

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

FERNANDA URSOLI FERREIRA

Investigação de diferentes fontes de células-tronco mesenquimais da medula óssea e biomateriais para a geração de ossículos humanizados funcionais *in vivo*

Ribeirão Preto
2021

FERNANDA URSOLI FERREIRA

Investigação de diferentes fontes de células-tronco mesenquimais da medula óssea e biomateriais para a geração de ossículos humanizados funcionais *in vivo*

Versão original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Células-tronco e terapia celular

Orientador: Dr. Dimas Tadeu Covas

Ribeirão Preto
2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica

Ferreira, Fernanda Ursoli

Investigação de diferentes fontes de células-tronco mesenquimais da medula óssea e biomateriais para a geração de ossículos humanizados funcionais *in vivo*, 2021.

110 p.: il.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Covas, Dimas Tadeu

1. Células-tronco mesenquimais. 2. Ossículo Humanizado. 3. Nicho hematopoiético heterotópico. 4. Biomateriais.

Nome: FERREIRA, Fernanda Ursoli

Título:

Investigação de diferentes fontes de células-tronco mesenquimais da medula óssea e biomateriais para a geração de ossículos humanizados funcionais *in vivo*.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Células-tronco e terapia celular

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com apoio das seguintes instituições:

- Centro de Terapia Celular - CTC-CEPID-FAPESP
(número 2013/08135-2)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior –
Brasil (CAPES)
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP)
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo (FRMP-USP)

Aos meus pais, Roberto e Ana Lúcia, ao meu marido Roberto Vinicius pelo suporte, incentivo, confiança e palavras de encorajamento, e aos meus filhos pelo amor incondicional e por tornarem meus dias mais prazerosos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e sabedoria que me proporcionou durante esta etapa de minha vida, e por concretizar mais um sonho. “O coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa dos lábios vem do Senhor.” (Provérbios 16:1).

Aos meus pais, Roberto e Ana, por sempre me incentivarem e me apoiarem em meus estudos e sonhos, e por nunca medirem esforços para me ajudar a realizá-los.

Ao meu marido, Roberto Vinicius, pela paciência, pelo incentivo e suporte diário.

Aos meus filhos, Lorenzo e Sarah, e ao meu enteado Isaac, por cada sorriso e cada abraço que sempre me confortam.

Às minhas irmãs, Roberta e Nathália, pelo carinho, amizade e torcida diária.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas, pela oportunidade de estudar, trabalhar e me aperfeiçoar por tantos anos nesta instituição onde aprendi muito. Pela orientação e pelas conversas esclarecedoras.

À Profa. Dra. Simone Kashima, pela confiança, apoio e ensinamento diário.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular e Transferência Gênica do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde este trabalho foi desenvolvido e os quais direta ou indiretamente tiveram participação neste estudo. Muito obrigada Joseane, Dra. Evandra, Juliana, Jonathan, Mariane, Elaine, Débora, Rafaela, Dra. Daiane Maciely e especialmente ao Prof. Dr. Lucas Eduardo Botelho pelas conversas e discussões pertinentes ao delineamento desta tese. Meu obrigada principalmente ao Péricles pelo envolvimento em etapas primordiais dos experimentos e discussões de resultados.

Agradeço especialmente ao amigo Felipe Augusto Rós, pela amizade, companheirismo, incentivo, dedicação e apoio incondicional. Pela grande ajuda nos experimentos e nas discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Fabricio Fogagnolo pela grande disponibilidade e indispensável ajuda em nos ceder as amostras de fragmentos ósseos utilizadas para a realização deste trabalho. Pelo incentivo e confiança em nosso trabalho.

Aos professores e colegas da Faculdade de Odontologia da USP, Dr. Adalberto Rosa, Dr. Márcio Beloti e Dr. Gileade, pelas conversas prazerosas e trocas de experiências em temas pertinentes à metodologia e resultados referentes principalmente à histologia.

À Patrícia Vianna e Camila Menezes pelo suporte essencial durante as análises por citometria de fluxo.

Às secretárias Carminha, Dalvinha e Rosana pela grande ajuda e sempre simpatia nas soluções de assuntos burocráticos. Pela disponibilidade e agilidade sempre.

À Nayara, pela disposição e por me auxiliar nos procedimentos de histologia.

Ao laboratório de Terapia Celular, especialmente à Dra. Maristela, Sâmia e Taísa pela amizade, paciência e trocas de ensinamentos em cultura celular.

À Dra. Cleide (Cleidinha), pela amizade, disponibilidade, pelas conversas prazerosas sobre meus experimentos e por toda ajuda nos experimentos com modelo animal.

À Sandra Navarro, pela contribuição na arte gráfica deste trabalho.

A todos os funcionários do Hemocentro de Ribeirão Preto, pela companhia cotidiana e por contribuírem das mais diversas maneiras para prover condições essenciais para a execução dos projetos de pesquisa.

A todos os colegas do Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo companheirismo cotidiano, pelas risadas e momentos de descontração.

À Fundação Hemocentro por ceder toda a infraestrutura e materiais de consumo necessários para a realização desta tese de doutorado.

“What I cannot create, I do not understand.”

Richard Feynman

RESUMO

FERREIRA, F. U. **Investigação de diferentes fontes de células-tronco mesenquimais da medula óssea e biomateriais para a geração de ossículos humanizados funcionais *in vivo***. 2021. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

O nicho hematopoiético fornece um microambiente adequado para as células-tronco hematopoiéticas (CTHs) residirem, e é responsável pelo destino destas células quanto à quiescência, autorrenovação e diferenciação. Neste nicho, diferentes tipos celulares (células endoteliais, estromais, osteoblastos, entre outros), fatores solúveis e concentração de oxigênio cooperam para dar suporte às CTHs e hematopoese. Pouco é conhecido sobre a identidade dos tipos celulares que compõem o microambiente hematopoiético *in vivo*. Sabe-se que células-tronco mesenquimais (CTMs) são capazes de dar suporte às CTHs. As CTMs são definidas como uma população clonogênica, multipotente, podendo se diferenciar *ex vivo* em células da linhagem mesenquimal. Embora encontradas em vários tecidos, elas foram primeiramente isoladas da medula óssea (MO), onde estão presentes em diferentes compartimentos do nicho medular, podendo ser encontradas na região perivascular da MO bem como próxima ao endóstio. Sendo assim, as CTMs residentes no nicho hematopoiético podem representar duas populações com características distintas para dar suporte às CTHs durante a hematopoese. Nas últimas décadas, diferentes tipos celulares têm sido cultivados em cultivo 3D com biomateriais/scaffolds e implantados *in vivo* visando a geração de modelos de organoides (micro tecidos) a fim de recapitular o comportamento destes tecidos para estudos de morfogênese e função. Portanto, é relevante adaptar o cultivo de CTMs humanas em biomateriais que mimetizam a estrutura do microambiente da CTH *in vivo*, e induzir a formação de um ossículo humanizado (hOss) contendo nicho heterotópico *in vivo* para recapitular um microambiente de MO humanizado. Este tipo de modelo permite melhorar o cenário dos estudos de xenotransplante com células hematopoiéticas sadias e malignas. Assim, este trabalho tem como objetivo produzir um hOss heterotópico a partir de CTMs humanas da MO e osso esponjoso cultivadas com células endoteliais e biomateriais osteocondutores. Tal conhecimento proporcionará entender a regulação

das CTHs mediada pelo nicho, podendo, futuramente, ajudar no melhoramento das respostas clínicas dos transplantes de MO.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Ossículo Humanizado. Nicho hematopoiético heterotópico. Biomateriais.

ABSTRACT

FERREIRA, F. U. **Investigation of different sources of bone marrow mesenchymal stem cells and biomaterials for the generation of functional humanized ossicles *in vivo***. 2021. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

The hematopoietic niche provides a suitable microenvironment for hematopoietic stem cells (HSC) to reside, and is responsible for the fate of these cells in terms of quiescence, self-renewal and differentiation. In the niche, different cell types (endothelial, stromal, osteoblast cells, among others), soluble factors and oxygen concentration cooperate to support HSC and hematopoiesis. Little is known about the identity of the cell types that make up the hematopoietic microenvironment *in vivo*. It is known that mesenchymal stem cells (MSC) are capable of supporting HSC. MSC are defined as a clonogenic, multipotent population that can differentiate *ex vivo* into mesenchymal lineage cells. Although found in several tissues, they were first isolated from the bone marrow (BM), where they are present in different compartments of the medullary niche, and can also be found in the perivascular region of the BM as well as close to the endosteum. Therefore, MSC residing in the hematopoietic niche may represent two populations with distinct characteristics to support HSC during hematopoiesis. In recent decades, different cell types have been cultivated in 3D culture with biomaterials/scaffolds and implanted *in vivo* aiming at the generation of organoid models (micro tissues) in order to recapitulate the behavior of these tissues for studies of morphogenesis and function. Therefore, it is relevant to adapt the cultivation of human MSC in biomaterials that mimic the structure of the HSC microenvironment *in vivo*, and induce the formation of a humanized ossicle (hOss) containing heterotopic niche *in vivo* to recapitulate a humanized BM microenvironment. This kind of model improves the scenario of xenotransplantation studies of healthy and malignant hematopoietic cells. Thus, this work aims to produce a heterotopic hOss from human MSC from BM and trabecular bone cultivated with endothelial cells and osteoconductive biomaterials. Such knowledge will provide an understanding of the niche-mediated regulation of HSC, which may help, in the future, to improve the clinical responses of BM transplants.

Keywords: Mesenchymal stem cells, humanized ossicle, heterotopic hematopoietic niche, biomaterials.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia experimental	35
Figura 2 - Isolamento das CTMs derivadas de fragmentos de OE e do lavado da MO.	38
Figura 3 - Preparo do biomaterial Gelfoam®.....	48
Figura 4 - Implantação do GF contendo CTMs e CEs em camundongos NSG.	49
Figura 5 - Preparo <i>in vitro</i> e Implantação <i>in vivo</i> dos organoides contendo CTMs- MO/CTMs-OE/HUVEC e HA + β -TCP.....	51
Figura 6 - Caracterização das CTMs quanto à morfologia.	57
Figura 7 - Caracterização das CTMs quanto aos marcadores típicos de linhagem mesenquimal.....	58
Figura 8 - Potencial de diferenciação das CTMs.....	59
Figura 9 - Análise por PCR em tempo real (n=3) da expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético e osteogênese.	61
Figura 10 - Avaliação de proteínas secretadas pelas CTMs-MO e OE envolvidas no nichos hematopoiético.	62
Figura 11 - Análise por imunohistoquímica do marcador estromal CD146 em amostra de osso esponjoso metafisário.	63
Figura 12 - Fluxograma do estabelecimento de um modelo de hOss para xenotransplante de células hematopoiéticas em camundongos.	64
Figura 13 - Bioluminescência <i>in vitro</i> das CTMs modificadas para expressar luciferase.	65
Figura 14 - Teste de viabilidade celular após 7 dias de cultivo das CTMs com <i>Gelfoam</i> ®.....	66
Figura 15 - Visualização por microscopia de fluorescência das CE coradas com corante fluorescente e por PIBB das CTMs transduzidas com Luciferase.	67
Figura 16 - Rastreamento das CTMLuc+ implantadas <i>in vivo</i>	68
Figura 17 - Isolamento dos organoides.	69
Figura 18 - Análise histológica dos organoides coletados após 56 dias de implante dos biomateriais com CTMs e CE.....	70
Figura 19 - Perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação osteogênica das CTMs Luc+.	71
Figura 20 - Análise macroscópica e microscópica dos organoides coletados 60 dias após o implante dos biomateriais com CTMs, HUVECs e BMP4.....	72

Figura 21 - Análise microscópica por imunohistoquímica dos organoides coletados 60 dias após o implante dos biomateriais com CTMs, HUVECs e BMP4.	74
Figura 22 - Análise macroscópica dos tecidos heterotópicos neoformados.	76
Figura 23 - Análise histológica dos organoides coletados 70 dias após o implante dos biomateriais com CTMs + HUVECs.	78
Figura 24 - Bioluminescência <i>in vitro</i> das MOLM-13 modificadas para expressar luciferase.	79
Figura 25 - Análise <i>in vivo</i> por PIBB da progressão tumoral.	80
Figura 26 - Análise <i>ex vivo</i> por PIBB dos organoides 12 dias após infusão de MOLM-13 Luc+.	81
Figura 27 - Quantificação da intensidade de bioluminescência <i>ex vivo</i> por PIBB dos organoides 12 dias após infusão de MOLM-13 Luc+.	82
Figura 28 - Organoides humanizados formados 8-10 semanas após transplante de MOLM-13 Luc+ em NSG.	84
Figura 29 - Células hematopoiéticas malignas - MOLM-13 Luc+ enxertam ossículos heterotópicos derivados de CTMs humanas.	86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Relação dos anticorpos utilizados para a realização da microscopia de fluorescência	41
Quadro 2 - Relação das sondas utilizadas nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvo	43

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ACTB	β -Actine
ALPL	Alkaline phosphatase
ANGPT2	Angiopoietin 2
ANGPTL5 5	Angiopoietin-like protein 5
B2M	β 2-Microglobulin
BCP	Fosfato de cálcio bifásico
BGLAP	Bone gamma-carboxyglutamate protein
BMP2	Bone morphogenetic protein 2
BMP4	Bone morphogenetic protein 4
BSA	Bovine serum albumin
CD105	Cluster of differentiation 105
CD14	Cluster of differentiation 14
CD146	Cluster of differentiation 146
CD19	Cluster of differentiation 19
CD271	Cluster of differentiation 271
CD34	Cluster of differentiation 34
CD45	Cluster of differentiation 45
CD73	Cluster of differentiation 73
CD90	Cluster of differentiation 90
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CE	Células endoteliais
CFU-F	Unidades formadoras de colônias fibroblásticas
Ct	Cycle threshold
CT	Célula(s)-tronco
CTHs	Célula(s)-tronco hematopoiéticas
CTMS-MOLuc	Células-tronco mesenquimais de medula óssea que expressam Luciferase
CTMs-OELuc	Células-tronco mesenquimais de osso esponjoso que expressam Luciferase
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CXCL12	CX-C motif chemokine 12
CXCR4	CX-C receptor type 4
DAPI	Dihidrocloro de 4,6 diamino-2-fenilindol;
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECFCs	Células formadoras de colônias endoteliais
ECM	Extracellular matrix
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGM-2	Endothelial cell growth medium 2
FGF-2	Fibroblast growth factor
FL	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FLT3L	FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FSC	Forward scatter
GAL-1	Galectin-1
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GF	<i>Gelfoam</i> ®
Grem-1	Gremlin 1

GVHD	Graft-versus-host disease
HA	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina & Eosina
HEK 293T	Human embryonic kidney 293 cells
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia-inducible transcription factors
HIV	Human immunodeficiency virus
HLA-DR	Human leukocyte antigen - DR serotype
HMVEC	Human dermal microvascular endothelial cells
hOss	Ossículos humanizados ectópicos
HRP	Horse peroxidase
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
IFN α	Interferon alfa
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IL6	Interleukin 6
iPSC	Induced pluripotent stem cells
ISCT	International Society for Cell Therapy
KIT-LG	KIT ligand (Stem cell factor)
MO	Medula óssea
OE	Osso esponjoso
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PIBB	Processamento de imagem baseado em bioluminescência
PTGES	Microsomal prostaglandin E synthase-1
qPCR	Quantitative PCR
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region of interest
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SCF	Stem cell factor
SCF	Stem cell factor
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
SFB	Soro fetal bovino
SMAD-4	Mothers against decapentaplegic homolog 4
SNS	Sistema nervoso simpático
SPARC	Secreted protein acidic and rich in cysteine
SSC	Side scatter
TA	Temperatura ambiente
TGF- β 1	Transforming growth factor beta 1
URE	Unidades relativas de expressão
VCAM-1	Vascular cell adhesion protein 1
VEFG-A	Vascular endothelial growth factor A
VEGF-B	Vascular endothelial growth factor B
VEGF-C	Vascular endothelial growth factor C
VSV-G	Vesicular stomatitis virus G
α -MEM	Minimum essential medium α
β 3-AR	Receptor adrenérgico β 3

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	Nicho hematopoiético	20
1.2	Culturas tridimensionais	23
1.3	Células-tronco mesenquimais	25
1.4	Desenvolvimento de Ossículos / Organoides humanizados	28
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	33
3	OBJETIVOS	34
3.1	Objetivo geral	34
3.2	Objetivos específicos	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Apreciação do projeto no aspecto de biossegurança e ética em pesquisa com seres humanos e animais	35
<i>4.1.1</i>	<i>Avaliação do projeto em relação à biossegurança e a ética em pesquisa envolvendo seres humanos e animais</i>	<i>36</i>
<i>4.1.2</i>	<i>Crítérios de seleção e exclusão dos doadores humanos de fragmentos ósseos e punção de medula óssea</i>	<i>36</i>
4.2	Isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs)	36
<i>4.2.1</i>	<i>Isolamento de CTMs derivadas do “lavado” da medula óssea (CTMs-MO) e do osso esponjoso (CTMs-OE)</i>	<i>36</i>
<i>4.2.2</i>	<i>Isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da punção da medula óssea</i>	<i>38</i>
4.3	Caracterização das CTMs	39
<i>4.3.1</i>	<i>Caracterização das CTMs isoladas quanto ao perfil imunofenotípico</i>	<i>39</i>
<i>4.3.2</i>	<i>Caracterização das CTMs por imunofluorescência quanto à expressão de marcadores típicos mesenquimais</i>	<i>40</i>
<i>4.3.3</i>	<i>Caracterização das CTMs quanto à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos</i>	<i>41</i>
4.4	Análise da expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético	42
4.5	Avaliação da presença de proteínas expressas em CTMs e que estão envolvidas no nicho hematopoiético	44
4.6	Análise por imunohistoquímica em amostra de osso esponjoso metafisário e nas amostras de hOss geradas	44

4.7	Produção de víriões carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro	45
4.8	Modificação gênica das CTMs MO e OE para expressar a proteína Luciferase.....	46
4.9	Cultivo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> das CTMs-MO/CTMs-OE e CE em biomaterial: Cultivo <i>in vitro</i> e implantação <i>in vivo</i> das CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE em Gelfoam®	47
4.9.1	<i>Cultivo in vitro das CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE em Gelfoam®.....</i>	47
4.9.2	<i>Procedimento cirúrgico para a implantação do biomaterial contendo CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE em camundongos NSG.....</i>	48
4.9.3	<i>Processamento e análises dos organoides formados in vivo a partir da implantação do Gelfoam®contendo CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE.....</i>	50
4.10	Implantação em camundongos NSG de biomateriais, produzidos à base de componentes inorgânicos do osso como hidroxiapatita (HA) e tricálcio fosfato (β-TCP), contendo CTMs-MO/CTMs-OE e HUVEC.....	50
4.11	Processamento histológico dos organoides formados <i>in vivo</i>.....	51
4.12	Teste de citotoxicidade dos biomateriais baseado em resazurina	52
4.13	Caracterização <i>in vitro</i> das CTMs expressando Luc+ quanto à imunofenotipagem e diferenciação em adipócitos e osteócitos.....	53
4.14	Modificação gênica da linhagem celular MOLM-13 para expressar a proteína Luciferase.....	53
4.15	Injeção intravenosa da linhagem MOL-13 Luc+ em NSG com organoides pré-formados	53
4.16	Análise Estatística	54
5	RESULTADOS	55
5.1	Caracterização das CTMs isoladas dos fragmentos de ossos esponjosos e da medula óssea.....	55
5.1.1	<i>As células isoladas apresentaram morfologia e perfil imunofenotípico condizentes com CTMs</i>	55
5.1.2	<i>Avaliação da multipotencialidade in vitro das CTMs quanto à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos</i>	58
5.1.3	<i>CTMs isoladas dos diferentes microambientes apresentaram expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético.....</i>	60

5.1.4	<i>As CTMs expressam proteínas que estão envolvidas no nicho hematopoiético</i>	60
5.1.5	<i>Fragmentos do OE metafisário da tíbia expressam o marcador progenitor mesenquimal CD146</i>	62
5.2	Estabelecimento de um ossículo / organoide humanizado heterotópico a partir da geração de organoides contendo CTMs e biomateriais	63
5.2.1	<i>CTMs modificadas geneticamente expressam a proteína repórter Luciferase (Luc+)</i>	64
5.2.2	<i>Cultivo 3D das CTMs e CEs com biomaterial Gelfoam®</i>	65
5.2.3	<i>CTMs Luc+ aderiram e proliferaram no Gelfoam® in vitro e in vivo</i>	66
5.2.4	<i>CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ permanecem in vivo formando um novo tecido heterotópico após implantação com Gelfoam® em NSG</i>	67
5.2.5	<i>CTMs modificadas com luciferase diminuem a capacidade de diferenciação osteogênica in vitro</i>	70
5.2.6	<i>CTMs-MO/CTMs-OE implantadas em Gelfoam® com HUVECs e o indutor osteogênico BMP4 formam organoides mais rígidos e vascularizados</i>	71
5.2.7	<i>Organoides gerados a partir de biomateriais à base de componentes inorgânicos do osso como hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato (HA+β-TCP), contendo CTMs-MO/CTMs-OE e HUVEC apresentam formação óssea</i>	74
5.2.8	<i>Linhagem celular leucêmica MOLM-13 migram e enxertam os organoides humanizados heterotópicos gerados a partir de biomateriais (HA+β-TCP) contendo CTMs</i>	77
5.2.9	<i>Linhagem celular MOLM-13 expressa a proteína repórter bioluminescente luciferase 2</i>	77
5.2.10	<i>MOLM-13 Luc+ migram para os microambientes heterotópicos neoformados</i>	79
5.2.11	<i>MOLM13 Luc+ enxertam organoides humanizados derivados de CTMs humanas</i>	82
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÕES	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 Nicho hematopoiético

As células-tronco hematopoiéticas (CTHs) possuem a capacidade de produzir todas as células do sistema hematopoiético. Como unidade funcional da hematopoese, essas células são responsáveis pela autorrenovação e manutenção do pool de múltiplas linhagens sanguíneas. Além disso, as células do sangue têm alta taxa de renovação: estima-se que os humanos produzem 1×10^6 células sanguíneas a cada segundo (SZADE *et al.*, 2018). Logo, devido a demanda clínica de CTH durante um transplante de medula óssea (MO), entender o processo de hematopoese e a relação das CTHs com o seu microambiente é de grande importância (SUGIMURA, 2016).

Muitos anos atrás, Schofield e colaboradores (1978) propôs que o microambiente da MO, referido como o “nicho”, também fornece fatores cruciais e indispensáveis para a autorrenovação e diferenciação de CTH. Há evidências que o nicho controla a quiescência e a proliferação desta célula, fornece informações estratégicas para a sua atuação nos tecidos, regula o destino de suas “células-filhas” (células diferenciadas) e restringe sua taxa de mutação. Embora esses experimentos iniciais reforcem a importância do nicho para a atividade das CTH, os mecanismos subjacentes às interações das CTH com o nicho permaneceram desconhecidas (BOURGINE *et al.*, 2019; SCHOFIELD, 1978).

O que sabemos, baseados na literatura, é que as decisões sobre o destino das células observadas nos compartimentos das CTs são rigidamente reguladas por fatores intrínsecos e extrínsecos. As CTs residentes na MO são envoltas por diversas células e matriz extracelular que dão suporte ao crescimento e manutenção das mesmas. Este conjunto de células e matriz no qual é denominado de nicho de CTs, permite a transdução de sinais facilitado por fatores solúveis e moléculas de adesão. Assim, o nicho fornece um microambiente específico para as CTHs residirem e é responsável pela ativação de processos como quiescência, autorrenovação, proliferação e diferenciação destas células (PASSARO *et al.*, 2017; SCADDEN, 2006; VUNJAK-NOVAKOVIC; SCADDEN, 2011).

No entanto, a composição celular e molecular precisa do nicho hematopoiético humano permanece em grande parte desconhecida (BOURGINE; MARTIN;

SCHROEDER, 2018; VAN PEL; FIBBE; SCHEPERS, 2016). Estudos prévios demonstraram que células de linhagem osteogênica controlam a formação do nicho e que as CTHs são encontradas preferencialmente na região endosteal (ZHAO *et al.*, 2014). As CTHs também foram localizadas preferencialmente em regiões perivasculares, perto de células reticulares que expressam altos níveis da quimiocina CXCL12 (também conhecida como SDF-1) (CALVI *et al.*, 2003; KIEL *et al.*, 2005; SUGIYAMA *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2003). A mobilização das CTH requer a sinalização do sistema nervoso simpático (SNS) que, quando em homeostasia, leva a oscilações rítmicas controladas pela expressão de Cxcl12 através do receptor adrenérgico β_3 (β_3 -AR, codificado por Adrb3). As fibras simpáticas na MO estão associadas com vasos sanguíneos e células reticulares adventícias conectadas por junções gap, formando assim uma rede estrutural denominada neuro reticular (MÉNDEZ-FERRER *et al.*, 2010).

Outro tipo celular relevante para manter o nicho hematopoiético são as células endoteliais (CEs). Além de secretar fatores pró-angiogênicos, elas também regulam elementos vasculares que permitem a habilidade de auto-renovação e diferenciação das CTHs (BUTLER *et al.*, 2010).

Uma das grandes dificuldades em estudar as CTHs *in vitro* é mantê-las por um longo período em cultura, uma vez que *in vivo* estas células são suportadas por fatores solúveis e outros tipos celulares aqui já citados. Antigamente a expansão *in vitro* de CTHs para o transplante de MO era necessária devido ao baixo rendimento destas células em cultura após o isolamento da MO de doadores. Assim, alguns estudos identificaram um coquetel de citocinas para manter e expandir com sucesso CTHs *in vitro*. Dentre essas citocinas destacam-se SCF (stem cell factor), FL (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand), G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor), IL-3 (interleukin 3), IL-6 (interleukin 6), ANGPTL5 (angiopoietin-like protein 5), dentre outras. Estas moléculas podem aumentar a eficácia do transplante de MO (PINEAULT; ABU-KHADER, 2015). No final da década de 70, foi descrito um sistema de cultura líquida que permitia a proliferação das CTHs, de precursores granulocíticos e a manutenção da granulopoese em cultura por várias semanas. Isso foi possível graças ao cultivo das CTHs com células estromais da MO. As células estromais na MO suportam as CTHs, porém ainda não está claro quais são os fatores ou tipo particular celular que estão envolvidos nesse suporte. (DEXTER; ALLEN; LAJTHA, 1977; revisado por SUGIMURA, 2016). No entanto, mais benefícios podem advir da observação da

estreita associação das CTHs com células do estroma da MO por meio do uso de estruturas que mimetizam a “natureza” do nicho hematopoiético para manter as CTHs na MO (MÉNDEZ-FERRER; SCADDEN; SÁNCHEZ-AGUILERA, 2015).

Portanto, a caracterização de células e fatores que compõem o nicho, em modelos humanizados utilizando camundongos transgênicos, começa a desempenhar um papel importante na biologia médica. Nossa compreensão da hematopoiese humana depende amplamente da analogia feita com o sistema murino (SCHEPERS; CAMPBELL; PASSEGUÉ, 2015). Na realidade, apesar das características genéticas comumente herdadas, a biologia básica das CTH difere entre as espécies e as interações correspondentes com seus nichos não são totalmente conservadas (DOULATOV *et al.*, 2012; VAN PEL; FIBBE; SCHEPERS, 2016). Em consequência, as informações derivadas de estudos murinos não se correlacionam sistematicamente com o sistema humano, levantando preocupações sobre sua relevância direta para o desenvolvimento terapêutico (DOULATOV *et al.*, 2012).

Outra questão importante quando se fala em nicho hematopoiético, é a concentração de oxigênio presente neste microambiente. Evidências demonstram que a sinalização por fatores de transcrição induzíveis por hipóxia (HIF do inglês hypoxia-inducible transcription factors) regulam a manutenção das CTHs. Em condições de hipóxia, o HIF desencadeia uma variedade de respostas adaptativas, tais como, metabolismo anaeróbico, migração celular e neoangiogênese. Fatores HIF têm sido cada vez mais relacionados na regulação da homeostase de CT, particularmente no sistema hematopoiético, no qual HIF- α é expressa em CTH e promove a manutenção das CTHs por meio do estado metabólico glicolítico (MOHYELDIN; GARZÓN-MUVDI; QUIÑONES-HINOJOSA, 2010; SUDA; TAKUBO; SEMENZA, 2011; TAKUBO *et al.*, 2013). Outro fato relevante, é que se acredita que as CTH quiescentes residem predominantemente em áreas periendosteais da MO, caracterizada por baixo nível de oxigênio (ELIASSON; JÖNSSON, 2010; MOHYELDIN; GARZÓN-MUVDI; QUIÑONES-HINOJOSA, 2010; SUDA; TAKUBO; SEMENZA, 2011).

Assim, a melhor compreensão do nicho das CTHs beneficiaria a aplicação clínica destas células em medicina regenerativa. Na verdade, há a necessidade de mimetizar o nicho hematopoiético em modelos experimentais através de abordagens de bioengenharia e terapia celular. Projetar uma MO artificial que reconstitui estruturalmente e funcionalmente a MO natural poderia ser uma poderosa ferramenta

para o estudo da hematopoese e para testar novas terapias abrangendo doenças hematopoiéticas (revisado por SUGIMURA, 2016).

Alguns estudos relatam o papel do microambiente medular na patogênese de tumores hematológicos (KONOPLEVA, Marina *et al.*, 2009; KONOPLEVA, Marina Y.; JORDAN, 2011). Sistemas de cultivo moderno de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas (CTH/CTHp) que mimetizam a fisiologia da medula, proporcionam uma ferramenta experimental para entender a regulação das CTH mediada pelo nicho, tanto em condições fisiológicas como patológicas (SHARMA; LIMAYE; KALE, 2012). Tal conhecimento pode ajudar no melhoramento dos resultados clínicos de transplantes autólogos e alogênicos.

Estudos demonstraram que co-cultivo de CTHp com células estromais são úteis para expandir efetivamente CTHp. Embora a maioria desses estudos de expansão de CTH/CTHp tenham sido realizados em cultura monocamada, alguns métodos em cultura 3D têm sido propostos. Entretanto, a maioria desses estudos foram limitados à exploração em pequena escala de *scaffolds* (arcabouços) de diferentes formas que mimetizam a estrutura do microambiente da CTH *in vivo* (revisado por HUANG *et al.*, 2016).

Modelos avançados de xenotransplante oferecem robusto enxerto e desenvolvimento de hematopoiese humana em ossos de camundongos (RONGVAUX *et al.*, 2014). Isso contribuiu significativamente para a compreensão progressiva das funções das CTH humanas em ambientes saudáveis e patológicos (ANTONELLI *et al.*, 2016; REINISCH *et al.*, 2016). No entanto, esses modelos de camundongos humanizados são incompatíveis com o estudo organizacional e funcional do nicho hematopoiético, pois o microambiente da MO permanece inteiramente murino.

Como alternativa, a possibilidade de projetar ossículos humanizados ectópicos (hOss) utilizando células estromais mesenquimais derivadas da MO humana estão recebendo cada vez mais atenção (BOURGINE *et al.*, 2014; REINISCH *et al.*, 2016; SCOTTI *et al.*, 2013), possibilitando o enxerto de sangue humano em cenários saudáveis e malignos (ABARRATEGI *et al.*, 2017; MARTINE *et al.*, 2017; REINISCH *et al.*, 2016).

1.2 Culturas tridimensionais

O cultivo celular *ex vivo* há anos tem proporcionado a elucidação de processos celulares fundamentais, como mitose, transcrição, tradução e migração celular. No entanto, apesar dos avanços, é preciso pôr em perspectiva a capacidade de compreensão da biologia celular proporcionada por esses modelos, uma vez que cultivo celular *in vitro* é muito diferente do microambiente *in vivo* (CARREL; BURROWS, 1911; HARRISON, 1910) (revisado por EYCKMANS; CHEN, 2017).

As células se organizam dinamicamente em tecidos complexos durante o desenvolvimento, e o arranjo tridimensional (3D) resultante entre as células e a matriz extracelular (ECM, do inglês *extracellular matrix*) proporciona um feedback que regula a função celular e tecidual. A ECM é formada por vários componentes que as células sintetizam, secretam e depositam, sendo importante para o desenvolvimento de muitos tecidos. As células aderem à ECM onde liberam fatores solúveis, como fatores de crescimento e citocinas, os quais são sequestrados dentro da ECM afetando a função e sinalização celular (BONNANS; CHOU; WERB, 2014) (revisado por EYCKMANS; CHEN, 2017).

Nas últimas décadas, a engenharia de tecidos tem sido amplamente estudada e se apresenta como uma terapia promissora. A engenharia de tecidos utiliza conhecimentos de engenharia e de ciências biológicas para o desenvolvimento de tecidos artificiais. É uma ciência interdisciplinar baseada na combinação de células, fatores de crescimento e *scaffolds*/arcabouços (DUPARD *et al.*, 2020; LANGER; VACANTI, 2016, 1993; ROSA, Adalberto Luiz; DE OLIVEIRA; BELOTI, 2008).

Os *scaffolds* têm como função, dentre outras, carregar as células e os fatores de crescimento, quando necessários. Idealmente devem ser tridimensionais, biocompatíveis, mecanicamente estáveis, reabsorvíveis e porosos com poros interconectados (LOGEART-AVRAMOGLU *et al.*, 2005; TANG *et al.*, 2016).

Culturas 3D projetadas incorporando ECM e células embutidas, fornecem um meio para modelar tecidos mais maduros. Os primeiros exemplos de tais modelos organotípicos incluem o uso de *Matrigel*® com células epiteliais para modelar ácino mamário, pulmão, glândula salivar e intestino (BARCELLOS-HOFF *et al.*, 1989; HOFFMAN *et al.*, 1996; SANDERSON *et al.*, 1996; SCHUGER *et al.*, 1990). Mais recentemente, o acoplamento destas abordagens com os avanços de tecnologia de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) e a biologia celular resultaram em inúmeros novos modelos de organoides. Por exemplo, iPSC humanas diferenciadas em células neuroepiteliais cultivadas em *Matrigel*®, formam espontaneamente

estruturas estratificadas semelhantes a retinas (NAKANO *et al.*, 2012), e de forma semelhante, células-tronco neuronais podem estratificar para formar estruturas reminiscentes do córtex do cérebro (LANCASTER *et al.*, 2013). Os organoides similares, também referidos às vezes como micro tecidos, têm sido desenvolvidos para estudar a morfogênese e a função do pulmão, rim, glândula salivar, fígado, pele e vasos sanguíneos (revisado por CLEVERS, 2016; PASSIER; ORLOVA; MUMMERY, 2016). Muitos destes modelos foram amplamente adotados e utilizados com sucesso para capturar o comportamento de numerosos epitélios.

Em contraste com as células epiteliais, as quais estão presentes na superfície e glândulas de todo o corpo, as células estromais mesenquimais, também chamadas de células tronco mesenquimais (CTMs), desenvolvem um papel central em depositar e interligar grande quantidade de diversas proteínas de ECM em muitos tecidos, incluindo osso, músculo, tendão e pele. A ECM exerce um relevante papel nas respostas de diferenciação terminal, maturação e cicatrização destas células (revisado por EYCKMANS; CHEN, 2017). Devido a essas e outras características, as CTMs se tornaram células promissoras em abordagens de bioengenharia de tecidos promovendo a formação de organoides que recapitulam a estrutura e funcionalidade de um tecido, como por exemplo da MO.

1.3 Células-tronco mesenquimais

Antes dos estudos que abordaram sobre os constituintes do nicho das CTH, a pergunta inicial era: “Quais são as células que constituem o nicho hematopoiético?” (revisado por SZADE *et al.*, 2018; UCHIDA *et al.*, 1993; WEISSMAN, 1994). Como abordado anteriormente, o nicho perivascular das CTHs se baseia em distintos tipos celulares, como uma população estromal conhecida como células-tronco mesenquimais (CTMs). Elas são definidas como uma população clonogênica, multipotente, podendo se diferenciar *ex vivo* em células da linhagem mesenquimal tais como adipogênica, osteogênica e condrogênica. Elas são caracterizadas por sua morfologia fibroblastoide e capacidade de aderência ao plástico quando cultivadas *in vitro*. As CTMs são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície celulares CD105, CD73 e CD90, e ausência da expressão de CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR (NOMBELA-ARRIETA; RITZ; SILBERSTEIN, 2011; revisado por ROHBAN; PIEBER, 2017).

