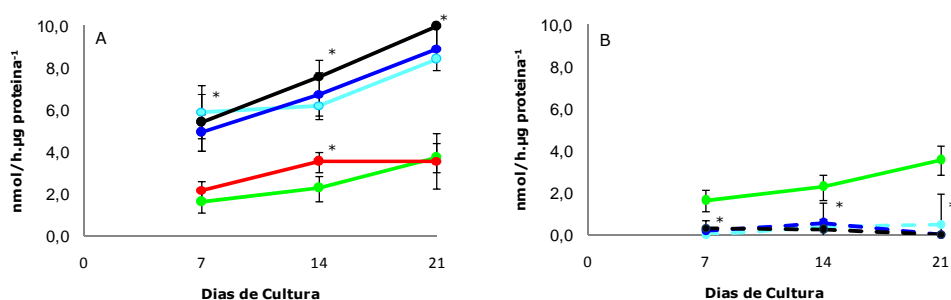


Figura 18. Actividade de fosfatase alcalina das culturas celulares efectuadas nas diferentes condições experimentais. A: AA+βGP (—, situação controlo); AA+βGP+Dex (—); AA+βGP+P1 (—); AA+βGP+P2 (—) e AA+βGP+P3 (—). B: AA+βGP (—, situação controlo); AA+βGP+Dex+P1 (—); AA+βGP+Dex+P2 (—) e AA+βGP+Dex+P3 (—). *Significativamente diferente da situação AA+βGP.

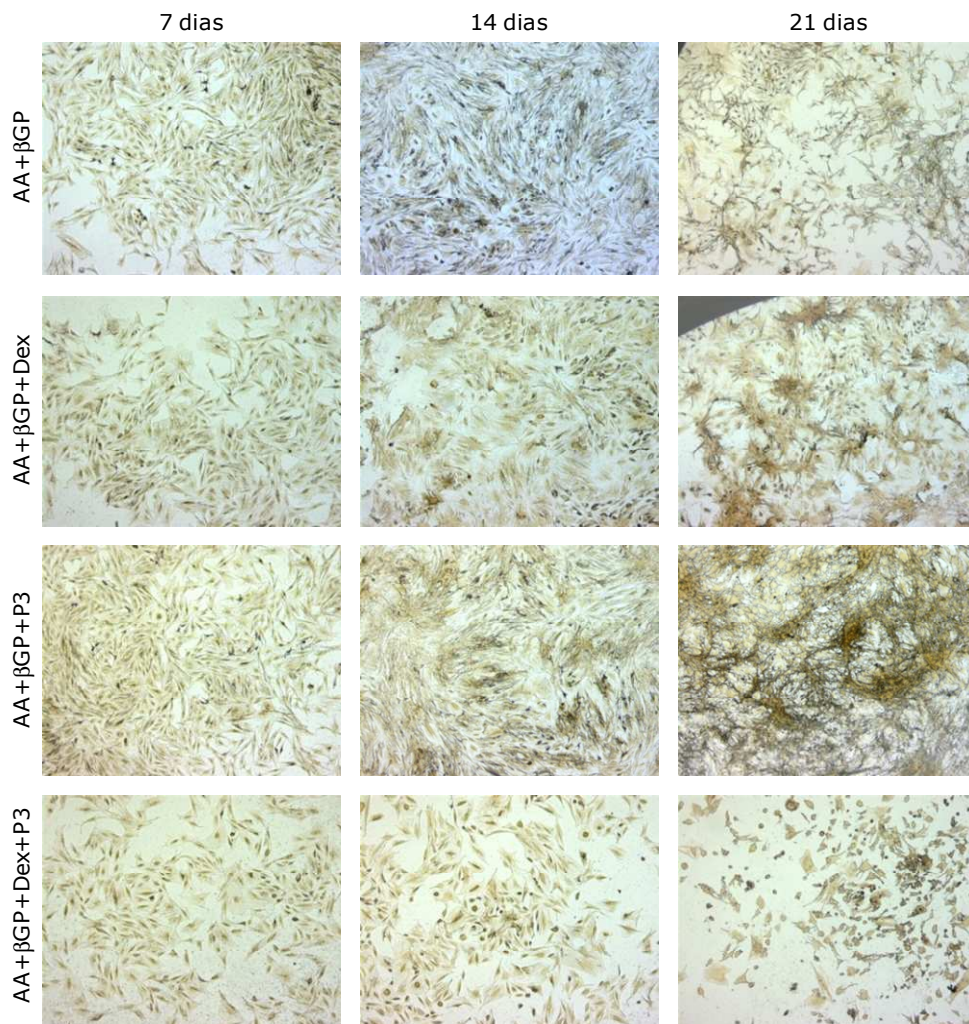
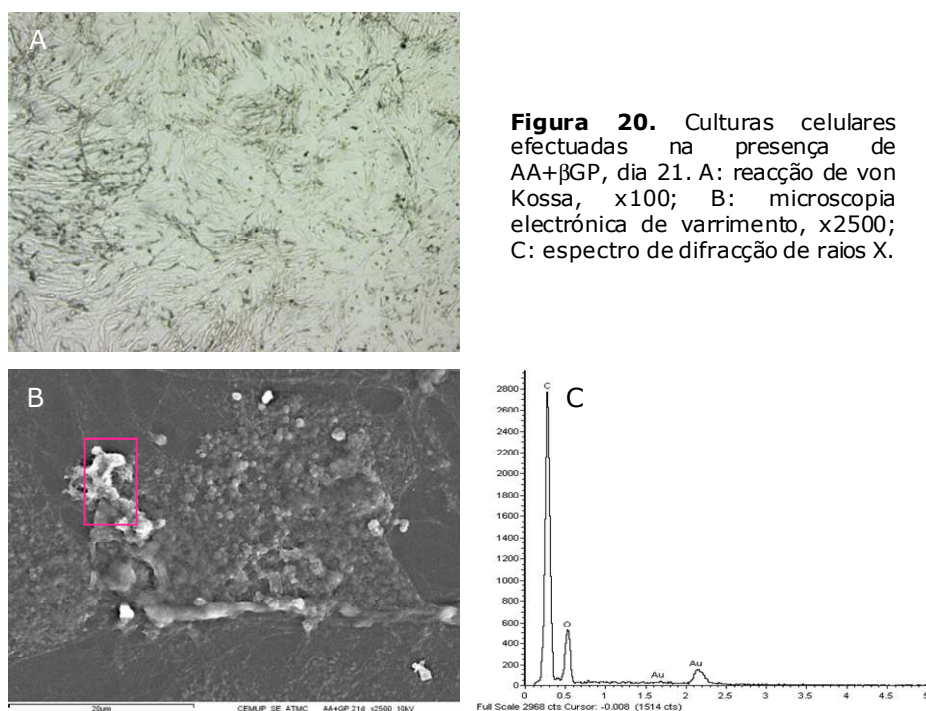


Figura 19. Culturas celulares efectuadas em situações experimentais representativas, dias 7, 14 e 21. Reacção histoquímica para a presença de fosfatase alcalina. Microscopia de luz, x50.

2.4 Formação de depósitos mineralizados na matriz

As culturas celulares efectuadas nas várias condições experimentais apresentaram reacção de von Kossa negativa nos dias 7 e 14. No dia 21, observaram-se zonas da camada celular que aparentemente mostravam reacção de von Kossa positiva, Figuras 20 a 23. No entanto, a observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento revelou que estas zonas correspondiam a locais de extensa alteração da morfologia celular, evidenciada por uma camada celular muito rugosa. A análise por espectroscopia de raios X mostrou que apenas as culturas tratadas com dexametasona apresentaram algumas zonas pontuais (muito poucas) em que se detectou deposição mineral, Figuras 20 a 23.



