

Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

**EFEITO DO ÁCIDO RETINOICO NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE
CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina para obtenção do Grau de Doutor em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cruz, Ariadne Cristiane Cabral da
Efeito do ácido retinoico na diferenciação
osteogênica de células-tronco derivadas do tecido
adiposo humano / Ariadne Cristiane Cabral da Cruz ;
orientador, R Magini, 2017.
56 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. células-tronco mesenquimais.
3. osteogênese. 4. proteína óssea morfogenética tipo
2. 5. ácido retinoico. I. Magini, R. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Ariadne Cristiane Cabral da Cruz

**EFEITO DO ÁCIDO RETINOICO NA DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS-TRONCO DERIVADAS DO
TECIDO ADIPOSEO HUMANO**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 02 de junho de 2017.

Prof.^a, Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Águedo Aragonês
Biocentro

Prof.^a Dr.^a Cláudia Maria Oliveira Simões
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Glaucia dos Santos Zimmermann
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Universidade Federal de Santa Catarina

Aos meus filhos,
Pedro e João, por me permitirem
conhecer o amor tão profundamente!

AGRADECIMENTOS

DEUS, obrigada pela oportunidade de nossas existências! Obrigada por todos os ensinamentos e pelo seu infinito amor! Obrigada por sempre tentar guiar nossos passos e nossos corações!

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini, meu estimado orientador, agradeço enormemente pela oportunidade de realizar o Doutorado em Odontologia! Esse doutoramento representa possibilidades que sempre vislumbrei em minha carreira! A gratidão sempre me acompanhará por ter me permitido essa conquista e por ter confiado mais uma vez em meu trabalho!

Prof^a. Dr^a. Glauca dos Santos Zimmermann, minha amiga, obrigada por ter sido a catalisadora deste trabalho de Doutorado! Obrigada pelo estímulo, apoio e torcida para eu iniciar este Doutorado! Você foi fundamental para esta realização!

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti muito obrigada por ter me ajudado enormemente a viabilizar esse Doutorado! Seu esforço e auxílio constante tornaram realidade essa conquista! Muito obrigada!

Dr^a. Francielle Tramontini Gomes de Sousa Cardozo, minha amiga, muito obrigada pela parceria deste trabalho! Foi um enorme prazer poder fazer esta jornada ao seu lado! Você foi essencial para este Doutorado!

Agradeço enormemente ao Laboratório de Virologia da Universidade de São Paulo, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Clarisse Martins Machado, pela parceria realizada por meio da Dr^a. Francielle Tramontini Gomes de Sousa Cardozo, que viabilizou a análise das vias metabólicas envolvidas no processo de diferenciação osteogênica avaliado neste trabalho de doutoramento.

Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões, obrigada pelos seus enormes ensinamentos de outrora que ainda ecoam dentro de mim! Com certeza, os levarei sempre guardados em meu coração! Obrigada por todas as oportunidades, pela confiança e pela amizade!

Prof^a. Dr^a. Izabel Cristina Santos Almeida e Prof^a. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero muito obrigada por terem confiado em meu trabalho! Obrigada pela oportunidade deste Doutorado! Também sou grata pelo carinho, pelo estímulo e pela torcida!

José Della Pasqua Neto, meu companheiro, meu amigo, meu esposo e meu amor, obrigada por novamente aceitar as minhas escolhas e respeitar meus sonhos e ideais!

Aos meus filhos amados, Pedro e João, obrigada pela luz enviada para meu coração! Serei eternamente grata pelos seus sorrisos e pela oportunidade de vivenciar a evolução de vocês!

Aos meus pais e meus irmãos, Alceu, Mariliza, Vanessa e Thiago, obrigada pelo amor e por caminharmos juntos nessa existência!

À Silvane, funcionária do CEPID, obrigada pelo apoio e carinho!

À chefe de expediente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Ana Maria Vieira Frandolozo, obrigada pela proficiência no exercício de suas funções.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, MUITO OBRIGADA!