As CTMs foram primeiramente isoladas da medula óssea (MO), na década de 60, quando se demonstrou claramente seu potencial em se diferenciar em osteoblasto e osteócito. Neste trabalho, fragmentos autólogos de MO de roedores foram transplantados sendo capazes de gerar um novo microambiente heterotópico contendo medula e osso. Assim, com esse experimento pioneiro, observou-se uma evidência inicial de células-tronco não hematopoiéticas presentes na medula óssea (Células Estromais da Medula) (TAVASSOLI; CROSBY, 1968; UCCELLI; MORETTA; PISTOIA, 2008). Mais tarde, um outro grupo identificou uma subpopulação de células estromais responsáveis pelo potencial osteogênico da MO. Friedenstein e colaboradores cultivaram flushing ósseo de camundongo e observaram uma fração celular aderente da medula óssea, que quando cultivadas em baixa densidade eram capazes de gerar unidades formadoras de colônias fibroblastoides (CFU-F), as quais quando co-transplantadas em câmaras de difusão davam origem a formação óssea (FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970). Entretanto, além de seu isolamento pioneiro da MO, onde elas cooperam com as CTHs para formação do nicho, as CTMs foram isoladas de outras fontes, tais como cordão umbilical e sangue do cordão umbilical, tecido adiposo, placenta, membrana amniótica, dentre outros (KÖGLER *et al.*, 2004; PARK *et al.*, 2011; REINISCH; STRUNK, 2009; SARUGASER *et al.*, 2005; ZUK *et al.*, 2002).

Além disso, as CTMs podem ser induzidas a se diferenciarem em neurônios funcionais, células epiteliais da córnea e cardiomiócitos dentro de pré-tratamentos específicos *ex vivo* e *in vivo*, o que capacita essas células a intervirem em terapias regenerativas (GRIFFITHS; BONNET; JANES, 2005; MA *et al.*, 2006; MIMEAULT; BATRA, 2006). Além das características citadas, elas contêm propriedades imunomoduladoras as quais as tornam promissoras no tratamento de doenças imunes como GVHD (do inglês, *Graft-Versus-Host Disease*) e Diabetes tipo 1 (ABDI *et al.*, 2008; KRAMEROV; LJUBIMOV, 2016; OZAKI, 2012).

A multipotencialidade das CTMs é uma das razões para considerá-las relevantes para medicina regenerativa. Além dessas características bem definidas, as CTMs também mostram um potencial em interagir com outras células da parede vascular como de microvasculaturas e artérias em órgãos como baço, fígado, rim, pulmão, pâncreas e cérebro (DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; ZENGIN *et al.*, 2006).

Alguns trabalhos demonstraram evidências para a elaboração da hipótese de que a ampla distribuição apresentada pelas CTMs no organismo era devida sua localização perivascular, levando à especulação que CTMs na medula óssea ocupariam o nicho perivascular (COVAS *et al.*, 2008; CRISAN *et al.*, 2008; DA SILVA MEIRELLES; CHAGASTELLES; NARDI, 2006; MIURA *et al.*, 2003; SHI; GRONTHOS, 2003).

Posteriormente, Tormin e colaboradores observaram que CTMs da medula óssea CD146- CD271+ compunham o tecido de revestimento interno da cavidade óssea, o endóstio, enquanto CTMs CD146+CD271- localizavam-se na região perivascular do estroma medular, o que contribuiu para a ideia inovadora de que as CTMs também poderiam estar presentes fora da região perivascular (TORMIN *et al.*, 2011).

Embora seja comumente postulado que CTMs perivasculares originam osso, cartilagem e gordura, estudos recentes *in vivo* demonstraram que CTMs oriundas de regiões clonais do osso de ratos, principalmente da placa de crescimento, não originam gordura. Em concordância com estes resultados, Worthley e colaboradores observaram que CTMs que expressam Grem-1 localizam-se exclusivamente na região endóstio e são responsáveis por gerar tecido ósseo, cartilagem e o sistema reticular da medula óssea, mas não tecido adiposo (CHAN, Charles K.F. *et al.*, 2015; WORTHLEY *et al.*, 2015).

Assim, uma vez que no osso, o nicho fisiológico é composto por vários ambientes locais, incluindo o nicho endosteal e o nicho vascular, acredita-se que há duas populações distintas de CTMs presentes no nicho hematopoiético, uma localizada no endóstio e outra que ocuparia o nicho perivascular da MO. Sendo que cada uma delas atuaria diferentemente na produção e manutenção de fatores e/ou células responsáveis pelo suporte do nicho hematopoiético.

Todos esses conceitos levam à especulação de que independente do tecido de origem, as CTMs poderiam atuar como fonte em terapia regenerativa para tratar doenças como osteoporose, artrites, regeneração vascular após injúria, dentre outras (CHAN, Jerry *et al.*, 2007; WOLBANK *et al.*, 2007; YAMADA *et al.*, 2007).

Porém, torna-se necessário um melhoramento nos métodos de cultivo *in vitro* das CTMs. É pertinente mimetizar ao máximo *in vitro* o ideal para sua posterior sobrevivência em modelos experimentais *in vivo*. Assim, critérios importantes como por exemplo o cultivo em hipóxia deve ser recapitulado *in vitro*, uma vez que *in vivo*,

as CTMs são expostas a uma concentração de oxigênio 4-10 vezes menor do que nas condições de cultivo convencionais *in vitro*. A baixa concentração de oxigênio tem um efeito significativo nas características biológicas das CTMs (proliferação, sobrevivência, diferenciação e secreção de fatores solúveis), além de melhorar o potencial tecidual regenerativo (revisado por SEONG KIM *et al.*, 2016).

Devido às características peculiares destas células em dar suporte às CTH e sua plasticidade em se diferenciar em componentes importantes do nicho hematopoiético, como adipócitos, osteócitos e condrócitos, as CTMs vêm sendo empregadas em estudos sobre desenvolvimentos de ossículos / organoides humanizados ectópicos - hOss. Esta reconstituição *in vivo* dos compartimentos esquelético e hematopoiético humano oferece uma oportunidade para investigar processos moleculares e celulares envolvidos no estabelecimento e funções do nicho hematopoiético em um ambiente humano. Além disso, torna-se possível o desenvolvimento de hOss como plataforma tecnológica para estudos hematopoiéticos em humanos.

1.4 Desenvolvimento de Ossículos / Organoides humanizados

O desenvolvimento de hOss parece estar historicamente ligado a estudos com o objetivo de identificar a fonte de osteo-progenitores associados à formação de osso ectópico e MO. No século 19, o perióstio e os tecidos da medula foram identificados como as principais fontes de células osteogênicas capazes de formar osso (GOUJON; E., 1869; OLLIER, 1865). Um século depois e após a identificação das CTH (BECKER; MCCULLOCH; TILL, 1963) - o transplante de células osteogênicas foi posteriormente testado em uma tentativa de melhorar a eficácia do transplante de MO. Isso permitiu a identificação de osteo-progenitores derivados de MO capazes de formar microambientes ósseos e medulares (por via subcutânea ou sob a cápsula renal) em roedores, com manutenção bem-sucedida de hematopoiese murina (FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966; TAVASSOLI; CROSBY, 1968). Trabalhos adicionais revelaram que essas células podem ser isoladas como uma população heterogênea de células aderentes ao plástico que dão origem a células do estroma da medula óssea (incluindo adipócitos) *in vivo*, enquanto a vasculatura e as células hematopoiéticas são derivadas do hospedeiro (revisado por DUPARD *et al.*, 2020; FRIEDENSTEIN, A. J., 1980;

FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.*, 1978; FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; FRIEDENSTEIN, Alexander; KURALESOVA, 1971; FRIEDENSTEIN, Alexander J. *et al.*, 1974).

Esses estudos podem, portanto, ser considerados como os precursores do conceito de modelo de hOss, embora a formação de osso ectópico e tecidos da MO ainda não tenha sido confirmada com células humanas. A identificação de células esqueléticas/osteo-progenitoras humanas combinadas com sua exploração para estratégias de engenharia de tecidos (como osso) marcaram um ponto de inflexão no estabelecimento do hOss. Ao longo dos anos a definição/identificação de osteo-progenitores foi bastante refinada (revisado por DUPARD *et al.*, 2020).

Os estudos de Friedenstein, os quais demonstraram o potencial osteogênico das CTMs da MO (FRIEDENSTEIN, A. J., 1980; FRIEDENSTEIN, A. J. *et al.*, 1978; FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO; PETRAKOVA, 1966), complementados mais tarde por Caplan (CAPLAN, 1987, 1991), levaram à introdução progressiva de células-tronco estromais, responsáveis pelo desenvolvimento, manutenção e reparo ósseo *in vivo*. Este termo tem sido usado de forma imprecisa para descrever células isoladas de vários tecidos e que compartilham características fenotípicas semelhantes, porém mal caracterizadas, pois muitas vezes não necessariamente exibem propriedades de células-tronco (DUPARD *et al.*, 2020).

No entanto, atualmente a definição de CTMs humanas adultas depende essencialmente do estudo pioneiro de Pittenger (PITTENGER *et al.*, 1999) que evidenciou seu fenótipo estável, potencial de formação de colônias e capacidade de se diferenciar em múltiplas linhagens para gerar osso, cartilagem, gordura e estroma da medula. O estudo descreveu ainda as condições de cultura que permitem a expansão e diferenciação de CTMs derivadas da MO (CTMs-MO), abrindo assim caminhos para sua exploração em engenharia de tecidos (LANGER; VACANTI, 1993).

Com o objetivo inicial de projetar enxertos osteogênicos para reparo ósseo, CTMs-MO humanas foram combinadas com biomateriais/*scaffolds* e implantadas em camundongos para avaliação funcional (COUTU *et al.*, 2011; COUTU; YOUSEFI; GALIPEAU, 2009; MOREAU *et al.*, 2007; OHGUSHI; CAPLAN, 1999). Além da formação óssea, alguns protocolos resultaram no desenvolvimento de compartimento hematopoiético (HAYNESWORTH *et al.*, 1992) no qual células humanas derivadas das mesenquimais implantadas estavam localizadas dentro do estroma, demonstrando sua contribuição na formação de nicho hematopoiético (KUZNETSOV

et al., 1997; MANKANI *et al.*, 2004, 2008). Isso sugeriu o estabelecimento de um nicho de MO humana funcional que poderia apoiar a manutenção de células do sangue humano (hematopoiese). Em um estudo pioneiro, CTMs humanas transplantadas ectopicamente em *scaffolds* de poliuretano em camundongos imunocomprometidos foram capazes de suportar células leucêmicas humanas transplantadas (VAISELBUH *et al.*, 2010). Assim, ao relatar o transplante / enxerto bem-sucedido de CTH em um osso humanizado projetado, surgiu o primeiro modelo de hOss (VAISELBUH *et al.*, 2010). Interessantemente, esta abordagem surgiu pela primeira vez com o objetivo de projetar um modelo de nicho leucêmico.

As estratégias atuais dependem da capacidade das células mesenquimais de recapitular processos de formação óssea seguindo um programa endocondral ou intramembranoso, antes de se tornar elementos constitutivos do nicho hematopoiético humano. Já foram relatados vários modelos de hOss que oferecem um sistema *in vivo* que recapitula parcialmente a organização / função de osso humano e seu nicho hematopoiético. O surgimento desta tecnologia ajuda preencher as lacunas entre o sistema hematopoiético humano e murino, uma vez que embora muitos aspectos da hematopoiese sejam conservados entre camundongos e humano (SYKES; SCADDEN, 2013), várias diferenças precisam ser levadas em consideração antes de extrapolar os insights reunidos de camundongo para humano com o objetivo de desenvolver modelos pré-clínicos mais preditivos (DOULATOV *et al.*, 2012; ENGERT *et al.*, 2016). Ao hospedar um nicho hematopoiético humano funcional com suporte à hematopoiese, o hOss despertou grande interesse como um modelo avançado para investigar eventos moleculares e celulares específicos de humanos (revisado de DUPARD *et al.*, 2020).

Antes de iniciar estudos mais robustos sobre a interação das CTHs com o nicho hematopoiético em modelos de ossículos humanizados (hOss), por muitos anos os modelos de xenotransplante representaram ferramentas poderosas para a investigação da hematopoiese humana saudável e maligna. Porém, esses modelos não imitam totalmente os componentes do microambiente da medula óssea humana (BM) e permitem apenas o enxerto limitado de amostras de algumas doenças malignas humanas, pois o microambiente hematopoiético não é transplantável.

Assim, a iniciativa em delinear experimentos baseados em modelos de hOss ectópico se tornou cada vez mais relevante e necessária. Logo após o surgimento do primeiro modelo de hOss, Chen e colaboradores demonstraram o enxerto de CTH

normais e leucêmicas em um microambiente que eles chamaram de MO extramedular humana. Esse microambiente foi gerado a partir do implante de CTMs-MO e células formadoras de colônias endoteliais (ECFCs) misturadas com *Matrigel*® e implantadas no dorso de camundongos NSG. Sabe-se que as células leucêmicas se localizam no nicho em locais com baixa tensão de oxigênio (hipóxia). Assim, foi realizado o *knockdown* do fator α -1 indutor de hipóxia (*HIF-1* α) nas CTMs-MO ocasionando uma redução significativa do enxerto das células leucêmicas humanas MOLM-13 (linhagem de LMA) (CHEN *et al.*, 2012).

Reinisch e colaboradores, relataram que as CTMs-MO, quando misturadas com matriz extracelular e implantadas subcutaneamente nos flancos de camundongos NSG, formaram um microambiente de MO humanizado que é capaz de recrutar e dar suporte ao enxerto da hematopoiese de camundongos. Esses nichos hematopoiéticos humanizados ectópicos também são capazes de recrutar várias linhagens de células sanguíneas humanas maduras e progenitoras (CD34+) quando a hematopoiese humana foi estabelecida antes da formação do nicho (REINISCH *et al.*, 2015).

Mais tarde, esse mesmo grupo estabeleceu em modelos de xenotransplante, ossículos humanizados subcutâneos com um microambiente hematopoiético, formado por CTMs-MO humana. Esse hOss ectópico permitiu o enxerto robusto de CTH humanas saudáveis, bem como o enxerto de CTH malignas como de leucemia mieloide aguda (LMA), em níveis muito maiores do que aqueles em camundongos não manipulados para a formação de hOss (REINISCH *et al.*, 2016, 2017).

Para a construção desses hOss, é muito importante a escolha do biomaterial / *scaffold* que será adicionado juntamente com as CTMs e/ou outros tipos celulares no momento do implante para a geração dos hOss. Essa escolha é relevante pois se trata de mimetizar ao máximo *in vitro* as condições que estas células encontrarão *in vivo* para que possam atuar como coadjuvantes na formação do nicho hematopoiético heterotópico.

Na literatura encontra-se o uso de distintos biomateriais e métodos que auxiliarão tanto no momento de confeccionar o implante que será infundido nos animais (cultivo 3D das CTMs e não em monocamada), quanto na própria formação do hOss ectópico. Muitos desses métodos utilizam biomateriais osteo-condutores como fosfato tricálcico / hidroxiapatita de cálcio, fosfato de cálcio bifásico (BCP) ou policaprolactona de uso médico (mPCL) para formar ossículos heterotópicos com que imite um microambiente da MO *in vivo*. Esses protocolos requerem um pré-cultivo *in*

vitro dos biomateriais com as CTMs isoladas ou pré-diferenciadas que forcem as células para um estado pré-osteoblasto (ABARRATEGI *et al.*, 2017; ANTONELLI *et al.*, 2016; GROEN *et al.*, 2012; HOLZAPFEL *et al.*, 2015; JANICKI *et al.*, 2010; MARTINE *et al.*, 2017; SACCHETTI *et al.*, 2007).

Outro tipo de abordagem é baseado no uso de modelos de biomateriais semissólidos absorvíveis como alguns à base de colágeno, matriz extracelular, gel de fibrina e *Matrigel*®. As células podem ser cultivadas previamente em formato de cultura 3D com esses biomateriais ou apenas serem misturadas com eles antes do implante nos camundongos imunodeficientes (PIEVANI *et al.*, 2017; REINISCH *et al.*, 2017; SACCHETTI *et al.*, 2007; SCOTTI *et al.*, 2013, 2010; SERAFINI *et al.*, 2014).

Há relatos também de formação de hOss ectópico utilizando biomateriais formados por esponja de colágeno estéril absorvível, o *Gelfoam*®. Foi descrito um protocolo de geração de modelos organotípicos à base de formação de tecido ósseo com nicho hematopoiético após infusão de CTMs-MO misturadas em *Gelfoam*® e implantadas em camundongos NSG. (ABARRATEGI *et al.*, 2017; PASSARO *et al.*, 2017). Além disso, foi descrito como a co-implantação de outros componentes celulares da MO humanas, como células endoteliais humanas (CE) e / ou citocinas importantes para a formação óssea (como por exemplo, BMP2 humana), cooperam com a CTMs humana para gerar diferentes microambientes humanizados, como demonstrado em sistema de imagens ao vivo *in situ* (PASSARO *et al.*, 2017).

Com o desenvolvimento de novos modelos murinos e técnicas de imagem, podemos agora identificar com mais precisão os componentes do nicho e investigar prospectivamente o papel do nicho hematopoiético. Entretanto, muitas questões ainda precisam ser esclarecidas: quais tipos de células são essenciais para manter o nicho hematopoiético funcionando? O nicho é unicamente para as CTH? Quais são os mecanismos de competição dentro do nicho? Como o nicho leucêmico é diferente? Como o nicho protege as CTH da exaustão? (revisado de BOURGINE *et al.*, 2019).

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Através de várias décadas, diversos estudos tentaram elucidar o conceito de nicho hematopoiético por meio de modelos *in vitro* e *in vivo*. Porém ainda não está claro quais são os principais fatores responsáveis pelo destino das CTH quanto à sua manutenção (auto-renovação), proliferação e diferenciação (hematopoese). Sabe-se que as CTMs são células importantes no nicho devido a sua capacidade de diferenciação em outros tipos celulares que compõem o nicho e devido ao suporte que emprega às CTHs que residem neste microambiente. No entanto, acredita-se que há populações de CTMs distintas que ocupam diferentes compartimentos do nicho da MO (o perivascular e o endósteo) e, portanto, contribuem de forma distintas com a CTH. Além das CTMs, as células endoteliais também são importantes na composição do nicho hematopoiético e sua presença é de grande relevância na secreção de fatores pró-angiogênicos, além de ter importância na regulação de elementos vasculares que permitem a habilidade de auto-renovação e diferenciação das CTHs permitindo o enriquecimento do nicho hematopoiético.

Mimetizar ao máximo *in vitro* os processos biológicos recorrentes *in vivo*, como por exemplo o cultivo de CTMs sob hipóxia e em biomateriais, é um passo primordial para o desenvolvimento de um microambiente adequado para o cultivo celular *ex vivo* e para um melhor entendimento do que ocorre *in vivo*. Para complementar os modelos de xenotransplante *in vivo*, nos quais são por décadas utilizados para o estudo de transplante de CTH e hematopoese, estratégias complementares têm sido desenvolvidas, incluindo a geração de ossículos / organoides humanizados em modelos murinos imunodeficientes.

O uso de abordagens de bioengenharia e biologia celular e molecular, nos permite projetar e/ou mimetizar uma MO artificial que reconstitui estruturalmente e talvez funcionalmente a MO natural, podendo ser uma poderosa plataforma para o estudo da hematopoese normal e maligna, bem como da interação das CTH saudáveis ou não com esse microambiente. Tal conhecimento proporciona entender a regulação das CTHs mediada pelo nicho, podendo futuramente ajudar no melhoramento das respostas clínicas dos transplantes de MO.

Assim, a hipótese desse trabalho é que CTMs derivadas da MO e do osso esponjoso (OE) quando cultivadas na presença de células endoteliais e biomateriais, são capazes de gerar um hOss heterotópico com capacidade de enxertia de CTH.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Gerar um ossículo humanizado heterotópico a partir de CTMs humanas da MO e OE, células endoteliais (CE) e biomaterial sob condição de hipóxia.

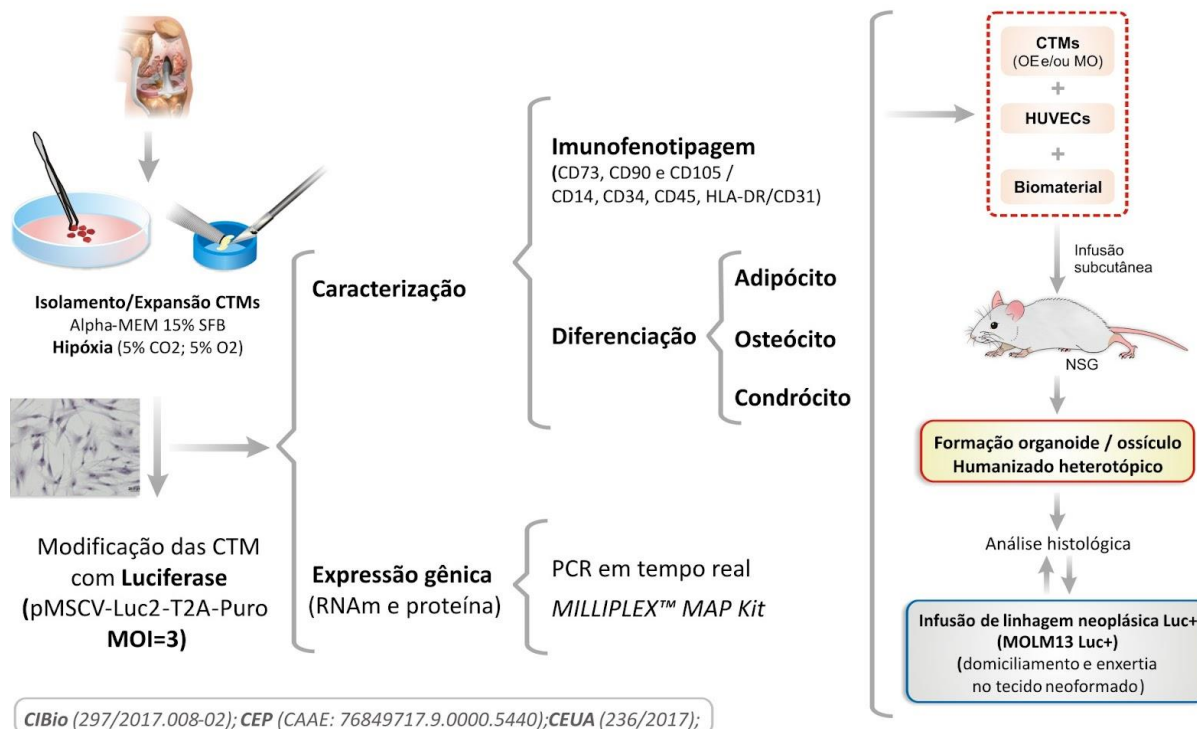
3.2 Objetivos específicos

- a) Isolar e cultivar CTMs humanas da MO e OE metafisário sob condições de hipóxia;
- b) Caracterizar as CTMs isoladas quanto a morfologia, imunofenotipagem e diferenciação (adipócitos, osteócitos e condrócitos);
- c) Modificar geneticamente CTMs-MO/CTMs-OE para expressar a proteína luciferase;
- d) Padronizar o cultivo de CTMs-MO/CTMs-OE com CE em biomaterial indutor de formação de tecido ósseo;
- e) Implantar CTMs-MO + CE e CTMs-OE + CE (CTMs transduzidas ou não com luciferase) cultivadas em cultura 3D com biomaterial, no subcutâneo de camundongos NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ para gerar um hOss heterotópico;
- f) Avaliar a histologia dos hOss e a formação de nicho hematopoiético heterotópico;
- g) Infundir *in vivo* células da linhagem MOLM13 (de Leucemia Mieloide Aguda) modificadas geneticamente com luciferase para avaliar a migração e enxertia nos hOss.

4 METODOLOGIA

Resumidamente, os experimentos deste trabalho foram divididos em três etapas, sendo a primeira referente ao isolamento, expansão e caracterização *in vitro* das CTMs-MO e CTMs-OE; a segunda, ao implante das CTMs, cultivadas em condições de cultivo 3D juntamente com CE e biomateriais, em camundongos visando à formação do hOss; e a terceira, o transplante de células leucêmicas MOLM-13, modificadas geneticamente com luciferase, visando investigar o domicílio e enxertia destas células hematopoiéticas malignas nos hOss heterotópicos gerados (Figura 1).

Figura 1 - Estratégia experimental



Os experimentos realizados neste trabalho podem ser divididos em três etapas. A primeira etapa abrange o processo de isolamento e caracterização das CTMs-MO e CTMs-OE *in vitro*. A segunda etapa é referente ao cultivo 3D das CTMs com células endoteliais e biomateriais, bem como a infusão dessa mistura em animais NSG e posterior análise da formação de hOss heterotópicos. Por fim, a terceira etapa contempla a infusão intravenosa de MOLM-13 Luc+ (linhagem leucêmica de LMA) em camundongos NSG com os hOss previamente estabelecidos.

4.1 Apreciação do projeto no aspecto de biossegurança e ética em pesquisa com seres humanos e animais

4.1.1 Avaliação do projeto em relação à biossegurança e a ética em pesquisa envolvendo seres humanos e animais

Este projeto foi aprovado pela Comissão Interna de Biossegurança do Hemocentro de Ribeirão Preto (CIBio) e pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) sob o número de processo: 297/2017.008-02. O uso de material biológico humano foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HC-FMRP-USP (CAAE: 76849717.9.0000.5440) e para o uso de animais, a proposta foi avaliada e aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CEUA 236/2017).

4.1.2 Critérios de seleção e exclusão dos doadores humanos de fragmentos ósseos e punção de medula óssea

Foram incluídos pacientes adultos, ambos os sexos, com osteoartrose e submetidos à artroplastia total de joelho. Foram excluídos pacientes com artroplastias de revisão, doenças infecciosas, neoplásicas, reumatológicas ou osteometabólicas, e pacientes em uso de imunossupressores. Foram coletados fragmentos de ossos esponjosos (OE) da metáfise proximal da tíbia que seriam descartados após procedimento cirúrgico.

A medula óssea foi obtida de indivíduos adultos saudáveis, doadores voluntários de medula óssea. Foram coletados 5-7 mL de amostra. Essas últimas foram concedidas do banco de amostra 2918/2009 (CEP 1981/2009) pelo laboratório de Terapia Celular do Hemocentro de Ribeirão Preto, a fim de utilizá-las na padronização e comparação de alguns experimentos.

4.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs)

4.2.1 Isolamento de CTMs derivadas do “lavado” da medula óssea (CTMs-MO) e do osso esponjoso (CTMs-OE)

Os fragmentos ósseos coletados foram lavados em tampão de coleta (PBS suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB) (Hyclone) e 1mM EDTA (Merck)). Após a lavagem, os fragmentos ósseos foram separados por filtração em peneira de

70 μm e reservados para digestão enzimática. Todo o líquido obtido foi recolhido e centrifugado 200 x g por 7 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e ao pellet foram adicionados 10 mL de solução de lise de hemácias (solução com 155 mM de NH_4Cl , 7,2 mM de K_2CO_3 e 0,1 mM de EDTA). A suspensão foi incubada por 5 minutos em gelo e em seguida foram adicionados 20 mL de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB e foi realizada uma nova centrifugação (200 x g / 7 minutos). Por fim, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 15 mL de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB. O número de células foi determinado e plaqueou-se cerca de 5×10^5 - 1×10^6 células/cm². A cultura de células foi feita em incubadora de hipóxia (Thermo Fisher) a 37 ° C e atmosfera composta de 5% CO_2 e 5% O_2 . A primeira troca de meio foi feita 4 dias após o isolamento e, posteriormente, a cada 2 ou 3 dias até a confluência celular de 80-100%. Quando confluentes, as células foram colhidas enzimaticamente com tripsina-EDTA 1X (Gibco™), e expandidas até a 3^a-5^a passagem quando foram caracterizadas

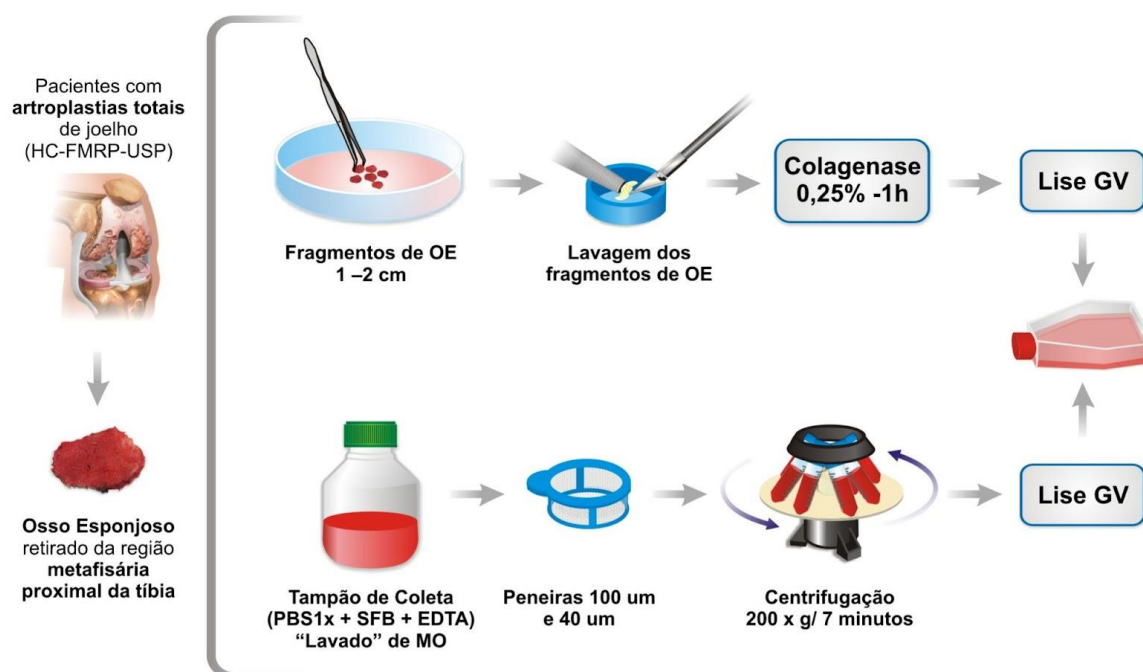
Os fragmentos ósseos reservados foram cortados em pequenos pedaços com auxílio de tesouras estéreis e submetidos à digestão com 0,25% de colagenase tipo I (GIBCO) a 37 °C por uma hora, sendo agitados a cada 20 minutos. Após a digestão, foi adicionado 10 mL de meio α -MEM 15% SFB e a solução foi filtrada em filtros de 100 μm e de 40 μm . Em seguida, foi realizada centrifugação (200 x g/ 7 minutos), o sobrenadante descartado e adicionado 10 mL de solução de lise de hemácias durante 5 minutos em gelo. Após esse período, foi adicionado 10 mL de meio α -MEM suplementado com 15% de SFB e realizada uma nova centrifugação com as mesmas condições da anterior. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensionadas em PBS para a contagem com Azul de Trypan (Figura 2).

As células totais isoladas foram plaqueadas em garrafas de 75 cm². Após 4 dias, foi realizada a remoção do meio antigo e das células não-aderentes e adicionado novo meio de cultivo. A troca do meio foi realizada a cada 2 dias até a confluência celular de 80 a 100% quando as células foram colhidas por tripsinização.

As condições de cultivo utilizadas neste estudo foram: a) meio de cultivo: α -MEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Nova York, EUA), acrescido de 2mM/L de L-glutamina (Gibco), 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina (Gibco), enriquecido com 15% SFB (HyClone™) previamente inativado a 56 °C por 45 minutos; b) cultivo em estufa úmida a 37 °C sob condições de hipóxia (5% O_2 e 5% CO_2).

A cada processo de tripsinização contou-se uma passagem. Todas as células isoladas foram expandidas, caracterizadas e utilizadas para posteriores experimentos *in vitro* e *in vivo* dentre a 3ª e 5ª passagem. As células endoteliais (CE) utilizadas neste trabalho foram: HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells - ATCC® - Catalog. PCS-100-013), sendo as mesmas utilizadas dentre 3ª e 5ª passagem. O meio utilizado para cultivo das CE foi o EGM-2 com 5% SFB, o qual é formado pelo meio basal EBMTM-2 (CC-3156) e suplementos EGMTM-2 SingleQuots™ (CC-4176) requerido para o crescimento das CE.

Figura 2 - Isolamento das CTMs derivadas de fragmentos de OE e do lavado da MO.



Os fragmentos de OE foram lavados seguidos de digestão enzimática para isolamento das CTMs-OE. Após esse processo as células coletadas e separadas por centrifugação foram plaqueadas para expansão e caracterização. As CTMs-MO foram isoladas a partir do "lavado" dos fragmentos ósseos, as quais igualmente foram plaqueadas para expansão e caracterização após o processo de centrifugação.

4.2.2 Isolamento das células-tronco mesenquimais (CTMs) derivadas da punção da medula óssea

As amostras de medula óssea puncionada (4 a 5mL) foram coletadas de doadores normais em centro cirúrgico, durante o processo de doação de medula e colocadas em tubos heparizados. As amostras foram processadas em até 6 horas após a coleta.

As células mononucleares da medula óssea foram isoladas por centrifugação em gradiente de Ficoll-Paque™ Plus (Histopaque-1077, GE HealthCare BioSciences, Upsala, Suécia) de densidade 1077 g/mL conforme descrito a seguir. Primeiramente, foram adicionados 25 mL de PBS ao volume de sangue coletado, sendo essa mistura homogeneizada. Em seguida, foi pipetado vagarosamente no tubo 13 mL de Ficoll-Paque™ Plus e realizada centrifugação de 30 minutos, 1500 rpm (sem freio e aceleração) em temperatura de 25°C. O anel de células mononucleares presentes na interface das soluções foi coletado e transferido para outro tubo. Em seguida essas células foram lavadas mais duas vezes.

O pellet final foi ressuspenso em 1-5 mL de meio de cultura α -MEM (GIBCO BRL, Life Technologies, Nova York, EUA) para contagem da suspensão celular em câmara de Neubauer utilizando o azul de tripan na diluição 1:50. Após a contagem das células viáveis, as células mononucleares foram plaqueadas em garrafas de cultura celular de 75 cm² (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Alemanha) na concentração de $1-3 \times 10^7$ células mononucleares por garrafa ($1,3 - 4,0 \times 10^5$ cel/cm²), em 15 ml de meio de cultura α -MEM suplementado com 15% de SFB e isoladas por aderência ao plástico. As culturas foram mantidas em incubadora com 85% de umidade sob hipóxia, sendo todo o meio trocado após 3 a 7 dias a fim de retirar as células que não estavam aderidas à garrafa. Passado esse período inicial, o meio foi trocado a cada dois dias até atingir confluência celular de 80 a 100% quando as células foram tripsinizadas com tripsina.

Após a tripsinização, alíquotas de 3×10^5 células foram plaqueadas em garrafas de 75 cm² em meio α -MEM 15% SFB para posteriores experimentos *in vitro* e *in vivo*.

4.3 Caracterização das CTMs

4.3.1 Caracterização das CTMs isoladas quanto ao perfil imunofenotípico

A imunofenotipagem das CTMs foi realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais que reconhecem antígenos da superfície da membrana da célula. Para tal, s foi montado um painel contendo os seguintes marcadores: CD105 PE, CD73 PE, CD51/61 FITC, HLA-ABC PE, CD45 FITC, CD14 PE, CD34 PE, CD54 PE, CD44 FITC, CD166 PE, CD49e PE, CD29 PE, HLA-Dr FITC, HLA-ABC FITC, CD90 PE, CD146 PE, CD13 PE e CD31 PE (Becton Dickinson).