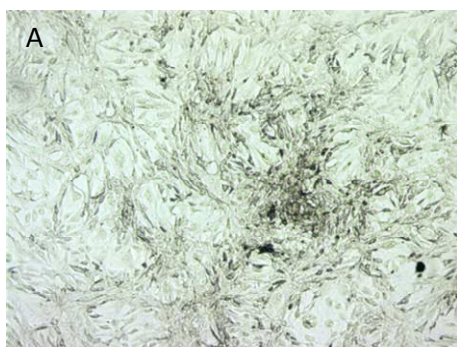
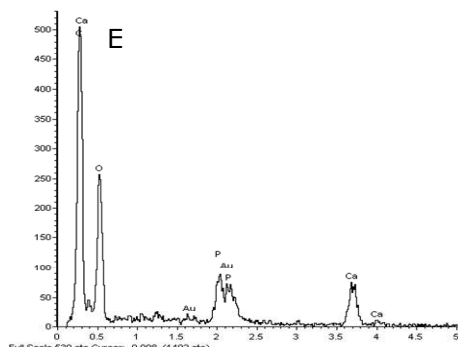
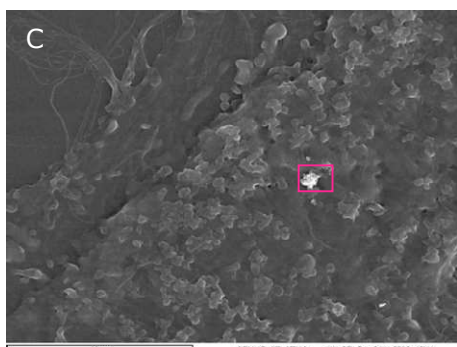
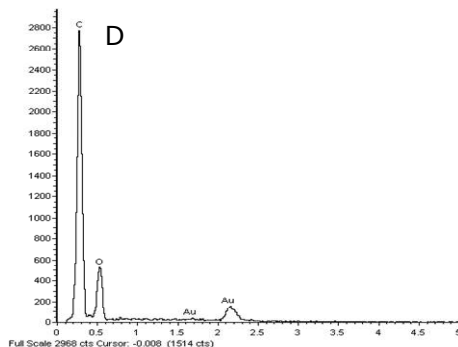
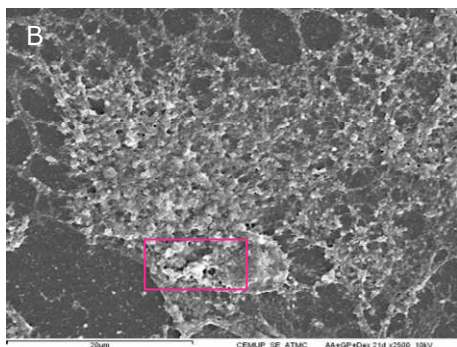


Figura 21. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+Dex, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B, C: microscopia electrónica de varrimento, (B: 2500; C: x5000); D, E: espectros de difracção de raios X.



As culturas suplementadas com dexametasona apresentaram uma morfologia celular característica em que a superfície celular se apresentou muito rugosa, mas que não estava associada a qualquer deposição mineral. Em algumas zonas muito pontuais observou-se a presença de pequenos depósitos que continham cálcio e fósforo.

As culturas tratadas com purmorfamina e, simultaneamente, com dexametasona e purmorfamina também não apresentaram qualquer evidência de deposição mineral.

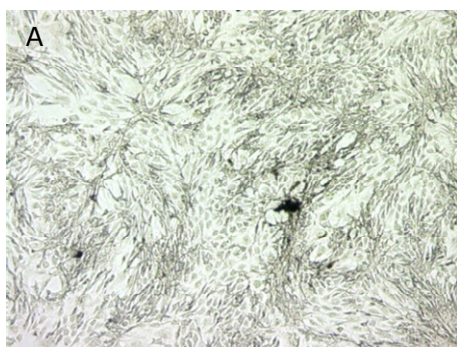


Figura 22. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+P3, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B: microscopia electrónica de varrimento, x500; C: espectro de difracção de raios X.

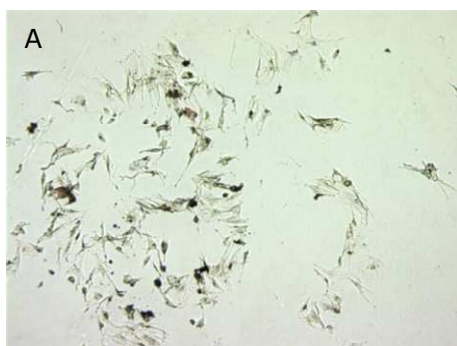
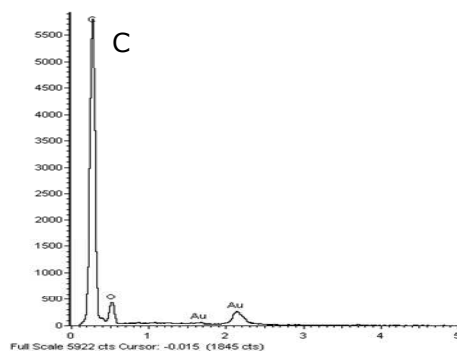
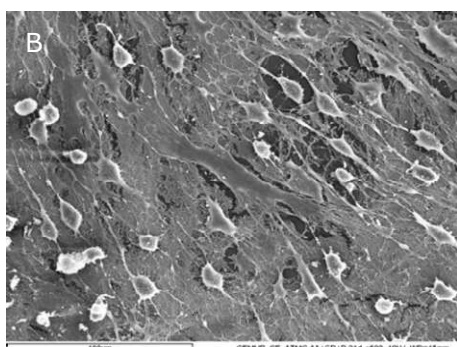
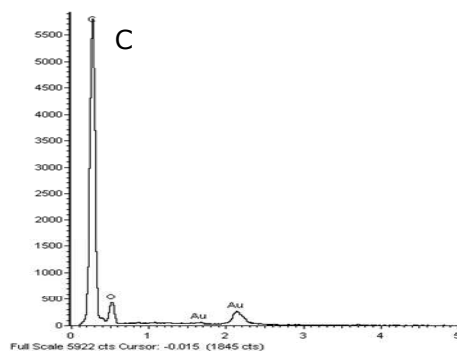
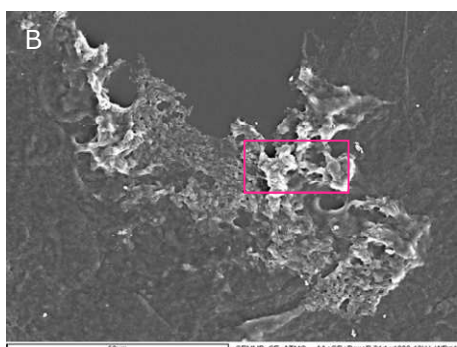


Figura 23. Culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+Dex+P3, dia 21. A: reacção de von Kossa, x100; B: microscopia electrónica de varrimento, x1000; C: espectro de difracção de raios X.



VI – Discussão

O trabalho experimental desenvolveu-se no sentido de concretizar o seguinte objectivo: estudar o padrão de proliferação e diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas isoladas de tecido adiposo de rato na presença de dexametasona, utilizada frequentemente como substância osteoindutora *in vitro* (Maniatopoulos *et al.*, 1988; Grigoriadis *et al.*, 1988; Bellows *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1997; Costa e Fernandes, 2000; Huang *et al.*, 2002; Tholpady *et al.*, 2003; Akavia *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2008) e purmorfamina, um composto recente que parece estimular a diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas multipotentes e, também, de células da linhagem osteoblástica (Wu *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2004; Beloti *et al.*, 2005a; Beloti *et al.*, 2005b; Sinha e Chen, 2006).

As condições experimentais utilizadas na cultura primária (cultura da suspensão celular obtida por digestão proteolítica do tecido adiposo subcutâneo em α -MEM, 10% soro bovino fetal, 50 μ g/ml ácido ascórbico, 100 UI/ml penicilina, 100 μ g/ml estreptomicina e 2.5 μ g/ml anfotericina B) permitiram isolar uma população de células aderentes, com aparência fibroblástica que apresentou uma elevada taxa de proliferação celular, com formação de colónias dispersas no substrato de cultura. A população celular isolada nestas condições manteve a morfologia fibroblástica e a elevada taxa de proliferação após subcultura. Este comportamento está de acordo com o descrito em estudos anteriores relativos ao isolamento de células mesenquimatosas a partir do tecido adiposo (Gimble e Guilak, 2003; Tholpady *et al.*, 2003; Strem *et al.*, 2005; Rodriguez *et al.*, 2005; Im *et al.*, 2005; Izadpanah *et al.*, 2006; Kern *et al.*, 2006; Yoshimura *et al.*, 2006, Noel *et al.*, 2008).