**"Para ser grande, Sê inteiro:
Nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa.
Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive"**

Fernando Pessoa

RESUMO

A proteína óssea morfogenética tipo 2 (BMP-2) e o ácido retinoico (RA) são fatores osteoindutivos que estimulam os mecanismos de reparo ósseo endógeno e podem ser aplicados no manejo de defeitos ósseos em cirurgias bucais e maxilofaciais. Considerando os resultados controversos do RA na osteogênese e a possibilidade de seu uso para substituir/potencializar os efeitos da BMP-2, esse estudo comparou os efeitos *in vitro* da BMP-2, do RA e da BMP-2+RA na diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) humano e avaliou as vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação. As ASCs foram tratadas a cada dois dias com meio osteogênico básico (OM) sozinho ou suplementado com BMP-2, RA ou BMP-2+RA. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi determinada usando o método do p-nitrofenolfosfato. A mineralização da matriz extracelular foi avaliada pela técnica de coloração de Von Kossa e pela quantificação do cálcio. As expressões de osteonectina e osteocalcina mRNA foram determinadas por qPCR. As proteínas Smad1, Smad4, Smad1/5/8 fosforiladas, BMP-4, e BMP-7 foram analisadas por *western blotting*. As vias de sinalização foram avaliadas pelo programa IPA®. O tratamento com RA resultou em maior atividade de ALP nos dias 7, 14, 21 e 28, enquanto a BMP-2+RA forneceu maior mineralização da matriz extracelular em 12 e 32 dias. As expressões de osteocalcina e osteonectina mRNA, bem como Smad1/5/8 fosforiladas foram maiores no grupo tratado com BMP-2+RA em 7 dias. A associação BMP-2+RA promoveu a maior sinalização da via da BMP em 7 e 14 dias. O RA e a BMP-2+RA demonstraram maior ativação da diferenciação de células formadoras de osso, comparadas com o grupo OM, enquanto a BMP-2 não apresentou essa capacidade. Assim, pode-se concluir que o RA aumentou os efeitos da BMP-2 na diferenciação osteogênica das ASCs. Tendo em vista esse achado, a possibilidade de usar a BMP-2 associada ao RA para melhorar a regeneração óssea em cirurgias orais e maxilofaciais é reforçada. Sendo importante ressaltar que, além de melhorar a osteogênese, o uso da BMP-2 combinada ao RA pode permitir o uso de doses reduzidas de BMP-2, minimizando os efeitos adversos e os custos relacionados à BMP-2.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais. Diferenciação celular. Osteogenesis. Proteína óssea morfogenética tipo 2. Ácido retinoico.

ABSTRACT

Bone morphogenetic protein type 2 (BMP-2) and retinoic acid (RA) are osteoinductive factors that stimulate endogenous mechanisms of bone repairing which might be applied on management of osseous defects in oral and maxillofacial fields. Considering the controversial results of RA on osteogenesis and its possible use to substitute/potentiate the BMP-2 effects, this study compared the outcomes of BMP-2, RA, and BMP-2+RA on in vitro osteogenic differentiation of ASCs and evaluated the signaling pathway involved in the differentiation process. ASCs were treated every other day with basic osteogenic medium (OM) alone or supplemented with BMP-2, RA, or BMP-2+RA. Alkaline phosphatase (ALP) activity was determined using the p-nitrophenol method. Extracellular matrix mineralization was evaluated by Von Kossa staining and calcium quantification. Expression of osteonectin and osteocalcin mRNA was determined by qPCR. Proteins Smad1, Smad4, phosphorylated Smad1/5/8, BMP-4, and BMP-7 were analyzed by western blotting. Signaling pathway was evaluated by IPA® software. RA treatment best stimulated ALP activity at days 7, 14, 21, and 28, while BMP-2+RA was the most active on matrix mineralization at days 12 and 32. Osteocalcin and osteonectin mRNA, and phosphorylated Smad1/5/8 protein expression were most improved by BMP-2+RA at day 7. BMP-2+RA promoted the highest BMP signaling pathway activation at days 7 and 14. RA and BMP-2+RA demonstrated more activation of differentiation of bone-forming cells than OM. In summary, RA increased the effect of BMP-2 on osteogenic differentiation of human ASCs. The possibility of using BMP-2 combined to RA to enhance the bone regeneration in oral and maxillofacial surgery is strengthened by this study. Additionally, the use of BMP-2 associated to RA may enable the use of reduced doses of BMP-2, possibly minimizing the BMP-2-induced adverse effects and cost.