Para a marcação, foram utilizados 0.15 µg dos anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos em alíquotas de 105 células diluídas em 100 µL de PBS. Logo após, as amostras foram incubadas no escuro, à temperatura ambiente, por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 2 mL de PBS em cada tubo, as amostras foram centrifugadas a 300 x g por 3 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o botão celular foi ressuspensão em 200 µL de PBS para aquisição.

As células foram adquiridas em citômetro de fluxo (BD FACSCalibur™) e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo™ Vx.0.7.

4.3.2 Caracterização das CTMs por imunofluorescência quanto à expressão de marcadores típicos mesenquimais

Para avaliar a expressão de proteínas por imunofluorescência, aproximadamente 1×10^4 células foram cultivadas em placas de 24 poços forrados com lamínula de vidro estéril. Após 24 horas, as células foram fixadas em paraformaldeído (2%) por 10 minutos à temperatura ambiente (TA), incubadas por 30 min em solução de glicina 0,1M (Amersham Pharmacia Biotech AB) e novamente lavadas duas vezes com PBS (1X). Em seguida, foram permeabilizadas com solução de TritonX-100 (Sigma) 0,3% por 10 minutos, lavadas três vezes com PBS (1X) e incubadas por 1 hora à TA em solução de BSA 1%. Durante este período, os anticorpos primários e o anticorpo secundário conjugado com fluorocromo Alexa Fluor (Invitrogen) foram diluídos em solução de BSA a 1% visando à concentração final de 1µg/100µL. As células foram incubadas com 10 µg/mL do anticorpo primário específico contra o antígeno de interesse por 1 hora a TA em câmara úmida, lavadas 5 vezes com PBS (1X) e novamente incubadas com 6,7 µg/mL do anticorpo secundário previamente diluído (Quadro 1). Para identificar os filamentos de actina, as células foram incubadas com 66 mU/mL de faloidina (Invitrogen) conjugada com Texas-Red (Molecular Probes) por 1h à TA. Para visualização dos núcleos, as amostras foram incubadas com DAPI (do inglês, dihidroclorato de 4,6 diamino-2-fenilindol; Abbott Molecular Inc., Abbott Park) na concentração de 100 ng/mL por 10 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida ao abrigo da luz. Ao final deste período, as lamínulas foram novamente lavadas 10 vezes com PBS e imersas uma vez em água destilada, para retirada dos resquícios de sal presentes na solução de PBS. A seguir, as lâminas foram montadas com Fluoromount G (Electron Microscopy Sciences). As lâminas foram analisadas em

Microscópio Confocal LSM 710 (Carl Zeiss) com lente objetiva 63x em óleo de imersão e abertura numérica de 1.4. A análise das imagens foi realizada utilizando o software Zen 2008 (ZEN, version 2.5). As imagens 'teste' e 'controle' foram capturadas usando parâmetros idênticos.

Quadro 1 - Relação dos anticorpos utilizados para a realização da microscopia de fluorescência.

Anticorpos	Marca / Código
CD90	BD Pharmingen/ 555593
Fibronectina	Abcam/ ab23750
N-caderina	BD Pharmingen / 610920
Nestina	Abcam/ ab18102
Alexa Fluor 488	Molecular Probes-Invitrogen / A21202

4.3.3 Caracterização das CTMs quanto à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos

a) Adipócitos: 40.000 células/mL foram cultivadas em placas de 24 poços. O meio utilizado para a indução da diferenciação em adipócitos foi o α -MEM 15% SBF, suplementado com 0,2 mM de dexametasona, $3,4 \times 10^{-3}$ mM de insulina e 0,2 mM de indometacina. Metade do meio foi trocado 2 vezes por semana durante 20 dias, quando foram observadas vesículas lipídicas nas células diferenciadas em adipócitos. Após esse período, foi realizada a coloração com oil red O para a visualização de vesículas lipídicas. Para tal, as amostras foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas em formalina 10% por 1 hora à TA. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com água desionizada e, então, as amostras foram incubadas durante 5 minutos em solução aquosa contendo 60% de isopropanol e coradas com solução de *oil red O* por uma hora. Em seguida, as amostras foram lavadas em

água deionizada por 4 vezes para o excesso de corante ser removido e foi realizado o registro fotográfico.

b) Osteócitos: 35.000 células/mL foram cultivadas em placas de 24 poços. O meio utilizado para a indução da diferenciação osteócitos foi o α -MEM 7,5% SBF suplementado com 0,02 mM de dexametasona, 0,4 mM de ácido ascórbico e 20 mM de β -glicerolfosfato. Metade do meio indutor foi trocado 2 vezes por semana durante 30 dias, quando foi observado pontos com precipitado de cálcio nas células diferenciadas em osteócitos. Após a indução da osteogênese foi realizada a coloração com vermelho de alizarina, que cora depósitos de cálcio em vermelho. Para tanto, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e fixadas em formalina 10% por 30 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, as amostras foram lavadas 2 vezes com água deionizada e incubadas em solução de vermelho de alizarina 2% (pH 4,1 - 4,3) por 45 minutos no escuro à TA. Posteriormente as amostras foram lavadas 4 vezes com água deionizada e mantidas em PBS para o registro fotográfico.

c) Condrócitos: O meio utilizado para a indução da diferenciação em condrócitos foi o DMEM, sem SBF, suplementado com 1 μ g/mL de TGF β 3, 0,1 mM de piruvato de sódio, 0,001 mM de dexametasona, 0,05 mM de ácido ascórbico e 0,04% albumina humana. Para este ensaio foi utilizado a cultura de células em aglomerados tridimensionais (Vemuri et al., 2011; Freitas et al., 2020). Para tanto, foram plaqueadas $2,5 \times 10^5$ células já com o meio indutor (200 μ L/poço) em poços de 96 wells de baixa aderência (com fundo em "U"), sendo que após o plaqueamento, a placa foi centrifugada 500 x g, 5 minutos. As células foram armazenadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de atmosfera úmida com trocas de meio a cada 3-4 dias. Após 30 dias de indução à diferenciação, o aglomerado celular formado foi incluído em parafina para processamento histológico e marcação tecidual. Após corte histológico (5-7 μ m) foi realizado coloração de Tricrômio de Masson para comprovação da diferenciação condrogênica.

4.4 Análise da expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético

O RNA total das células foi extraído por RNeasy Mini Kit (Qiagen) acrescido da enzima DNase RNase-free DNase Set (Qiagen), para evitar a contaminação do extrato com DNA genômico, de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o RNA gerado foi diluído em água *nuclease-free* (Promega) e acondicionado a -80°C. O mesmo foi quantificado e avaliado quanto à integridade e pureza por meio da análise em gel de agarose 1% e leitura em espectrofotômetro (NanoVue – GE) nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm.

O RNA total (1,0 µg) foi reversamente transcrito em cadeia complementar do ácido desoxirribonucleico (cDNA) utilizando-se o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems), segundo as instruções do fabricante. Após a transcrição, o cDNA foi estocado a -20°C. Os cDNAs obtidos foram diluídos 10X e utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real.

A PCR em tempo real foi realizada utilizando o sistema TaqMan (Applied Biosystems). O nível da expressão dos transcritos foi calculado com base nos Ct (*cycle threshold*) obtidos e a normalização da reação realizou-se pela quantificação do gene endógeno β -actina, β 2-microglobulina e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), com base no cálculo de unidades relativas de expressão (URE) (ALBESIANO et al., 2003). As reações de amplificação foram conduzidas no equipamento 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems). Além da avaliação da transcrição de genes relacionados ao nicho hematopoiético também foram analisados genes relacionados à osteogênese e as sondas utilizadas na reação de PCR em tempo real estão listadas no Quadro 2.

Quadro 2 - Relação das sondas utilizadas nas reações de PCR em tempo real e seus respectivos genes-alvo.

Nomes dos genes	Código
ACTB (β -actina)	4326315E
ALPL	Hs01029144_m1
ANGPT2	Hs00765775_m1
BGLAP	Hs01587814_g1
BMP-4	Hs00370078_m1
CXCL12	Hs00171022_m1

FGF-2	Hs00266645_m1
GAL-1	Hs00355202_m1
GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)	4326317E
GREM-1	Hs00171951_m1
HGF	Hs00300159_m1
KITLG	Hs00241497_m1
PTGES	Hs00610420_m1
RUNX2	HS00231692_m1
SPARCH	Hs00234160_m1
TGF- β 1	Hs000998133_m1
VCAM-1	Hs00174239_m1
VEFG-A	Hs00900055_m1
VEGF-B	Hs01549976_m1
VEGF-C	Hs01099203_m1
β 2-MICROGLOBULINA	4333766

4.5 Avaliação da presença de proteínas expressas em CTMs e que estão envolvidas no nicho hematopoiético

Foi utilizado o Kit MILLIPLEX™ MAP Human Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel I e II (MERCK), baseado na tecnologia Luminex® para analisar o nível de proteínas relacionadas ao nicho hematopoiético e secretadas pelas CTMs: CXCL12, SCF, SDF-1, FGF2, IL6, VEGF, FLT3L e IFN α . A extração proteica, bem como todo o procedimento da técnica, foi realizada segundo as instruções do fabricante (Cat. HCYTOMAG-60K e HCYP2MAG-62K). A leitura da placa e a análise dos resultados foram realizadas pelo equipamento e software MAGPIX (Luminex XMAP Technology).

4.6 Análise por imunohistoquímica em amostra de osso esponjoso metafisário e nas amostras de hOss geradas

Com relação à amostra de fragmento ósseo esponjosos, primeiramente a amostra foi fixada em Formalina 10%. Após fixação, as peças foram descalcificadas

com solução de EDTA a 4% e pH 7,4 (Merck), a TA por 14 dias, seguida por desidratação em concentrações crescentes de álcool (70%, 80%, 90%, 95% e 100%), por 2 horas cada. Ao final da desidratação as peças foram mantidas overnight em solução de 50% álcool absoluto (Merck) e 50% de Xilol PA (Merck) e posteriormente diafanizadas com duas passagens em Xilol PA, 2 horas em cada passagem e incluídas em parafina utilizando forma de papel e parafina PA (Merck). Após a inclusão, as peças foram cortadas em micrótomo com 5 µm de espessura, montadas em lâminas para ensaio de imunohistoquímica utilizando o Kit Dako LSAB + System HRP (ref: K0690 Biotinylated link universal – Streptavidin-HRP) e o anticorpo primário anti-CD146 (Abcam – ab75769).

Para a realização da marcação imunohistoquímica dos organoides formados utilizando o biomaterial *Gelfoam*®, foi realizado todo processamento histológico seguido da marcação para imunohistoquímica. Para tanto, foi utilizado o kit de detecção de IHC seguindo instruções do fabricante (IHC Detection Kit – Micro-polymer – Abcam, ab236466). Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anti-CD146 (Abcam, ab75769), anti-CD31 (Cell Signaling, 89C2), anti-Smad 4 (Abcam, ab40759) e anti-CD15 (Abcam, ab231561).

4.7 Produção de vírions carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro

Os vírions carregando o vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro foram utilizados posteriormente para transduzir as CTMs e fazê-las expressar a proteína repórter bio luminescente luciferase 2 (sequência com códons otimizados para expressão em células de mamíferos). Para a produção dos vírions, células HEK 293T cultivadas em placas de 150 mm (80% de confluência) foram transfectadas simultaneamente com 12 µg do vetor pMSCVLuc2- T2A-Puro, 8 µg do vetor pCMV_dr8.91 (que codifica o capsídeo do HIV e os componentes enzimáticos virais) e 4 µg do vetor pMD2.G (que codifica o envelope do VSV-G). A transfecção foi realizada com Lipofectamina Reagent 3000® (Invitrogen). Vinte e quatro horas após a transfecção, o meio de cultura foi substituído e as células foram cultivadas por mais 48 h. Após este período, o sobrenadante contendo os vírions foi coletado, centrifugado a 300 g (15 min, TA) para a remoção de células em suspensão e filtrado à vácuo utilizando filtro de PVDF com poros de 0,45 µm de diâmetro.

Após a coleta, o meio contendo vírions foi alíquotado em tubos para ultracentrífuga e concentrados por ultracentrifugação a 112.500 g (25.000 RPM, rotor SW 28, Beckman Coulter) durante 2 h à 4 °C. Ao final deste período, o sobrenadante foi descartado e os tubos foram vertidos sobre papel absorvente por 10 min para remoção do excesso de líquido. Em seguida, 200 µL de PBS foram adicionados a cada um dos tubos e os mesmos foram mantidos a 4-8 °C até a manhã seguinte. Por fim, os vírions foram suspensos em PBS e congelados em alíquotas individuais a -80 °C.

Para o cálculo do título viral, 1×10^5 células da linhagem HEK 293FT foram incubadas com 2 µL e 5 µL da suspensão concentrada de vírions pMSCV-Luc2-T2A-Puro na presença de 8 µg/mL de polibreno (Sigma-Aldrich) overnight. Após 72 horas da transdução, o DNA genômico das células foi extraído com o kit Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras de DNA foram submetidas à qPCR para amplificação da região LTR do vetor lentiviral integrado ao genoma. Foram incluídas na reação uma curva-padrão com quantidades conhecidas de cópias do vetor pMSCV-Luc2-T2A-Puro e outra com quantidades conhecidas de DNA das células HEK293FT para amplificação do gene endógeno β -actina (β ACTN). As qPCR foram feitas utilizando o kit TaqMan® Universal Master Mix II (Applied Biosystems) e o aparelho termociclador Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

O número de cópias do vetor lentiviral integradas ao genoma e do gene endógeno nas amostras testadas foram determinados a partir dos dados de amplificação das curvas-padrão. Estes valores foram usados para o cálculo do título viral, expresso em unidades infectantes por mL (UI/mL), por meio da fórmula apresentada por Kutner e colaboradores (Kutner et al., 2009). Os vírions contendo a luciferase foram alíquotados e mantidos em freezer -80°C para serem posteriormente transduzidos nas CTMs da MO e do OE e linhagem celular de Leucemia Mielóide Aguda (MOLM-13).

4.8 Modificação gênica das CTMs MO e OE para expressar a proteína Luciferase

Para a transdução celular, 1×10^6 CTMs foram plaqueadas em placas de 150 mm. Após 24 horas, as células foram transduzidas para expressão da luciferase,

sendo utilizado MOI=3 e 6,0 ug/mL de polibreno. Após 48 horas iniciou-se o tratamento, das CTMs transduzidas, com 1,0 ug/mL de puromicina para selecionar apenas as células positivas para luciferase. O tratamento com puromicina foi realizado durante 8 dias sendo o antibiótico adicionado a cada 48 horas. A análise da eficiência das células transduzidas foi confirmada por meio da detecção da bioluminescência realizada com o equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer). Para o processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) *in vitro*, adicionou-se D-luciferina (Perkin Elmer) ao meio de cultivo a uma concentração final de 150 µg/mL. Em seguida, as placas foram imediatamente submetidas à captura de imagens.

A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio do uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software Living Image 3.0, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi desenhada manualmente para abranger o sinal bioluminescente, cuja intensidade é reportada como fluxo de fótons, expresso em fótons/s.

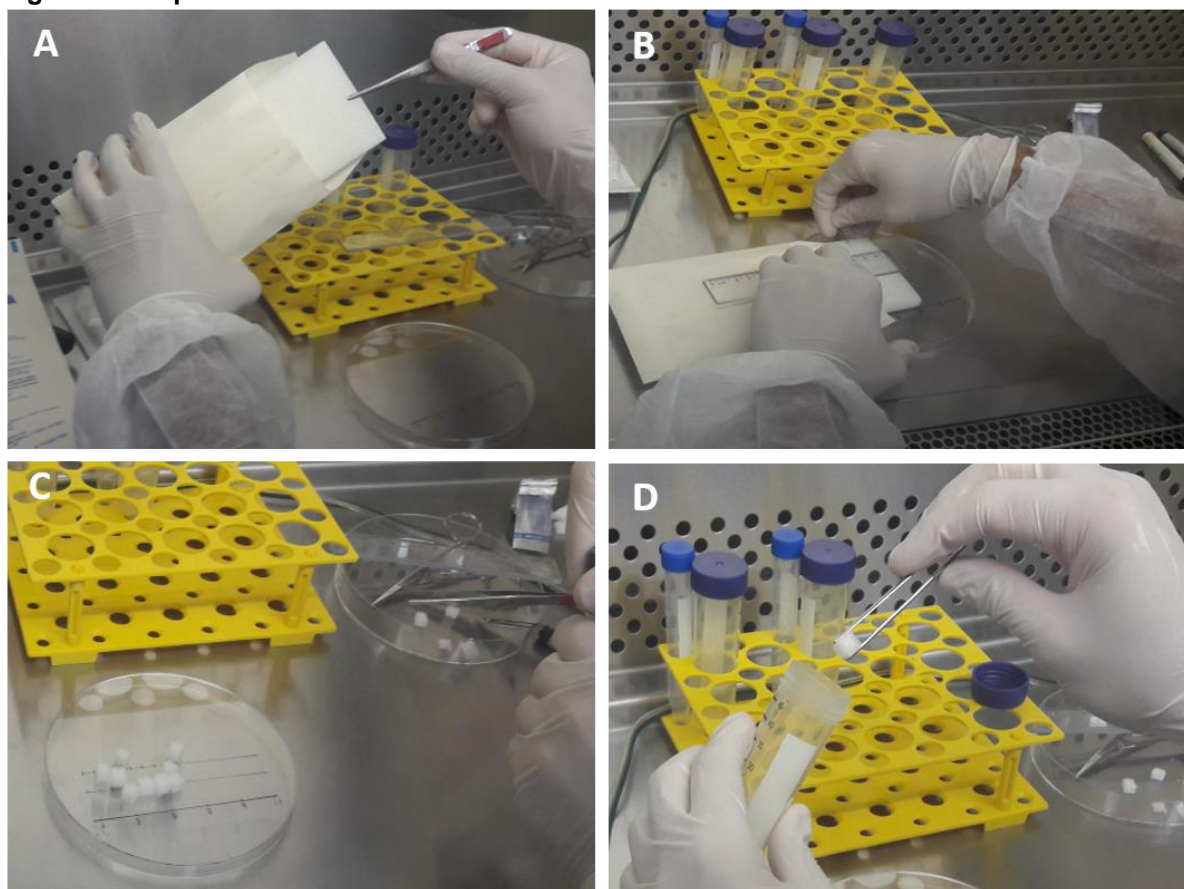
4.9 Cultivo *in vitro* e *in vivo* das CTMs-MO/CTMs-OE e CE em biomaterial: Cultivo *in vitro* e implantação *in vivo* das CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE em Gelfoam®

4.9.1 Cultivo *in vitro* das CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE em Gelfoam®

O procedimento utilizado para o cultivo das CTMs e CEs no *Gelfoam*® (GF) foi baseado no protocolo de Passaro e colaboradores (Passaro et al., 2017, JOVE). Resumidamente, os blocos de GF foram previamente cortados nas dimensões 6,6 mm X 7,5 mm X 7 mm (Figura 3). Em seguida, os blocos foram umedecidos durante 5 minutos em PBS 1X, seguido de secagem em gaze estéril. As células foram misturadas em um volume de 50 µL de meio EGM-2 nas seguintes proporções: 2×10^5 CTMs e 1×10^5 CEs (HUVEC) por biomaterial. Em seguida, com um auxílio de seringa de 1 mL, as células foram adicionadas no GF, e plaqueados em poços de 24 wells de baixa aderência e permanecidos em estufa (37°C e sob hipóxia (5% CO₂+5%N)). Após 1h, foram adicionados 2,5 mL de meio EGM-2 nos poços e mantidos novamente em estufa por 24h para posterior implante em camundongos NSG.

Para posterior análise de aderência ao biomaterial, as CE foram marcadas com o corante fluorescente PKH67GL-1KT (Sigma), segundo instruções do fabricante e observadas por microscopia de fluorescência. A capacidade de aderência das CTMs ao biomaterial foi analisada *in vitro* no dia da implantação e quatro dias após implantação, sendo confirmado pelo processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB), realizado no equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer).

Figura 3 - Preparo do biomaterial Gelfoam®.



A) Abertura do envelope para retirar a esponja estéril. B-D) Corte do biomaterial com lâmina de bisturi estéril nas dimensões de 6,6 mm x 7,5 mm x 7 mm.

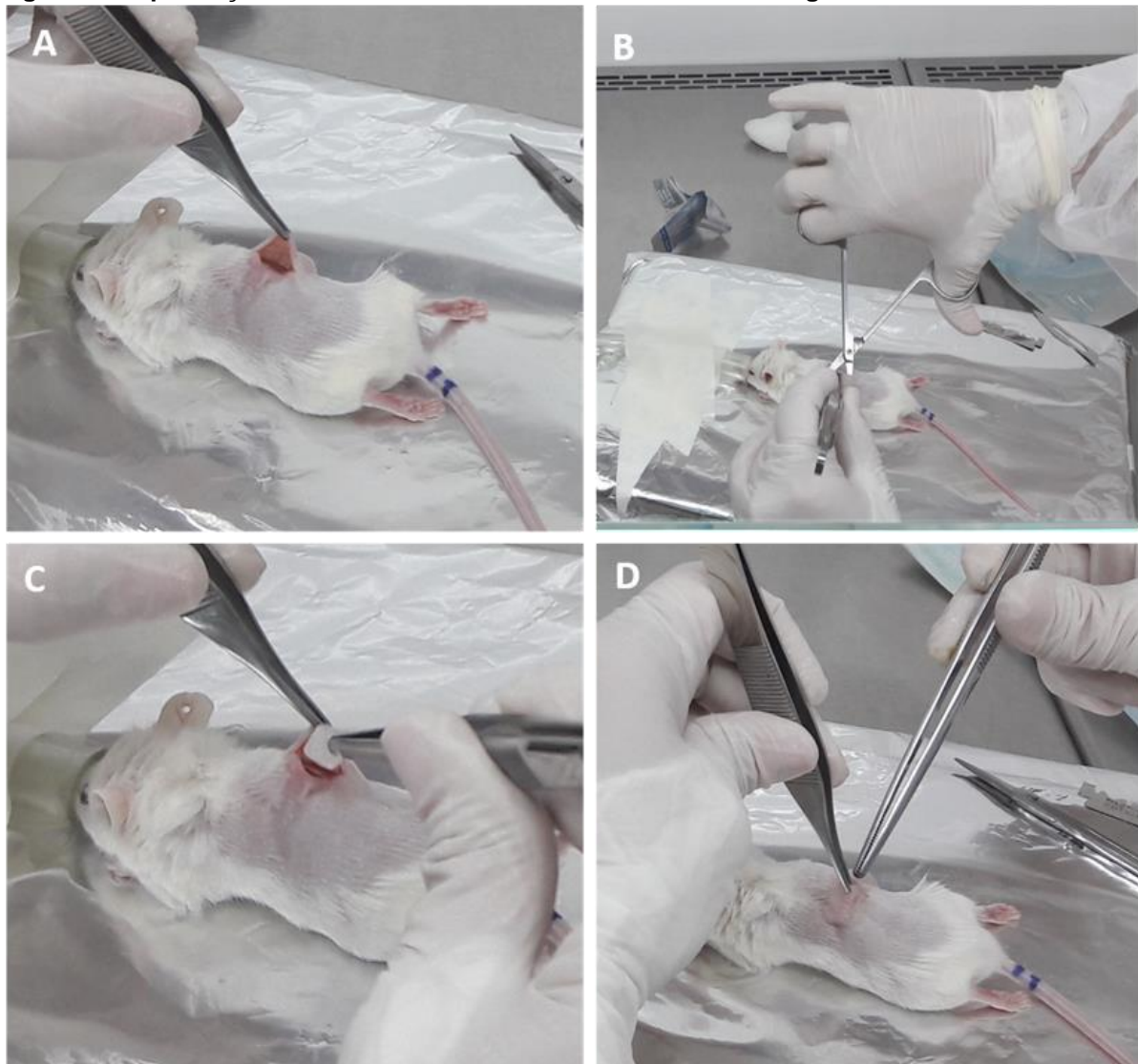
4.9.2 Procedimento cirúrgico para a implantação do biomaterial contendo CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE em camundongos NSG

Para a infusão das CTMs foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) fêmeas da linhagem NOD.Cg-Prkdc scid IL2rg tm1Wjl /SzJ (NSG), fornecidos pelo

Laboratório para Estudos em Experimentação em Animais (LEEA) do Hemocentro de Ribeirão Preto, onde permaneceram durante a realização deste trabalho.

Os biomateriais com as células incorporadas foram implantados subcutaneamente no dorso posterior de animais NSG. Cerca de uma hora antes da implantação, os animais receberam 200 mg/kg de dipirona intraperitoneal, sendo essa mesma dose administrada a cada 6 horas após a implantação durante 48 horas. Cada animal recebeu dois biomateriais com a mesma composição celular: Apenas biomaterial (GF); GF + CE (D-HMVEC ou HUVEC); CTMS-MOLuc + CE + Biomaterial; CTMs-OELuc + CE + Biomaterial; CTMs-OELuc + CTMS-MOLuc + CE + Biomaterial (Figura 4). No momento do implante alguns animais receberam a adição de 200 ng do

Figura 4 - Implantação do GF contendo CTMs e CEs em camundongos NSG.



A) Incisão dorsal de aproximadamente 1 cm. B) Divulsão do subcutâneo bilateral. C) Implantação do biomaterial com e/ou sem CTMs e CEs. D) Dermorrafia com adesivo cirúrgico.

indutor osteogênico - Bone Morphogenetic Protein 4 (BMP4) (Peprotech; Catálogo 120-05ET) por biomaterial.

4.9.3 *Processamento e análises dos organoides formados in vivo a partir da implantação do Gelfoam® contendo CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ e CE*

A bioluminescência foi analisada semanalmente a fim de avaliarmos a sobrevivência das CTMs em biomaterial *in vivo*. A análise dessa eficiência foi confirmada por meio da detecção da bioluminescência realizada com o IVIS Lumina System. Para o PIBB *in vivo*, adicionou-se 150 mg/Kg de D-luciferina (Perkin Elmer) em cada animal. Em seguida, os animais foram submetidos à captura de imagens.

A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio do uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software *Living Image 3.0*, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi desenhada manualmente para abranger o sinal bioluminescente, cuja intensidade é reportada como fluxo de fótons, expresso em *fótons/s*.

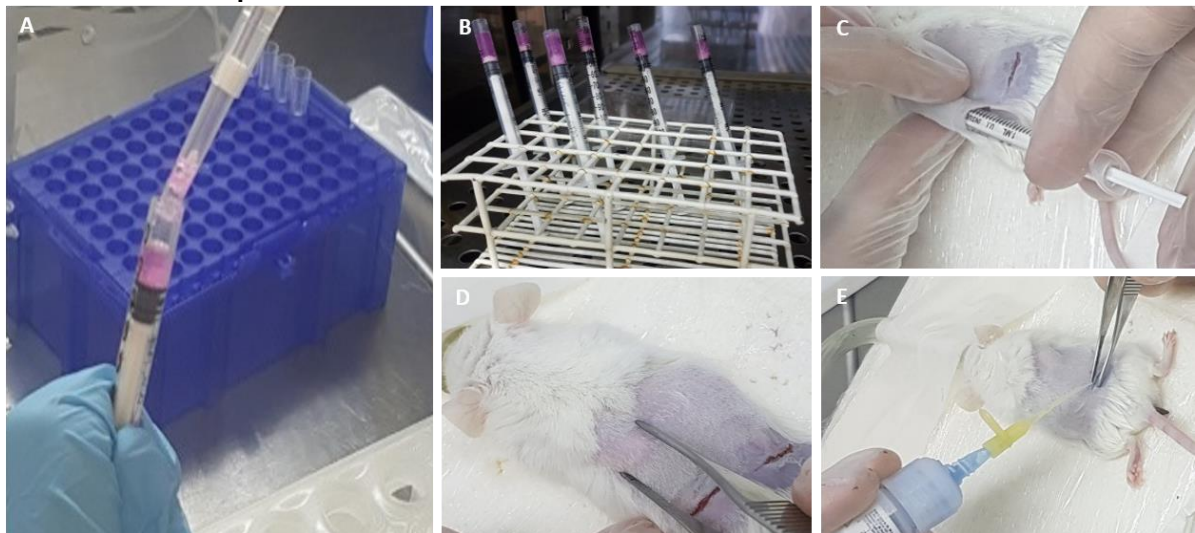
4.10 Implantação em camundongos NSG de biomateriais, produzidos à base de componentes inorgânicos do osso como hidroxiapatita (HA) e tricálcio fosfato (β -TCP), contendo CTMs-MO/CTMs-OE e HUVEC

Devido a importância em detectarmos formação óssea nos organoides gerados, nesses novos experimentos foram utilizados grânulos de hidroxiapatita (HA) e beta fosfato tricálcio (β -TCP), os quais simulam a composição do tecido ósseo devido à similaridade química e estrutural com a fase mineral dos ossos. Para tanto, foi utilizado dois tipos diferentes de biomateriais, sendo um tipo de biomaterial apenas a base de HA (Straumann® cerabone® – Enxerto ósseo bovino) e outro tipo de biomaterial formado por grânulos de HA+ β -TCP (Straumann® BoneCeramic – Grânulos de Fosfato de Cálcio). Ambos são cientificamente testados e aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para aplicabilidade como enxerto em humano.

As CTMs humanas utilizadas neste experimento foram provenientes da MO e OE esponjoso metafisário (CTMs-MO e CTMs-OE (n=2)) e CTMs provenientes do aspirado de MO (CTMs-MO (n=2)).

O procedimento utilizado para o cultivo das células com esses biomateriais foi baseado no protocolo de Reinisch e colaboradores (REINISCH *et al.*, 2017) com algumas modificações. Resumidamente, as células foram misturadas nas proporções $1,0 \times 10^6$ CTMs e $7,5 \times 10^5$ HUVEC + 40 mg de biomaterial com 500 μ L de EGM-2. Em seguida, essa mistura permaneceu 2 horas sob agitação. Após esse período, as células com o biomaterial foram centrifugadas por 5 minutos em 1200 rpm. Antes do implante, a mistura dos biomateriais e células foram misturadas com 200 μ L de *Matrigel*[®] (Corning 356234) e incubados dentro de seringas de 1 mL em estufa (37 °C) por 1 hora. Os organoides contendo biomateriais com as células incorporadas foram implantados subcutaneamente no dorso posterior de animais NSG (Figura 5).

Figura 5 - Preparo *in vitro* e Implantação *in vivo* dos organoides contendo CTMs-MO/CTMs-OE/HUVEC e HA + β -TCP.



A) Mix (*Matrigel*[®] + células + biomaterial) sendo adicionados com auxílio de ponteira em seringa de 1 mL previamente cortadas/adaptadas; B) Mix acoplados às seringas permaneceram em estufa durante 1h; C) Implantação dos organoides previamente gerados *in vitro*; D) Organóide recém implantado no dorso do animal; E) Dermorragia com cola cirúrgica.

Após 60 - 70 dias, os animais foram eutanasiados e os organoides formados foram removidos e analisados por histologia. Para análise histológica, os organoides foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo com 5 μ m de espessura, corados com Hematoxilina & Eosina (HE) e analisados em microscopia óptica.

4.11 Processamento histológico dos organoides formados *in vivo*

Após aproximadamente 60-70 dias, os animais foram eutanasiados, com 300 mg/kg de ketamina e 30 mg/kg de xilazina via intraperitoneal, e os organoides formados foram removidos. Os organoides neoformados a partir dos experimentos com *Gelfoam*® foram fixados em formalina 10% (pH=7) por 24 horas seguidos para inclusão em parafina. Os organoides neoformados a partir dos experimentos com HA/TCP foram fixados em formalina 10% (pH=7) por 24 horas sendo que após esse período os mesmos foram colocados em recipiente contendo EDTA (a 4% com pH 7,4) para descalcificação do material antes da inclusão em parafina.

Para a realização do processamento histológico, os organoides foram incubados em soluções de álcool 70%, 80%, 90% durante 1 hora em cada e álcool 95% overnight. Em seguida, foram incubadas em três soluções de álcool absoluto por 1 hora cada. Depois foram realizadas novas incubações em álcool e xilol e três soluções de xilol por 3 minutos em cada. Então, as amostras foram incubadas em parafina por 4 horas e incluídas em parafina.

Para análise histológica, os organoides incluídos em parafina foram cortados em micrótomo com 5 µm de espessura, corados com Hematoxilina & Eosina (HE) e Tricrômico de Masson e analisados em microscopia óptica.

Posteriormente, algumas lâminas foram destinadas à marcação por imunohistoquímica (IHC). Para tanto, foi utilizado o kit de detecção de IHC seguindo instruções do fabricante (IHC Detection Kit – Micro-polymer – Abcam, ab236466). Os anticorpos utilizados foram os seguintes: anti-CD146 humano (Abcam, ab75769), anti-CD31 humano (Cell Signaling, 89C2), anti-Smad 4 (Abcam, ab40759) e anti-CD45 humano (Santa Cruz, H-230, Cat. SC-25590) .

4.12 Teste de citotoxicidade dos biomateriais baseado em resazurina

Previamente ao implante das células com os biomateriais, foi realizado um teste de citotoxicidade frente aos biomateriais utilizados (*Gelfoam*® e/ou HA+β-TCP). Para tanto, foi realizado um teste de viabilidade celular baseado em resazurina. Para esse ensaio, foram adicionados 2×10^4 células (CTMs e CEs) por poço (24 wells) e 24 horas após o plaqueamento (e antes do teste) foi adicionado em cada poço (exceto nos controles) os biomateriais, nas mesmas dimensões/condições utilizadas para os experimentos *in vivo*. Após 5 dias de cultivo, foram adicionados 10 µM de resazurina

(diluídas em 400 uL de meio) por poço, e após 4 horas de incubação foi realizada a leitura em espectrofotômetro (excitação a 544 nm e emissão a 590 nm).

4.13 Caracterização *in vitro* das CTMs expressando Luc+ quanto à imunofenotipagem e diferenciação em adipócitos e osteócitos

Uma vez que as CTMs cultivadas com os biomateriais e utilizadas para o implante nos animais foram inicialmente modificadas geneticamente para expressar a proteína Luciferase, as células transduzidas com luciferase (Luc+) foram caracterizadas para verificar se as mesmas continuavam apresentando características típicas condizentes com CTMs.

Todos os procedimentos para imunofenotipagem e diferenciação foram realizados segundo os protocolos já citados nos itens 4.3.2 e 4.3.3.

4.14 Modificação gênica da linhagem celular MOLM-13 para expressar a proteína Luciferase

O processo de produção de vírions carreadores do vetor lentiviral pMSCV-Luc2-T2A-Puro foi realizado conforme o protocolo citado em item 7.0.

Para a transdução da linhagem celular MOLM-13 (Leucemia Mielóide Aguda - LMA), 1×10^6 de células foram plaqueadas em poços de 24 wells. Após 24 horas, as células foram transduzidas com luciferase, sendo utilizado MOI=1 e/ou MOI=5 com adição de 6,0 ug/mL de polibreno. Após 48 horas iniciou-se o tratamento, das MOLM13 transduzidas, com 1,0 ug/mL de puromicina para selecionar apenas as células positivas para luciferase. O tratamento com puromicina foi realizado durante 8 dias sendo o antibiótico adicionado a cada 48 horas. A análise da eficiência das células transduzidas foi confirmada por meio da detecção da bioluminescência realizada com o equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer) semelhante ao protocolo citado no item 7.0.

4.15 Injeção intravenosa da linhagem MOL-13 Luc+ em NSG com organoides pré-formados

Após 70 dias de formação do microambiente heterotópico *in vivo*, 5×10^5 de células de LMA, MOLM-13 Luc+, foram injetadas nos camundongos por via intravenosa. Vinte quatro horas depois, foi realizado o IVIS a fim de avaliar o domicílio e locais de enxertia das células leucêmicas, sendo que essa análise se repetiu após 8 dias. Após 12 dias de infusão da MOLM-13 Luc+, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta dos organoides formados *in vivo* para posteriores análises histológicas.