As células da 2ª subcultura foram cultivadas em várias situações experimentais – AA (condições semelhantes às utilizadas na cultura primária), AA+ β GP, AA+ β GP+Dex, AA+ β GP+P (P1, P2 e P3) e AA+ β GP+Dex+P (P1, P2 e P3) – e as culturas avaliadas relativamente a parâmetros de proliferação celular e função osteoblástica.

O AA tem um papel importante na produção da matriz extracelular colagenosa, processo que parece ser dependente da dose (Bellows *et al.*, 1990; Marsh *et al.*, 1995; Pollak *et al.*, 1997; Coelho e Fernandes, 2000; Shiga *et al.*, 2003; Anurag *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008). Há vários trabalhos que mostram

que a presença de uma matriz colagenosa é fundamental para a expressão do fenótipo osteoblástico (Bellows *et al.*, 1990; Lynch *et al.*, 1995; Shiga *et al.*, 2003; Hayami *et al.*, 2007). O β GP é adicionado às culturas de células osteoblásticas como fonte de fosfato (após hidrólise pela fosfatase alcalina) para o processo de mineralização da matriz (Bellows *et al.*, 1992; Chung *et al.*, 1992; Marsh *et al.*, 1995; Pollak *et al.*, 1997; Coelho e Fernandes, 2000; Anurag *et al.*, 2007; Cabral *et al.*, 2007). A dexametasona é um glicocorticóide sintético que se utiliza por rotina como substância osteoindutora em culturas celulares. Promove a expressão de parâmetros fenotípicos de diferenciação osteoblástica como a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea e, também, a capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada (Maniopoulos *et al.*, 1988; Grigoriadis *et al.*, 1988; Bellows *et al.*, 1990; Cheng *et al.*, 1994; Fernandes *et al.*, 1997; Costa e Fernandes, 2000; Huang *et al.*, 2002; Tholpady *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2006; Cabral *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008; Kondo *et al.*, 2008). A purmorfamina demonstrou capacidade osteoindutora na linha celular C3H10T1/2 constituída por células precursoras mesenquimatosas e na linha celular pré-osteoblástica MC3T3-E1 (Wu *et al.*, 2004) e, ainda, em células mesenquimatosas obtidas de medula óssea humana (Beloti *et al.*, 2005a; Beloti *et al.*, 2005b). Não foi encontrada nenhuma referência bibliográfica relativa à capacidade osteoindutora da purmorfamina em células precursoras isoladas de tecido adiposo. Neste trabalho, a purmorfamina foi utilizada em três concentrações, 1, 2 e 3 μ M, com base nos estudos referidos.

O comportamento celular foi estudado em culturas estabelecidas com duas densidades celulares – 5×10^3 células/cm² e 10^4 células/cm² – pois está descrito que a densidade celular inicial influencia a taxa de proliferação celular e também o processo de diferenciação osteoblástica (Yoshimura *et al.*, 2006).

As culturas celulares foram avaliadas relativamente a parâmetros de viabilidade/proliferação celular (ensaio do MTT), conteúdo em proteína total e actividade funcional osteoblástica, nomeadamente actividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. A fosfatase alcalina é sintetizada em quantidades elevadas pelas células osteoblásticas e é um marcador *in vitro* da diferenciação osteoblástica (Bellows *et al.*, 1991). Esta enzima está associada ao processo de mineralização da matriz extracelular, sendo responsável pela hidrólise de fosfatos orgânicos (no caso das culturas celulares, o β GP) aumentando a concentração de iões fosfato

nos locais de mineralização que, juntamente com os íons cálcio (presentes em elevada concentração no meio circundante), promovem a formação de depósitos de fosfato de cálcio durante a mineralização da matriz (Ter Brugge e Jansen, 2002; Huang *et al.*, 2002; Im *et al.*, 2005). A formação de uma matriz mineralizada traduz a expressão completa do fenótipo osteoblástico (Weinzierl *et al.*, 2006; Hayami *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2008).

As culturas efectuadas na presença de AA e AA+ β GP, quer estabelecidas com uma densidade celular de 5×10^3 células/cm² (1ª experiência) ou de 10^4 células/cm² (2ª experiência), apresentaram um comportamento semelhante, que se traduziu por uma taxa de proliferação celular elevada durante o período de cultura, com alguma tendência para a formação de zonas de maior densidade celular, actividade de fosfatase alcalina relativamente baixa e ausência de áreas mineralizadas. As culturas suplementadas com AA+ β GP foram consideradas como situação controlo, pois foram mantidas na presença de um composto importante na síntese da matriz extracelular colagenosa (AA) e de uma fonte de fosfato (β GP), mas na ausência de qualquer factor de indução do fenótipo osteoblástico.

As culturas suplementadas com AA+ β GP+Dex apresentaram um comportamento distinto, relativamente à situação controlo. A presença de Dex causou uma diminuição muito significativa da taxa de proliferação celular, acompanhada por um padrão de crescimento característico, evidenciado pela formação de agrupamentos celulares isolados ou interligados que aumentaram de tamanho com o tempo de incubação. Estas estruturas celulares apresentaram uma coloração intensa para a fosfatase alcalina e, muitas delas, reacção de von Kossa positiva. A determinação bioquímica da actividade de fosfatase alcalina (2ª experiência) mostrou que a dexametasona provocou uma ligeira indução na expressão da enzima, sobretudo durante a 2ª semana, observação que sugere uma tendência de diferenciação osteoblástica (Huang *et al.*, 2002; Atmani *et al.*, 2003). A observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento permitiu verificar que as células apresentavam uma aparência fibroblástica nos primeiros dias, que evoluiu para uma forma poligonal com o tempo de cultura. Na última fase da cultura (3ª semana) muitas das células presentes nos agrupamentos celulares mostraram uma extensa rugosidade celular. Observou-se ainda a presença de depósitos mineralizados intimamente relacionados com as zonas de maior rugosidade celular. A análise por espectroscopia de raios X mostrou depósitos que continham apenas cálcio, mas outros apresentaram na

sua composição cálcio e fósforo. Estes resultados mostram a capacidade das células mesenquimatosas obtidas de tecido adiposo de expressarem marcadores de diferenciação osteoblástica quando tratadas com factores osteoindutores, nomeadamente a dexametasona. Estão assim de acordo com estudos anteriores efectuados em condições semelhantes em culturas de células derivadas de tecido adiposo de rato e humano (Halvorsen *et al.*, 2000; Halvorsen *et al.*, 2001a; Zuk *et al.*, 2002; Gimble e Guilak, 2003; Aust *et al.*, 2004; De Ugarte *et al.*, 2003; Tholpady *et al.*, 2006; Gomillion e Burg, 2006; Yoshimura *et al.*, 2006; Noel *et al.*, 2008).

O padrão de comportamento descrito, relativamente à proliferação celular e parâmetros de função osteoblástica, foi semelhante nas culturas estabelecidas com uma densidade inicial de 5×10^3 células/cm² (1ª experiência) ou 10^4 células/cm² (2ª experiência). No entanto, as culturas iniciadas com uma densidade celular menor (5×10^3 células/cm²) apresentaram um processo de diferenciação osteoblástica mais evidente, com formação de agrupamentos celulares bem definidos, que coraram intensamente para a presença de fosfatase alcalina e apresentaram, muitos deles, depósitos mineralizados de fosfato de cálcio. O padrão de crescimento em nódulos tridimensionais constitui um comportamento característico que tem sido repetidamente descrito em vários modelos de culturas de células mesenquimatosas obtidas de medula óssea e de tecido adiposo (Tholpady *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2008). Este comportamento foi menos vincado nas culturas estabelecidas com a densidade celular maior (10^4 células/cm²) observando-se, nas mesmas condições experimentais, pior definição dos agrupamentos celulares e a formação de depósitos mineralizados associados a estas estruturas foi muito esporádica. A densidade celular inicial constitui um parâmetro muito importante que influencia todo o processo de proliferação/diferenciação fenotípica como se demonstrou, por exemplo, nos estudos de Yoshimura e colaboradores (2006) que compararam a multipotencialidade de células precursoras mesenquimatosas e rato provenientes da medula óssea, sinóvio, perióstio, tecido adiposo e músculo. Estes autores verificaram que a utilização de uma densidade celular baixa permite a máxima taxa de expansão celular no substrato de cultura disponível, evitando interacções entre colónias celulares e favorecendo deste modo a expressão fenotípica (Yoshimura *et al.*, 2006). O desenvolvimento do fenótipo osteoblástico, desde a célula osteoprogenitora até ao osteoblasto maduro compreende três fases: proliferação celular que é acompanhada pela

produção da matriz extracelular colagenosa, maturação e organização da matriz (fase em que já não se observa proliferação ou que esta é muito baixa) e mineralização da matriz, o evento final que traduz a expressão completa do fenótipo osteoblástico (Huang *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2008). Observa-se, assim, uma relação inversa entre a proliferação celular e a diferenciação osteoblástica. Deste modo, o esgotamento do substrato de cultura numa fase em que a população celular ainda se encontra numa fase de proliferação activa diminui a possibilidade de diferenciação fenotípica.