Keywords: Mesenchymal stem cells. Cell differentiation. Osteogenesis. Bone morphogenetic protein 2. Retinoic acid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Avaliação da matriz extracelular	48
Figura 2 – Expressões relativas de mRNA	49
Figura 3 – Expressão de proteínas relacionadas com osteoblastos	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Via de sinalização da BMP nos dias 7, 14, 21 e 28.....	45
Tabela 2 – Funções biológicas evidenciadas pelo IPA® no dia 14.....	46
Tabela 3 – Funções biológicas evidenciadas pelo IPA® no dia 28.....	47

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	ARTIGO TRADUZIDO.....	27
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
	REFERÊNCIAS	52

1 INTRODUÇÃO

Em inúmeros casos, a reabilitação oral requer procedimentos de enxerto ósseo, seja para permitir a instalação de implantes dentários ou para melhorar as condições estéticas previamente aos procedimentos reabilitadores protéticos. O reparo de defeitos ósseos extensos, que produzem danos funcionais, estéticos e psicológicos nos pacientes, continua um grande desafio na Odontologia. As limitações do osso autógeno, como morbidade do sitio doador e quantidade limitada de material disponível, têm levado a pesquisas em busca de substitutos ósseos com as excelentes propriedades do osso autógeno sem as suas limitações (YOUNGER; CHAPMAN, 1989).

A utilização de células nas pesquisas visando a regeneração óssea tem sido uma constante. Essas células podem ser abordadas como um dos pilares da tríade de engenharia tecidual ou como uma ferramenta para avaliar o papel de substâncias osteoindutoras (KHOJASTEH et al. 2013; CRUZ et al. 2012; CRUZ et al. 2015). Dentre as células frequentemente empregada, pode-se destacar as células-tronco mesenquimais. Essas células podem ser isoladas de inúmeros tecidos, incluindo medula óssea, polpa dental, ligamento periodontal e tecido adiposo (PAREKKADAN; MILWID, 2010; ROSA; BOTERO; NÖR, 2011; SONG et al., 2007). As células-tronco derivadas do tecido adiposo (ASCs) representam uma opção celular interessante, tendo em vista que são acessível em grande número, apresentam grande potencial osteogênico, aderem e proliferaram rapidamente em condições de cultura, além de possuírem um procedimento para sua remoção pouco invasivo, especialmente quando comparado com as células-tronco da medula óssea (CRUZ et al. 2012; CRUZ et al. 2015; CRUZ et al. 2016).

As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) pertencem a superfamília do fator de crescimento transformador β (TGF- β) e foram identificadas pela sua habilidade de induzir a formação de tecido ósseo em áreas ectópicas (URIST, 1965). A BMP do tipo 2 (BMP-2) é um dos fatores de crescimento osteoindutores mais estudados e tem sido usada para a diferenciação osteogênica de células-tronco para reparo ósseo bucal e maxilofacial (ALONSO et al. 2010; WANG et al. 2014).

Além disso, a *Food and Drug Administration* aprovou o uso clínico da BMP-2 em Odontologia para procedimentos de elevação do assoalho do seio maxilar e regeneração do osso alveolar localizada. Apesar da promissora atividade da BMP-2 no reparo ósseo, esse fator de crescimento tem sido relacionado clinicamente com consideráveis efeitos adversos, incluindo formação óssea ectópica, reabsorção óssea ao redor da área implantada, renite, edema, eritema, e dor (SHAH et al. 2008; VAIDYA et al. 2007; BOYNE et al. 1997). Além disso, a BMP-2 apresenta o custo elevado. Por essas razões, as pesquisas continuam a busca por substâncias para serem empregadas como fatores osteoindutores.