4.16 Análise Estatística

Os gráficos e os testes estatísticos indicados nestes experimentos foram feitos com o auxílio do programa Prism® 6.0, utilizando os testes T-Student e one-way ANOVA, considerando que houve diferença entre as médias comparadas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das CTMs isoladas dos fragmentos de ossos esponjosos e da medula óssea

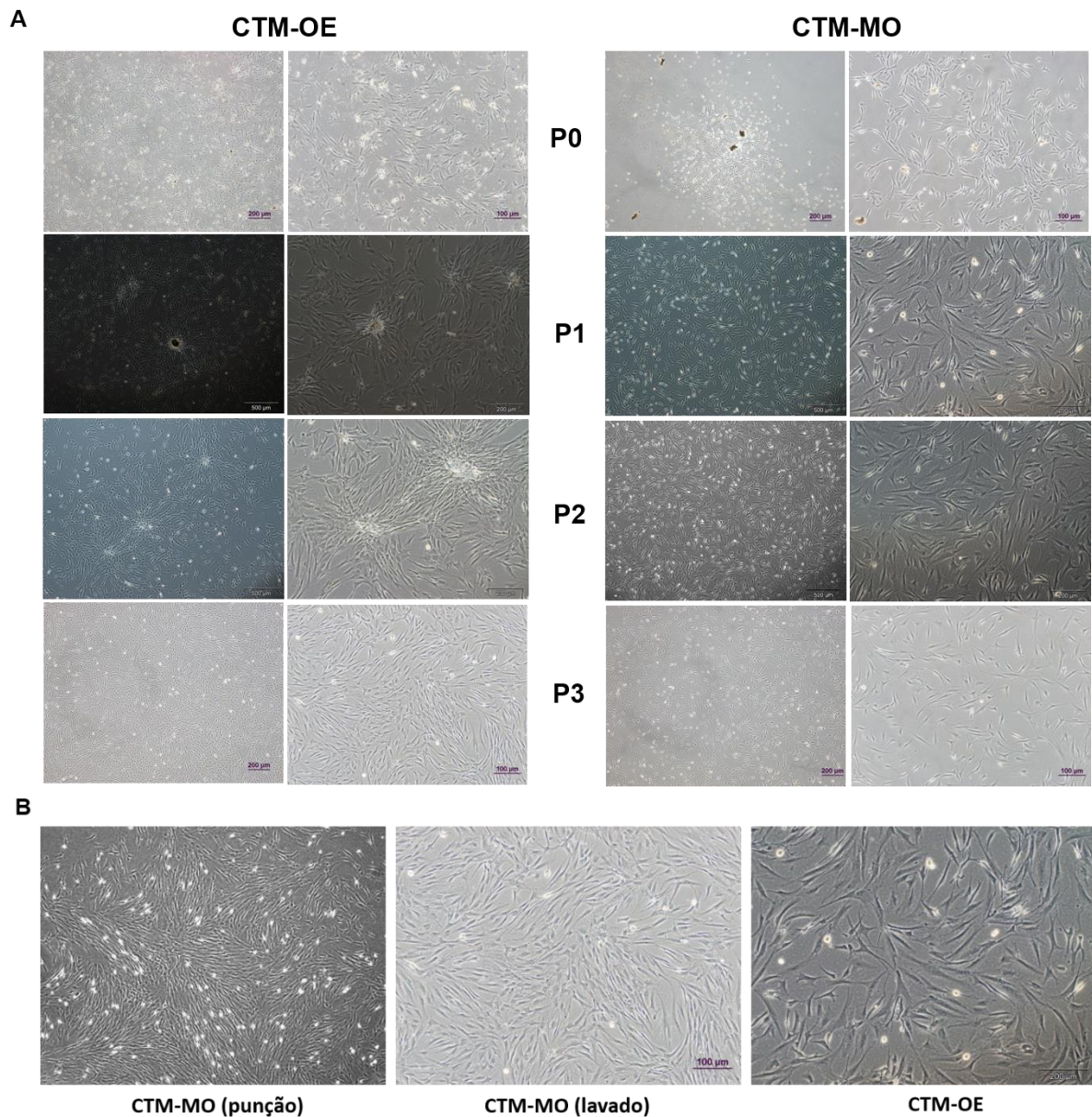
As CTMs são definidas como uma população clonogênica, multipotente, podendo se diferenciar *ex vivo* em células da linhagem mesenquimal tais como adipócitos, osteócitos e condrócitos. Elas são caracterizadas por sua morfologia fibroblastoide e aderência ao plástico quando cultivadas *in vitro*. Além disso, são caracterizadas pela expressão dos marcadores de superfície celulares CD105, CD73 e CD90, e ausência da expressão de CD14, CD19, CD34, CD45 e HLA-DR. Assim, após o isolamento das CTMs utilizadas neste estudo, foi realizada a caracterização das mesmas. Os resultados demonstrados neste trabalho, referem-se às CTMs isoladas dos fragmentos de ossos esponjosos (CTMs-OE; n=3; OE-02; OE-03 e OE-04), do lavado desses fragmentos (CTMs-MO; n=3; MO-02; 2MO-03 e MO-04 Nº4) e da punção de MO (CTMs-MO; n=2; MO Nº6 - MO Nº7). Uma vez que as CTMs-MO oriundas da punção medular são consideradas “gold standard” principalmente no uso em terapia celular, elas foram utilizadas em alguns experimentos como controle positivo do fenótipo de célula-tronco mesenquimal. Desta forma, além da caracterização, os resultados a seguir demonstrarão se há ou não diferença entre as linhagens primárias isoladas do osso compacto e seu lavado medular com as mesenquimais isoladas de punção medular.

5.1.1 As células isoladas apresentaram morfologia e perfil imunofenotípico condizentes com CTMs

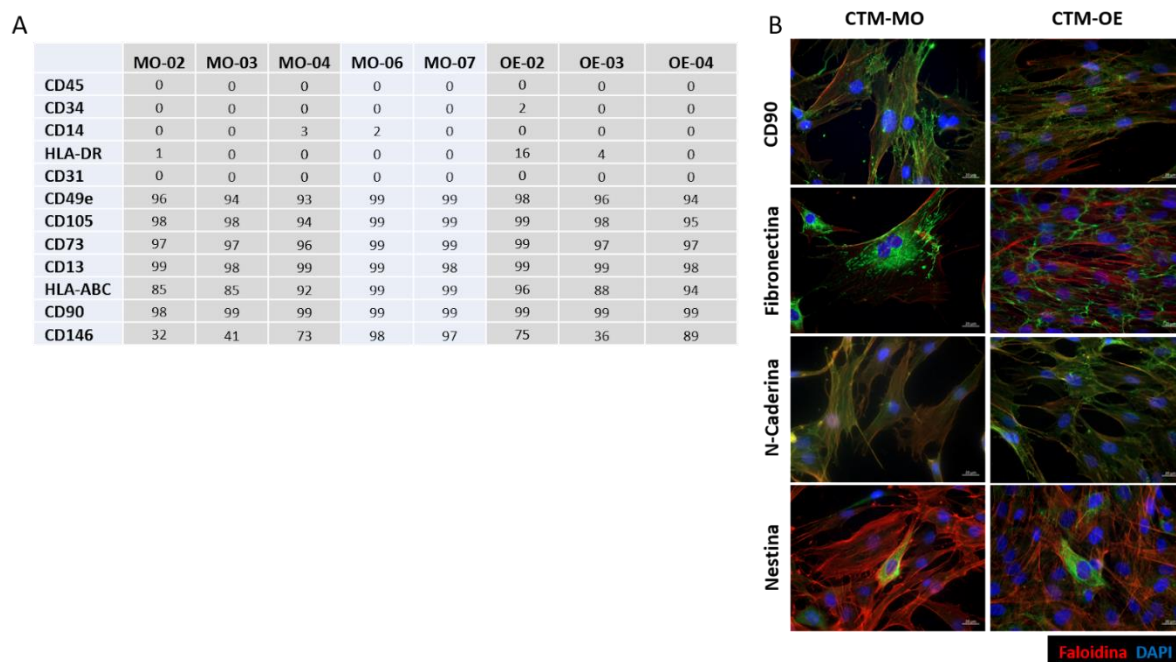
Aproximadamente 4 dias após o isolamento, as células adquiriram características típicas de CTMs, como aderência ao plástico e com morfologia fibroblastoide e uniforme com o decorrer das passagens (Figura 6A). Qualitativamente, não foram observadas diferenças morfológicas entre as células isoladas do OE e seu lavado medular com as provenientes de punção medular (Figura 6B). De acordo com a *International Society for Cell Therapy* (ISCT) um dos critérios básicos para a caracterização de uma CTMs em condições de cultivo é a expressão em mais de 95% da sua população dos antígenos de membrana CD73, CD90 e

CD105. Adicionalmente, essas células podem apresentar menos de 2% de positividade para os antígenos hematopoiéticos CD14 ou CD11b, CD19 ou CD79 α , CD34, CD45 e HLA-DR (DOMINICI *et al.*, 2006). Após 3 passagens em cultura, as CTMs foram tripsinizadas e imunofenotipadas. No geral, todas as CTMs isoladas corroboraram com esses critérios, com exceção do HLA-DR nas CTMs-OE 2 e 4 que apresentaram cerca de 16 e 4%, respectivamente, de suas populações positivas para o marcador (Figura 7A). Além disso, análises por imunofluorescência demonstraram a expressão de outros marcadores típicos de mesenquimais como fibronectina, N-caderina e nestina (Figura 7B).

Figura 6 - Caracterização das CTMs quanto à morfologia.



A) Fotomicrografia de contraste de fase demonstrando a morfologia fibroblástica, das CTMs isoladas do OE e do lavado de MO, após 4 dias de isolamento e após passagens 1 a 3. Aumento de 40x e 100x. B) Fotomicrografia de contraste de fase demonstrando que as CTMs isoladas por punção medular (CTMs-MO (punção)), lavado (CTMs-MO (lavado)) e osso compacto (CTMs-OE). Aumento de 100x.

Figura 7 - Caracterização das CTMs quanto aos marcadores típicos de linhagem mesenquimal.

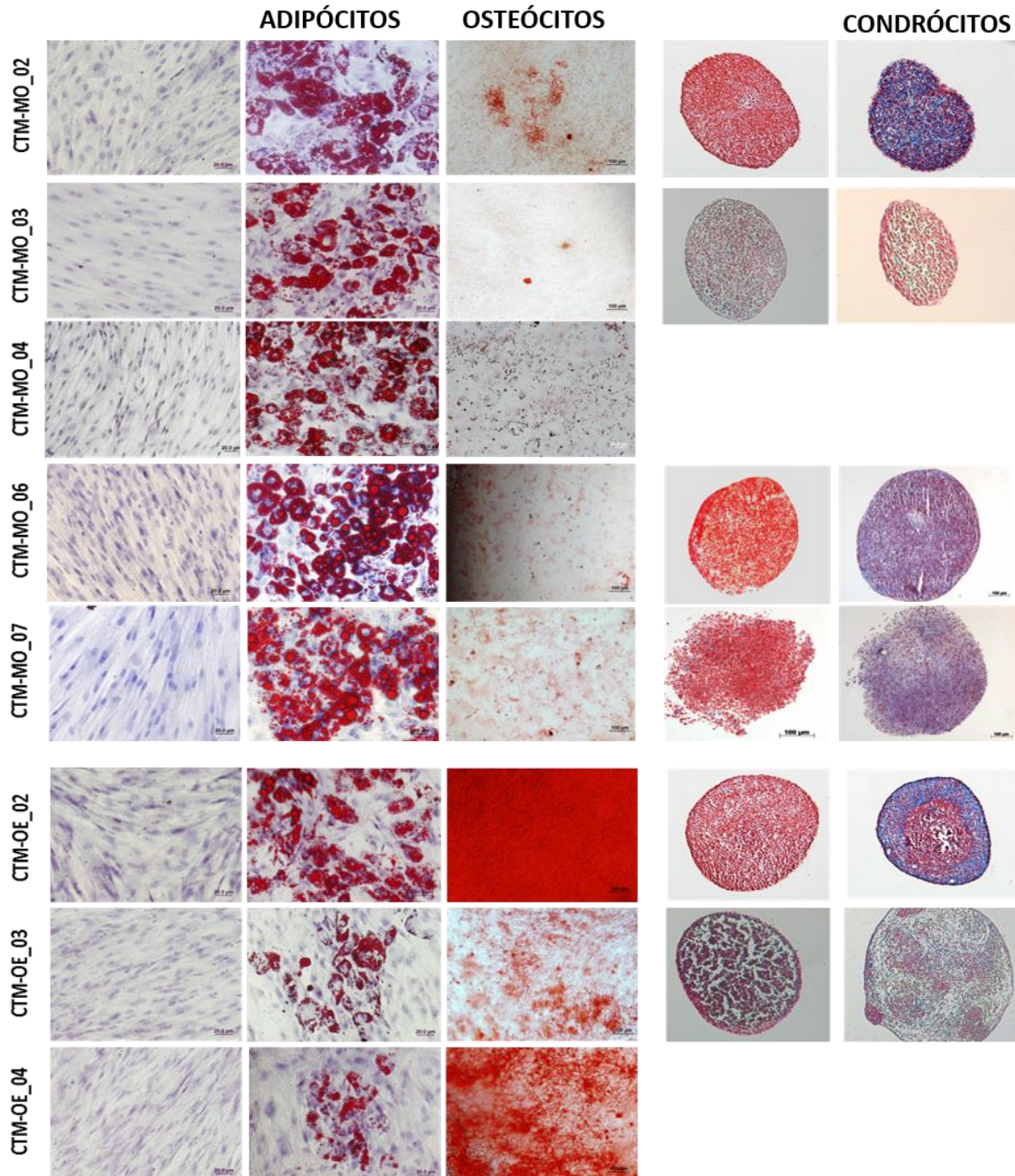
A) Porcentagem de células positivas para os marcadores mesenquimais. Imunofenotipagem pela técnica de citometria de fluxo. B) Análise por imunofluorescência da expressão de marcadores típicos de mesenquimais em CTMs isoladas. A marcação positiva para CD90, fibronectina, N-caderina e Nestina está evidenciada em verde (alexa fluor 488) O citoesqueleto celular foi marcado com faloidina (vermelho) e os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul). Barra = 100µm.

5.1.2 Avaliação da multipotencialidade *in vitro* das CTMs quanto à diferenciação em adipócitos, osteócitos e condrócitos

Outro aspecto importante para definir uma CTMs é quanto a sua plasticidade em se diferenciar em tipos celulares da linhagem mesodermal como adipócitos, osteócitos e condrócitos. Ambos os tipos celulares, CTMs isoladas da MO e OE, foram capazes de se diferenciar em adipócitos em média de 15 dias. As células tratadas com fatores lipogênicos demonstraram acúmulo de vesículas de gordura coradas em vermelho pelo corante Oil Red O. Com relação à diferenciação osteogênica, em média de 25 dias, as CTMs diferenciaram-se em osteócitos. Os indícios de diferenciação neste caso foram os acúmulos de oxalato de cálcio corados em vermelho pelo corante Alizarin Red S. Destaca-se que as CTMs derivadas do OE demonstraram maiores acúmulos sugerindo um maior potencial de diferenciação óssea em comparação às CTMs-MO do lavado. Foi observado que ambas CTMs submetidas ao ensaio de condrogênese por 30 dias e posteriormente coradas com Tricoma de Masson

demonstraram maior acúmulo de colágeno (coloração azul para colágeno e vermelha para células) (Figura 8).

Figura 8 - Potencial de diferenciação das CTMs.



Fotomicrografia em campo claro demonstrando diferenciação adipogênica com acúmulo de gorduras coradas em vermelho (aumento 20x) e diferenciação osteogênica com acúmulo de oxalato de cálcio corados em vermelho (aumento 10x). Análise morfológica de cortes histológicos de aglomerados tridimensionais submetidos ou não (CT) à diferenciação condrogênica por 30 dias. Cada corte foi corado com Tricromo de Masson, que evidencia células (cor rósea-avermelhada) de tecidos conjuntivos circundantes (cor azul para colágeno). Imagens obtidas em microscópio de contraste de fase (aumento 10x). Colunas da esquerda (1 e 4) = Controles (sem diferenciação) (n=3).

5.1.3 CTMs isoladas dos diferentes microambientes apresentaram expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético

Uma das grandes dificuldades em estudar as CTHs *in vitro*, é mantê-las por um longo período em cultura, uma vez que *in vivo* estas células são suportadas por fatores solúveis e outros tipos celulares. No final da década de 70, foi descrito um sistema de cultura líquida que permitia a proliferação das CTHs, de precursores granulocíticos e a manutenção da granulopoiese em cultura por várias semanas. Isso foi possível graças ao cultivo das CTHs com células estromais da MO. É sabido que *in vivo*, as células estromais na MO (como as CTMs) suportam as CTHs, portanto, foi realizada uma análise do mRNA das CTMs com relação à expressão de genes relevantes para a proliferação, manutenção e suporte das CTHs no nicho hematopoiético.

Foi observado diferenças de unidades relativas de expressão (URE) de alguns genes entre as duas populações distintas de CTMs. Porém não houve diferença significativa entre elas. Interessantemente, ambas populações de CTMs expressaram altos níveis de CXCL12 (stromal cell-derived factor [SDF]-1). Essa quimiocina é essencial para a hematopoiese e para manter o pool de CTHs no nicho hematopoiético (SUGIYAMA *et al.*, 2006) (Figura 9).

5.1.4 As CTMs expressam proteínas que estão envolvidas no nicho hematopoiético

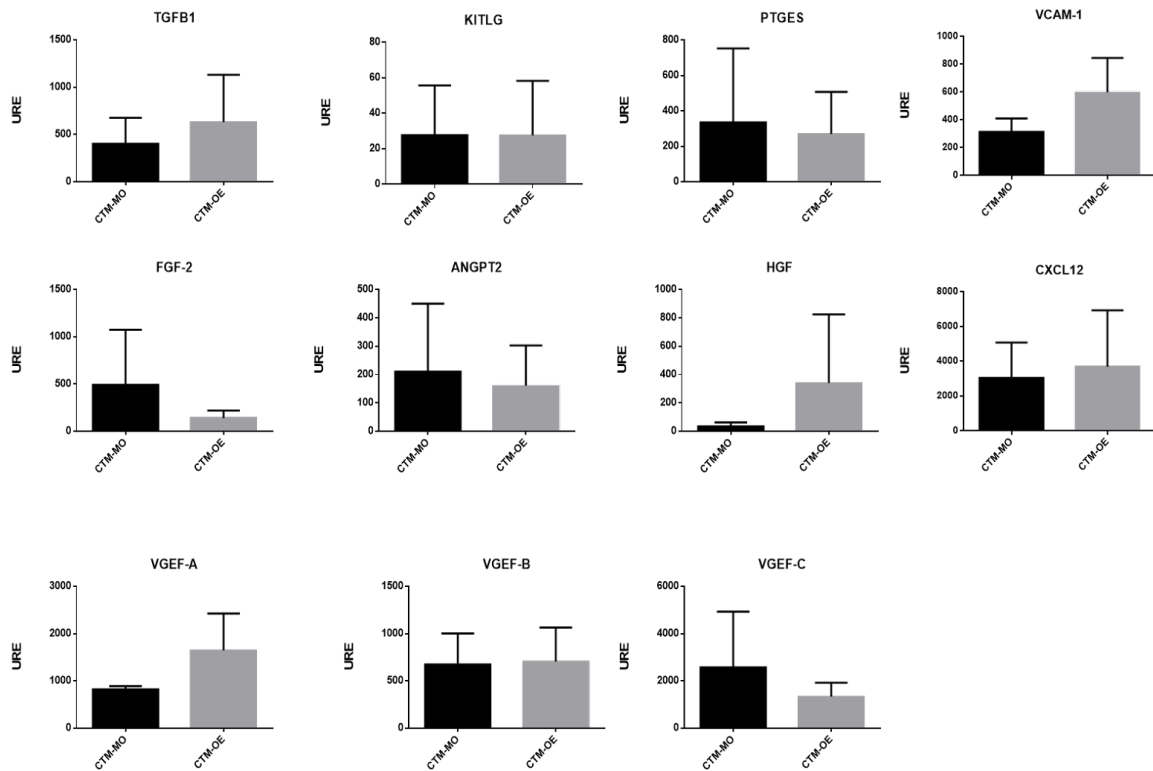
As CTMs têm a capacidade de secretar vários fatores dentre citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e fatores angiogênicos os quais são importantes para o microambiente onde elas estão alojadas. Uma das principais quimiocinas secretada pelas CTMs no nicho hematopoiético, é o *stromal cell-derived factor 1* (SDF1), também conhecido como *C-X-C motif chemokine 12* (CXCL12). Nós já demonstramos pela análise de PCR em tempo real que as CTMs altamente expressam o gene CXCL12. Esta quimiocina se liga nas células tronco hematopoiéticas (CTH) por meio do receptor CXCR4, sendo essa sinalização (CXCL12-CXCR4) essencial para a hematopoiese e para manter o pool de CTHs na medula óssea adulta (MORRISON; SCADDEN, 2014).

Neste contexto, foi investigado se há a secreção por parte das CTMs de CXCL12 e/ou outras proteínas relacionadas ao nicho hematopoiético. Para tanto, foi utilizado o Kit MILLIPLEX™ MAP Human Cytokine / Chemokine Magnetic Bead Panel

I e II (MERCK), o qual é baseado na tecnologia Luminex®. Foram analisadas as seguintes proteínas: CXCL12, SCF, SDF-1, FGF2, IL6, VEGF, FLT3L e IFN α .

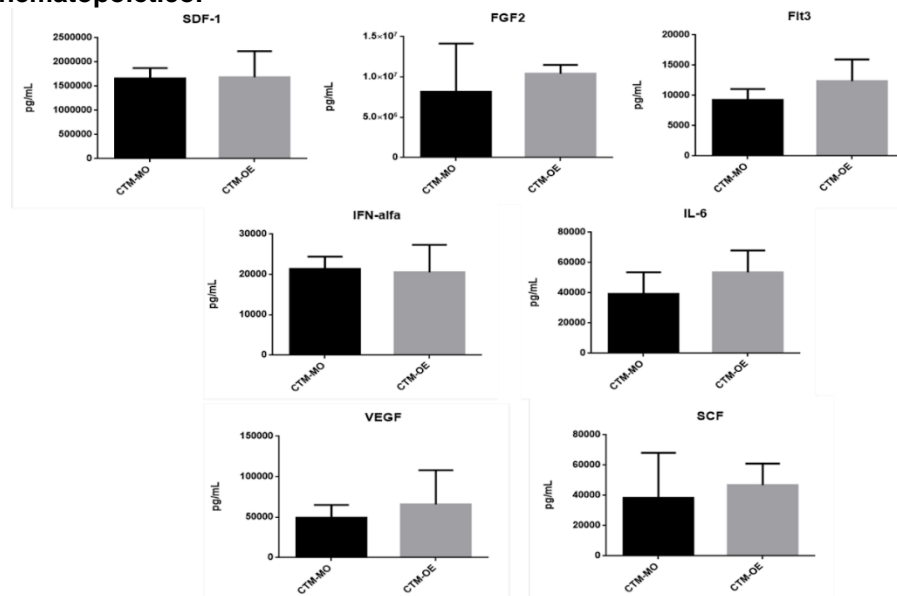
Foi observado que o *basic fibroblast growth factor* (bFGF ou FGF-2) e CXCL12, foram altamente expressas tanto nas CTMs-MO quanto nas CTMs-OE. Enquanto as outras proteínas analisadas foram expressas em menor quantidade (Figura 10).

Figura 9 - Análise por PCR em tempo real (n=3) da expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético e osteogênese.



Análise por PCR em tempo real (n=3) da expressão de genes relacionados ao nicho hematopoiético e osteogênese. Análise estatística teste T não pareado com nível de significância (α)=0,05.

Figura 10 - Avaliação de proteínas secretadas pelas CTMs-MO e OE envolvidas no nicho hematopoiético.



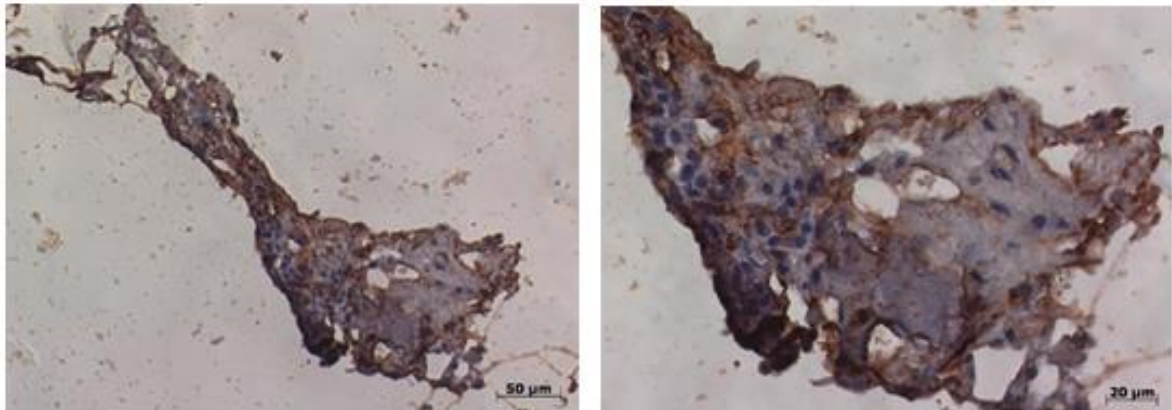
Análise pela técnica do multiplex da presença de proteínas envolvidas no nicho hematopoiético. (Teste T de Student; n=3).

5.1.5 Fragmentos do OE metafisário da tíbia expressam o marcador progenitor mesenquimal CD146

Múltiplos marcadores já foram descritos para caracterizar CTMs principalmente derivadas da MO. Sabe-se que não há um marcador específico que distingue as CTMs dos outros tipos células estromais em cultivados, principalmente devido ao fato de que a expressão de algumas moléculas de superfície celular é afetada pelas condições de cultivo. Acredita-se que o marcador CD146, também conhecido como MCAM (do inglês, *melanoma-associated cell adhesion molecule*) está presente principalmente nas células estromais perivasculares, e que seu nível de expressão é alterado conforme condições de cultivo celular como por exemplo normóxia e hipóxia (DE SOUZA *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que células progenitoras estromais CD146+ são capazes de gerar ossículo composto por estroma e recapitular o microambiente hematopoiético *in vivo*, ressaltando assim a importância deste marcador estromal (SACCHETTI *et al.*, 2007).

Assim, nós comprovamos que o fragmento de osso metafisário no qual foi isolado as CTMs de nosso trabalho, apresenta marcação *in situ* do CD 146 (Figura 11).

Figura 11 - Análise por imunohistoquímica do marcador estromal CD146 em amostra de osso esponjoso metafisário.



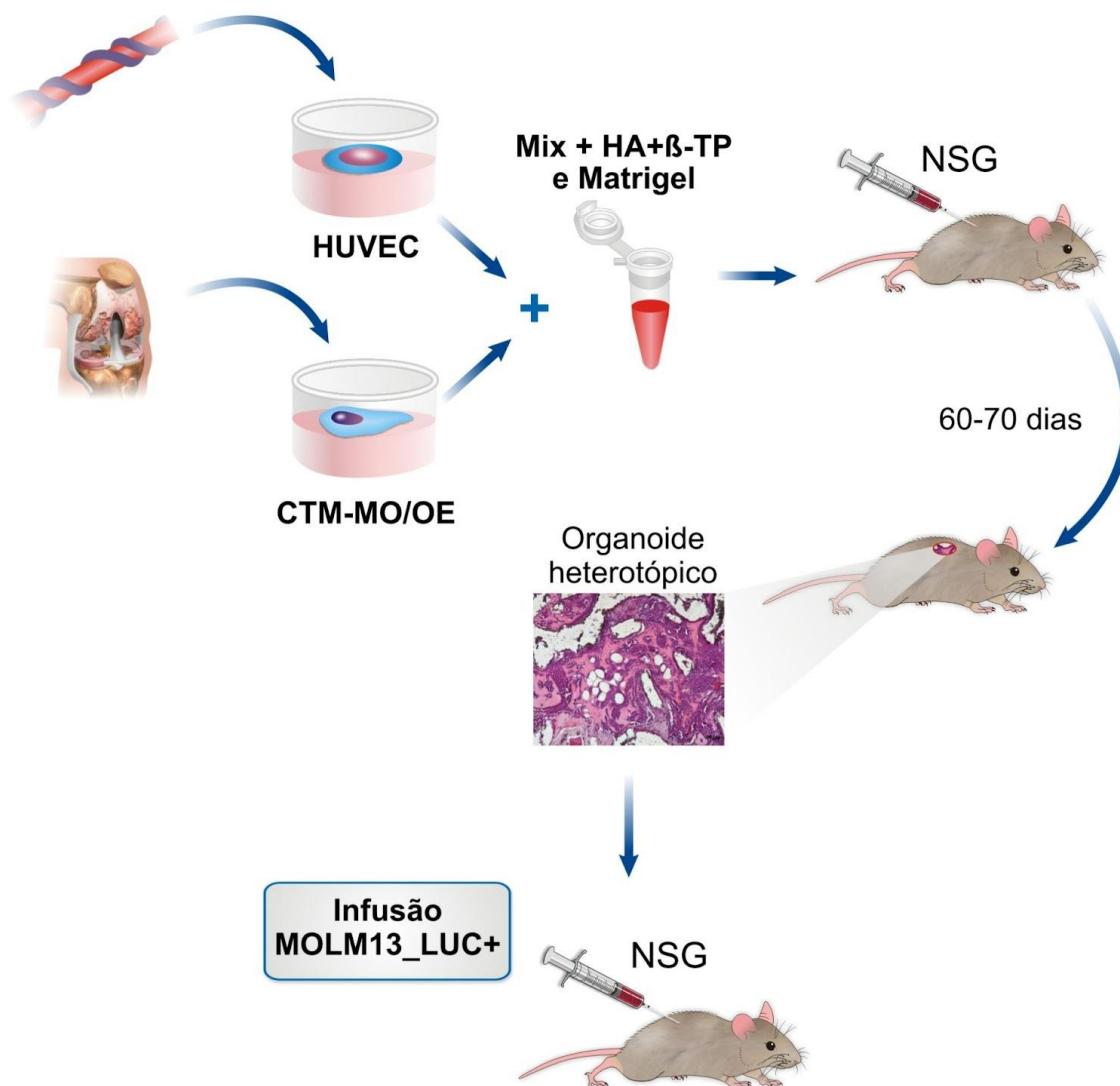
Presença do marcador CD146 nas regiões coradas em cor marrom. Aumento de 20x (figura esquerda) e 40x (figura direita).

5.2 Estabelecimento de um ossículo / organoide humanizado heterotópico a partir da geração de organoides contendo CTMs e biomateriais

Após caracterização *in vitro* das CTMs isoladas dos diferentes compartimentos medulares, foi feita a caracterização do uso destas células em modelo tridimensional com o uso de biomateriais / *scaffold*. A padronização e geração desta cultura tridimensional é essencial para posterior estabelecimento de um microambiente humanizado. A ideia foi gerar um organoide, ou seja, estruturas tridimensionais, derivadas de células tronco que mimetizam um hOss com nicho hematopoiético heterotópico. Além das células estromais, como as CTMs, sabe-se que há outros tipos celulares importantes na composição do microambiente hematopoiético, como as células endoteliais que permitem a vascularização tecidual. Assim, nós também optamos por infundir células endoteliais juntamente com as CTMs.

Após a formação do hOss, CTH malignas oriundas da linhagem celular de LMA - MOLM13 serão injetadas nos camundongos a fim de demonstrar o domicílio e enxertia destas células no microambiente heterotópico neoformado (Figura 12).

Figura 12 - Fluxograma do estabelecimento de um modelo de hOss para xenotransplante de células hematopoiéticas em camundongos.



Enxertia de células leucêmicas humanas em um microambiente humano

Após a caracterização das CTMs, ambas as linhagens foram misturadas com o biomaterial e matrigel previamente ao implante em camundongos NSG. Após 60 a 70 dias do implante e geração dos hOss heterotópicos, os animais receberam infusão de células leucêmicas, MOLM-13 modificadas com luciferase, a fim de acompanhar o domicílio e enxertia destas células no organoide neoformado.

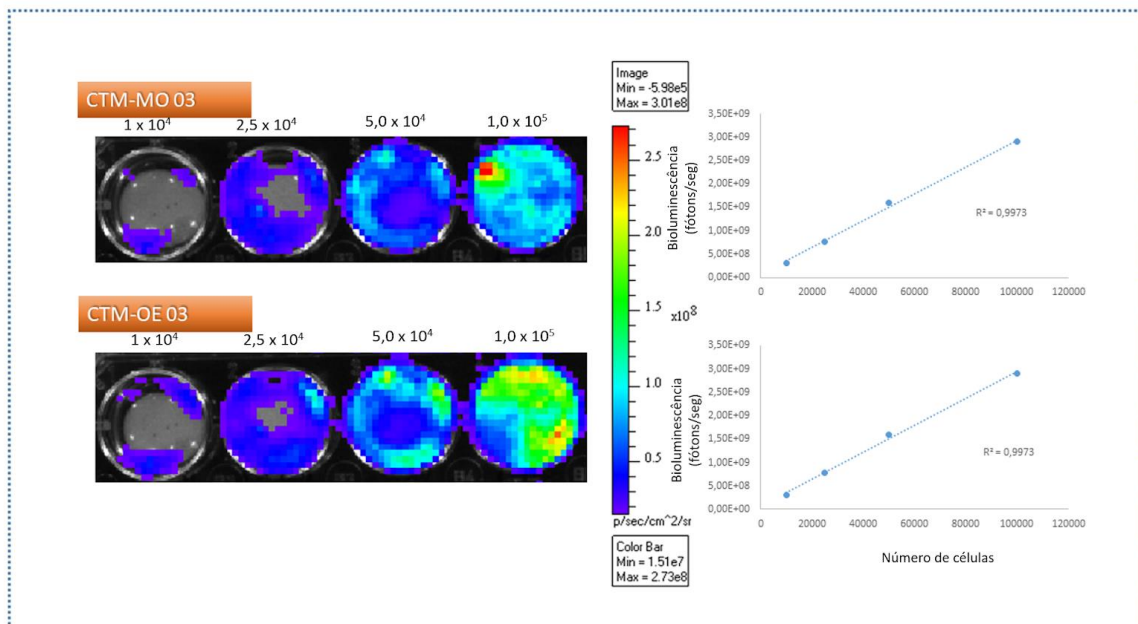
5.2.1 CTMs modificadas geneticamente expressam a proteína repórter Luciferase (Luc+)

Inicialmente, foi uma preocupação deste trabalho verificar se as CTMs ficaram retidas no biomaterial e se as mesmas proliferaram *in vivo* após implantação. Assim, modificamos geneticamente CTMs-MO e CTMs-OE com a proteína repórter

Luciferase para avaliar o rastreamento e proliferação *in vivo*. Ambas CTMs (CTMO-MO3 e CTMs-OE3) foram transduzidas com a luciferase.

A análise da eficiência das células transduzidas foi confirmada por meio da detecção da bioluminescência realizada com o equipamento IVIS Lumina System (Perkin Elmer). Para o processamento de imagem baseado em bioluminescência (PIBB) *in vitro*, adicionou-se D-luciferina ao meio de cultivo e em seguida, as placas foram imediatamente submetidas à captura de imagens. A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio do uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software Living Image 3.0, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi desenhada manualmente para abranger o sinal bioluminescente, cuja intensidade é reportada como fluxo de fótons, expresso em fótons/s. A intensidade de bioluminescência (medida em fótons por segundo) foi diretamente proporcional ao número de células nos poços de cultura (Figura 13).

Figura 13 - Bioluminescência *in vitro* das CTMs modificadas para expressar luciferase.