As culturas celulares efectuadas na presença de AA+ β GP+P apresentaram diferenças significativas relativamente à situação controlo (AA+ β GP). Mostraram elevada taxa de proliferação celular, que foi superior à da situação controlo na presença de 3 μ M de purmorfamina. Evidenciaram também tendência para a formação de zonas de maior densidade celular que coraram mais intensamente para a presença de fosfatase alcalina que as zonas envolventes. No entanto, estas zonas apresentaram menor definição que os agrupamentos celulares observados nas culturas suplementadas com dexametasona. A determinação bioquímica da actividade de fosfatase alcalina (2ª experiência) revelou uma indução muito significativa da síntese desta enzima, com níveis cerca de 3 vezes superiores relativamente à situação controlo. No entanto, nas condições experimentais estudadas, esta indução da fosfatase alcalina não foi acompanhada de um efeito semelhante na capacidade de mineralização da matriz celular. A coloração de von Kossa foi negativa na maior parte da camada celular, observando-se muito esporadicamente reacção positiva em zonas pontuais. A observação das culturas por microscopia electrónica de varrimento revelou a presença de células alongadas e superfície lisa e a espectroscopia de raios X das áreas de maior densidade celular não mostrou a presença de depósitos mineralizados de fosfato de cálcio.

Os resultados descritos sugerem que a purmorfamina parece ter capacidade de induzir parâmetros de diferenciação osteoblástica em culturas de células mesenquimatosas isoladas de tecido adiposo de rato, nomeadamente a expressão de fosfatase alcalina. Não há registo na literatura de estudos semelhantes mas este comportamento na diferenciação osteoblástica está de acordo com trabalhos anteriores efectuados noutras populações celulares. Wu e colaboradores (2002) foram os primeiros autores a mostrar a capacidade osteoindutora da purmorfamina tendo verificado um aumento significativo da proliferação celular e da actividade da fosfatase alcalina ($DE_{50} = 1 \mu$ M) na linha

celular C3H10T1/2 obtida da mesoderme de embrião de rato. Esta linha celular é constituída por células progenitoras mesenquimatosas com potencial de diferenciação em adipócitos, osteoblastos, condrócitos e miócitos e é muito utilizada em estudos de diferenciação osteoblástica. Estes autores mostraram também que a purmorfamina (2 μ M) induz a proliferação celular e a osteogénese na linha celular MC3T3-E1 (Wu *et al.*, 2004), constituída por células pré-osteoblásticas de rato (células precursoras comprometidas com a linhagem osteoblástica). Observaram que, numa fase inicial, a purmorfamina estimula a expressão de genes que controlam o ciclo celular, o que justifica o aumento da proliferação celular, e, após confluência, provoca o aumento da expressão de múltiplos genes associados com a osteogénese, incluindo o factor de transcrição Cbfa1/Runx2, fosfatase alcalina e osteomodulina (Wu *et al.*, 2004). Os efeitos osteoindutores da purmorfamina parecem ser mediados pela via de sinalização Hedgehog que tem um papel importante durante o desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos, incluindo o pulmão, tecido ósseo e sistema nervoso central (Wu *et al.*, 2004). Mais tarde, Beloti e colaboradores descreveram também efeitos indutores da purmorfamina em culturas celulares de células mesenquimatosas obtidas de medula óssea humana, que se traduziram por um aumento no conteúdo em proteína total, actividade de fosfatase alcalina e formação de nódulos mineralizados (Beloti *et al.*, 2005a; Beloti *et al.*, 2005b).

As culturas suplementadas com AA+ β GP+P mostraram a presença de dois tipos de células com uma morfologia distinta: uma camada de células alongadas de dimensões relativamente grandes e que se organizava em zonas de maior densidade celular e, também, uma rede extensa de células de pequenas dimensões com uma morfologia tipo "neuronal"/"osteócito" que parecia interagir estreitamente com a camada de células alongadas. Neste trabalho, o fenótipo destas células não foi estudado. No entanto, Wu e colaboradores, no estudo efectuado na linha celular C3H10T1/2, referiram que a morfologia das células tratadas com purmorfamina variava de uma forma fibroblástica ("fina e alongada") para uma forma tipo "osteócito" ("pequena e redonda"), mas não apresentaram qualquer informação adicional reativamente a este aspecto (Wu *et al.*, 2004). De referir, que a morfologia dos osteócitos e das células neuronais é muito semelhante, nomeadamente um corpo celular condensado com projecções citoplasmáticas longas e finas. Pode também colocar-se a hipótese de a purmorfamina induzir a diferenciação neuronal de células

mesenquimatosas obtidas de tecido adiposo, pois estas células apresentam este potencial quando cultivadas na presença de substâncias indutoras do fenótipo neuronal (Gimble e Guilak, 2003; Aust *et al.*, 2004).

Neste trabalho estudou-se também o efeito da presença simultânea de dexametasona e purmorfamina no comportamento de proliferação e actividade funcional osteoblástica (culturas tratadas com AA+ β GP+Dex+P). Observou-se uma diminuição muito acentuada da proliferação celular relativamente à situação controlo (AA+ β GP). Este efeito inibitório foi superior ao observado nas culturas tratadas com AA+ β GP+Dex. Verificou-se ainda algum crescimento celular na presença de AA+ β GP+Dex+P1, mas nas culturas tratadas com 2 e 3 μ M de purmorfamina o crescimento celular foi praticamente inexistente. No entanto, observou-se a formação de agrupamentos celulares, visíveis sobretudo na última semana de cultura. A observação por microscopia electrónica de varrimento mostrou uma alteração significativa da morfologia celular e ausência de formação de depósitos mineralizados. Assim, os resultados sugerem que, na presença simultânea das duas substâncias indutoras, o efeito da dexametasona parece prevalecer, pois observou-se uma diminuição acentuada da proliferação e formação de agrupamentos celulares bem definidos, não se verificando nenhum dos efeitos característicos da purmorfamina, nomeadamente estimulação do crescimento celular e da actividade de fosfatase alcalina. Pelo contrário, a presença da purmorfamina parece resultar num efeito citotóxico que é dependente da dose. O mecanismo envolvido nesta interacção não foi estudado neste trabalho. De referir que a purmorfamina apresenta efeito sinérgico com a BMP-4, um indutor da diferenciação osteoblástica. Wu e colaboradores (2002) mostraram, na linha celular C3H10T1/2, que o tratamento simultâneo com purmorfamina e BMP-4 resulta num efeito sinérgico na síntese de fosfatase alcalina, por mecanismos independentes.

VII – Conclusões

As condições experimentais utilizadas na cultura da suspensão celular obtida por digestão proteolítica do tecido adiposo subcutâneo de rato permitiu isolar uma população de células aderentes com morfologia alongada e formação de colónias dispersas no substrato de cultura que apresentaram taxa de

proliferação elevada, um comportamento característico de células mesenquimatosas em cultura.

As culturas celulares efectuadas na presença de AA e AA+ β GP, substâncias utilizadas, respectivamente, na síntese da matriz colagenosa e como fonte de iões fosfato para o processo de mineralização, apresentaram um comportamento semelhante que se traduziu por uma taxa de proliferação elevada, formação de uma camada contínua com zonas de maior densidade celular, níveis de fosfatase alcalina baixos e ausência de mineralização da matriz.