O ácido retinoico (RA) é um derivado da vitamina A e desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário e na manutenção de órgãos vitais em adultos (CONAWAY et al. 2013). Alguns estudos têm mostrado que o RA está envolvido na regulação positiva de genes osteogênicos, aumento da diferenciação osteogênica de diferentes tipos celulares, incluindo células derivadas de osteosarcoma, osteoblastos, preadipócitos e células-tronco mesenquimais (SKILLINGTON et al. 2002; ZHANG et al. 2010; LIU et al. 2013; ZHANG et al. 2014). O RA também tem sido relacionado com o aumento dos efeitos da BMP-2, confirmados pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), do fator transcriptor RunX2 e da expressão de osteopontina mRNA durante a diferenciação condrocítica e osteoblástica de células murinas (WAN et al. 2006; LIU et al. 2003). Adicionalmente, Cowan et al. (2005) demonstraram que a BMP-2 associada ao RA acelera a formação óssea *in vivo*. Entretanto, os achados da literatura são bem controversos em relação aos efeitos do RA, sozinho ou associado com a BMP-2, na diferenciação osteogênica, uma vez que Wang et al. (2008) demonstraram que o RA inibe a diferenciação osteogênica de células estromais da medula óssea de ratos, Ogston et al. (2002) e Takahashi et al. (2008) mostraram uma redução na atividade da ALP decorrente da ação do RA, e Hoffman et al. (2006) verificaram que a ação da BMP envolve a atenuação da sinalização do RA.

Considerando os resultados controversos do RA na indução osteogênica e a possibilidade de usar esta substância para substituir/potencializar os efeitos da BMP-2, o propósito desse trabalho foi comparar os efeitos *in vitro* do RA e da BMP-2, sozinhos ou

associados, na diferenciação osteogênica de ASCs e avaliar as vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Comparar os efeitos da proteína óssea morfogenética tipo 2 (BMP-2), do ácido retinoico (RA) e da associação BMP-2+RA na diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ASCs) e avaliar as vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação.

2.2 Objetivos Específicos

Etapa 1 – Culturas celulares:

- Estabelecer uma cultura primária de osteoblastos humanos advindos de tecido ósseo remanescente da instalação de implantes dentários, para serem empregados como controle positivo da diferenciação osteogênica;
- Verificar a viabilidade da cultura primária de osteoblastos;
- Isolar células-tronco derivadas de tecido adiposo (ASCs) humano obtidos de procedimentos de lipoaspiração;
- Verificar a viabilidade e a proliferação das ASCs;
- Comprovar se as ASCs são células-tronco mesenquimais (MSCs), por meio de citometria de fluxo avaliando-se determinados marcadores de superfície, e através da capacidade de diferenciação em adipócitos e osteoblastos;

Etapa 2 – Ensaios de diferenciação osteogênica:

- Induzir a diferenciação osteogênica das ASCs, utilizando BMP-2, RA e a combinação de ambos;
- Cultivar as ASCs com meio osteogênico básico (grupo controle negativo) e os pré-osteoblastos murinos comercialmente disponíveis, MC3T3-E1 subclone 4 (grupo controle positivo);
- Determinar a atividade de fosfatase alcalina nos grupos avaliados;
- Avaliar a mineralização da matriz extracelular, por meio da coloração de Von Kossa e da quantificação de cálcio;

- Avaliar a expressão relativa de osteocalcina e osteonectina mRNA, por meio de qPCR;
- Avaliar a expressão das proteínas Smad1, Smad1/5/8 fosforiladas, Smad4, BMP-4, e BMP-7, empregando-se *western blotting*;

Etapa 3 – Análise das vias de sinalização:

- Determinar as vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteogênica, empregando-se o programa IPA®;
- Identificar os efeitos dos tratamentos celulares nas funções biológicas das ASCs, por meio do programa IPA®.

3 ARTIGO TRADUZIDO

O ácido retinoico coopera com a proteína óssea morfogenética do tipo 2 na diferenciação osteogênica de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano

Resumo

Objetivos: A proteína óssea morfogenética do tipo 2 (BMP-2) e o ácido retinoico (RA) são fatores osteoindutores que estimulam mecanismos endógenos de reparo ósseo que podem ser aplicados no manejo de defeitos ósseos nas áreas bucais e maxilofaciais. Considerando os resultados controversos do RA na osteogênese e seu possível uso para substituir/potencializar os efeitos da BMP-2, este estudo avaliou os resultados dos tratamentos com BMP-2, RA e BMP-2+RA na diferenciação osteogênica *in vitro* de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ASCs), bem como a(s) via(s) de sinalização envolvida(s).