Após a transdução com o vetor lentiviral contendo o gene da luciferase 2, as CTMs passaram a emitir sinal bioluminescente. Além disso, a intensidade de bioluminescência (medida em fótons por segundo) foi diretamente proporcional ao número de células nos poços de cultura.

5.2.2 Cultivo 3D das CTMs e CEs com biomaterial Gelfoam®

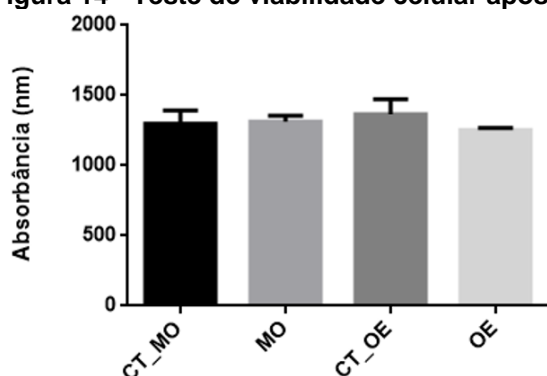
Primeiramente, fizemos uma busca na literatura de biomateriais aptos para a formação de um ossículo (tecido ósseo) contendo nicho hematopoiético heterotópico.

Passaro e colaboradores (2017) demonstraram em seu trabalho que ao cultivar CTMs em *Gelfoam*[®] (Pfizer) e implantar essa mistura em camundongos NSG, houve a formação final (após 60 dias) de um nicho hematopoiético heterotópico humanizado. Assim, inicialmente optamos por utilizar o biomaterial *Gelfoam*[®] devido sua praticidade de manuseio e baseados em seus resultados já demonstrados na literatura. Além da praticidade, o *Gelfoam*[®], é aprovado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para aplicabilidade como enxerto em humanos. Esse biomaterial é uma matriz dobrável, porosa, hemostático absorvível, composto por esponja estéril de gelatina purificada especialmente tratada sem levar à formação de tecido cicatricial excessivo ou à reação celular quando implantada nos tecidos.

5.2.3 CTMs *Luc*⁺ aderiram e proliferaram no *Gelfoam*[®] *in vitro* e *in vivo*

Antes de iniciarmos o cultivo 3D das CTMs no biomaterial, nós fizemos uma análise de citotoxicidade do *Gelfoam*[®] baseado na metabolização de resazurina. Não foi observado diferença significativa na viabilidade entre as células que ficaram em contato com o biomaterial e as células sem contato, demonstrando que o *Gelfoam*[®] não teve citotoxicidade (Figura 14).

Figura 14 - Teste de viabilidade celular após 7 dias de cultivo das CTMs com *Gelfoam*[®].

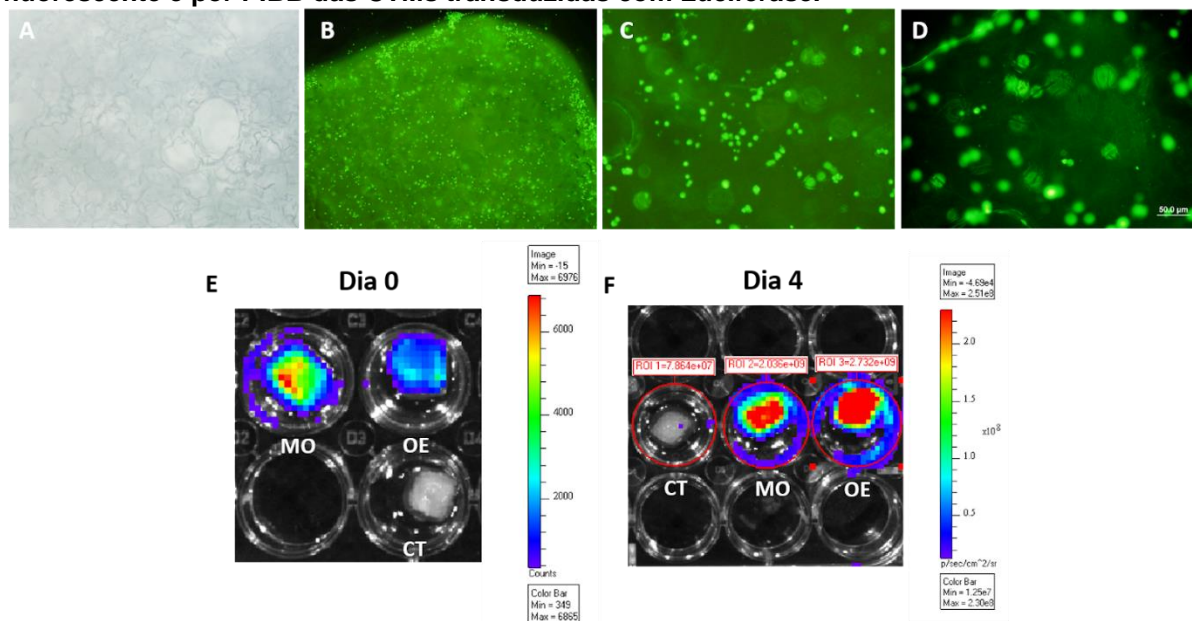


Teste de redução da resazurina demonstrando que não houve diferença significativa entre as células cultivadas ou não (CT) com *Gelfoam*[®]. Teste T de Student ($p < 0,05$).

Antes de implantar as células, tanto CTMs quanto CEs, nos animais NSG, nós observamos se as células foram capazes de permanecer aderidas ao biomaterial. Para tanto, as CTMs *Luc*⁺ foram cultivadas com o *Gelfoam*[®] (conforme material e métodos) e no decorrer de 4 dias, observamos a emissão de bioluminescência. De

acordo com os resultados, houve emissão e aumento do sinal ao decorrer dos 4 dias sugerindo a aderência e proliferação das CTMs. Para a detecção de CEs (D-HMVECs - células endoteliais microvasculares humanas), as mesmas foram marcadas com um corante fluorescente verde que cora membrana celular (PKH67). Foi observado que as CEs também aderiram ao biomaterial e permaneceram aderidas até o final da análise (24 horas) (Figura 15).

Figura 15 - Visualização por microscopia de fluorescência das CE coradas com corante fluorescente e por PIBB das CTMs transduzidas com Luciferase.



A) Fotomicrografia em contraste de fase do GF sem células. B-D) GF com as D-HMVECs marcadas com PKH67GL-1KT (aumento de 4x (B), 10x (C) e 20x (D)). E-F) PIBB demonstrando aderência das CTMs ao GF no dia 0 e dia 4 após implantação das células ao biomaterial. CT = controle (biomaterial sem células); MO = CTMs derivadas da MO; OE = CTMs derivadas do OE.

5.2.4 CTMs-MO/CTMs-OE LUC+ permanecem *in vivo* formando um novo tecido heterotópico após implantação com Gelfoam® em NSG

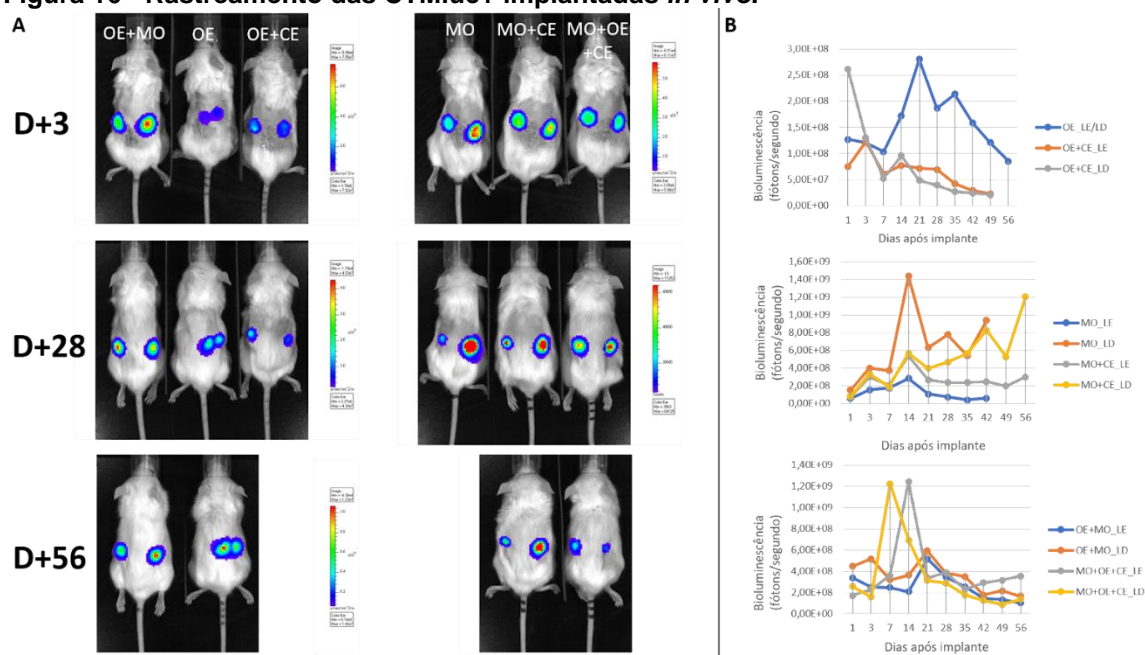
Nos primeiros estudos realizados, utilizamos as CTMs 03 para modificação gênica (Luc+) e padronização dos experimentos *in vitro* e *in vivo*. Os biomateriais com as células incorporadas (organoides) foram implantados subcutaneamente no dorso posterior de animais NSG (vide metodologia). Cada animal recebeu dois biomateriais com a mesma composição celular: apenas biomaterial *Gelfoam*® (GF); GF + CE (D-HMVEC); CTMS-MOLuc + CE + Biomaterial; CTMs-OELuc + CE + Biomaterial; CTMs-OELuc + CTMS-MOLuc + CE + Biomaterial.

A bioluminescência foi analisada semanalmente a fim de avaliarmos a sobrevivência das CTMs em biomaterial *in vivo*. A análise dessa eficiência foi confirmada por meio da detecção da bioluminescência realizada com o IVIS Lumina System. Para o PIBB *in vivo*, adicionou-se 150 mg/Kg de D-luciferina (Perkin Elmer) em cada animal. Em seguida, os animais foram submetidos à captura de imagens.

A intensidade de bioluminescência foi quantificada por meio do uso da ferramenta ROI (do inglês, *region of interest*) do software Living Image 3.0, utilizado para operar o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi desenhada manualmente para abranger o sinal bioluminescente, cuja intensidade é reportada como fluxo de fótons, expresso em *fótons/s*.

As análises por PIBB *in vivo* demonstraram que as CTMs sobreviveram ao implante durante os 56 dias de experimento (Figura 16).

Figura 16 - Rastreamento das CTMluc+ implantadas *in vivo*.

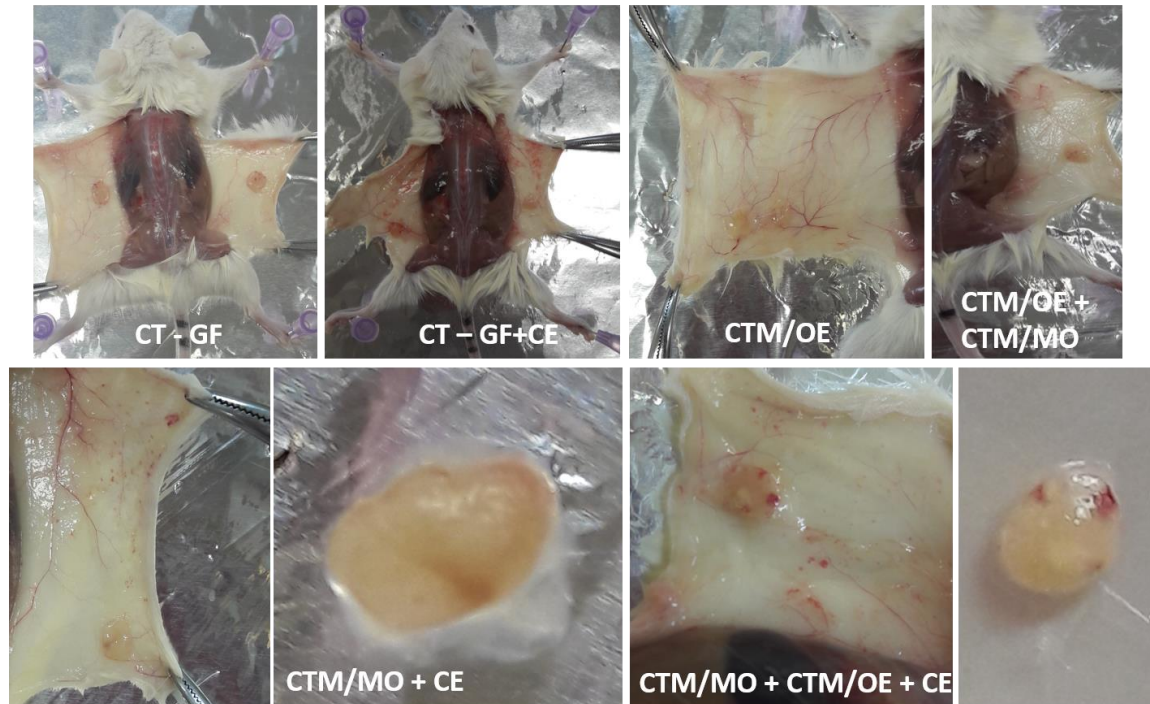


Biomateriais contendo CTMs-MO e/ou CTMs-OE na presença ou não de CEs foram implantados bilateralmente nos flancos de animais NSG. A detecção de bioluminescência nas regiões de infusão demonstra que as CTMluc+ sobreviveram ao implante. (B) Quantificação da bioluminescência emitida pelas CTMluc+ durante 56 dias após transplante. A sobrevivência das ADSCs foi similar independentemente da presença de CE. MO = CTMs derivadas da MO; OE = CTMs derivadas do OE; CE = Células Endoteliais (D-HMVEC); LD = lado direito; LE = lado esquerdo.

Após este período, os animais foram eutanasiados e os organoides formados foram removidos. Os organoides formados nos animais a partir dos biomateriais com

presença das CTMs apresentaram aspectos mais rígidos e tamanhos maiores quando comparados com os organoides formados nos animais controles (Figura 17).

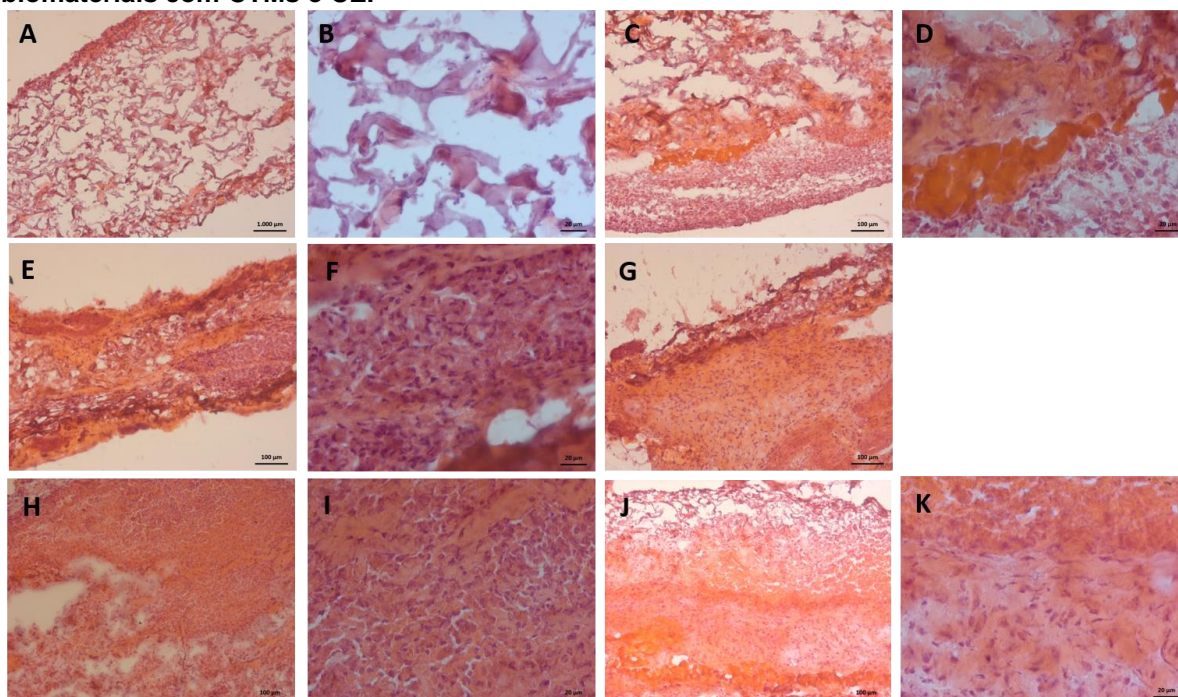
Figura 17 - Isolamento dos organoides.



Aspectos dos organoides formados *in vivo* após 56 dias de implante dos biomateriais com CTMs e CE nos animais NSG.

A análise histológica dos biomateriais implantados sem adição de células (controle experimental) revelou manutenção de arcabouço de colágeno, porém não foram observados núcleos celulares em quantidade que indicasse uma formação tecidual (Figura 18A-B). Os organoides formados a partir de biomateriais contendo apenas as CEs, apresentaram focos de formação tecidual indicada pela presença de núcleo de coloração roxa, sobretudo nas margens do biomaterial, onde também foi observado uma deposição e tecido conjuntivo (provavelmente formado por células do próprio animal) (Figura 18C-D). Por fim, os organoides formados à partir de biomateriais contendo CTMs-MO e/ou CTMs-OE, com ou sem CEs, apresentaram grande quantidade de núcleos celulares envolvendo o arcabouço do biomaterial, organizados de forma que sugere a formação de tecido conjuntivo em quantidade comparativamente maior às demais condições experimentais (Figura 18E-K). Não foram observados sinais de deposição mineral e indícios de vascularização em nenhuma das condições experimentais.

Figura 18 - Análise histológica dos organoides coletados após 56 dias de implante dos biomateriais com CTMs e CE.



A e B) CT (GF). C e D) GF + D-HMVEC. E e F) GF + CTMs-OE. G) GF + CTMs-MO + CTMs-OE. H e I) GF + CTMs-MO + D-HMVEC. J e K) GF + CTMs-MO + CTMs-OE + D-HMVEC. Aumento 10x = A, C, E, G, H e J. Aumento 40x = B, D, F, I e K.

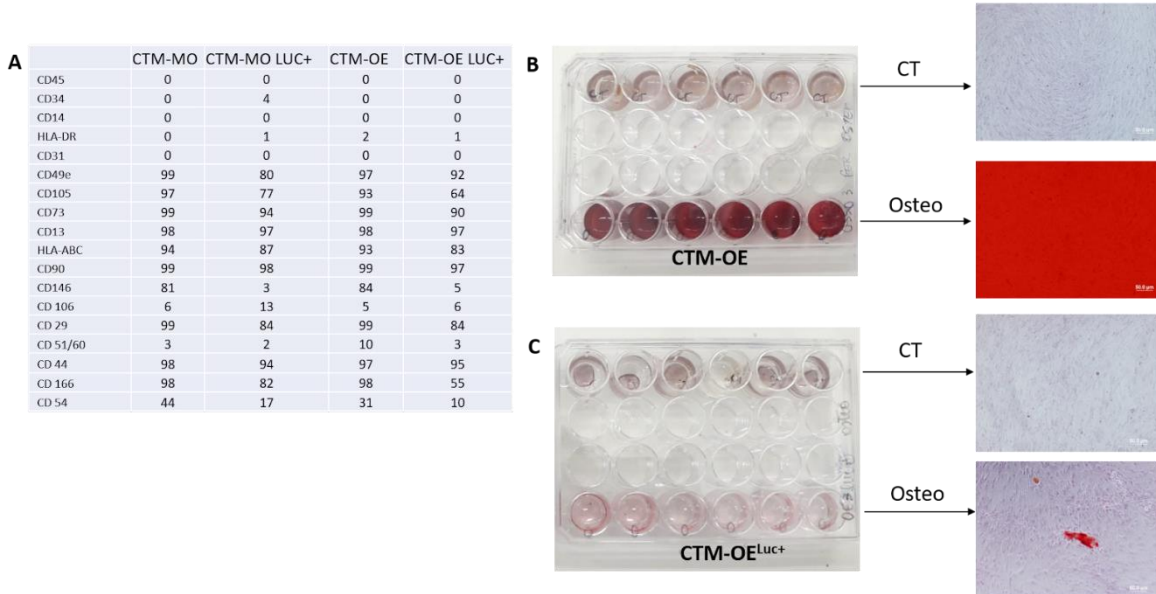
5.2.5 CTMs modificadas com luciferase diminuem a capacidade de diferenciação osteogênica *in vitro*

Uma vez que as CTMs cultivadas com os biomateriais e utilizadas para o implante nos animais foram inicialmente modificadas geneticamente para expressar a proteína Luciferase (como demonstrado em outros relatórios), nós caracterizamos as células transduzidas com luciferase (Luc+) para verificar se as mesmas continuavam apresentando características típicas condizentes com CTMs.

Com relação ao perfil imunofenotípico, notamos que houve grande alteração apenas nos marcadores CD146 e CD54 (Figura 19A) de ambas CTMs transduzidas. Entretanto, esses dois marcadores estão significativamente envolvidos no processo de diferenciação osteogênica (Hu et al, 2016). E ao analisar a diferenciação celular, não houve alteração na capacidade de diferenciação adipogênica entre as células transduzidas ou não com luciferase (dados não mostrados). Entretanto, após aproximadamente 35 dias de indução osteogênica *in vitro*, houve uma grande alteração no processo de diferenciação osteogênica entre as CTMs-OE e CTMs-

OELuc+ (Figura 19B e C). As CTMs transduzidas com luciferase obtiveram sua diferenciação osteogênica nitidamente prejudicada. O motivo ainda não está claro, porém, devido a esse fato observado, os próximos experimentos *in vivo* foram conduzidos com CTMs não transduzidas, uma vez que o processo de diferenciação osteogênica *in vivo* é muito importante para a formação do nicho heterotópico.

Figura 19 - Perfil imunofenotípico e potencial de diferenciação osteogênica das CTMs Luc+.



A) Painel imunofenotípico das CTMs-MO e OE expressando (Luc+) ou não luciferase. B) Diferenciação osteogênica das CTMs-OE não transduzidas (acúmulo de precipitado de cálcio corados em vermelho). C) Diferenciação osteogênica das CTMs-OE transduzidas com luciferase (Luc+). Diminuição em acúmulo de precipitado de cálcio (corados em vermelho). CT=Controle (células sem diferenciar).

5.2.6 CTMs-MO/CTMs-OE implantadas em Gelfoam® com HUVECs e o indutor osteogênico BMP4 formam organoides mais rígidos e vascularizados

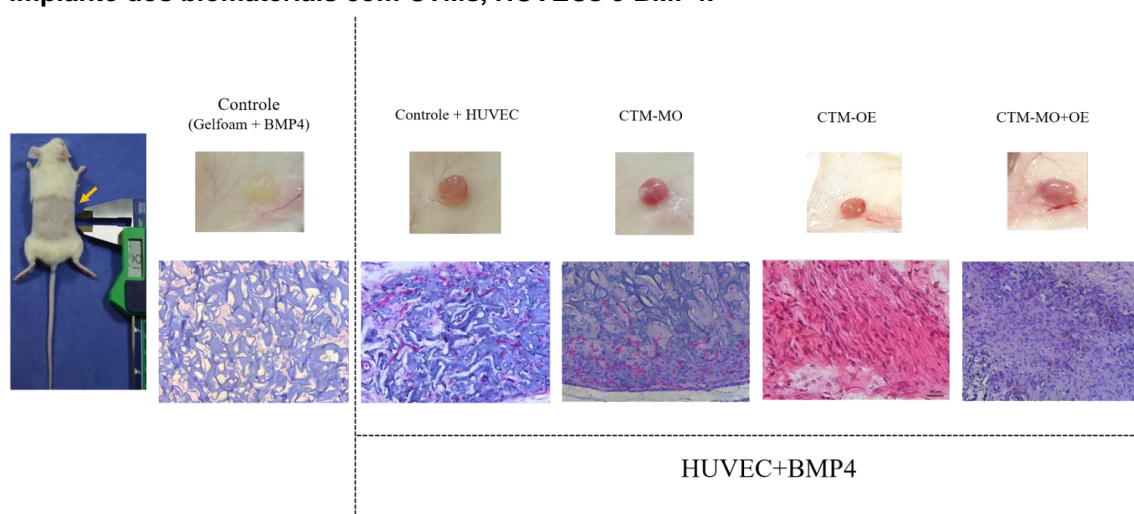
Uma vez que não foi observado formação de tecido ósseo e neovascularização nos tecidos neoformados *in vivo*, fizemos algumas modificações para os próximos experimentos baseados em outras evidências científicas da literatura (Passaro et al. 2017): A) optamos por utilizar as células endoteliais derivadas da veia do cordão umbilical (HUVECs) para melhorar a vascularização do tecido heterotópico formado; B) além dos biomateriais contendo as células, os animais também receberam no momento da implantação, 200 ng por organoide do indutor osteogênico BMP4 (do inglês *Bone Morphogenetic Protein*). Uma vez que esse trabalho tem como objetivo principal formar um ossículo heterotópico contendo um nicho hematopoiético, torna-

se necessário que o organoide implantado esteja em contato com um microambiente contendo fatores osteogênicos como a proteína óssea morfogenética (BMP).

Os biomateriais (*Gelfoam*®) com as células incorporadas (organoides) foram implantados subcutaneamente no dorso posterior de animais NSG e no momento do implante todos organoides receberam indutor osteogênico BMP4. Cada animal recebeu dois biomateriais com a mesma composição celular: Apenas biomaterial *Gelfoam*® (GF); GF + HUVEC; CTMs-MO + HUVEC; CTMs-OE + HUVEC; CTMs-OE + CTMs-MO + HUVEC.

Após este período, os animais foram eutanasiados e os organoides formados foram removidos. Foi observado que os organoides que receberam CTMs com HUVECs apresentaram uma vascularização mais evidente, e os que receberam CTMs apresentaram aspecto mais rígido quando comparado com os organoides controles (sem CTMs). Porém não houve formação de tecido ósseo, apenas formação de um tecido conjuntivo (Figura 20).

Figura 20 - Análise macroscópica e microscópica dos organoides coletados 60 dias após o implante dos biomateriais com CTMs, HUVECs e BMP4.



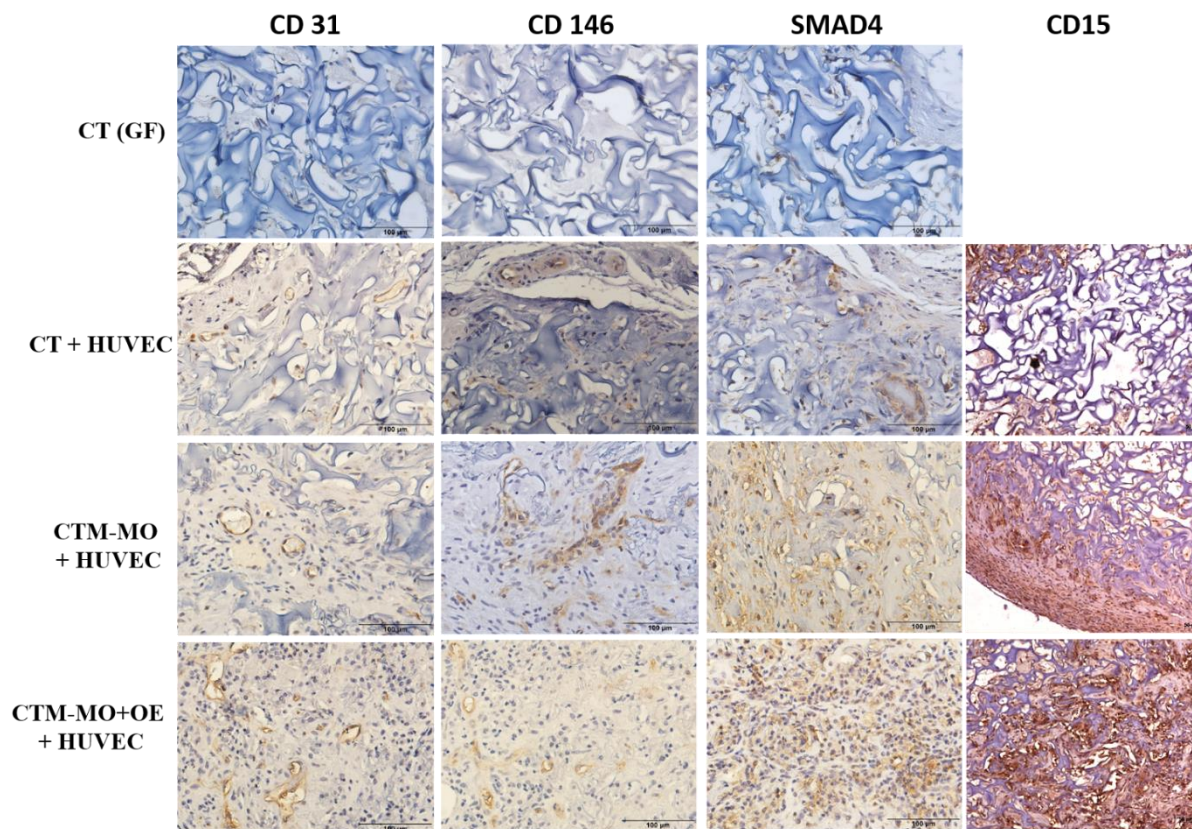
Os organoides implantados com HUVECs apresentaram coloração avermelhada compatível com um processo de vascularização. Análise histológica demonstrando formação de tecido vascularizado em todos organoides implantados com HUVECs e formação de tecido conjuntivo nos organoides que receberam CTMs. Coloração H&E. Aumento 10x.

Com relação à análise por imunohistoquímica dos organoides neoformados, nós observamos marcação positiva para o marcador endotelial CD31 (anti-humano), demonstrando que houve formação de vasos oriundos das HUVECs que foram implantadas junto com as CTMs nos animais. Também observamos a presença de

células CD 146 positivas, sugerindo presença de células estromais progenitoras (Figura 21). Acredita-se que o marcador CD146, também conhecido como MCAM (do inglês, *melanoma-associated cell adhesion Mmolecule*) está presente principalmente nas células estromais perivasculares, e que seu nível de expressão é alterado conforme condições de cultivo celular como por exemplo normóxia e hipóxia (DE SOUZA *et al.*, 2016). Estudos demonstraram que células progenitoras estromais CD146+ são capazes de gerar ossículo composto por estroma e recapitular o microambiente hematopoiético *in vivo*, ressaltando assim a importância deste marcador estromal (SACCHETTI *et al.*, 2007).

Apesar dessa evidência de células CD 146+, não foram identificadas regiões com ossificação. Porém, foi observado regiões com marcação positiva para o efetor do indutor osteogênico BMP, o SMAD-4, sendo este mais intenso nos organoides que receberam CTMs. SMAD-4 é uma proteína transdutora de sinal dos receptores onde se ligam membros da superfamília do *transforming growth factor beta* (TGF- β), na qual se encontra a *bone morphogenetic proteins* - BMP. Uma característica importante desta citocina, é sua habilidade em formar osso e cartilagem. Assim, a presença de SMAD4 nos organoides formados, pode sugerir que embora não houve formação de tecido ósseo, houve um “encaminhamento” para iniciar esse processo, uma vez que todos os organoides receberam BMP4 no dia do implante. Nós também observamos a presença do marcador de granulócitos maduros murino, CD15, de forma exacerbada nos tecidos neoformados a partir de CTMs-MO+OE, sugerindo que há uma migração destas células murinas para o microambiente heterotópico formado. Os animais que receberam os implantes contendo apenas as CTMs-OE, faleceram antes do término do experimento, não sendo, portanto, realizado a imunohistoquímica deste grupo (Figura 21).

Figura 21 - Análise microscópica por imunohistoquímica dos organoides coletados 60 dias após o implante dos biomateriais com CTMs, HUVECs e BMP4.



Todos tecidos formados pelos organoides implantados com HUVECs apresentaram marcação positiva para o marcador endotelial CD31 (nitidamente visualizado em coloração marrom ao redor dos vasos). Marcação positiva para o marcador progenitor estromal CD146 (corado em marrom) principalmente nos tecidos formados por organoides implantados com CTMs. Marcação positiva para SMAD4 (corado em marrom) principalmente nos tecidos formados por organoides implantados com CTMs, aparecendo em maior quantidade nos organoides que receberam ambas CTMs (MO+OE). E houve presença de granulócitos maduros murinos (CD15) principalmente nos organoides que receberam as CTMs. Aumento 100x.

5.2.7 Organoides gerados a partir de biomateriais à base de componentes inorgânicos do osso como hidroxiapatita (HA) e beta-tricálcio fosfato (HA+ β -TCP), contendo CTMs-MO/CTMs-OE e HUVEC apresentam formação óssea

Nos primeiros experimentos *in vivo*, embora houvesse a formação de um organoide compacto/rígido (após aproximadamente 60 dias de implante), nós não observamos formação óssea, o que pode ter prejudicado a formação de um nicho hematopoiético heterotópico. Assim, em outros experimentos descritos acima utilizamos um indutor osteogênico (BMP4) no momento do implante das células com o biomaterial (*Gelfoam*®) nos animais. Acredita-se que a rigidez observada seja pelo maior depósito de tecido conjuntivo por parte da CTMs. Análises de

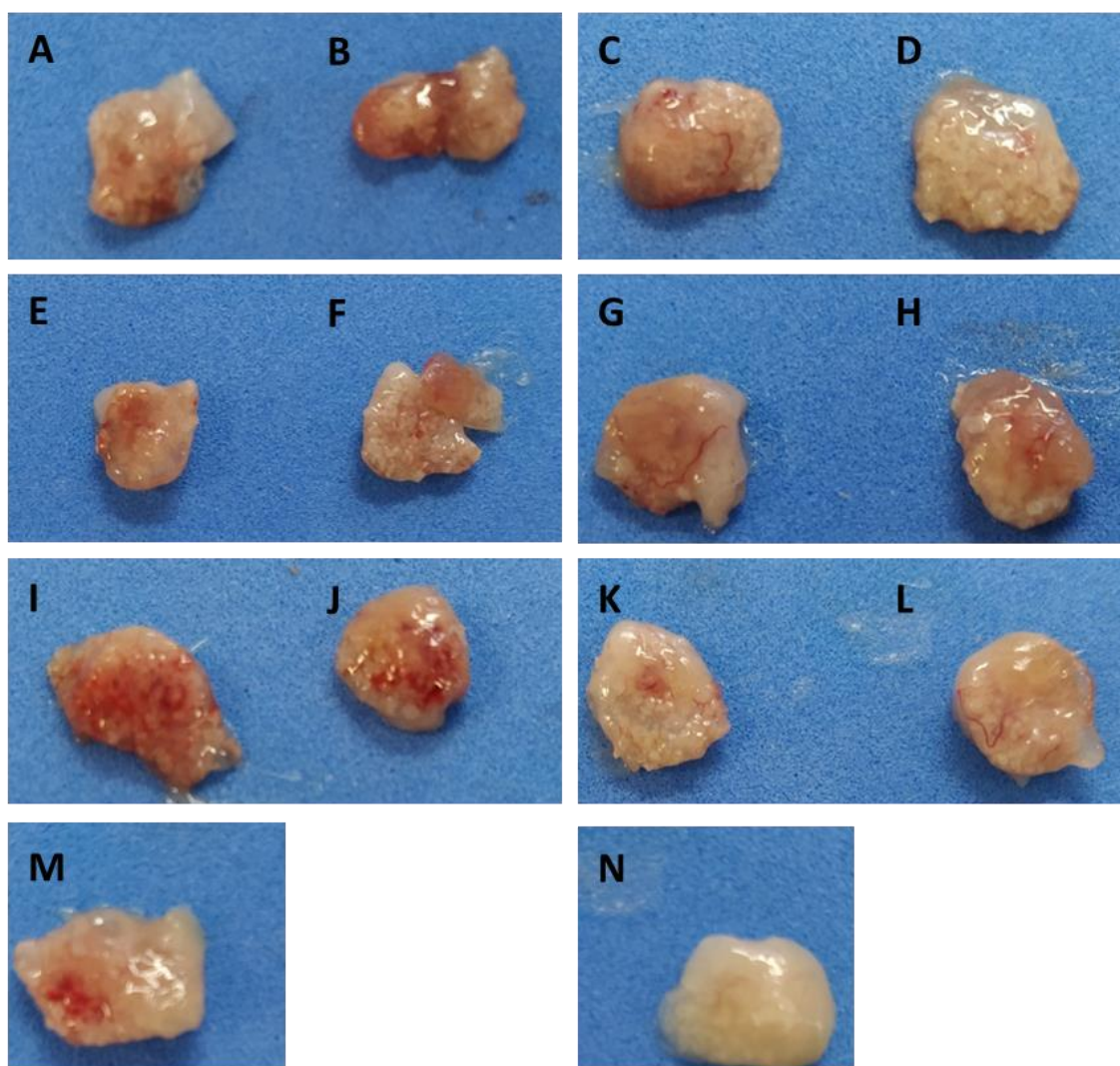
imunohistoquímica demonstraram regiões com marcação positiva para SMAD-4 (proteína efetora do indutor osteogênico BMP), sendo este mais intenso nos organoides que receberam CTMs, além da marcação positiva para CD146 (marcador progenitor estromal), para fosfatase alcalina e para o CD15 (marcador de granulócitos maduros). A neovascularização foi evidenciada pela presença do marcador endotelial CD31 humano. Embora tenhamos obtido resultados promissores com esses experimentos, não houve ainda nítida formação óssea.