A presença de dexametasona, culturas suplementadas com AA+ β GP+Dex, resultou numa diminuição significativa da taxa de proliferação celular, formação de agrupamentos celulares bem definidos que apresentaram reacção intensa para a fosfatase alcalina e, alguns deles, presença de depósitos mineralizados de fosfato de cálcio. A expressão das características osteoblásticas foi influenciada pela densidade celular inicial.

A presença de purmorfamina, culturas suplementadas com AA+ β GP+P (P=1, 2 ou 3 μ M), causou um aumento da proliferação celular e uma indução muito significativa da actividade de fosfatase alcalina, mas deposição mineral praticamente inexistente. Observou-se a presença de uma camada de células alongadas e organizadas em zonas de maior densidade celular e, também, de uma rede extensa de células de pequenas dimensões e morfologia tipo "neuronal"/"osteócito" que cobria praticamente toda a placa de cultura. O fenótipo destas células não foi objecto de avaliação neste trabalho.

A presença simultânea de dexametasona e purmorfamina, culturas tratadas com AA+ β GP+Dex+P (P=1, 2 ou 3 μ M) provocou uma diminuição muito acentuada da taxa de proliferação celular, formação de agrupamentos celulares que mostraram reacção positiva para a fosfatase alcalina e ausência de depósitos mineralizados na matriz. A acção da dexametasona pareceu prevalecer sobre a da purmorfamina, pois não foram observados os efeitos característicos deste composto, nomeadamente indução da proliferação celular e da actividade de fosfatase alcalina.

Este trabalho permite concluir que, à semelhança do observado em outros estudos, as células mesenquimatosas de tecido adiposo de rato apresentam características osteoblásticas quando cultivadas na presença de dexametasona. Os resultados obtidos sugerem ainda que a purmorfamina parece ter capacidade de induzir a expressão de parâmetros de diferenciação

osteoblástica nesta população celular, que se evidenciou por um aumento muito significativo da actividade de fosfatase alcalina mas que, aparentemente, não foi acompanhado de igual efeito na mineralização da matriz celular.

A purmorfamina parece actuar como agonista da via de sinalização "Hedgehog", que tem um papel importante no desenvolvimento de muitos tecidos e órgãos, incluindo o tecido ósseo. Assim, a activação desta via pode, potencialmente, revestir-se de interesse terapêutico. Também, a purmorfamina pode constituir uma ferramenta farmacológica adicional na elucidação dos mecanismos envolvidos na diferenciação do tecido ósseo.

VIII – Referências Bibliográficas

Afonso, A. S. (1998). *Interacção entre Biomateriais e Tecido Ósseo*. Dissertação de Doutoramento, Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Akavia, U. D., Shur, I., Rechavi, G. e Benayahu, D. (2006). Transcriptional profiling of mesenchymal stromal cells from young and old rats in response to Dexamethasone. *BMC Genomics*, 7: 1-13.

Alameda, C. A. (2006). Advanced Cell Technology Announces Technique to Generate Human Embryonic Stem Cells that Maintains Developmental Potential of Embryo.[On-line]. Advanced Cell Technology. <http://www.advancedcell.com/press-release/advanced-cell-technology-announces-technique-to-generate-human-embryonic-stem-cells-that-maintains-developmental-potential-of-embryo> (27 de Novembro de 2007).

Anurag, G., Tai, L. D., Fen, B. H., Brat, S. S., Thiam-Chye, L. e Werner, H. D. (2007). Osteo-maturation of adipose-derived stem cells required the combined action of vitamin D3, b-glycerophosphate, and ascorbic acid. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362: 17-24.

Assady, S., Maor, G., Amit, M., Itskovitz-Eldor J., Skorecki, K. L. e Tzukerman, M. (2001). Insulin-production by human embryonic stem cells. *Diabetes* 50, 1691-1697.

Atala, A., e Lanza, R. P. (2002). *Methods of tissue engineering*. San Diego, CA: Academic Press.

Atmani, H., Chappard, D. e Basle, M. F. (2003). Proliferation and differentiation of osteoblasts and adipocytes in rat bone marrow stromal cell cultures: effects of dexamethasone and calcitriol. *Journal of Cellular Biochemistry* 89, 364-372.

Aubin, J. E. e Liu, F. (1996). The osteoblast lineage. In : *Principles of Bone Biology*, Eds. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G. A., Academic Press, San Diego, 51-67.

Aubin, J. E. e Triffitt, J. T. (2002). Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In: Principles of Bone Biology, Eds. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G. A., Academic Press, San Diego, vol. I, 2ª Ed., 59-81.

Aubin, J. A., Turksen, K. e Heersche, J. N. M. (1993). Osteoblastic cell lineage. In: Edt. Noda, M., Cellular and Molecular Biology of Bone, Academic Press, San Diego, 2-45.

Aust, L., Devlin, B., Foster, S. J., Halvorsen, Y. D., Hicok, K., du Laney, T., Sen, A., Willingmyre, G. D., e Gimble, J. M. (2004). Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6(1), 7-14.

Ballas, C. B., Zielske, S. P. e Gerson, S. L. (2002). Adult bone marrow stem cells for cell and gene therapies: implications for greater use. *J Cell Biochem Suppl* 38, 20-28.

Baron, R., Chakraborty, M., Chatterjee, D., Horne, W., Lomri, A. e Ravesloot, J. H. (1993). Biology of the osteoclast. In: Edts. Mundy, G. R., Martin, T. J. Handbook of Experimental Pharmacology, Springer-Verlag, Berlin, Vol. 107; 111-147.

Barry, F. P., e Murphy, J. M. (2004). Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 36, 568-584.

Beahm, E. K., Walton, R. L., e Patrick, Jr. C. W. (2003). Progress in adipose tissue construct development. *Clin Plast Surg* 30(4), 547-558.

Bellows, C. G., Heersche, J. N. M. E Aubin, J. E. (1990). Determination of the capacity for proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in the presence and absence of dexamethasone. *Dev. Biol.*, 140(1): 132-138.

Bellows, C. G., Aubin, J. E. e Heersche, J. N. M. (1991). Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone Min.*, 14(1): 27-40.

Bellows, C. G., Heersche, J. N. M. E Aubin, J. E. (1992). Inorganic phosphate added exogenously or released from β -glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Min.*, 17(1): 15-29.

Beloti, M. M., Bellesini, L. S. e Rosa, A. L. (2005a). Purmorphamine enhances osteogenic activity of human osteoblasts derived from bone marrow mesenchymal cells. *Cell Biology International* 29(7), 537-541.

Beloti, M. M., Bellesini, L. S. e Rosa, A. L. (2005b). The effect of purmorphamine on osteoblasts phenotype expression of human bone marrow mesenchymal cells cultured on titanium. *Biomaterials* 26(20), 4245-4248.

Bjorklund, A., e Lindvall, O. (2000). Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature Neurosciences* 3, 537-544.

Bonewald, L. F. (2002). Transforming growth factor- β . In: Principles of Bone Biology. Vol. II, 2^a Ed., Eds. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G. and Rodan, G. A., Academic Press, San Diego, 903-918.

Boquest, A. C., Shahdadfar, A., Frønsdal, K., Sigurjonsson, O., Tunheim, S. H., Collas, P., e Brinchmann, J. E. (2005). Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. *Molecular Biology of the Cell* 16, 1131-1141.

Brey, E. M., e Patrick, Jr. C. W. (2000). Tissue engineering applied to reconstructive surgery. *IEEE Eng Med Biol Mag* 19(5), 122-125.

Brivanlou, A. H., Gage, F. H., Jaenisch, R., Jessell, T., Melton, D. e Rossant, J. (2003). Stem cells. Setting standards for human embryonic stem cells. *Science*. 300(5621), 913-916.

Cabral, M. C. P. M. T. (2004). Estudo do tecido ósseo relacionado com patologias dos maxilares e influência de materiais exógenos. Dissertação de Doutorado. Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto (Tese de Doutorado).

Cabral, M. C., Costa, M. A. e Fernandes, M. H. (2007). In vitro models of periodontal cells: a comparative study of long-term gingival, periodontal ligament and alveolar bone cell cultures in the presence of β -glycerophosphate and dexamethasone. *J. Mater. Sci.: Mater Med.*, 18: 1079-1088.