Métodos: As ASCs foram tratadas todos os dias com meio osteogênico básico (OM) sozinho ou suplementado com BMP-2, RA ou BMP-2+RA. A atividade da fosfatase alcalina (ALP) foi determinada utilizando o método de p-nitrofenol. A mineralização da matriz extracelular foi avaliada por coloração de Von Kossa e quantificação de cálcio. A expressão de mRNA de osteonectina e osteocalcina foi determinada por qPCR. A expressão das proteínas Smad1, Smad4, Smad1/5/8 fosforilada, BMP-4, e BMP-7 foi analisada por *western blotting*. A via de sinalização foi avaliada pelo *software* IPA®.

Resultados: BMP-2+RA demonstrou maior expressão das proteínas Smad1/5/8 fosforiladas no dia 7 e a maior expressão de Smad4 nos dias 7, 14, 21 e 28. A expressão de mRNA de osteocalcina e osteonectina foi mais estimulada pela BMP-2+RA no dia 7. A mineralização de matriz foi melhorada pela BMP-2+RA nos dias 12 e 32. Adicionalmente, BMP-2+RA promoveu a maior ativação da via de sinalização de BMP nos dias 7 e 14 e demonstrou mais ativação da diferenciação de células formadoras de osso comparada com o grupo OM.

Conclusões: O RA aumentou o efeito da BMP-2 na diferenciação osteogênica das ASCs humanas. A possibilidade de utilização da BMP-2

combinada ao RA para melhorar a reparação óssea nas cirurgias orais e maxilofaciais é reforçada por este estudo. Adicionalmente, a utilização de BMP-2 associada ao RA pode permitir o uso de doses reduzidas de BMP-2, possivelmente minimizando os efeitos adversos induzidos por BMP-2 e os custos de tratamento.

1. Introdução

O reparo de defeitos ósseos extensos permanece um desafio na Odontologia. Devido aos inconvenientes dos materiais de enxerto ósseo disponíveis, os cientistas têm procurado novas substâncias e combinações para serem usadas como fatores osteoindutores. As proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) pertencem a super-família do fator de crescimento transformador β (TGF- β) e foram inicialmente identificadas pela sua capacidade de induzir a formação óssea ectópica [1]. A BMP tipo 2 (BMP-2) é um dos fatores osteoindutores mais estudados que tem sido utilizado para diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais para reparos ósseos nas áreas de cirurgia bucais e maxilofaciais. No entanto, juntamente com seu alto custo, o uso de BMP-2 tem sido associado a efeitos adversos, incluindo inchaço substancial, eritema e dor [4 - 6].

O ácido retinoico (RA) é um composto derivado da vitamina A que desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário e na manutenção de órgãos vitais em adultos [7]. Alguns estudos *in vitro* têm demonstrado que o RA está envolvido na regulação de genes osteogênicos, aumentando a diferenciação osteogênica de diferentes tipos de células, incluindo células derivadas de osteossarcoma, osteoblastos, pré-adipócitos e células-tronco mesenquimais [8-11]. O RA também tem sido relacionado com o aumento dos efeitos da BMP-2 através do aumento da atividade da fosfatase alcalina (ALP), do fator de transcrição RunX2 e da expressão do RNAm da osteopontina durante a diferenciação condrocítica e osteoblástica de células murinas [12,13]. Além disso, Cowan et al. [14] demonstraram que a BMP-2 associada ao RA acelera a formação óssea *in vivo*. No entanto, os resultados do RA, isolados ou associados à BMP-2, sobre a diferenciação osteogênica são controversos, uma vez que Wang et al. [15] demonstraram que o RA inibe a diferenciação osteogênica de células-tronco da medula óssea de ratos, Ogston et al. [16] e Takahashi

et al. [17] mostraram uma redução na atividade de ALP pelo RA, e Hoffman et al. [18] verificaram que a ação de BMP envolve a atenuação da sinalização de RA. Considerando os resultados controversos do RA sobre a indução osteogênica e seu possível uso para substituir/potencializar os efeitos da BMP-2, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos do RA e da BMP-2, isolados ou associados, na diferenciação osteogênica *in vitro* de células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (ASCs) e as vias de sinalização envolvidas no processo de diferenciação.