Assim, resolvemos investir em um outro tipo de biomaterial osteocondutor produzido à base de componentes inorgânicos do osso como hidroxiapatita (HA) e beta tricálcio fosfato (β -TCP). É comum o uso de hidroxiapatita no desenvolvimento de materiais bioativos que simulem a composição do tecido ósseo devido a sua similaridade química e estrutural com a fase mineral dos ossos. Considera-se que a hidroxiapatita sintética seja capaz de induzir o crescimento do tecido ósseo onde se localiza devida a sua estrutura porosa a qual é semelhante ao osso poroso. Para tanto, realizamos uma busca sobre esses biomateriais e optamos por utilizar dois tipos diferentes de biomateriais, sendo um tipo de biomaterial apenas a base de HA (Straumann® Cerabone® – Enxerto ósseo bovino) e outro tipo de biomaterial formado por grânulos de HA+ β -TCP (Straumann® BoneCeramic – Grânulos de Fosfato de Cálcio).

Primeiramente, foi realizada duplicata biológica para cada condição experimental, sendo que em todas as condições houve presença de biomaterial à base de HA ou HA+ β -TCP: CT (controle apenas biomaterial); CT + HUVEC; CTMS-MO2 + HUVEC; CTMs-OE2 + HUVEC; CTMS-MO2 + CTMs-OE2 + HUVEC; CTMS-MO4 + HUVEC; CTMs-OE4 + HUVEC; CTMS-MO4 + CTMs-OE4 + HUVEC; CTMS-MO6/MO7 + HUVEC; CTMS-MO6/MO7 + CTMs-OE4 + HUVEC;

Após 70 dias, os animais foram eutanasiados e os organoides formados foram removidos e processados para análise histológica. Foi realizada uma análise macroscópica dos tecidos neoformados retirados dos animais. Com exceção do controle (CT apenas HA+ β -TCP), todos os tecidos neoformados apresentaram vascularização e aspectos rígidos com indícios de formação de tecido ósseo heterotópico (Figura 22).

Figura 22 - Análise macroscópica dos tecidos heterotópicos neoformados.



A) CT + HUVEC; B) CTMS-MO2 + HUVEC; C) CTMs-OE2 + HUVEC; D) CTMS-MO2 + CTMs-OE2 + HUVEC; E e G) CTMS-MO4 + HUVEC; F e H) CTMs-OE4 + HUVEC; I) CTMS-MO6 + HUVEC; J e L) CTMS-MO4 + CTMs-OE4 + HUVEC; K) CTMS-MO7 + HUVEC; M) CTMS-MO6 + CTMs-OE4 + HUVEC; N) CT (controle apenas β -TCP + HA). Nitidamente, houve vascularização em todos os organoides gerados *in vivo*, com exceção do organoide CT o qual não recebeu HUVECs.

Análises microscópicas demonstraram que, independentemente da condição experimental, houve indícios de formação óssea em todos os organoides coletados, sendo observado pela presença de regiões com coloração eosinofílica (avermelhada – setas pretas) com poucos núcleos celulares (contendo células semelhantes aos osteócitos). Em algumas regiões também houve formação de tecidos com presença de gordura (setas azuis) e células hematopoiéticas (setas vermelhas) recapitulando o arcabouço do nicho hematopoiético. No animal onde foi implantado apenas biomaterial HA+ β -TCP, não observamos formação de tecido ósseo e microambiente hematopoiético como observado nas outras condições. Embora o outro controle,

formado apenas por HUVECs + HA+ β -TCP (isento de CTMs), nós observamos branda presença de formação óssea (Figura 23). Esse fato pode ser justificado pela propriedade que as células endoteliais têm de formarem vasos. É sabido que a angiogênese é um dos primeiros eventos que ocorre para que se inicie o processo de formação óssea.

5.2.8 Linhagem celular leucêmica MOLM-13 migram e enxertam os organoides humanizados heterotópicos gerados a partir de biomateriais (HA+ β -TCP) contendo CTMs

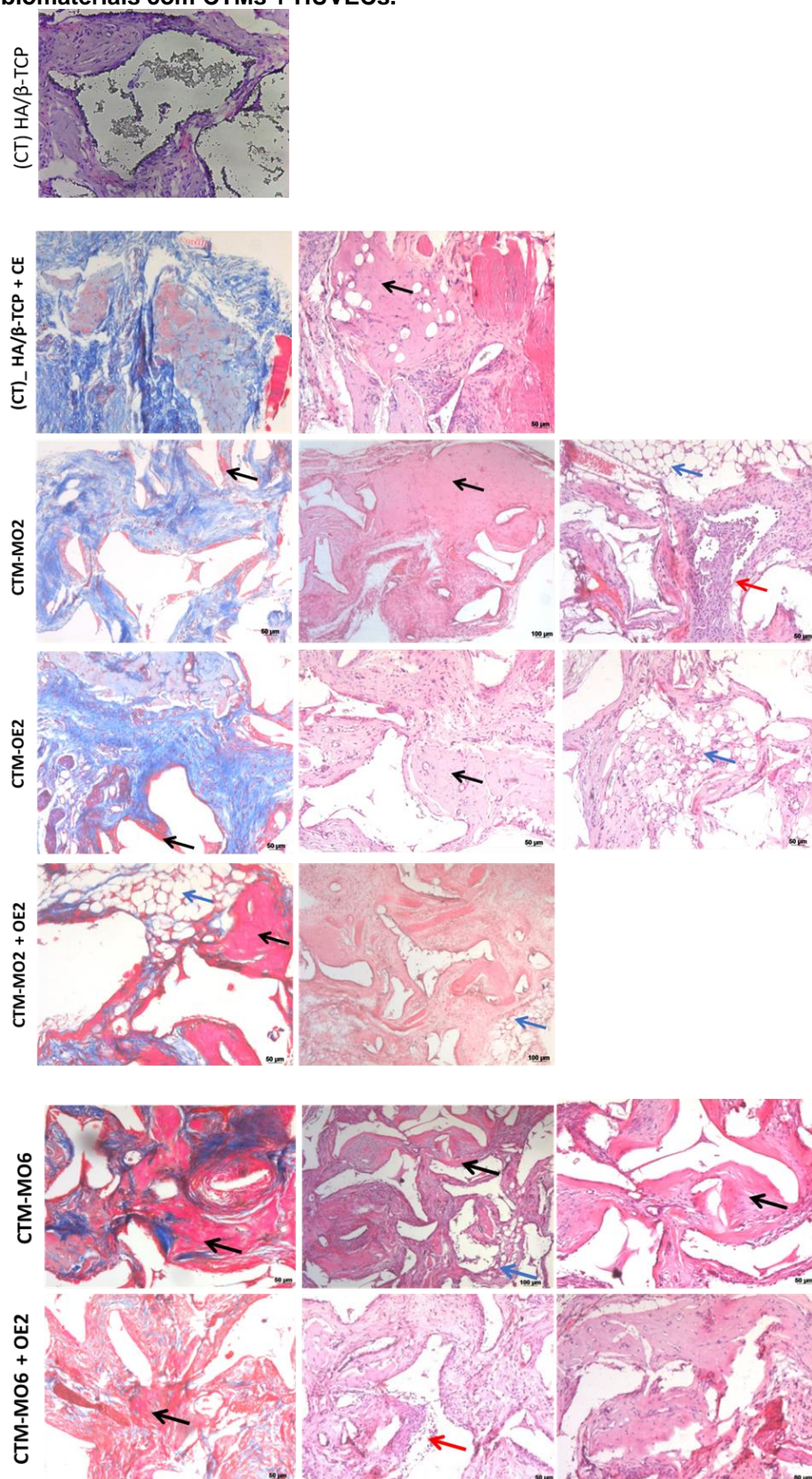
Uma vez que foi possível criar um microambiente humanizado, recapitulando algumas estruturas do nicho hematopoiético, nós tivemos interesse em injetar a linhagem celular MOLM-13, de Leucemia Mielóide Aguda, para compreender melhor a atuação/comportamento das CTHs malignas em um microambiente humanizado.

Este modelo murino humanizado de um microambiente semelhante ao nicho hematopoiético pode futuramente auxiliar nos estudos de xenotransplante, uma vez que a maioria dos estudos de interação das CTHs com o microambiente hematopoiético da MO derivam de estudos murinos em camundongos imunodeficientes. Embora represente um modelo válido, este tipo de estudo apresenta muitos desafios como por exemplo a diferença entre os receptores celulares murinos e humanos, os quais permitem o *homing* ou enxerto das CTHs humanas, ou até mesmo a influência mal compreendida nas interações e funções célula-célula.

5.2.9 Linhagem celular MOLM-13 expressa a proteína repórter bioluminescente luciferase 2

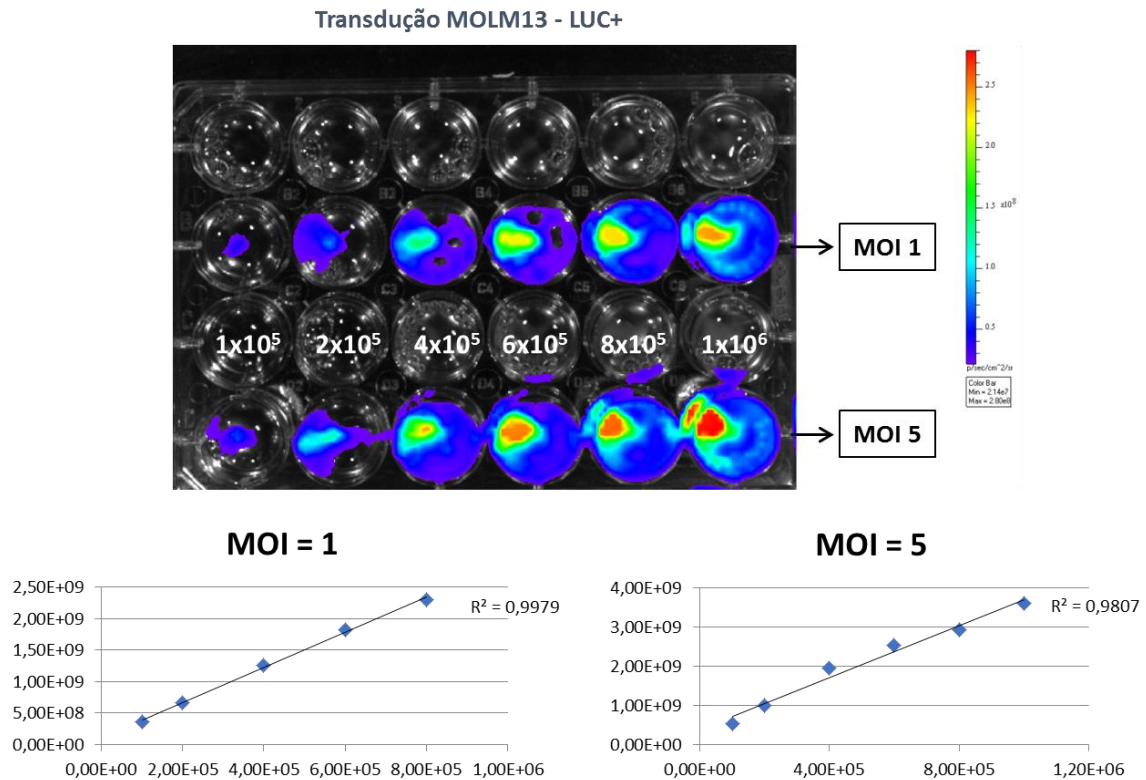
Para possibilitar a análise do domicílio e engraftment das células hematopoiéticas leucêmicas no microambiente heterotópico, as MOLM-13 foram transduzidas com o gene repórter Luciferase 2 com MOI 1 e 5. Essa proteína repórter bioluminescente contém sequência com códons otimizados para expressão em células de mamíferos. A eficiência de transdução celular foi confirmada por detecção da bioluminescência realizada com o equipamento IVIS. Uma região de interesse foi manualmente desenhada para abranger o sinal bioluminescente, cuja intensidade é reportada como fluxo de fótons, expresso em fótons/s (Figura 24).

Figura 23 - Análise histológica dos organoides coletados 70 dias após o implante dos biomateriais com CTMs + HUVECs.



Análise histológica demonstrando formação de tecido vascularizado em todos organoides. Houve nítida formação de tecido ósseo em todas as condições experimentais (presença de tecido ósseo demonstrado pelas setas pretas), em algumas condições houve presença de células hematopoiéticas (setas vermelhas) e formação de tecido adiposo (setas azuis). Coloração H&E. Aumento 10x.

Figura 24 - Bioluminescência *in vitro* das MOLM-13 modificadas para expressar luciferase.



Após a transdução com o vetor lentiviral contendo o gene da luciferase 2, a linhagem celular MOLM-13 passou a emitir sinal bioluminescente. Além disso, a intensidade de bioluminescência (medida em fótons por segundo) foi diretamente proporcional ao número de células nos poços de cultura.

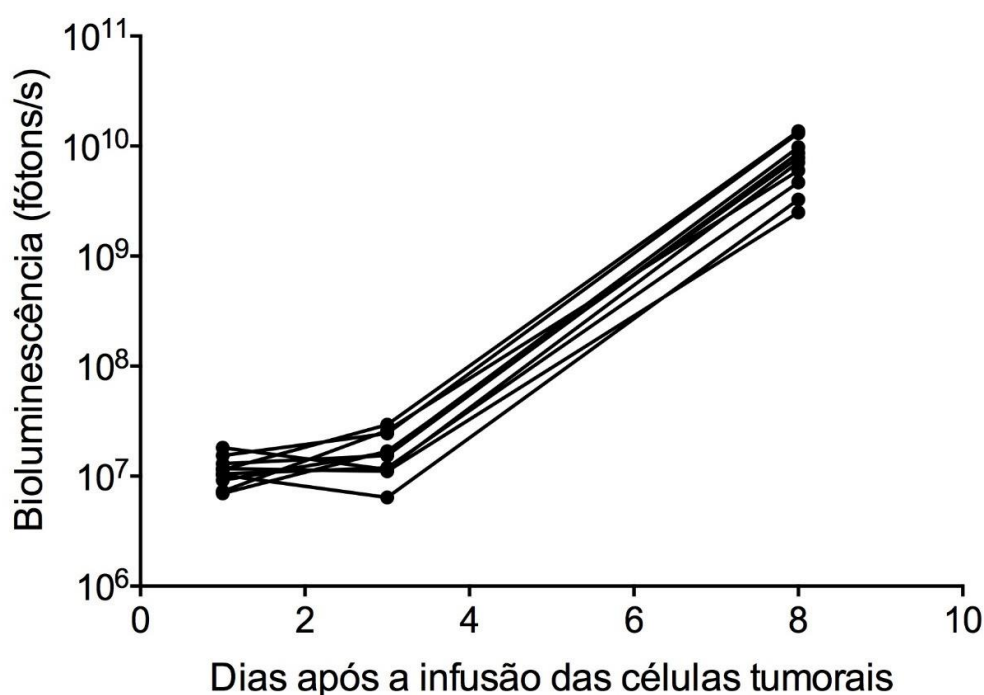
5.2.10 MOLM-13 Luc+ migram para os microambientes heterotópicos neoformados

As MOLM13 expressandoluciferase (MOLM13 Luc+) foram infundidas via endovenosa pela veia caudal dos animais NSG previamente induzidos à formação dos microambientes heterotópicos (70 dias pós formação dos organoides *in vivo*). O protocolo de indução da formação dos microambientes heterotópicos foi semelhante ao citado anteriormente em tópico 2.5. Porém neste experimento foi utilizado um tipo de biomaterial diferente (apenas HA ou HA+ β -TCP) para cada variável experimental. A bioluminescência foi analisada 24 horas, 72 horas e 8 dias após o transplante das MOLM13 Luc+ visando observar o domicílio e migração destas células nos tecidos neoformados. A análise dessa eficiência foi confirmada por meio da detecção da bioluminescência realizada com o IVIS Lumina System.

As análises por PIBB *in vivo* demonstraram que as células leucêmicas migraram para vários órgãos dos animais, inclusive para a região dos organoides, e permaneceram nesses tecidos durante todas as análises. Foi observado que a

intensidade de bioluminescência aumentou no decorrer dos dias, sugerindo assim que a progressão tumoral foi semelhante em todos os animais (Figura 25). Após 10 dias de infusão das MOLM13 Luc+ os animais começaram a perder peso e apresentaram algumas disfunções decorrentes da leucemia como dificuldade de movimentação. Após 12 dias da infusão das células leucêmicas o experimento foi encerrado e os animais foram eutanasiados.

Figura 25 - Análise *in vivo* por PIBB da progressão tumoral.

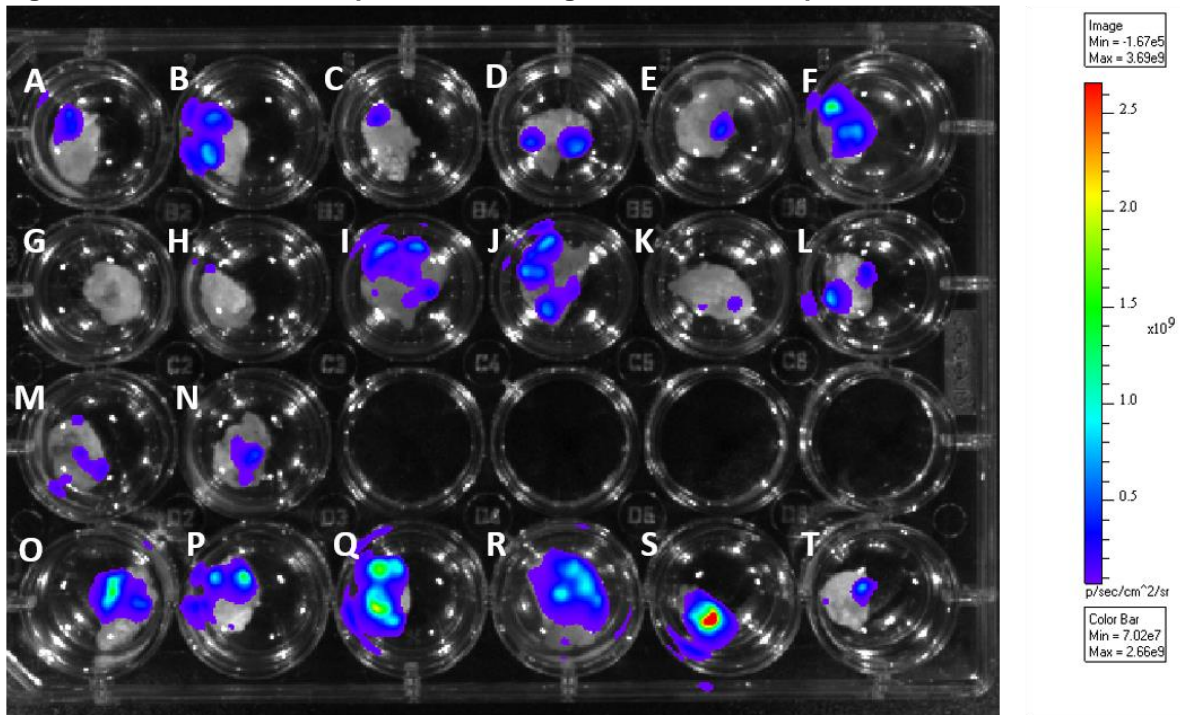


A progressão tumoral foi semelhante em todos os animais no decorrer de 8 dias pós infusão das MOLM-13 Luc+. A intensidade de bioluminescência medida em fótons/s foi semelhante nos 10 animais NSG que receberam infusão das células leucêmicas.

Os tecidos neoformados foram coletados e submetidos a análise *ex vivo* por processamento de imagem (IVIS) para investigar a presença das MOLM-13 Luc+ nesses microambientes heterotópicos (engraftment). Em seguida, foram fixados para processamento histológico. Independente do biomaterial utilizado, apenas HA ou HA+ β -TCP, quando comparado com organoides controles (sem CTMs), foi demonstrado que a intensidade de bioluminescência foi maior nos organoides que continham as CTMs oriundas da MO ou de ambos compartimentos (MO + OE), inferindo que há uma predileção das MOLM-13 Luc+ aos tecidos heterotópicos formados a partir de CTMs derivadas da MO. Quando comparamos os organoides formados pelas CTMs oriundas da MO e do OE separadamente, notamos aumento na intensidade de

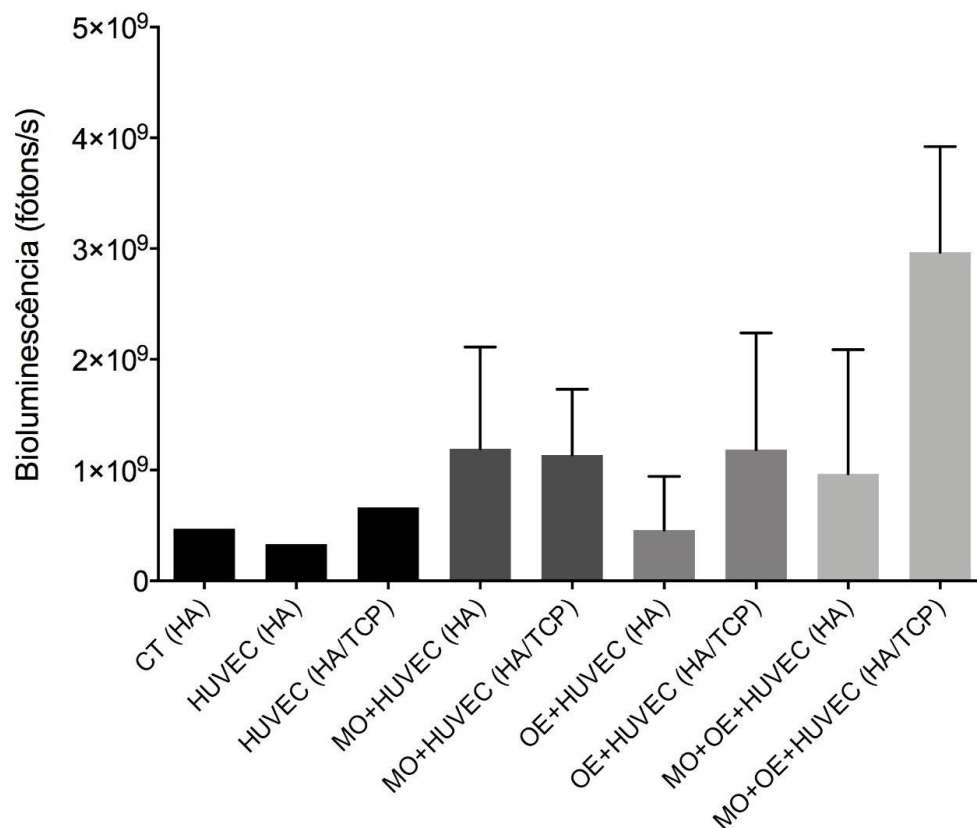
bioluminescência nos microambientes que receberam apenas CTMs com origem da MO (Figura 27 e 28). Quando analisamos as variáveis por tipo de biomaterial, ficou nítido que as MOLM-13 enxertaram principalmente os organoides formados nos biomateriais com HA+ β -TCP. Esses resultados sugerem que as células hematopoiéticas leucêmicas migraram para todos os organoides *in vivo*, porém a maior parte delas permaneceram enxertadas (fizeram domicílio) nos ossículos neoformados a partir de ambas CTMs (MO + OE), devido esse microambiente ter formado um nicho hematopoiético heterotópico mais completo, como demonstrado a seguir pela análise histológica. Além disso, observamos que a intensidade de bioluminescência foi maior nos organoides implantados com o biomaterial HA+ β -TCP do que nos que receberam apenas HA (Figura 27).

Figura 26 - Análise *ex vivo* por PIBB dos organoides 12 dias após infusão de MOLM-13 Luc+.



Organoides gerados a partir de HA+ β -TCP : A) CT (controle) + HUVEC; B) CTMS-MO2 + HUVEC; E) CTMS-OE2 + HUVEC; F) CTMS-MO2 + CTMS-OE2 + HUVEC; I) CTMS-MO4 + HUVEC; J) CTMS-OE4 + HUVEC; R) CTMS-MO4 + CTMS-OE4 + HUVEC; M) CTMS-MO6 + HUVEC; N) CTMS-MO7 + HUVEC; S) CTMS-MO6 + CTMS-OE4 + HUVEC; Organoides gerados a partir de HA : C) CT (controle) + HUVEC; D) CTMS-MO2 + HUVEC; G) CTMS-OE2 + HUVEC; H) CTMS-MO2 + CTMS-OE2 + HUVEC; K) CTMS-MO4 + HUVEC; L) CTMS-OE4 + HUVEC; P) CTMS-MO4 + CTMS-OE4 + HUVEC; O) CTMS-MO6 + HUVEC; Q) CTMS-MO7 + HUVEC; T) CT apenas HA.

Figura 27 - Quantificação da intensidade de bioluminescência *ex vivo* por PIBB dos organoides 12 dias após infusão de MOLM-13 Luc+.



A intensidade de bioluminescência foi maior nos organoides que foram implantados com CTMs oriundas da MO ou com ambas CTMs juntas (MO + OE) e com o biomaterial HA+ β -TCP (one-way ANOVA).

5.2.11 MOLM13 *Luc+* enxertam organoides humanizados derivados de CTMs humanas

Após 12 dias da infusão da MOLM13 *Luc+*, os animais foram eutanasiados e os organoides formados foram removidos, processados e analisados. Primeiramente, foi realizada uma análise macroscópica dos tecidos neoformados retirados dos animais. Com exceção dos controles, todos os tecidos neoformados apresentaram vascularização e aspectos rígidos com indícios de formação de tecido ósseo heterotópico.

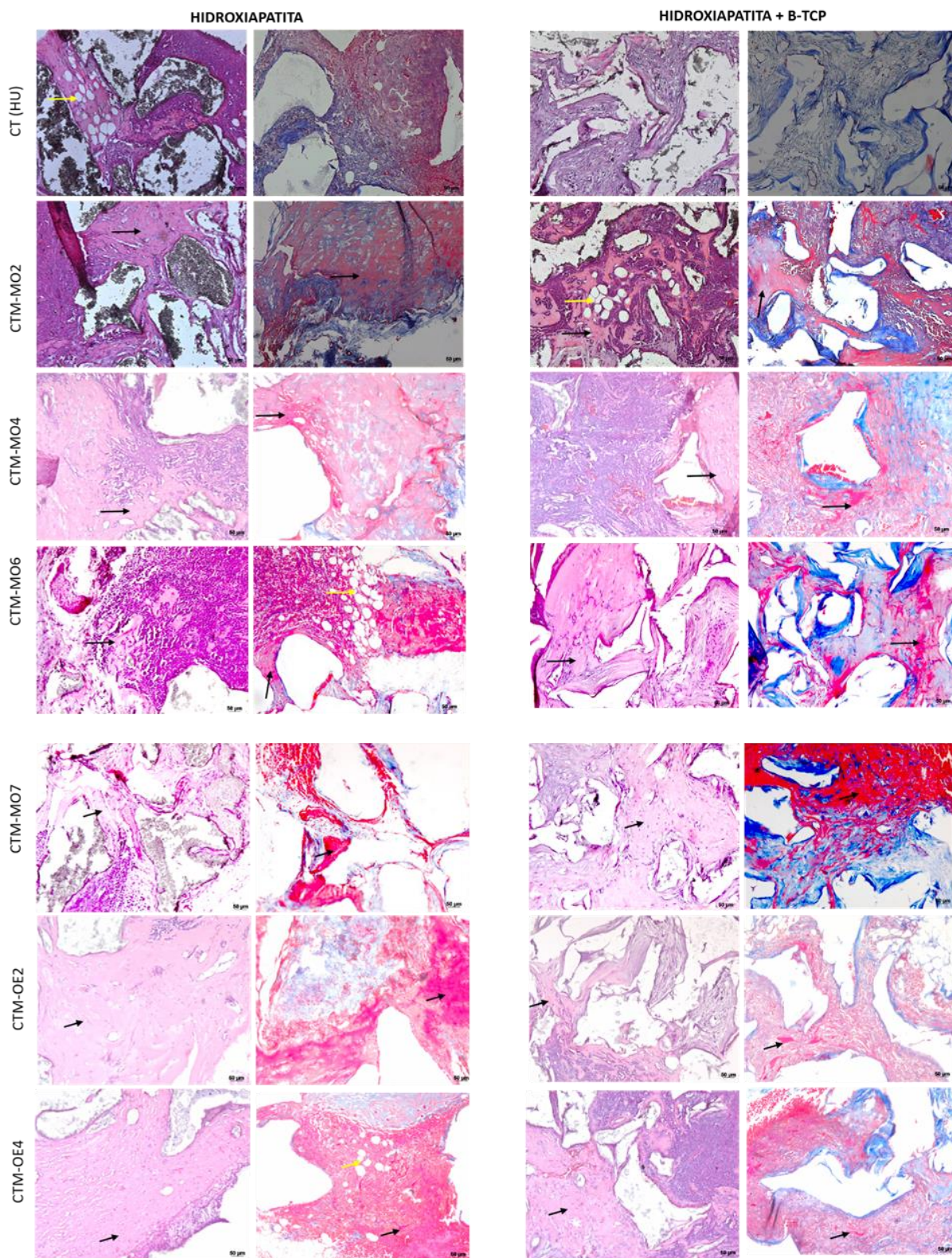
Quanto à análise morfológica, foi observado que, independentemente do biomaterial utilizado, houve formação de tecido ósseo (setas pretas), tecido conjuntivo (em coloração azul pelo TM- cora fibras de colágeno), tecido adiposo (setas amarelas), formação de vasos sanguíneos em todos os tecidos heterotópicos formados e presença de células hematopoiéticas enxertadas (podendo ser tanto

oriundas dos camundongos como as leucêmicas injetadas - MOLM-13), sendo esses achados mais evidentes do tecidos com presença de CTMs oriundas da MO. Interessantemente, nos controles (sem adição de CTMs), tanto com apenas HA quanto com biomateriais e HUVECs, observamos pequena formação de tecido ósseo, porém maior concentração de tecido conjuntivo, e pouca presença de células hematopoiéticas enxertadas, sugerindo que as MOLM13 infundidas têm melhor “tropismo” e enxertia nos microambientes onde havia presença de CTMs. Aparentemente, houve maior enxertia nos tecidos neoformados a partir de implantes com o biomaterial β -TCP + HA quando comparado com os que receberam apenas HA (Figura 28, partes 1 e 2). Esse fato, pode ser devido as CTMs expressarem abundância do ligante CXCL12 (como já demonstrado na literatura e em nosso estudo) e as células hematopoiéticas (como MOLM13) expressarem o receptor CXCR4.

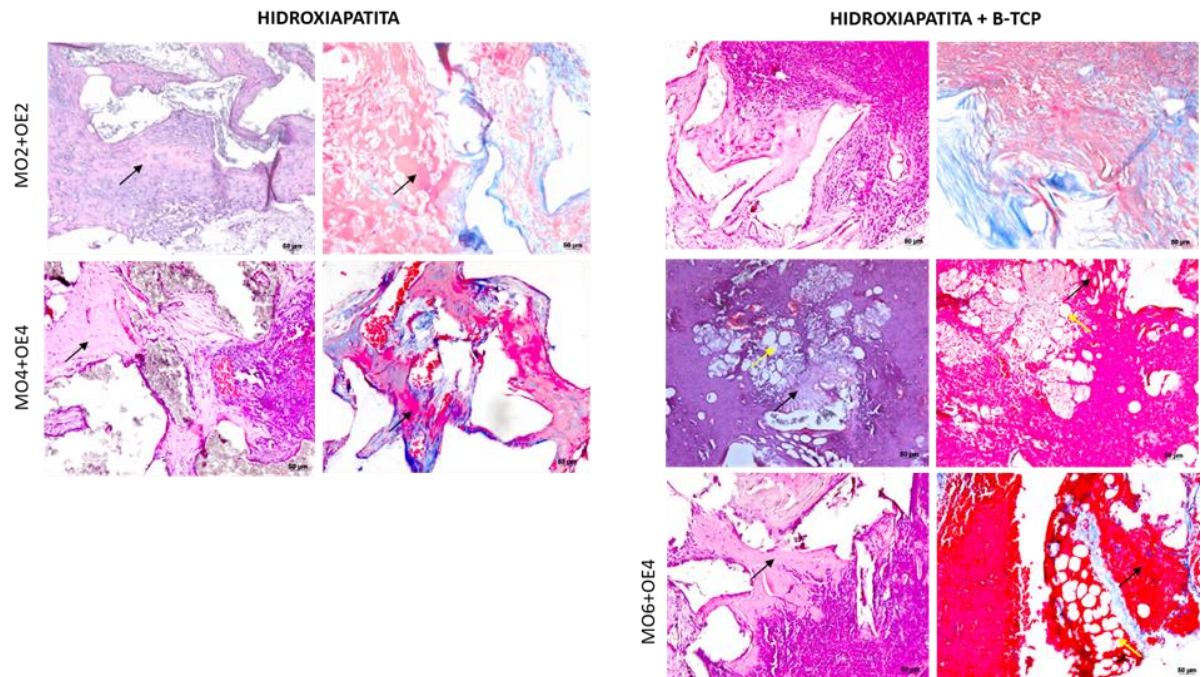
Uma vez que detectamos a presença de células hematopoiéticas nos organoides humanizados gerados, nós decidimos investigar se essas células enxertadas são as células hematopoiéticas malignas humanas transplantadas intravenosamente. Os modelos de xenotransplante representam ferramentas poderosas para a investigação da hematopoiese humana saudável e maligna. No entanto, os modelos atuais não imitam totalmente os componentes do microambiente da MO humana e permitem apenas o enxerto limitado de amostras de algumas doenças malignas humanas.

Em nosso estudo, observamos o domicílio das células malignas de LMA transplantadas (MOLM-13) e o robusto engraftment destas células nos organoides humanizados neoformados. Este resultado foi constatado pela presença *in situ* de células CD45 humanas nos organoides formados e coletados. Análises após marcação por imunohistoquímica, demonstraram que embora também houve presença destas células nos organoides controles (gerados sem presença de CTMs), nós nitidamente detectamos maior presença desta população celular nos microambientes gerados a partir de CTMs oriundas principalmente da MO (Figura 29). Esta abordagem de xenotransplante de ossículo humanizado fornece um sistema para modelar uma ampla variedade de doenças hematológicas humanas. Infelizmente, devido às manifestações da LMA nos animais, este experimento foi encerrado em curto prazo (12 dias), portanto, seria necessário novos experimentos para análises à longo prazo da enxertia destas células nestes ossículos heterotópicos.