Cheng, S. L., Yang, J. W., Rifas, L., Zhang, S. F. e Avioli, L. V. (1994). Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology* 134, 277-286.

Chung, C. H., Golub, E. E., Forbes, E., Tokuoka, T. e Shapiro, I. M. (1992). Mechanism of action of β -glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue Int.*, 51(4): 305-311.

Coelho, M. J. e Fernandes, M. H. (2000). Human bone cell cultured in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials*, 21(11): 1095-1102.

Colaço, B. J. A. (2008). Ingeniería del tejido cartilaginosa-Obtención de cartílago in vitro para su utilización en ingeniería de tejidos. Tese Doctoral. León: Faculdade de Veterinaria-Universidade de León, pp. 320.

Conrad, C., e Huss, R. (2005). Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery. *J Surg Res* 124(2), 201-208.

Cooper, L. F., Masuda, T., Whitson, S. W., Yliheikkilä, P. e Felton, D. A. (1999). Formation of mineralizing osteoblast culture on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implants* 14(1), 37-47.

Cortesini, R. (2005). Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation. *Transpl Immunol* 15(2), 81-89.

Costa, J. V. e Duarte, J. S. (2006). Tecido Adiposo e Adipocinas. *Acta Med Port* (19), 251-256.

Costa, M. A. e Fernandes, M. H. (2000). Long-term effects of parathyroid hormone, 1,25-dihydroxyvitamin D3 and dexamethasone on the cell growth and functional activity of human osteogenic alveolar bone cell cultures. *Pharmacological Research* 42: 345-353.

De Ugarte, D. A., Ashjian, P. H., Elbarbary, A., e Hedrick, M. H. (2003). Future of fat as raw material for tissue regeneration. *Ann Plast Surg* 50(2), 215-219.

Deliloglu-Gurhan, S. I., Vatansever, H. S., Ozdal-Kurt, F. e Tuglu, I. (2006). Characterization of osteoblasts derived from bone marrow stromal cells in a modified cell culture system. *Acta histochemica* 108, 49-57.

Deng, C. H., Sun, X. Z., Gao, Y., Luo, D. S., Liu, G. H. e Huang, Y. P. (2008). An experimental study of the culture, isolation and biological characteristics of rat adipose tissue-derived stromal cells in vitro. *Zhonghua Nan Ke Xue*. 14 (2): 99-105.

Deslex, S., Negrel, F., Vannier, C., Etienne, J. e Ailhaud, G. (1986). Differentiation of human adipocyte precursors in a chemically defined serum-free medium. *Int J Obes* 11(1), 19-27.

Dias, M. I. R. (2004). Regeneração Óssea - Efeito do volume ou da associação ao plasma enriquecido em plaquetas nas propriedades osteogénicas do enxerto de osso esponjoso autólogo. Estudo dos marcadores bioquímicos de formação óssea durante o processo de cicatrização das fracturas ósseas. Dissertação de Doutoramento, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Eurell, J. C. e Van Sickle, D. C. (1998). Connective and support tissue. In: *Textbook of Veterinary Histology*, Eds. Dellman, H. D., Eurell, J. C., Williams & Wilkins, Baltimore, 5ª Ed., 32.

Fernandes, M. H., Costa, M. A. e Carvalho, G. S. (1995). In vitro osteogenesis by human alveolar bone cells in the presence of dexamethasone. *Pharmacol. Res* 31(suppl), 8.

Fernandes, M. H., Costa, M. A. e Carvalho, G. S. (1997). Mineralization in serially passaged human alveolar bone cells. *J. Mater Sci Mater Med* 8(2), 61-65.

Fernandes, M. H. R. (1998). Mecanismos de regulação do metabolismo ósseo. *Acta Médica Portuguesa* 11, 41-52.

Fraser, J. K., Wulur, I., Alfonso, Z., e Hedrick, M. H. (2006). Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *TRENDS in Biotechnology* 24(4), 150-154.

Fuchs, J. R., Nasser, B. A., e Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *Ann Thorac Surg* 72(2), 577-591.

Gearhart, J. (2006). Cell Differentiation in the Skeleton. In: *Essentials of Stem Cell Biology*, Eds. Lanza, R., Gearhart, J., Hogan, B., Melton, D., Pedersen, R., Thomas, E. D., Thomson, J. e West, M., Elsevier Academic Press, Oxford, 191-194.

Ghostine, S., Carrion, C., Souza, L. C., Richard, P., Bruneval, P., Vilquin, J. T., Pouzet, B., Schwartz, K., Menasché, P. e Hagège, A. A. (2002). Long-term efficacy of myoblast transplantation on regional structure and function after myocardial infarction. *Circulation* 106, 1131-1136.

Gimble, J. M., e Guilak, F. (2003). Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy* 5(5), 362-369.

Girolamo, L. de, Sartori, M. F., Albisetti, W. e Brini, A. T (2007). Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med* 1, 154-157.

Gomillion, C. T., e Burg, K. J. L. (2006). Stem cells and adipose tissue engineering. *Biomaterials* 27, 6052-6063.

Grigoriadis, A. E., Heersche, J. N. e Aubin, J. E. (1988). Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol.* 106 (6): 2139-2151.

Gronthos, S., Graves, S. E., Ohta, S. e Simmons, P. J. (1994). The STRO-11 fraction of adult human bone marrow contains the osteogenic precursors. *Blood* 84, 4164-4173.

Gronthos, S., Franklin, D. M., Leddy, H. A., Robey, P. G., Storms, R. W., e Gimble, J. M. (2001). Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol* 189(1), 54-63.

Guilak, F., Lott, K. E., Awad, H. A., Cao, Q., Hicok, K. C., Fermor, B., e Gimble, J. M. (2006). Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *J Cell Physiol* 206(1), 229-237.

Habib, N. A. (2005). *Stem cell repair and regeneration*. London: Imperial College Press: Distributed by World Scientific Publishing.

Hagège, A. A., Carrion, C., Menasché, P., Vilquin, J. T., Duboc, D., Marolleau, J. P., Desnos, M. e Bruneval, P. (2003). Viability and differentiation of autologous skeletal myoblast transplantation for severe postinfarction left ventricular dysfunction. *Lancet* 361(9356), 491-492.

Halsey, M. F., McLeod, K. e Rubin, C. (1997). *The Biology of Bone*. In: Edts. Dee, R., Hurst, L. C., Gruber, M. A., Kottmeier, S. A., *Principles of Orthopaedic Practice*, The McGraw-Hill Companies, New York, 17-36.

Halvorsen, Y. D., Wilkison, W. O., e Gimble, J. M. (2000). Adipose-derived stromal cells – their utility and potential in bone formation. *Int J Obes Rel Metab Dis* 24(Suppl.), S41-44.

Halvorsen, Y. D., Franklin, D. M., Bond, A. L., Hitt, D. C., Auchter, C., Boskey, A. L., Paschalis, E. P., Wilkison, W. O., e Gimble, J. M. (2001a). Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7(6), 729-741.

Halvorsen, Y. D., Bond, A., Sen, A., Franklin, D. M., Lea-Currie, Y. R., Sujkowski, D., Ellis, P. N., Wilkison, W. O., e Gimble, J. M. (2001b). Thiazolidinediones and glucocorticoids synergistically induce differentiation of human adipose tissue stromal cells: biochemical, cellular and molecular analysis. *Metabolism* 50(4), 407-413.

Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K., Ishihara, M. (2005). Bone Formation Using Human Adipose Tissue-Derived Stromal Cells and a Biodegradable Scaffold. *Wiley Periodicals, Inc.* 230-238.

Hattori, H., Ishihara, M., Fukuda, T., Suda, T. e Katagiri, T. (2006). Establishment of a novel method for enriching osteoblast progenitors from adipose tissues using a difference in cell adhesive properties. *Biochem Biophys Res Commun* 343(4): 1118-1123.

Hayami, T, Zhang, Q., Kapila, Y e Kapila, S. (2007). Dexamethasone's enhancement of osteoblastic markers in human periodontal ligament cells is associated with inhibition of collagenase expression. *Bone*, 40: 93-104.