2. Materiais e Métodos

Reagentes

Antibióticos/antifúngicos (PSA) foram adquiridos da Cultilab (São Paulo, SP, Brasil). Foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) ácido ascórbico, β -glicerofosfato, BMP-2, eosina, paraformaldeído, fosfato de p-nitrofenol (pNPP), nitrato de prata e tripsina. O meio essencial mínimo de Eagle (α MEM modificado) e o meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) foram adquiridos da Nutricell (São Paulo, SP, Brasil). DNase, soro bovino fetal (FBS), SuperScript III e Trizol foram adquiridos da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). O kit de ensaio de cálcio foi obtido da BioAssay Systems (Hayward, CA, EUA). SYBR[®] Green PCR Master Mix foi adquirido da Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EUA). As membranas Immobilon-P e os anticorpos anti - β -actina (04-1116), -Smad1 (05-1459), -Smad1/5/8 fosforiladas (AB3848), -Smad4 (04-1033), -BMP-4 (MAB1049), -BMP-7 (MAB4350), -coelho, e -camundongo foram obtidos da Millipore (Danvers, MA, EUA). O Kit de quimioluminescência Pierce ECL foi adquirido da Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA). Todos os produtos químicos foram de grau analítico.

2.1 Condições de isolamento e de cultura das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano (ASCs)

A aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina e o consentimento por escrito dos participantes foram obtidos antes do início deste estudo (N ° 194/06 para ASCs e N ° 568/10 para osteoblastos). Os

tecidos lipoaspirados humanos de pacientes com saúde (idade média de 21 anos), com índices de massa corpórea normais, não fumantes e não tomando qualquer medicação, foram processados para isolar ASCs, como descrito anteriormente [19]. As ASCs foram mantidas a níveis sub-confluentes e utilizadas na passagem 3 para todos os experimentos. As ASCs foram tratadas todos os dias, de acordo com os grupos: OM - meio osteogênico (DMEM, 10% FBS, 1% PSA, 250 μ M ascorbato e 10 mM β -glicerofosfato); BMP-2 - OM e 50 ng/mL BMP-2; RA - OM e 2,5 μ M ácido trans-retinoico (RA); BMP-2+RA - OM, 50 ng/mL BMP-2, e 2,5 μ M RA [12]. Osteoblastos humanos isolados de biópsias do osso cortical mandibular [20] foram mantidos em OM e utilizados na passagem 6 como controle positivo em experimentos de qPCR. Utilizaram-se subclone 4 de pré-osteoblastos MC3T3-E1 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EUA) como controles positivos na atividade de ALP, mineralização de matriz e ensaios de *western blotting*. As células MC3T3-E1 foram cultivadas de acordo com as recomendações do fornecedor em α MEM modificado com 5 μ M ascorbato e 10 mM β -glicerofosfato.

A imunofenotipagem e a diferenciação multilinhagem de ASCs foram realizadas para confirmar as características de células-tronco mesenquimais, como descrito anteriormente [19].

2.2 Determinação da atividade da fosfatase alcalina

ASCs e MC3T3-E1 ($9,4 \times 10^4$ células/cavidade) foram cultivadas em placas de 24 cavidades durante 7, 14, 21 e 28 dias. A atividade de ALP foi determinada pela liberação de *p*-nitrofenol (*p*NP) a partir do *p*-nitrofenofosfato (*p*NPP) como descrito anteriormente [20]. A atividade de ALP foi calculada a partir de uma curva padrão de *p*NP e todos os valores foram normalizados contra a concentração de proteína total determinada pelo método de Lowry [21].

2.3 Avaliação da mineralização da matriz

A coloração de Von Kossa foi aplicada para detectar a presença de fosfato, indicador de mineralização da matriz extracelular. ASCs e MC3T3-E1 (2×10^4 células/cavidade) foram cultivadas em placas de 96 cavidades durante 21 dias. As células foram fixadas durante 1 hora com paraformaldeído aquoso a 3% (v / v), coradas com 1% (p / v) de nitrato

de prata sob exposição à luz durante 1 hora e contra-coradas com eosina [20].

O cálcio total foi quantificado nas ASCs e MC3T3-E1 (2×10^4 células/cavidade), cultivadas em placas de 96 cavidades por 5, 12, 23 e 32 dias, utilizando um kit de ensaio de cálcio [20].