Figura 28 - Organoides humanizados formados 8-10 semanas após transplante de MOLM-13 Luc+ em NSG.

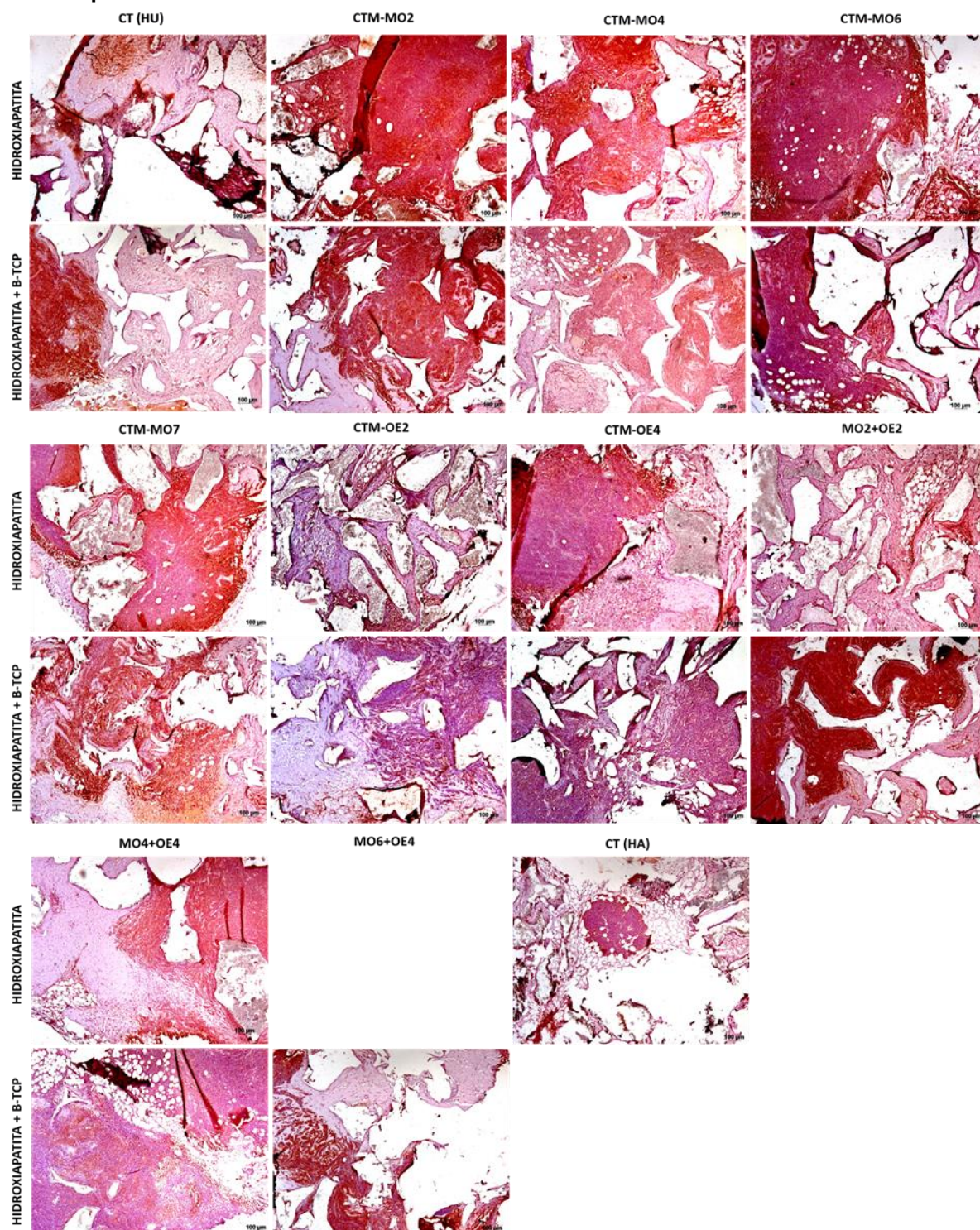


Parte 1.



Parte 2 - Colunas à esquerda são organoides heterotópicos formados que receberam organoides com biomaterial formado apenas por grânulos de HA. Colunas à direita são microambientes heterotópicos formados que receberam organoides com biomaterial formado por grânulos de HA+ β TCP . A análise histológica foi demonstrada por meio de coloração H&E (primeira coluna) e TM (segunda coluna). Setas pretas = tecido ósseo (corado em rosa em H&E e em vermelho -TM); Setas amarelas = tecido adiposo (vacúolos de gordura); coloração azul = tecido conjuntivo (fibras de colágeno).

Figura 29 - Células hematopoiéticas malignas - MOLM-13 Luc+ enxertam ossículos heterotópicos derivados de CTMs humanas.



Imunohistoquímica para o marcador hematopoiético humano CD45 demonstrado na coloração amarronzada, demonstrando presença de células hematopoiéticas malignas humanas (MOLM-13-LMA) mais abundantemente nos ossículos gerados à partir de CTMs oriundas da MO, independente do biomaterial utilizado na geração do organoide.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho foi dividido em três etapas principais: I) Isolamento e caracterização das CTMs isoladas de dois compartimentos distintos da MO humana (CTMs-MO e CTMs-OE); II) Confecção e Geração de organoides / ossículos humanizados heterotópicos (abrangendo aqui a escolha do biomaterial ideal para essa formação adequada); III) Investigação do domiciliamento e enxertia de CTHs malignas (MOLM-13) infundidas em animais NSG pós geração de hOss.

O isolamento das CTMs por punção da MO já está bem padronizado há anos, sendo que este tipo celular derivado da MO é considerado *gold standard* quando se trata de abordagens no campo da terapia celular. No entanto, o uso de células derivadas da MO nem sempre é aceitável, devido à sua alta probabilidade de exposição a agentes infecciosos (como os vírus) e diminuição significativa no número de células e capacidade de proliferação / diferenciação conforme a idade. Além disso, a obtenção de uma amostra de CTMs-MO é uma tarefa dolorosa, pois o procedimento da coleta é extremamente invasivo (STENDERUP *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2016).

Acredita-se que há duas populações distintas de CTMs presentes no nicho hematopoiético, uma localizada no endóstio e outra que ocuparia o nicho perivascular da MO (BIANCO, 2011; WORTHLEY *et al.*, 2015). Nós isolamos e caracterizamos CTMs derivadas de fragmentos ósseos próximos à porção endosteal derivados do osso esponjoso metafisário da tíbia humana (CTMs-OE). Sabe-se que essa região (osso esponjoso - trabecular) é rica em MO vermelha. Assim, nosso trabalho foi pioneiro em criar um protocolo de isolamento de CTMs humana oriunda da MO (CTMs- MO), diferente dos protocolos invasivos baseados em punção medular. As CTMs-MO utilizadas em nosso trabalho foram adquiridas a partir do “lavado” dos fragmentos ósseos metafisários.

Ambos os tipos celulares isolados neste trabalho (CTMs-MO e CTMs-OE) apresentaram características típicas de CTMs e semelhantes entre elas como morfologia fibroblástóide, aderência ao plástico e painel imunofenotípico condizente com mesenquimais. Porém com relação aos critérios de diferenciação em três linhagens mesodermiais como adipócitos, osteócitos e condrócitos, as CTMs-MO se diferenciaram menos em osteócitos e mais em adipócitos, enquanto embora as CTMs-OE apresentaram nítida diferenciação em todos os três tipos de tecidos mesodermiais, esse tipo celular apresentou diferenciação exacerbada em osteócitos. Quando

comparamos ambas CTMs com as CTMs-MO isoladas por punção da crista ilíaca observamos resultados semelhantes, ou seja, as CTMs-MO isoladas do lavado apresentaram plasticidade de diferenciação semelhante às isoladas da punção medular. Entretanto com relação aos outros critérios, morfologia e imunofenotipagem, todas as CTMs apresentaram resultados semelhantes. O mesmo ocorreu com relação à expressão de genes e proteínas relacionados à manutenção e sustentação do nicho hematopoiético, ambas populações de CTMs apresentaram abundância na maioria destes genes e proteínas.

No estudo de Yusop e colaboradores (2018), foi demonstrado semelhanças na taxa proliferativa e painel imunofenotípico quando comparou duas populações diferentes, CTMs-MO e CTMs-OC (osso compacto), porém a multipotencialidade entre elas foi contrastante. CTMs-OC em passagens mais baixas, tinham uma forte potência em diferenciação osteogênica e baixa potência para adipogênese, enquanto as CTMs-MO apresentaram maior potencialidade tanto para osteogênese quanto adipogênese (YUSOP *et al.*, 2018).

Um outro grupo isolou CTMs de fragmentos de osso trabecular (CTMs-OT) da cabeça do fêmur, adquiridos de pacientes submetidos à cirurgia de reparação do quadril, e comparou com CTMs isoladas da MO pelo método tradicional de aspiração da crista ilíaca dos mesmos pacientes. Foi demonstrado que as CTMs-OT atendem aos critérios de diferenciação em linhagens mesodermais (adipogênica, osteogênica e condrogênica) e perfil imunofenotípico usados para definir as CTMs. Também foi comparado os rendimentos celulares, a cinética de crescimento, a avaliação do ciclo celular e CFU-F de ambas as fontes e foi concluído que esses parâmetros não diferem significativamente. Houve apenas pequenas diferenças entre essas populações, como maior expressão do marcador CD90, menor tempo de expansão pelas diferentes passagens e maior porcentagem de células cíclicas nas CTMs-OT, o que justifica mais estudos com o método de isolamento proposto pelos autores a fim de obter mais conhecimento sobre o status das CTMs neste microambiente (SANCHEZ-GUIJO *et al.*, 2009).

Outros trabalhos já isolaram e compararam CTMs localizadas anatomicamente em compartimentos distintos do nicho hematopoiético na MO, como CTMs derivadas da porção endosteal de osso compacto. Porém, a maioria desses trabalhos demonstraram esse isolamento e caracterização a partir de modelos de camundongos e ratos (CAI *et al.*, 2015; GUO *et al.*, 2006; ROSSETTI *et al.*, 2021; SUNG *et al.*, 2008).

Zhu e colaboradores demonstraram que CTMs obtidas a partir do plaqueamento das células isoladas do osso compacto ou do plaqueamento de fragmentos ósseos com ou sem a digestão enzimática apresentam características típicas de CTMs-MO. Assim, o osso compacto é apontado como fonte promissora para obtenção de CTMs, uma vez que proporcionou menor contaminação por células hematopoiéticas e maior rendimento celular em comparação com a MO (ZHU *et al.*, 2010).

Uma vez que o ambiente natural *in vivo* das CTMs frequentemente exibe concentrações de oxigênio consideravelmente baixas (menor que 21% de O₂ - hipóxia) (CHOW *et al.*, 2001; LAVRENTIEVA *et al.*, 2010; SNOW *et al.*, 2002), no passado o efeito das condições de oxigênio reduzido nas CTMs foi extensivamente investigado, surgindo várias vantagens no cultivo hipóxico em relação ao seu uso terapêutico (BURAVKOVA *et al.*, 2014). Na verdade, as CTMs apresentam aumento na proliferação (GRAYSON *et al.*, 2007; IIDA *et al.*, 2010; LAVRENTIEVA *et al.*, 2010), redução de senescência (TSAI *et al.*, 2011) e estabilidade genética prolongada (ESTRADA *et al.*, 2012), quando expostas à hipóxia além de manter suas propriedades imunossupressoras (NOLD *et al.*, 2015).

Assim, nós optamos por cultivar e expandir as CTMs *in vitro* em hipóxia, desde seu isolamento até seu cultivo 3D antes de implantá-las nos animais. Egger e colaboradores demonstraram que CTMs (derivadas do tecido adiposo) em cultivo 3D em biorreatores, sob condições de hipóxia, exibiram uma viabilidade de 78-86% e mantiveram seu perfil de marcador de superfície e potencial de diferenciação após o cultivo. Esse tipo de cultivo 3D é valioso para a produção em grande escala de CTMs ou seus componentes secretados após a otimização adicional dos parâmetros de cultivo sob hipóxia (EGGER *et al.*, 2017).

Recentemente, nosso grupo isolou e comparou duas populações distintas de CTMs murinas, derivadas da MO e do osso compacto. Ambas foram cultivadas e expandidas sob condições de hipóxia. Foi demonstrado que sob hipóxia, o osso compacto é mais rico em números absolutos de CTMs e o isolamento de CTMs-OC está associado a um risco reduzido de contaminação com células hematopoiéticas. Além disso, assim como observado em nosso estudo com as CTMs humanas, as CTMs-OC têm maior capacidade osteogênica *in vitro* do que CTMs-MO, enquanto o potencial de diferenciação adipogênica é semelhante (ROSSETTI *et al.*, 2021).

Esses achados reforçam a hipótese da existência de populações de CTMs funcionalmente distintas na MO e destacam tanto o OC murino quanto o OE humano como fontes eficientes de CTMs em concentrações fisiológicas de oxigênio.

Uma vez que as CTMs utilizadas neste trabalho foram devidamente caracterizadas, nós iniciamos uma busca pelo biomaterial adequado para cultivo 3D das CTMs capacitando-as à formação de um ossículo / organoide humanizado in vivo. Inicialmente nos baseamos no trabalho de Passaro e colaboradores (2017) no qual descreveram como a co-implantação de CTMs-MO cultivadas com células endoteliais em *Gelfoam*[®] (um biomaterial de esponja de colágeno) e na presença da citocina osteocondutora BMP2 humana, geram in vivo um microambiente humanizado composto por tecido ósseo e nicho hematopoiético (PASSARO *et al.*, 2017).

Assim como neste trabalho, nós também optamos por cultivar junto com as CTMs, outro componente celular da MO importante para gerar e manter o nicho hematopoiético, a célula endotelial. E como comprovado aqui, quando as CE não foram adicionadas em nossa cultura 3D previamente ao implante in vivo, não houve formação de ossículos / organoides vascularizados. Outros estudos que se propuseram estabelecer um modelo in vivo de geração nicho hematopoiético heterotópico humanizado, também utilizaram em seus “constructos” células endoteliais a fim de gerar um ossículo vascularizado mais completo (BATTULA *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2012).

Além de nossos constructos conterem CTMs e CE, durante o estabelecimento da formação do ossículo humanizado, nós também utilizamos uma citocina importante no processo de formação óssea no momento do implante nos animais, BMP4 humana. Diferentemente dos resultados de Passaro *et al.* (2017), onde foi demonstrado formação de nicho hematopoiético heterotópico humanizado através de imagens in situ, utilizando o mesmo biomaterial (*Gelfoam*[®]), nós não observamos formação de tecido ósseo e nem de nicho hematopoiético em nossos experimentos com o *Gelfoam*[®]. Nós apenas observamos nos organoides gerados nestes experimentos, formação de um tecido conjuntivo mais denso e formação de vasos sanguíneos provavelmente derivados das CE humanas implantadas, como demonstrado em análises histológicas e por imunohistoquímica do marcador endotelial CD31 humano (PASSARO *et al.*, 2017).

Uma vez que não observamos formação óssea nos organoides gerados a partir do biomaterial *Gelfoam*[®], decidimos buscar outros biomateriais osteocondutores e

biomiméticos para a formação do tecido de interesse. Como nosso principal objetivo é a formação de um ossículo heterotópico contendo nicho hematopoiético, nós optamos por investigar biomateriais comumente já utilizados para enxerto ósseo em fraturas ósseas. Atualmente, há diferentes estratégias para curar defeitos ósseos utilizando substitutos de enxerto ósseo sintético, substâncias biologicamente ativas e as próprias células-tronco. A maioria dos estudos disponíveis atualmente se concentra em estratégias que ainda estão nos estágios iniciais de desenvolvimento e usam principalmente experimentos *in vitro* com linhagens celulares ou células-tronco (HO-SHUI-LING *et al.*, 2018).

As abordagens de tratamento para defeitos ósseos podem ser classificadas em três principais categorias: i) substitutos apenas com biomateriais sozinho para o enxerto ósseo; ii) biomateriais combinados com moléculas bioativas, como fatores de crescimento, peptídeos ou pequenas moléculas direcionadas às células precursoras do osso; iii) estratégias baseadas em células com células progenitoras combinadas ou não com moléculas ativas que podem ser injetadas ou semeadas em biomateriais para melhora do implante (HO-SHUI-LING *et al.*, 2018).

Em nosso trabalho utilizamos a terceira estratégia, porém agora com a escolha de outro tipo de biomaterial - os compostos com Hidroxiapatita de Cálcio (HA) e fosfato tricálcico (β -TCP), por embasamento da literatura e de pesquisadores colaboradores de nossa instituição os quais têm utilizado esses tipos de biomateriais em vários trabalhos de pesquisa com resultados relevantes em reparo ósseo. Materiais de fosfato de cálcio, como hidroxiapatita (HA), são usados em ortopedia, odontologia e maxilo-facial cirurgia como um substituto ósseo, porque eles se ligam quimicamente diretamente no osso após a implantação (ROSA, Adalberto L.; BELOTI; VAN NOORT, 2003).

A otimização da arquitetura de biomateriais visa replicar, ou mimetizar, a estrutura óssea para fornecer um ambiente semelhante ao natural em um ambiente *in vivo* para as células ósseas colonizarem e regenerarem o tecido ósseo saudável (FERNANDEZ-YAGUE *et al.*, 2015). Um dos desafios com relação a esses biomateriais é o controle do processo de degradação deles. De fato, o biomaterial deve servir primeiro como *scaffold* temporário e deve ser gradualmente substituído por um novo osso, a fim de restaurar a forma e função até que o osso recém-crescido seja mecanicamente competente (HO-SHUI-LING *et al.*, 2018).

A degradação do material pode melhorar a regeneração óssea, proporcionando maior espaço para o crescimento do osso. Assim, torna-se importante a seleção de um biomaterial com capacidade de reabsorção mais controlada para otimizar o processo de formação óssea. Alguns tipos de biomateriais proporcionam melhor essa característica, como por exemplo o β -TCP que é mais reabsorvível do que a HA (YANG *et al.*, 2017).

Assim, é relevante delinear a escolha ideal do tipo de biomaterial bem como do tipo celular adequado para a geração fidedigna no microambiente medular. Em um estudo não muito recente, Sacchetti e colaboradores mostraram que células estromais CD146+ quando implantadas juntamente com partículas de HA+ β TCP e gel de fibrina geraram um microambiente hematopoiético *in vivo* comprovados pela participação destes progenitores estromais humanos juntamente com o processo de angiogênese murino (SACCHETTI *et al.*, 2007).

Em nosso estudo, nós utilizamos biomateriais composto por apenas HA e composto por HA + β -TCP. Foi observado que, independentemente do biomaterial utilizado, houve formação de tecido ósseo, e em alguns organoides foi observado formação de tecido semelhante ao nicho hematopoiético com presença de células adiposas e células hematopoiéticas. Embora, não utilizamos técnicas que medem essa formação de ossículo heterotópico humanizado, aparentemente esse aspecto foi mais visível nos organoides gerados a partir de CTMs-MO (lavado e/ou punção) + CTMs-OE, sugerindo que pode haver um efeito catalisador da formação do nicho quando há a presença de ambas CTMs de compartimentos diferentes. Além disso, pode haver diferenças na habilidade das CTMs formarem hOss robustos devido à variabilidade dos doadores, assim como observamos essa diferença quanto ao processo de diferenciação destas células *in vitro*. Portanto, para esses experimentos *in vivo*, nós não utilizamos as CTMs número 03, uma vez que morfológicamente, principalmente as CTMs-OE obtiveram menor plasticidade em se diferenciar tanto em osteócitos.

Reinisch e colaboradores (2017) descreveram uma metodologia robusta *in vivo* e reproduzível para o estudo da hematopoiese humana normal e maligna em um ambiente mais fisiológico. Eles estabeleceram um modelo completo para a geração de hOss (a partir de CTMs-MO humana) com um nicho hematopoiético acessível e que recapitula fielmente a morfologia e função de nicho da MO normal. Porém eles demonstraram que apesar de suas semelhanças morfológicas e imunofenotípicas *in*

vitro, houve uma variabilidade inerente na capacidade de gerar hOss robustos ao implantar CTMs-MO in vivo de diferentes doadores. Foi observado que 44% (8/18) das amostras de CTMs-MO testadas foram capazes de formar ossículo. Insuficiente diferenciação *in vivo* e infiltração medular pode levar a organoides com formação de MO reduzida e apenas pequenas áreas de infiltração hematopoiética. Alguns doadores de CTMs-MO foram incapazes de formar nicho hematopoiético in vivo (REINISCH *et al.*, 2017).

Neste mesmo estudo, após 8 semanas do implante das CTMs-MO para formação dos hOss, células hematopoiéticas humanas normais e malignas (LMA) foram injetadas diretamente nesse microambiente neoformado e foram capazes de enxertar o hOss heterotópico. Para análise do engraftment, foram realizadas subsequentes imunofenotipagem por citometria de fluxo com anticorpos próprios de linhagem linfóide e mielóide, sendo que para eliminar possíveis contaminações com leucócitos e eritrócitos murinos, foram adicionados às análises, anticorpos que detectam essas populações como CD45 e Ter119 murinos. Foi demonstrado presença de células hematopoiéticas humanas normais e malignas após 8 a 16 semanas do transplante. Os ossículos, portanto, podem permitir o enxerto acelerado e superior de LMA e de outras doenças hematológicas malignas, como mielofibrose (MF) em camundongos. (REINISCH *et al.*, 2017).

Após 70 dias do implante das CTMs em camundongos NSG para geração dos hOss, nós injetamos intravenosamente MOLM-13 (linhagem de LMA) modificadas com luciferase a fim de acompanhar o domicílio e engraftment destas células hematopoiéticas malignas no microambiente neoformado. Esses parâmetros foram monitorados por imagem de bioluminescência in vivo pelo sistema IVIS a curto prazo (12 dias após o transplante). O sinal da luciferase foi capturado em várias regiões dos camundongos, inclusive no dorso próximo ao local onde os organoides foram gerados. Foi também observado sinal bioluminescente nesses organoides ex vivo após coletas dos mesmos, indicando que as MOLM-13 Luc⁺ migraram e enxertaram esses hOss heterotópicos. Além disso, análises histológicas demonstraram presença de células hematopoiéticas como observado pela marcação de H&E e por marcação do anticorpo leucocitário humano CD45. Foi observado a presença destas células em todos os organoides heterotópicos gerados. O ideal seria analisar esse engraftment por períodos mais longos como realizados em outros estudos. Porém foi necessário encerrarmos precocemente este experimento devido ao fato de que os animais que

receberam infusão destas células hematopoiéticas malignas começaram em poucos dias entrar em sofrimento sendo que alguns vieram à óbito.

Chen e colaboradores construíram um modelo de hOss a partir de CTMs-MO + CE e após 6 semanas injetaram intravenosamente MOLM-13 Luc/GFP+ para determinar se esse modelo gerado poderia ser utilizado para estudar o enxerto de células leucêmicas humanas em um microambiente humano. Igualmente, análises pelo sistema IVIS detectaram sinal bioluminescente não apenas na calvária e coluna vertebral, mas também nos flancos dos camundongos onde a mistura CTMs-MO+CE+Matrigel® foram implantadas. Esse grupo também demonstrou o engraftment destas células hematopoiéticas malignas, por análises histológicas, tanto por coloração H&E quanto por imunohistoquímica com anticorpos anti-humanos CD45 e específicos da linhagem linfóide (CD19) e linhagem mielóide (CD33) (CHEN *et al.*, 2012).

Todos esses modelos de hOss gerados, permitem as seguintes aplicações do método: células hematopoiéticas podem ser injetadas diretamente nos hOss (injeção intra-ossículo) visando maximizar a taxa de engraftment destas células humanas; o domicílio e a mobilização das CTH humanas nos hOss podem ser estudadas quando injetadas intravenosamente ou quando injetadas diretamente em apenas um dos hOss gerados (quando há mais de um ossículo no mesmo animal) para analisar se as células injetadas migram e enxertam os outros hOss; a alternativamente, ossículos humanizados podem ser utilizados para estudar metástase óssea de tumor sólido gerado nos mesmos animais a partir de células humanas (REINISCH *et al.*, 2017).

Embora seja necessário realizarmos novos experimentos visando estudar melhor o enxerto de células hematopoiéticas saudáveis e malignas em hOss, nosso trabalho pode contribuir na confecção de um organoide / ossículo humanizado indicado para potenciais aplicações do estudo de xenotransplante em hOss, para otimizar a taxa de *engraftment* de células hematopoiéticas humanas.

7 CONCLUSÕES

Ambas CTMs humanas isoladas pioneiramente por esse trabalho (CTMs-MO do “lavado” e CTMs-OE) podem ser caracterizadas como CTMs, pois atenderam aos critérios de CTMs contemplados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. Além disso, ambas demonstraram expressão de genes associados à manutenção do nicho hematopoiético, tornando-as candidatas em potencial para auxiliar na construção de um nicho hematopoiético heterotópico;

As CTMs cultivadas em cultura 3D com biomateriais adequados (HA e/ou HA+ β -TCP) foram capazes de gerar in vivo um organoide / ossículo humanizado heterotópico contendo tecidos das três linhagens mesodermis como o tecido adiposo, tecido ósseo e tecido conjuntivo. Além disso, esse microambiente neoformado apresentou vascularização oriunda das CE (HUVECs) cultivadas juntamente com as CTMs na cultura 3D e formação de locais semelhantes ao nicho hematopoiético, com presença de células hematopoiéticas.

Células hematopoiéticas malignas, MOLM-13 (LMA) migraram e enxertaram os hOss heterotópicos gerados. O estabelecimento deste modelo permite estudar a hematopoese humana normal e maligna, bem como as leucemias humanas e outras desordens hematológicas. Além disso, este protocolo auxilia no entendimento das possíveis alterações que podem ocorrer no nicho hematopoiético, após a *engraftment* / *homing* destas células neste microambiente humanizado.

REFERÊNCIAS

- ABARRATEGI, A.; FOSTER, K.; HAMILTON, A.; MIAN, S. A.; PASSARO, D.; GRIBBEN, J.; MUFTI, G.; BONNET, D. Versatile humanized niche model enables study of normal and malignant human hematopoiesis. **Journal of Clinical Investigation**, vol. 127, no. 2, p. 543–548, 1 Feb. 2017. <https://doi.org/10.1172/JCI89364>.
- ABDI, R.; FIORINA, P.; ADRA, C. N.; ATKINSON, M.; SAYEGH, M. H. Immunomodulation by mesenchymal stem cells: A potential therapeutic strategy for type 1 diabetes. **Diabetes**, vol. 57, no. 7, 2008. <https://doi.org/10.2337/db08-0180>.
- ANTONELLI, A.; NOORT, W. A.; JAQUES, J.; DE BOER, B.; DE JONG-KORLAAR, R.; BROUWERS-VOS, A. Z.; LUBBERS-AALDERS, L.; VAN VELZEN, J. F.; BLOEM, A. C.; YUAN, H.; DE BRUIJN, J. D.; OSSENKOPPELE, G. J.; MARTENS, A. C. M.; VELLENGA, E.; GROEN, R. W. J.; SCHURINGA, J. J. Establishing human leukemia xenograft mouse models by implanting human bone marrow-like scaffold-based niches. **Blood**, vol. 128, no. 25, 2016. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-05-719021>.
- BARCELLOS-HOFF, M. H.; AGGELER, J.; RAM, T. G.; BISSELL, M. J. Functional differentiation and alveolar morphogenesis of primary mammary cultures on reconstituted basement membrane. **Development**, vol. 105, no. 2, 1989. <https://doi.org/10.1242/dev.105.2.223>.
- BATTULA, V. L.; CHEN, Y.; DA GRACA CABREIRA, M.; RUVOLO, V.; WANG, Z.; MA, W.; KONOPLEV, S.; SHPALL, E.; LYONS, K.; STRUNK, D.; BUESO-RAMOS, C.; DAVIS, R. E.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. **Blood**, vol. 122, no. 3, 2013. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-06-437988>.
- BECKER, A. J.; MCCULLOCH, E. A.; TILL, J. E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. **Nature**, vol. 197, no. 4866, 1963. <https://doi.org/10.1038/197452a0>.
- BIANCO, P. Bone and the hematopoietic niche: a tale of two stem cells. 2011. DOI 10.1182/blood-2011-01. Available at: www.bloodjournal.org.
- BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 15, no. 12, 2014. <https://doi.org/10.1038/nrm3904>.
- BOURGINE, P. E.; FRITSCH, K.; PIGEOT, S.; TAKIZAWA, H.; KUNZ, L.; KOKKALIARIS, K. D.; COUTU, D. L.; MANZ, M. G.; MARTIN, I.; SCHROEDER, T. Fate Distribution and Regulatory Role of Human Mesenchymal Stromal Cells in Engineered Hematopoietic Bone Organs. **iScience**, vol. 19, p. 504–513, 27 Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2019.08.006>.

BOURGINE, P. E.; MARTIN, I.; SCHROEDER, T. Engineering Human Bone Marrow Proxies. **Cell Stem Cell**, vol. 22, no. 3, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.01.002>.

BOURGINE, P. E.; SCOTTI, C.; PIGEOT, S.; TCHANG, L. A.; TODOROV, A.; MARTIN, I. Osteoinductivity of engineered cartilaginous templates devitalized by inducible apoptosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 111, no. 49, 2014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411975111>.

BURAVKOVA, L. B.; ANDREEVA, E. R.; GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B. Mesenchymal stem cells and hypoxia: Where are we? **Mitochondrion**, vol. 19, no. Part A, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.07.005>.

BUTLER, J. M.; NOLAN, D. J.; VERTES, E. L.; VARNUM-FINNEY, B.; KOBAYASHI, H.; HOOPER, A. T.; SEANDEL, M.; SHIDO, K.; WHITE, I. A.; KOBAYASHI, M.; WITTE, L.; MAY, C.; SHAWBER, C.; KIMURA, Y.; KITAJEWSKI, J.; ROSENWAKS, Z.; BERNSTEIN, I. D.; RAFII, S. Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. **Cell Stem Cell**, vol. 6, no. 3, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.02.001>.

CAI, Y.; LIU, T.; FANG, F.; XIONG, C.; SHEN, S. Comparisons of mouse mesenchymal stem cells in primary adherent culture of compact bone fragments and whole bone marrow. **Stem Cells International**, vol. 2015, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/708906>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

CALVI, L. M.; ADAMS, G. B.; WEIBRECHT, K. W.; WEBER, J. M.; OLSON, D. P.; KNIGHT, M. C.; MARTIN, R. P.; SCHIPANI, E.; DIVIETI, P.; BRINGHURST, F. R.; MILNER, L. A.; KRONENBERG, H. M.; SCADDEN, D. T. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, vol. 425, no. 6960, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature02040>.

CAPLAN, A. I. Bone development and repair. **BioEssays**, vol. 6, no. 4, p. 171–175, 1 Apr. 1987. DOI 10.1002/BIES.950060406. Available at: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bies.950060406>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

CAPLAN, A. I. Mesenchymal stem cells. **Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society**, vol. 9, no. 5, p. 641–650, 1991. DOI 10.1002/JOR.1100090504. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1870029/>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

CARREL, A.; BURROWS, M. T. Cultivation of tissues in vitro and its technique. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 13, no. 3, 1911. <https://doi.org/10.1084/jem.13.3.387>.

CHAN, C. K. F.; SEO, E. Y.; CHEN, J. Y.; LO, D.; MCARDLE, A.; SINHA, R.; TEVLIN, R.; SEITA, J.; VINCENT-TOMPKINS, J.; WEARDA, T.; LU, W. J.; SENARATH-YAPA, K.; CHUNG, M. T.; MARECIC, O.; TRAN, M.; YAN, K. S.; UPTON, R.; WALMSLEY, G. G.; LEE, A. S.; ... LONGAKER, M. T. Identification and specification of the mouse

skeletal stem cell. **Cell**, vol. 160, no. 1–2, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.002>.

CHAN, J.; WADDINGTON, S. N.; O'DONOGHUE, K.; KURATA, H.; GUILLOT, P. v.; GOTHERSTROM, C.; THEMIS, M.; MORGAN, J. E.; FISK, N. M. Widespread Distribution and Muscle Differentiation of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells After Intrauterine Transplantation in Dystrophic mdx Mouse . **Stem Cells**, vol. 25, no. 4, 2007. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0694>.

CHEN, Y.; JACAMO, R.; SHI, Y. X.; WANG, R. Y.; BATTULA, V. L.; KONOPLEV, S.; STRUNK, D.; HOFMANN, N. A.; REINISCH, A.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Human extramedullary bone marrow in mice: A novel in vivo model of genetically controlled hematopoietic microenvironment. **Blood**, vol. 119, no. 21, p. 4971–4980, 24 May 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-11-389957>.

CHOW, D. C.; WENNING, L. A.; MILLER, W. M.; PAPOUTSAKIS, E. T. Modeling pO₂ distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. **Biophysical Journal**, vol. 81, no. 2, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(01\)75732-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(01)75732-3).

CLEVERS, H. Modeling Development and Disease with Organoids. **Cell**, vol. 165, no. 7, p. 1586–1597, 16 Jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.082>.

COUTU, D. L.; CUERQUIS, J.; EL AYOUBI, R.; FORNER, K. A.; ROY, R.; FRANÇOIS, M.; GRIFFITH, M.; LILLICRAP, D.; YOUSEFI, A. M.; BLOSTEIN, M. D.; GALIPEAU, J. Hierarchical scaffold design for mesenchymal stem cell-based gene therapy of hemophilia B. **Biomaterials**, vol. 32, no. 1, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.08.094>.

COUTU, D. L.; YOUSEFI, A. M.; GALIPEAU, J. Three-dimensional porous scaffolds at the crossroads of tissue engineering and cell-based gene therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, vol. 108, no. 3, 2009. <https://doi.org/10.1002/jcb.22296>.

COVAS, D. T.; PANEPUCCI, R. A.; FONTES, A. M.; SILVA, W. A.; ORELLANA, M. D.; FREITAS, M. C. C.; NEDER, L.; SANTOS, A. R. D.; PERES, L. C.; JAMUR, M. C.; ZAGO, M. A. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. **Experimental Hematology**, vol. 36, no. 5, p. 642–654, May 2008. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2007.12.015>.

CRISAN, M.; YAP, S.; CASTEILLA, L.; CHEN, C. W.; CORSELLI, M.; PARK, T. S.; ANDRIOLO, G.; SUN, B.; ZHENG, B.; ZHANG, L.; NOROTTE, C.; TENG, P. N.; TRAAS, J.; SCHUGAR, R.; DEASY, B. M.; BADYLAK, S.; BUHRING, H. J.; GIACOBINO, J. P.; LAZZARI, L.; ... PÉAULT, B. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. **Cell Stem Cell**, vol. 3, no. 3, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.07.003>.

DA SILVA MEIRELLES, L.; CHAGASTELLES, P. C.; NARDI, N. B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of Cell Science**, vol. 119, no. 11, 2006. <https://doi.org/10.1242/jcs.02932>.

DE SOUZA, L. E. B.; MALTA, T. M.; KASHIMA HADDAD, S.; COVAS, D. T. Mesenchymal Stem Cells and Pericytes: To What Extent Are They Related? **Stem Cells and Development**, vol. 25, no. 24, p. 1843–1852, 15 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1089/SCD.2016.0109>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

DEXTER, T. M.; ALLEN, T. D.; LAJTHA, L. G. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 91, no. 3, 1977. <https://doi.org/10.1002/jcp.1040910303>.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F. C.; KRAUSE, D. S.; DEANS, R. J.; KEATING, A.; PROCKOP, D. J.; HORWITZ, E. M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, vol. 8, no. 4, p. 315–317, Aug. 2006. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.