Herndon, D. N., Hayward, P. G., Rutan, R. L. e Barrow, R. E. (1992). Growth hormones and factors in surgical patients. *Adv. Surg.* 25, 65-97.

Huang, J. I., Beanes, S. R., Zhu, M., Lorenz, H. P., Hedrick, M. H. e Benhaim, P. (2002). Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast Reconstr Surg* 109(3), 1033-1041.

Huang, J. I., Kazmi, N., Durbhakula, M. M., Hering, T. M., Yoo, J. U., e Johnstone, B. (2005). Chondrogenic potential of progenitor cells derived from human bone marrow and adipose tissue: a patient-matched comparison. *J Orthop Res* 23(6), 1383-1389.

Im, G., Shin, Y. e Lee, K. (2005). Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *OsteoArthritis and Cartilage*, 13:845-853.

Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J. M. e Bunnell, B. A. (2006). Biologic Properties of Mesenchymal Stem Cells Derived From Bone Marrow and Adipose Tissue. *J. Cell. Biochem.*, 99: 1285-1297.

Junqueira, L. C. e Carneiro, J. (1999). Tecido Ósseo. In: *Histologia Básica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 9ª Ed, 111-128.

Katz, A. J. Llull, R., Hedrick, M. H. e Futrell, J. W. (1999). Emerging approaches to the tissue engineering of fat. *Clin Plas Surg* 26(4), 587-603.

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Klüter, H. e Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem cells* 24, 1294-1301.

Kim, H., Kim, H. W. e Suh, H. (2003). Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 24(25), 4671-4679.

Kondo, T., Kitazawa, R., Yamaguchi, A. e Kitazawa, S. (2008). Dexamethasone promotes osteoclastogenesis by inhibiting osteoprotegerin through multiple levels. *J Cell Biochem.* 103(1): 335-345.

Kukekov, R. (1999). Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain. *Exp Neurol* 156(2), 333-344.

Lee, R. H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H. S., Suh, K., Bae, Y. C., e Jung, J. S. (2004). Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 14(4-6), 311-324.

Lin, T. M., Tsai, J. L., Lin, S. D., Lai, C. S., e Chang, C. C. (2005). Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev* 14(1), 92-102.

Lowry, O. H., Rosebrough, A.L., e Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Luzi, E., Marini, F., Sala, S. C., Tognarini, I., Galli, G. e Brandi, M. L. (2008). Osteogenic Differentiation of Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells is Modulated by the miR-26^a Targeting of the SMAD1 Transcription Factor. *J Bone Miner Res* 23(2), 287-295.

Lynch, M. P., Stein, J. L., Stein, G. S. e Lian, J. B. (1995). The Influence of Type I Collagen on the Development and Maintenance of the Osteoblast Phenotype in Primary and Passaged Rat Calvarial Osteoblasts: Modification of Expression of Genes Supporting Cell Growth, Adhesion, and Extracellular Matrix Mineralization. *Exp. Cell. Res.*, 216(1): 35-45

Maegawa, N., Kawamura, K., Hirose, M., Yajima, H. e Takakura, Y. (2007). Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Tissue Eng Regen Med* 1(4), 306-313.

Maniatopoulos, C., Sodek, J. e Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from marrow of young adult. *Cell Tissue Res* 254(2), 317-330.

Marks, S. C. e Popoff, S. N. (1988). Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am. J. Anat.* 183(1), 1-44.

- Marsh, M. E., Munne, A. M., Vogel, J. J., Cui, Y. e Franceschi, R. T. (1995). Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, 10(11): 1635-1643.
- Martin, T. J., Ng, K. W. e Nicholson, G. C. (1988). Cell biology in bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 2(1), 1-29.
- Martin, T. J., Findlay, D. M., Herth, J. K. e Ng, K.W. (1993). Osteoblasts: Differentiation and Function. In: Edts. Mundy, G. R., Martin, T. J. *Handbook of Experimental Pharmacology*, Springer-Verlag, Berlin, Vol. 107, 149-183.
- Masuda, T., Furue, M. e Matsuda, T. (2004). Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue Eng* 10(11-12), 1672-1683.
- McGee-Russell, S. M. (1958). Histochemical methods for calcium. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 6(1), 22-42.
- Mikami, Y., Takahashi, T., Kato, S. e Takagi, M. (2007). Dexamethasone promotes DMP1 mRNA expression by inhibiting negative regulation of Runx2 in multipotential mesenchymal progenitor, ROB-C26. *Cell Biology International* xx, 1-8.
- Minguell, J. J., Erices, A., e Conget, P. (2001). Mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)* 226(6), 507-520.
- Mitchell J. B., McIntosh, K., Zvonic, S., Garrett, S., Floyd, Z. E., Kloster, A., Di Halvorsen, Y., Storms, R. W., Goh, B., Kilroy, G., Wu, X. e Gimble, J. M. (2005). Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells* 24(2), 376-385.
- Moore, J. H. Jr., Kolaczynski, J. W., Morales, L. M., Considine, R. V., Pietrzakowski, Z., Noto, P. F., e Caro, J. F. (1995). Viability of fat obtained by syringe suction lipectomy: effects of local anesthesia with lidocaine. *Aesthetic Plast Surg* 19, 335-339.
- Murry, C. E., Soonpaa, M. H., Reinecke H., Nakajima, H., Nakajima, H. O., Rubart, M., Pasumarthi, K. B. S., Virag, J. I., Bartelmez, S. H., Poppa, V., Bradford, G., Dowell, J. D., Williams, D. A. e Field, L. J.(2004). Haematopoietic stem cells do not transdifferentiate into cardiac myocytes in myocardial infarction. *Nature* 428, 668-674.
- Nakase, T., Nomura, S., Yoshikawa, H., Hashimoto, J., Hirota, S., Kitamura, Y., Oikawa, S., Ono, K. e Takaoka, K. (1994). Transient and local expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing. *J. Bone Miner. Res.* 9(5), 651-659.
- Noël, D., Caton, D., Roche, S., Bony, C., Lehmann, S., Casteilla, L., Jorgensen, C. e Cousin, B. (2008). Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res.* 314(7), 1575-1584.

- Oedayrajsingh-Varma, M. J., van Ham, S. M., Knippenberg, M., Helder, M. N., Klein-Nulend, J., Schouten, T. E., Ritt, M. J. P. F., e van Milligen, F. J. (2006). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure. *Cytotherapy* 8(2), 166-177.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J. Cell Sci. Suppl.* 10, 63-76.
- Parfitt, A. M. (1993). The two faces of growth: Benefits and risks to bone integrity. *Osteoporosis International.* 4(6), 382-398.
- Patrick, Jr. C. W. (2000). Adipose tissue engineering: the future of breast and soft tissue reconstruction following tumor resection. *Semin Surg Oncol* 19(3), 302-311.
- Patrick, C. W. (2004). Breast tissue engineering. *Annu Rev Biomed Eng* 6, 109-130.
- Pollak, C., Arnaud, E., Renier, D. e Marie, P. J. (1997). Age-related changes in bone formation, osteoblastic cell proliferation, and differentiation during postnatal osteogenesis in human calvaria. *J. Cell. Biochem.*, 64(1): 128-139.
- Prentice, D. A. (2004). The President's council on bioethics: adult stem cells.
- Puzas, J. E. (1993). *The Osteoblast*. New York: Raven Press, 2nd ed.
- Rahaman, M. N. e Mao, J. J. (2005). Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng.* 91(3), 261-284.
- Regateiro, F., Soares, J., Lobo Antunes, J., Fevereiro, P., e Cabral, R. A. (2005). Relatório sobre investigação de células estaminais. Conselho Nacional de Ética para as Ciências da Vida.
- Rodbell, M. (1964). Metabolism of isolated fat cells. Effects of hormone on fat metabolism and lipolysis. *J Biol Chem* 239, 375-380.
- Rodriguez, A. M., Elabd, C., Amri, Ez-Z., Ailhaud, G., Dani, C. (2005). The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 87, 125-128.
- Santos, A. A., Miranda, C. D. O., Alves, M. T. S. e Faloppa, F. (2005). O papel da protein morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop Bras* 13(4), 194.
- Sen, A., Lea-Currie, Y. R., Sujkowska, D., Franklin, D. M., Wilkison, W. O., Halvorsen, Y. D., e Gimble, J. M. (2001). Adipogenic potential of human adipose derived stromal cells from multiple donors is heterogeneous. *J Cell Biochem* 81(2), 312-319.
- Shen, F. H., Zeng, Q., Lv, Q., Choi, L., Balian, G., Li, X. e Laurencin, C. T. (2006). Osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells treated with GDF-5 cultured on a novel three-dimensional sintered microsphere matrix. *Spine J.* 6(6), 615-623.

- Shiga, M., Kapila, Y. L., Zhang, Q., Hayami, T. e Kapila, S. (2003). Ascorbic Acid Induces Collagenase-1 in Human Periodontal Ligament Cells but Not in MC3T3-E1 Osteoblast-Like Cells: Potential Association Between collagenase Expression and Changes in Alkaline Phosphatase Phenotype. *J. Bone. Min. Res.* 18: 67-77.
- Shore, E. M., Ahn, J., Jan de Beur, S., Li, M., Xu, M. Gardner, R. J., Zasloff, M. A., Whyte, M. P., Levine, M. A. e Kaplan, F. S. (2002). Paternally inherited inactivating mutations of the *GNAS1* gene in progressive osseous heteroplasia. *New Engl J Med* 346(2), 99-106.
- Silvério Cabrita, A. M. (1993). Tecido ósseo – Alguns aspectos morfológicos e funcionais. *Rev. Port. Ortop. Traum.* 1, 102-108.
- Sinha, S. e Chen, J. K. (2006). Purmorphamine activates the Hedgehog pathway by targeting Smoothed. *Nature Chemical Biology* 2(1), 29-30.
- Smith, A. G. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 435- 462.
- Snow, N. E. (2003). Stem cell research: new frontiers in science and ethics. Notre Dame, Ind.: University of Notre Dame Press.
- Strem, B. M. e Hedrick, M. H. (2005). The growing importance of fat in regenerative medicine. *TRENDS in Biotechnology* 23(2), 64-66.
- Strem, B. M., Hicok, K. C., Zhu, M. Wulur, I., Alfonso, Z., Schreiber, R. E., Fraser, J. K., e Hedrick, M. H. (2005). Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54(3), 132-141.
- Takahashi, N., Udagawa, N., Takami, M., e Suda, T. (2002). Cells of Bone. Osteoclast generation. In: Eds. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G. e Rodan, G. A., *Principles of Bone Biology*, Academic Press, San Diego, Vol. I, 2ª Ed., 109-126.
- Tarnowski, M. e Sieron, A. L. (2006). Adult stem cells and their ability to differentiate. *Med Sci Monit.* 12(8), 154-163.
- Ter Brugge, P. J, e Jansen, J. A. (2002). *In Vitro* Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Cells Subcultured with and without Dexamethasone. *Tissue Engineering* 8(2), 321-331.
- Thirumala, S., Gimble, J. M., e Devireddy, R. V. (2005). Transport Phenomena During Freezing of Adipose Tissue Derived Adult Stem Cells. *Biotechnology and Bioengineering*, 92(3): 372-383.
- Tholpady, S. S., Katz, A. J. e Ogle, R. C. (2003). Mesenchymal Stem Cells From Rat Visceral Fat Exhibit Multipotential Differentiation In Vitro. *The Anatomical Record Part A* 272A, 398-402.
- Tholpady, S. S., Llull, R., Ogle, R. C., Rubin, J. P., Futrell, J. W., e Katz, A. J. (2006). Adipose tissue: stem cells and beyond. *Clin Plast Surg* 33(1), 55-62.
- Titorencu, I., Jinga, V. V., Constantinescu, E., Gafencu, A. V., Ciohodaru, C., Manolescu, I., Zaharia, C. e Simionescu, M. (2007). Proliferation, differentiation

and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy* 9(7), 682-696.

Triffitt, J. T. (1996). The Stem Cell of the Osteoblast. In: Edts. Bilezikian, J. P., Ritz, L. G. e Rodan, G. A., *Principles of Bone Biology*, Academic Press, San Diego, 39-50.

Van, R. L., Bayliss, C. E., e Roncari, D. A. K. (1976). Cytological and enzymological characterization of adult human adipocyte precursors in culture. *J Clin Invest* 58(3), 699-704.

Vats, A., Tolley, N. S., Polak, J. M., e Buttery, L. D. (2002). Stem cells: sources and applications. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 27(4), 227-232.

Verfaillie, C. M. (2006). "Adult" Stem Cells: Tissue Specific or Not?. In: Lanza, R. Ed. *Essentials of Stem Cell Biology*. Elsevier Academic Press: Oxford, 1-9.

Vergara, M. N., Arsenijevic, Y. e Rio-Tsonis, K. D. (2005). CNS Regeneration: A Morphogen's Tale. *J Neurobiol.* 64(4) 491-507.

Vescovi, A. (2002). Células Estaminais, as "Pérolas" da Vida. *Ciência e Saúde-Revista Científica do Hospital São Rafael.* 2(1).

von Heimburg, D., Kuberka, M., Rendchen, R., Hemmrich, K., Rau, G., e Pallua, N. (2003). Preadipocyte-loaded collagen scaffolds with enlarged pore size for improved soft tissue engineering. *Int J Artif Organs* 26(12), 1064-1076.

Waller, E. K., Olweus, J., Lund-Johansen, F., Huang, S., Nguyen, M., Guo, G. R., e Terstappen, L. (1995). The "common stem cell" hypothesis reevaluated: Human fetal bone marrow contains separate populations of hematopoietic and stromal progenitors. *Blood* 85(9), 2422-2435.

Wang, E. A., Israel, D., Kelly, S. e Luxenberg, D. P. (1993). Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells. *Growth Factors* 9, 57-71.

Weinzierl, K., Hemprich, A. e Frerich, B. (2006). Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J Cranio-Maxillofacial Surg.* 34(8), 466-471.

Weissman, I. L., Anderson, D. J. e Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 387-403.

Winter, A., Breit, S., Parsch, D., Benz, K., Steck, E., Hauner, H., Weber, R. M., Ewerbeck, V. e Richter, W. (2003). Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum* 48(2), 418-429.

Wu, X., Ding, S., Ding, Q. Gray, N. S. e Schultz, P. G. (2002). A small molecule with osteogenesis-inducing activity in multipotent mesenchymal progenitor cells. *J. Am. Chem. Soc.* 124(49), 14520-14521.

Wu, X., Walker, J., Zhang, J., Ding, S. e Schultz, P. G. (2004). Purmorphamine induces osteogenesis by activation of the hedgehog signaling pathway. *Chemistry & Biology* 11(9), 1229-1238.

Yang, X., Qu, L., Wang, X., Zhao, M., Li, W., Hua, J., Shi, M., Moldovan, N., Wang, H. e Dou, Z. (2007). Plasticity of Epidermal Adult Stem Cells Derived From Adult Goat Ear Skin. *Molecular Reproduction and Development* 74, 386-396.

Yoshimura, H., Muneta, T., Nimura, A., Yokoyama, A., Koga, H. e Sekiya, I. (2006). Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res.* 327(3), 449-462.

Yuasa, T., Kataoka, H., Kinto, N., Iwamoto, M., Enomoto-Iwamoto, M., Iemura, S., Ueno, N., Shibata, Y., Kurosawa, H. e Yamaguchi, A. (2002). Sonic hedgehog is involved in osteoblast differentiation by cooperating with BMP-2. *J Cell Physio.* 193(2), 225-232.

Zhang, X., Yang, M., Lin, L., Chen, P., Ma, K. T., Zhou, C. Y. e Ao, Y. F. (2006). Runx2 Overexpression Enhances Osteoblastic Differentiation and Mineralization in Adipose - Derived Stem Cells in vitro and in vivo. *Calcified Tissue International.* 79(3), 169-178.

Zoloth, L. (2006). The Ethics of Human Stem Cells Research: Immortal Cells, Moral Selves. In *Essentials of Stem Cell Biology* edited by Lanza. R. , Elsevier Academic Press, Amsterdam, 479-488.

Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J. I., Futrell, W. J., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., e Hedrick, M. H. (2001). Multi-lineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7(2), 211-226.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Urate, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, F. K., Benhaim, P., e Hedrick, M. H. (2002). Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* 13(12), 4279-4295.