DOULATOV, S.; NOTTA, F.; LAURENTI, E.; DICK, J. E. Hematopoiesis: A human perspective. **Cell Stem Cell**, vol. 10, no. 2, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.006>.

DUPARD, S. J.; GRIGORYAN, A.; FARHAT, S.; COUTU, D. L.; BOURGINE, P. E. Development of Humanized Ossicles: Bridging the Hematopoietic Gap. **Trends in Molecular Medicine**, vol. 26, no. 6, p. 552–569, 1 Jun. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.01.016>.

EGGER, D.; SCHWEDHELM, I.; HANSMANN, J.; KASPER, C. Hypoxic three-dimensional scaffold-free aggregate cultivation of mesenchymal stem cells in a stirred tank reactor. **Bioengineering**, vol. 4, no. 2, 1 Jun. 2017. <https://doi.org/10.3390/BIOENGINEERING4020047>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

ELIASSON, P.; JÖNSSON, J. I. The hematopoietic stem cell niche: Low in oxygen but a nice place to be. **Journal of Cellular Physiology**, vol. 222, no. 1, 2010. <https://doi.org/10.1002/jcp.21908>.

ENGERT, A.; BALDUINI, C.; BRAND, A.; COIFFIER, B.; CORDONNIER, C.; DÖHNER, H.; DE WIT, T. D.; EICHINGER, S.; FIBBE, W.; GREEN, T.; DE HAAS, F.; IOLASCON, A.; JAFFREDO, T.; RODEGHIERO, F.; SALL ES, G.; SCHURINGA, J. J.; ANDRÉ, M.; ANDRE-SCHMUTZ, I.; BACIGALUPO, A.; ... ZIEGER, B. The European Hematology Association Roadmap for European Hematology Research: a consensus document. **Haematologica**, vol. 101, no. 2, p. 115–208, 1 Feb. 2016. DOI 10.3324/HAEMATOL.2015.136739. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26819058/>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

ESTRADA, J. C.; ALBO, C.; BENGURÍA, A.; DOPAZO, A.; LÓPEZ-ROMERO, P.; CARRERA-QUINTANAR, L.; ROCHE, E.; CLEMENTE, E. P.; ENRÍQUEZ, J. A.; BERNAD, A.; SAMPER, E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death and Differentiation**, vol. 19, no. 5, 2012. <https://doi.org/10.1038/cdd.2011.172>.

EYCKMANS, J.; CHEN, C. S. 3D culture models of tissues under tension. **Journal of Cell Science**, vol. 130, no. 1, p. 63–70, 2017. <https://doi.org/10.1242/jcs.198630>.

FERNANDEZ-YAGUE, M. A.; ABBAH, S. A.; MCNAMARA, L.; ZEUGOLIS, D. I.; PANDIT, A.; BIGGS, M. J. Biomimetic approaches in bone tissue engineering: Integrating biological and physicommechanical strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 84, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.005>.

FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Haematology and blood transfusion**, vol. 25, 1980. https://doi.org/10.1007/978-3-642-67319-1_3.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. **Cell Proliferation**, vol. 3, no. 4, p. 393–403, 1970. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2184.1970.TB00347.X>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

FRIEDENSTEIN, A. J.; IVANOV-SMOLENSKI, A. A.; CHAJLAKJAN, R. K.; GORSKAYA, U. F.; KURALESOVA, A. I.; LATZINIK, N. W.; GERASIMOW, U. W. Origin of bone marrow stromal mechanocytes in radiochimeras and heterotopic transplants. **Experimental Hematology**, vol. 6, no. 5, 1978. .

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. v. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, vol. 16, no. 3, 1966. <https://doi.org/10.1242/dev.16.3.381>.

FRIEDENSTEIN, A.; KURALESOVA, A. I. Osteogenic precursor cells of bone marrow in radiation chimeras. **Transplantation**, vol. 12, no. 2, 1971. <https://doi.org/10.1097/00007890-197108000-00001>.

FRIEDENSTEIN, Alexander J.; CHAILAKHYAN, R. K.; LATZINIK, N. v.; PANASYVK, A. F.; KEILISS-BOROK, I. v. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: Cloning in vitro and retransplantation in vivo. **Transplantation**, vol. 17, no. 4, 1974. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>.

GOUJON; E. Recherches experimentales sur les proprietes physiologiques de la moelle des os. **J de l'Anatomie et de la Physiologie Normales et Pathologiques de l'Homme et des Animaux**, vol. 6, p. 399, 1869. Available at: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10017364630>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

GRAYSON, W. L.; ZHAO, F.; BUNNELL, B.; MA, T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 358, no. 3, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.054>.

GRIFFITHS, M. J. D.; BONNET, D.; JANES, S. M. Stem cells of the alveolar epithelium. **Lancet**, vol. 366, no. 9481, 2005. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)66916-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)66916-4).

GROEN, R. W. J.; NOORT, W. A.; RAYMAKERS, R. A.; PRINS, H. J.; AALDERS, L.; HOFHUIS, F. M.; MOERER, P.; VAN VELZEN, J. F.; BLOEM, A. C.; VAN KESSEL, B.; ROZEMULLER, H.; VAN BINSBERGEN, E.; BUIJS, A.; YUAN, H.; DE BRUIJN, J. D.; DE WEERS, M.; PARREN, P. W. H. I.; SCHURINGA, J. J.; LOKHORST, H. M.; ... MARTENS, A. C. M. Reconstructing the human hematopoietic niche in

immunodeficient mice: Opportunities for studying primary multiple myeloma. **Blood**, vol. 120, no. 3, 2012. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-03-414920>.

GUO, Z.; LI, H.; LI, X.; YU, X.; WANG, H.; TANG, P.; MAO, N. In Vitro Characteristics and In Vivo Immunosuppressive Activity of Compact Bone-Derived Murine Mesenchymal Progenitor Cells. **STEM CELLS**, vol. 24, no. 4, p. 992–1000, Apr. 2006. <https://doi.org/10.1634/STEMCELLS.2005-0224>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

HARRISON, R. G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. **Journal of Experimental Zoology**, vol. 9, no. 4, 1910. <https://doi.org/10.1002/jez.1400090405>.

HAYNESWORTH, S. E.; GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V. M.; CAPLAN, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. **Bone**, vol. 13, no. 1, 1992. [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(92\)90364-3](https://doi.org/10.1016/8756-3282(92)90364-3).

HOFFMAN, M. P.; KIBBEY, M. C.; LETTERIO, J. J.; KLEINMAN, H. K. Role of laminin-1 and TGF- β 3 in acinar differentiation of a human submandibular gland cell line (HSG). **Journal of Cell Science**, vol. 109, no. 8, 1996. <https://doi.org/10.1242/jcs.109.8.2013>.

HOLZAPFEL, B. M.; HUTMACHER, D. W.; NOWLAN, B.; BARBIER, V.; THIBAudeau, L.; THEODOROPOULOS, C.; HOOPER, J. D.; LOESSNER, D.; CLEMENTS, J. A.; RUSSELL, P. J.; PETTIT, A. R.; WINKLER, I. G.; LEVESQUE, J. P. Tissue engineered humanized bone supports human hematopoiesis in vivo. **Biomaterials**, vol. 61, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.057>.

HO-SHUI-LING, A.; BOLANDER, J.; RUSTOM, L. E.; JOHNSON, A. W.; LUYTEN, F. P.; PICART, C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. **Biomaterials**, vol. 180, p. 143–162, 1 Oct. 2018. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMATERIALS.2018.07.017>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

HUANG, X.; ZHU, B.; WANG, X.; XIAO, R.; WANG, C. Three-dimensional co-culture of mesenchymal stromal cells and differentiated osteoblasts on human bio-derived bone scaffolds supports active multi-lineage hematopoiesis in vitro: Functional implication of the biomimetic HSC niche. **International Journal of Molecular Medicine**, vol. 38, no. 4, p. 1141–1151, 1 Oct. 2016. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2712>.

IIDA, K.; TAKEDA-KAWAGUCHI, T.; TEZUKA, Y.; KUNISADA, T.; SHIBATA, T.; TEZUKA, K. I. Hypoxia enhances colony formation and proliferation but inhibits differentiation of human dental pulp cells. **Archives of Oral Biology**, vol. 55, no. 9, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.06.005>.

JANICKI, P.; KASTEN, P.; KLEINSCHMIDT, K.; LUGINBUEHL, R.; RICHTER, W. Chondrogenic pre-induction of human mesenchymal stem cells on β -TCP: Enhanced bone quality by endochondral heterotopic bone formation. **Acta Biomaterialia**, vol. 6, no. 8, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.037>.

KIEL, M. J.; YILMAZ, Ö. H.; IWASHITA, T.; YILMAZ, O. H.; TERHORST, C.; MORRISON, S. J. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and

progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, vol. 121, no. 7, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.026>.

KÖGLER, G.; SENSKEN, S.; AIREY, J. A.; TRAPP, T.; MÜSCHEN, M.; FELDHAHN, N.; LIEDTKE, S.; SORG, R. v.; FISCHER, J.; ROSENBAUM, C.; GRESCHAT, S.; KNIPPER, A.; BENDER, J.; DEGISTIRICI, Ö.; GAO, J.; CAPLAN, A. I.; COLLETTI, E. J.; ALMEIDA-PORADA, G.; MÜLLER, H. W.; ... WERNET, P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 200, no. 2, 2004. <https://doi.org/10.1084/jem.20040440>.

KONOPEVA, M.; TABE, Y.; ZENG, Z.; ANDREEFF, M. Therapeutic targeting of microenvironmental interactions in leukemia: mechanisms and approaches. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, vol. 12, no. 4–5, p. 103–113, Aug. 2009. DOI 10.1016/J.DRUP.2009.06.001. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19632887/>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

KONOPEVA, M. Y.; JORDAN, C. T. Leukemia Stem Cells and Microenvironment: Biology and Therapeutic Targeting. **Journal of Clinical Oncology**, vol. 29, no. 5, p. 591, 10 Feb. 2011. DOI 10.1200/JCO.2010.31.0904. Available at: </pmc/articles/PMC4874213/>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

KRAMEROV, A. A.; LJUBIMOV, A. v. Stem cell therapies in the treatment of diabetic retinopathy and keratopathy. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 241, no. 6, 2016. <https://doi.org/10.1177/1535370215609692>.

KUZNETSOV, S. A.; KREBSBACH, P. H.; SATOMURA, K.; KERR, J.; RIMINUCCI, M.; BENAYAHU, D.; ROBEY, P. G. Single-colony derived strains of human marrow stromal fibroblasts form bone after transplantation in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 12, no. 9, 1997. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1997.12.9.1335>.

LANCASTER, M. A.; RENNER, M.; MARTIN, C. A.; WENZEL, D.; BICKNELL, L. S.; HURLES, M. E.; HOMFRAY, T.; PENNINGER, J. M.; JACKSON, A. P.; KNOBLICH, J. A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature** **2013** **501:7467**, vol. 501, no. 7467, p. 373–379, 28 Aug. 2013. DOI 10.1038/nature12517. Available at: <https://www.nature.com/articles/nature12517>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

LANGER, R.; VACANTI, J. Advances in tissue engineering. 51., 2016. **Journal of Pediatric Surgery** [...]. [S. l.: s. n.], 2016. vol. 51, . <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022>.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science (New York, N.Y.)**, vol. 260, no. 5110, p. 920–926, 1993. DOI 10.1126/SCIENCE.8493529. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8493529/>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

LAVRENTIEVA, A.; MAJORE, I.; KASPER, C.; HASS, R. Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells. **Cell Communication and Signaling**, vol. 8, 2010. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-8-18>.

LOGEART-AVRAMOGLU, D.; ANAGNOSTOU, F.; BIZIOS, R.; PETITE, H. Engineering bone: Challenges and obstacles. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, vol. 9, no. 1, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2005.tb00338.x>.

MA, Y.; XU, Y.; XIAO, Z.; YANG, W.; ZHANG, C.; SONG, E.; DU, Y.; LI, L. Reconstruction of Chemically Burned Rat Corneal Surface by Bone Marrow-Derived Human Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells**, vol. 24, no. 2, 2006. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0046>.

MANKANI, M. H.; KUZNETSOV, S. A.; AVILA, N. A.; KINGMAN, A.; ROBEY, P. G. Bone Formation in Transplants of Human Bone Marrow Stromal Cells and Hydroxyapatite-Tricalcium Phosphate: Prediction with Quantitative CT in Mice. **Radiology**, vol. 230, no. 2, 2004. <https://doi.org/10.1148/radiol.2302011529>.

MANKANI, M. H.; KUZNETSOV, S. A.; MARSHALL, G. W.; ROBEY, P. G. Creation of new bone by the percutaneous injection of human bone marrow stromal cell and HA/TCP suspensions. **Tissue Engineering - Part A**, vol. 14, no. 12, 2008. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0348>.

MARTINE, L. C.; HOLZAPFEL, B. M.; MCGOVERN, J. A.; WAGNER, F.; QUENT, V. M.; HESAMI, P.; WUNNER, F. M.; VAQUETTE, C.; DE-JUAN-PARDO, E. M.; BROWN, T. D.; NOWLAN, B.; WU, D. J.; HUTMACHER, C. O.; MOI, D.; OUSSENKO, T.; PICCININI, E.; ZANDSTRA, P. W.; MAZZIERI, R.; LÉVESQUE, J. P.; ... HUTMACHER, D. W. Engineering a humanized bone organ model in mice to study bone metastases. **Nature Protocols**, vol. 12, no. 4, 2017. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.002>.

MÉNDEZ-FERRER, S.; MICHURINA, T. v.; FERRARO, F.; MAZLOOM, A. R.; MACARTHUR, B. D.; LIRA, S. A.; SCADDEN, D. T.; MA'AYAN, A.; ENIKOLOPOV, G. N.; FRENETTE, P. S. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. **Nature**, vol. 466, no. 7308, p. 829–834, 12 Aug. 2010. <https://doi.org/10.1038/nature09262>.

MÉNDEZ-FERRER, S.; SCADDEN, D. T.; SÁNCHEZ-AGUILERA, A. Bone marrow stem cells: Current and emerging concepts. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1335, no. 1, 2015. <https://doi.org/10.1111/nyas.12641>.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Concise Review: Recent Advances on the Significance of Stem Cells in Tissue Regeneration and Cancer Therapies. **Stem Cells**, vol. 24, no. 11, 2006. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0066>.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G.; SHI, S. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 100, no. 10, 2003. <https://doi.org/10.1073/pnas.0937635100>.

MOHYELDIN, A.; GARZÓN-MUVDI, T.; QUIÑONES-HINOJOSA, A. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. **Cell Stem Cell**, vol. 7, no. 2, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.07.007>.

MOREAU, J. E.; ANDERSON, K.; MAUNEY, J. R.; NGUYEN, T.; KAPLAN, D. L.; ROSENBLATT, M. Tissue-engineered bone serves as a target for metastasis of

human breast cancer in a mouse model. **Cancer Research**, vol. 67, no. 21, 2007. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2483>.

MORRISON, S. J.; SCADDEN, D. T. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. **Nature**, vol. 505, no. 7483, p. 327–334, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature12984>.

NAKANO, T.; ANDO, S.; TAKATA, N.; KAWADA, M.; MUGURUMA, K.; SEKIGUCHI, K.; SAITO, K.; YONEMURA, S.; EIRAKU, M.; SASAI, Y. Self-formation of optic cups and storable stratified neural retina from human ESCs. **Cell Stem Cell**, vol. 10, no. 6, p. 771–785, 14 Jun. 2012. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.05.009>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

NOLD, P.; HACKSTEIN, H.; RIEDLINGER, T.; KASPER, C.; NEUMANN, A.; MERNBERGER, M.; FÖLSCH, C.; SCHMITT, J.; FUCHS-WINKELMANN, S.; BARCKHAUSEN, C.; KILLER, M.; NEUBAUER, A.; BRENDDEL, C. Immunosuppressive capabilities of mesenchymal stromal cells are maintained under hypoxic growth conditions and after gamma irradiation. **Cytotherapy**, vol. 17, no. 2, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.10.004>.

NOMBELA-ARRIETA, C.; RITZ, J.; SILBERSTEIN, L. E. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, vol. 12, no. 2, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrm3049>.

OHGUSHI, H.; CAPLAN, A. I. Stem cell technology and bioceramics: From cell to gene engineering. **Journal of Biomedical Materials Research**, vol. 48, no. 6, 1999. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(1999\)48:6<913::AID-JBM22>3.0.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(1999)48:6<913::AID-JBM22>3.0.CO;2-0).

OLLIER, L. **DU PÉRIOSTE AU POINT DE VUE PHYSIOLOGIQUE ET CHIRURGICAL. COMMUNICATION ORALE FAITE AU CONGRÈS MÉDICAL DE LYON, LE 28 SEPTEMBRE 1864**. 5th ed. Lyon: VICTOR MASSON ET FILS, 1865.

OZAKI, K. [Novel strategy for GVHD treatment: possible use of mesenchymal stem cells and interleukin-21]. [**Rinshō ketsueki**] **The Japanese journal of clinical hematology**, vol. 53, no. 5, 2012. <https://doi.org/10.11406/rinketsu.53.483>.

PARK, S. B.; SEO, M. S.; KANG, J. G.; CHAE, J. S.; KANG, K. S. Isolation and characterization of equine amniotic fluid-derived multipotent stem cells. **Cytotherapy**, vol. 13, no. 3, 2011. <https://doi.org/10.3109/14653249.2010.520312>.

PASSARO, D.; ABARRATEGI, A.; FOSTER, K.; ARIZA-MCNAUGHTON, L.; BONNET, D. Bioengineering of humanized bone marrow microenvironments in mouse and their visualization by live imaging. **Journal of Visualized Experiments**, vol. 2017, no. 126, 9 Aug. 2017. <https://doi.org/10.3791/55914>.

PASSIER, R.; ORLOVA, V.; MUMMERY, C. Complex Tissue and Disease Modeling using hiPSCs. **Cell Stem Cell**, vol. 18, no. 3, p. 309–321, 3 Mar. 2016. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2016.02.011>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

PIEVANI, A.; SACCHETTI, B.; CORSI, A.; RAMBALDI, B.; DONSANTE, S.; SCAGLIOTTI, V.; VERGANI, P.; REMOLI, C.; BIONDI, A.; ROBEY, P. G.; RIMINUCCI, M.; SERAFIN, M. Human umbilical cord blood-borne fibroblasts contain marrow niche

precursors that form a bone/marrow organoid in vivo. **Development (Cambridge)**, vol. 144, no. 6, p. 1035–1044, 15 Mar. 2017. <https://doi.org/10.1242/dev.142836>.

PINEAULT, N.; ABU-KHADER, A. Advances in umbilical cord blood stem cell expansion and clinical translation. **Experimental Hematology**, vol. 43, no. 7, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.exphem.2015.04.011>.

PITTINGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECK, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A.; SIMONETTI, D. W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, vol. 284, no. 5411, 1999. <https://doi.org/10.1126/science.284.5411.143>.

REINISCH, A.; ETCHART, N.; THOMAS, D.; HOFMANN, N. A.; FRUEHWIRTH, M.; SINHA, S.; CHAN, C. K.; SENARATH-YAPA, K.; SEO, E.-Y.; WEARDA, T.; HARTWIG, U. F.; BEHAM-SCHMID, C.; TRAJANOSKI, S.; LIN, Q.; WAGNER, W.; DULLIN, C.; ALVES, F.; ANDREEFF, M.; WEISSMAN, I. L.; ... STRUNK, D. Epigenetic and in vivo comparison of diverse MSC sources reveals an endochondral signature for human hematopoietic niche formation. 2015. DOI 10.1182/blood-2014-04. Available at: www.bloodjournal.org.

REINISCH, A.; HERNANDEZ, D. C.; SCHALLMOSER, K.; MAJETI, R. Generation and use of a humanized bone-marrow-ossicle niche for hematopoietic xenotransplantation into mice. **Nature Protocols**, vol. 12, no. 10, p. 2169–2178, 1 Oct. 2017. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.088>.

REINISCH, A.; STRUNK, D. Isolation and animal serum free expansion of human umbilical cord derived mesenchymal stromal cells (MSCs) and endothelial colony forming progenitor cells (ECFCs). **Journal of Visualized Experiments**, no. 32, 2009. <https://doi.org/10.3791/1525>.

REINISCH, A.; THOMAS, D.; CORCES, M. R.; ZHANG, X.; GRATZINGER, D.; HONG, W. J.; SCHALLMOSER, K.; STRUNK, D.; MAJETI, R. A humanized bone marrow ossicle xenotransplantation model enables improved engraftment of healthy and leukemic human hematopoietic cells. **Nature Medicine**, vol. 22, no. 7, p. 812–821, 1 Jul. 2016. <https://doi.org/10.1038/NM.4103>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

ROHBAN, R.; PIEBER, T. R. Mesenchymal stem and progenitor cells in regeneration: Tissue specificity and regenerative potential. **Stem Cells International**, vol. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/5173732>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

RONGVAUX, A.; WILLINGER, T.; MARTINEK, J.; STROWIG, T.; GEARTY, S. v.; TEICHMANN, L. L.; SAITO, Y.; MARCHES, F.; HALENE, S.; PALUCKA, A. K.; MANZ, M. G.; FLAVELL, R. A. Development and function of human innate immune cells in a humanized mouse model. **Nature Biotechnology**, vol. 32, no. 4, 2014. <https://doi.org/10.1038/nbt.2858>.

ROSA, Adalberto L.; BELOTI, M. M.; VAN NOORT, R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. **Dental Materials**, vol. 19, no. 8, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(03)00024-1).

ROSA, Adalberto Luiz; DE OLIVEIRA, P. T.; BELOTI, M. M. Macroporous scaffolds associated with cells to construct a hybrid biomaterial for bone tissue engineering. **Expert Review of Medical Devices**, vol. 5, no. 6, 2008. <https://doi.org/10.1586/17434440.5.6.719>.

ROSSETTI, R.; RÓS, F. A.; SOUZA, L. E. B. de; MAÇONETTO, J. de M.; COSTA, P. N. M. da; FERREIRA, F. U.; BORGES, J. S.; CARVALHO, J. V. de; MOROTTI, N. P.; KASHIMA, S.; COVAS, D. T. Hypoxia-cultured mouse mesenchymal stromal cells from bone marrow and compact bone display different phenotypic traits. **Experimental Cell Research**, vol. 399, no. 1, 1 Feb. 2021. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2020.112434>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

SACCHETTI, B.; FUNARI, A.; MICHIEZI, S.; DI CESARE, S.; PIERSANTI, S.; SAGGIO, I.; TAGLIAFICO, E.; FERRARI, S.; ROBEY, P. G.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, vol. 131, no. 2, p. 324–336, 19 Oct. 2007. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.08.025>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

SANCHEZ-GUIJO, F. M.; BLANCO, J. F.; CRUZ, G.; MUNTION, S.; GOMEZ, M.; CARRANCIO, S.; LOPEZ-VILLAR, O.; BARBADO, M. V.; SANCHEZ-ABARCA, L. I.; BLANCO, B.; BRIÑÓN, J. G.; DEL CAÑIZO, M. C. Multiparametric comparison of mesenchymal stromal cells obtained from trabecular bone by using a novel isolation method with those obtained by iliac crest aspiration from the same subjects. **Cell and tissue research**, vol. 336, no. 3, p. 501–507, Jun. 2009. DOI 10.1007/S00441-009-0778-X. Available at: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19357871/>. Accessed on: 29 Nov. 2021.

SANDERSON, I. R.; EZZELL, R. M.; KEDINGER, M.; ERLANGER, M.; XU, Z. X.; PRINGAULT, E.; LEON-ROBINE, S.; LOUWARD, D.; WALKER, W. A. Human fetal enterocytes in vitro: Modulation of the phenotype by extracellular matrix. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 93, no. 15, 1996. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7717>.

SARUGASER, R.; LICKORISH, D.; BAKSH, D.; HOSSEINI, M. M.; DAVIES, J. E. Human Umbilical Cord Perivascular (HUCPV) Cells: A Source of Mesenchymal Progenitors. **Stem Cells**, vol. 23, no. 2, 2005. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0166>.

SCADDEN, D. T. The stem-cell niche as an entity of action. **Nature**, vol. 441, no. 7097, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04957>.

SCHEPERS, K.; CAMPBELL, T. B.; PASSEGUÉ, E. Normal and leukemic stem cell niches: Insights and therapeutic opportunities. **Cell Stem Cell**, vol. 16, no. 3, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.02.014>.

SCHOFIELD, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. A hypothesis. **Blood Cells**, vol. 4, no. 1–2, 1978. .

SCHUGER, L.; O'SHEA, K. S.; NELSON, B. B.; VARANI, J. Organotypic arrangement of mouse embryonic lung cells on a basement membrane extract: Involvement of laminin. **Development**, vol. 110, no. 4, 1990. <https://doi.org/10.1242/dev.110.4.1091>.

SCOTTI, C.; PICCININI, E.; TAKIZAWA, H.; TODOROV, A.; BOURGINE, P.; PAPADIMITROPOULOS, A.; BARBERO, A.; MANZ, M. G.; MARTIN, I. Engineering of a functional bone organ through endochondral ossification. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 110, no. 10, 2013. <https://doi.org/10.1073/pnas.1220108110>.

SCOTTI, C.; TONNARELLI, B.; PAPADIMITROPOULOS, A.; SCHERBERICH, A.; SCHAEREN, S.; SCHAUERTE, A.; LOPEZ-RIOS, J.; ZELLER, R.; BARBERO, A.; MARTIN, I. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 107, no. 16, 2010. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000302107>.

SEONG KIM, D.; WOO LEE, M.; JONG, Y. K.; JIN PARK, H.; JIN PARK, Y.; KIM, D.-I.; LIM JUNG, H.; WOONG SUNG, K.; HOE KOO, H.; HEE YOO, K. **Application of human mesenchymal stem cells cultured in different oxygen concentrations for treatment of graft-versus-host disease in mice**. [S. l.: s. n.], 2016.

SERAFINI, M.; SACCHETTI, B.; PIEVANI, A.; REDAELLI, D.; REMOLI, C.; BIONDI, A.; RIMINUCCI, M.; BIANCO, P. Establishment of bone marrow and hematopoietic niches in vivo by reversion of chondrocyte differentiation of human bone marrow stromal cells. **Stem Cell Research**, vol. 12, no. 3, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.01.006>.

SHARMA, M. B.; LIMAYE, L. S.; KALE, V. P. Mimicking the functional hematopoietic stem cell niche in vitro: recapitulation of marrow physiology by hydrogel-based three-dimensional cultures of mesenchymal stromal cells. **Haematologica**, vol. 97, no. 5, p. 651, 1 May 2012. DOI 10.3324/HAEMATOL.2011.050500. Available at: </pmc/articles/PMC3342965/>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

SHI, S.; GRONTHOS, S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. **Journal of Bone and Mineral Research**, vol. 18, no. 4, 2003. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.4.696>.

SNOW, J. W.; ABRAHAM, N.; MA, M. C.; ABBEY, N. W.; HERNDIER, B.; GOLDSMITH, M. A. Oxygen saturation in the bone marrow of healthy volunteers [6]. **Blood**, vol. 99, no. 1, 2002. <https://doi.org/10.1182/blood.V99.1.394>.

STENDERUP, K.; JUSTESEN, J.; CLAUSEN, C.; KASSEM, M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, vol. 33, no. 6, p. 919–926, 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.07.005>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

SUDA, T.; TAKUBO, K.; SEMENZA, G. L. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. **Cell Stem Cell**, vol. 9, no. 4, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.09.010>.

SUGIMURA, R. Bioengineering Hematopoietic Stem Cell Niche toward Regenerative Medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 99, p. 212–220, 1 Apr. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.10.010>.

SUGIYAMA, T.; KOHARA, H.; NODA, M.; NAGASAWA, T. Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool by CXCL12-CXCR4 Chemokine Signaling in Bone Marrow Stromal Cell Niches. **Immunity**, vol. 25, no. 6, p. 977–988, Dec. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.10.016>.

SUNG, J. H.; YANG, H. M.; PARK, J. B.; CHOI, G. S.; JOH, J. W.; KWON, C. H.; CHUN, J. M.; LEE, S. K.; KIM, S. J. Isolation and Characterization of Mouse Mesenchymal Stem Cells. **Transplantation Proceedings**, vol. 40, no. 8, p. 2649–2654, Oct. 2008. <https://doi.org/10.1016/J.TRANSProceed.2008.08.009>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

SYKES, S. M.; SCADDEN, D. T. Modeling human hematopoietic stem cell biology in the mouse. **Seminars in Hematology**, vol. 50, no. 2, 2013. <https://doi.org/10.1053/j.seminhematol.2013.03.029>.

SZADE, K.; GULATI, G. S.; CHAN, C. K. F.; KAO, K. S.; MIYANISHI, M.; MARJON, K. D.; SINHA, R.; GEORGE, B. M.; CHEN, J. Y.; WEISSMAN, I. L. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. **Antioxidants and Redox Signaling**, vol. 29, no. 2, p. 191–204, 10 Jul. 2018. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7419>.

TAKUBO, K.; NAGAMATSU, G.; KOBAYASHI, C. I.; NAKAMURA-ISHIZU, A.; KOBAYASHI, H.; IKEDA, E.; GODA, N.; RAHIMI, Y.; JOHNSON, R. S.; SOGA, T.; HIRAO, A.; SUEMATSU, M.; SUDA, T. Regulation of glycolysis by Pdk functions as a metabolic checkpoint for cell cycle quiescence in hematopoietic stem cells. **Cell Stem Cell**, vol. 12, no. 1, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.011>.

TANG, D.; TARE, R. S.; YANG, L. Y.; WILLIAMS, D. F.; OU, K. L.; OREFFO, R. O. C. Biofabrication of bone tissue: Approaches, challenges and translation for bone regeneration. **Biomaterials**, vol. 83, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.024>.

TAVASSOLI, M.; CROSBY, W. H. Transplantation of marrow to extramedullary sites. **Science**, vol. 161, no. 3836, p. 54–56, 1968. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.161.3836.54>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

TORMIN, A.; LI, O.; BRUNE, J. C.; WALSH, S.; SCHÜTZ, B.; EHINGER, M.; DITZEL, N.; KASSEM, M.; SCHEDING, S. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. **Blood**, vol. 117, no. 19, p. 5067–5077, 12 May 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-304287>.

TSAI, C. C.; CHEN, Y. J.; YEW, T. L.; CHEN, L. L.; WANG, J. Y.; CHIU, C. H.; HUNG, S. C. Hypoxia inhibits senescence and maintains mesenchymal stem cell properties through down-regulation of E2A-p21 by HIF-TWIST. **Blood**, vol. 117, no. 2, 2011. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-05-287508>.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, vol. 8, no. 9, 2008. <https://doi.org/10.1038/nri2395>.

UCHIDA, N.; FLEMING, W. H.; ALPERN, E. J.; WEISSMAN, I. L. Heterogeneity of hematopoietic stem cells. **Current Opinion in Immunology**, vol. 5, no. 2, 1993. [https://doi.org/10.1016/0952-7915\(93\)90002-A](https://doi.org/10.1016/0952-7915(93)90002-A).

VAISELBUH, S. R.; EDELMAN, M.; LIPTON, J. M.; LIU, J. M. Ectopic human mesenchymal stem cell-coated scaffolds in NOD/SCID mice: An in vivo model of the leukemia niche. **Tissue Engineering - Part C: Methods**, vol. 16, no. 6, 2010. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0179>.

VAN PEL, M.; FIBBE, W. E.; SCHEPERS, K. The human and murine hematopoietic stem cell niches: are they comparable? **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1370, no. 1, 2016. <https://doi.org/10.1111/nyas.12994>.

VUNJAK-NOVAKOVIC, G.; SCADDEN, D. T. Biomimetic platforms for human stem cell research. **Cell Stem Cell**, vol. 8, no. 3, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2011.02.014>.

WANG, Q.; YANG, Q.; WANG, Z.; TONG, H.; MA, L.; ZHANG, Y.; SHAN, F.; MENG, Y.; YUAN, Z. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from fetal-bone marrow, adipose tissue, and Warton's jelly as sources of cell immunomodulatory therapy. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, vol. 12, no. 1, p. 85–96, 1 Jan. 2016. <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1030549>.

WEISSMAN, I. L. Developmental switches in the immune system. **Cell**, vol. 76, no. 2, 1994. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90329-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90329-8).

WOLBANK, S.; PETERBAUER, A.; FAHRNER, M.; HENNERBICHLER, S.; VAN GRIENSVEN, M.; STADLER, G.; REDL, H.; GABRIEL, C. Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: A comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. **Tissue Engineering**, vol. 13, no. 6, 2007. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.0313>.

WORTHLEY, D. L.; CHURCHILL, M.; COMPTON, J. T.; TAILOR, Y.; RAO, M.; SI, Y.; LEVIN, D.; SCHWARTZ, M. G.; UYGUR, A.; HAYAKAWA, Y.; GROSS, S.; RENZ, B. W.; SETLIK, W.; MARTINEZ, A. N.; CHEN, X.; NIZAMI, S.; LEE, H. G.; KANG, H. P.; CALDWELL, J. M.; ... WANG, T. C. Gremlin 1 identifies a skeletal stem cell with bone, cartilage, and reticular stromal potential. **Cell**, vol. 160, no. 1–2, p. 269–284, 15 Jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.042>.

YAMADA, Y.; YOKOYAMA, S.; WANG, X.-D.; FUKUDA, N.; TAKAKURA, N. Cardiac Stem Cells in Brown Adipose Tissue Express CD133 and Induce Bone Marrow Nonhematopoietic Cells to Differentiate into Cardiomyocytes. **Stem Cells**, vol. 25, no. 5, 2007. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0588>.

YANG, C.; WANG, X.; MA, B.; ZHU, H.; HUAN, Z.; MA, N.; WU, C.; CHANG, J. 3D-Printed Bioactive Ca₃SiO₅ Bone Cement Scaffolds with Nano Surface Structure for Bone Regeneration. **ACS Applied Materials and Interfaces**, vol. 9, no. 7, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b14297>.

YUSOP, N.; BATTERSBY, P.; ALRAIES, A.; SLOAN, A. J.; MOSELEY, R.; WADDINGTON, R. J. Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from rat bone marrow and the endosteal niche: A comparative study. **Stem Cells International**, vol. 2018, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/6869128>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

ZENGIN, E.; CHALAJOUR, F.; GEHLING, U. M.; ITO, W. D.; TREEDE, H.; LAUKE, H.; WEIL, J.; REICHENSPURNER, H.; KILIC, N.; ERGÜN, S. Vascular wall resident progenitor cells: A source for postnatal vasculogenesis. **Development**, vol. 133, no. 8, 2006. <https://doi.org/10.1242/dev.02315>.

ZHANG, J.; NIU, C.; YE, L.; HUANG, H.; HE, X.; TONG, W. G.; ROSS, J.; HAUG, J.; JOHNSON, T.; FENG, J. Q.; HARRIS, S.; WIEDEMANN, L. M.; MISHINA, Y.; LI, L. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, vol. 425, no. 6960, 2003. <https://doi.org/10.1038/nature02041>.

ZHAO, M.; PERRY, J. M.; MARSHALL, H.; VENKATRAMAN, A.; QIAN, P.; HE, X. C.; AHAMED, J.; LI, L. Megakaryocytes maintain homeostatic quiescence and promote post-injury regeneration of hematopoietic stem cells. **Nature Medicine**, vol. 20, no. 11, 2014. <https://doi.org/10.1038/nm.3706>.

ZHU, H.; GUO, Z. K.; JIANG, X. X.; LI, H.; WANG, X. Y.; YAO, H. Y.; ZHANG, Y.; MAO, N. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. **Nature Protocols**, vol. 5, no. 3, p. 550–560, Mar. 2010. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2009.238>. Accessed on: 28 Nov. 2021.

ZUK, P. A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P.; DE UGARTE, D. A.; HUANG, J. I.; MIZUNO, H.; ALFONSO, Z. C.; FRASER, J. K.; BENHAIM, P.; HEDRICK, M. H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, vol. 13, no. 12, 2002. <https://doi.org/10.1091/mbc.E02-02-0105>.