2.4 qPCR

As ASCs e os osteoblastos humanos ($9,4 \times 10^4$ células/cavidade) foram cultivados em placas de 24 cavidade durante 7, 14, 21 e 28 dias. O RNA total foi isolado utilizando reagente Trizol[®], de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de RNA foi estimada por NanoVue (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, Reino Unido). Utilizaram-se apenas amostras com uma razão de densidade óptica a 260 nm / 280 nm superior a 1,8. Após o tratamento com DNase, o RNA total (1 µg) foi transcrito em cDNA utilizando iniciadores oligo dT e SuperScript, de acordo com as instruções do fabricante. As amplificações por PCR foram realizadas numa mistura reacional de 20 µL contendo 10 ng de cDNA, 50 nM de iniciadores e 10 µL de Power SYBR1 Green PCR Master Mix. Utilizou-se o método do limiar de ciclo comparativo (Ct) para quantificar as alterações na expressão do gene da osteocalcina e da osteonectina entre o controle (osteoblastos humanos) e as ASCs tratadas. A variação nos níveis de transcrição foi calculada de acordo com o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, em que $\Delta\Delta Ct = (\text{controle de Ct}) - (\text{tratamento de } \Delta Ct)$ e $\Delta Ct = (\text{gene alvo de Ct}) - (\text{controle interno de Ct, 18s ribossômicos})$. Utilizaram-se os seguintes iniciadores: Expressão relativa de mRNA de osteocalcina: 5'-AGGGCAGCGAGGTAGTGAAG-3 '(forward); 5'-AACTCGTCACAGTCCGGATTG-3 '(reverse). Expressão de mRNA de osteonectina: 5'-CGGGTGAAGAAGATCCATGAG-3 '(forward); 5'-CTGCCAGTGTACAGGGAAGATG-3 '(reverse).

2.5 Western blotting

As ASCs e os MC3T3-E1 ($9,4 \times 10^4$ células/cavidade) foram cultivadas em placas de 24 cavidade durante 7, 14, 21 e 28 dias. As amostras (5 µg de proteína) foram separadas por eletroforese num gel SDS / poliacrilamida e transferidas para membranas Immobilon-P (Millipore, Danvers, MA, EUA). Após bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite com anticorpos anti-Smad1 (05-1459, 1: 500), ou -

Smad4 (04-1033, 1: 1000), ou -Smad1/5/8 (AB3848, 1: 500) ou -BMP-4 (MAB1045, 1: 500) ou -BMP-7 (MAB4350, 2 ug / ml) ou β -actina (04-1116, 1: 2000). Após incubação com cada anticorpo secundário correspondente, utilizou-se o substrato Enhanced quimioluminescência Pierce ECL para detecção, de acordo com o protocolo do fabricante. A expressão de cada proteína foi normalizada contra a β -actina. As intensidades de banda foram quantificadas utilizando o *software* ImageJ (National Institute of Health, EUA).

2.6 Análise de vias de sinalização

Os dados de quantificação de cálcio, expressão e atividade das proteínas (ALP, Smad1, Smad4, Smad1/5/8 fosforiladas, BMP4 e BMP7) e expressão dos mRNAs (osteonectina e osteocalcina), designados como analitos, foram analisados utilizando o *software Ingenuity Pathways Analysis* (IPA[®], QIAGEN Redwood City, www.ingenuity.com) para determinar as vias celulares e as funções biológicas impactadas pela suplementação de BMP-2, RA ou BMP2+RA em todos os períodos experimentais avaliados. Todos os analitos com os respectivos valores de quantificação, ID de gene e valores de p foram carregados na aplicação para executar a análise de IPA-core. Analisadores globais desregulados (regulados positivamente e regulados negativamente, ambos juntos) foram analisados. Os grupos foram comparados entre si (concebidos como observação) por dobra de alteração dos níveis de analito. Os resultados identificaram as vias canônicas e funções biológicas que foram mais significativas para o conjunto de dados. O teste exato de Fisher foi usado para calcular um valor de p que determinou a probabilidade de que cada via ou função biológica atribuída a esse conjunto de dados seja devida ao acaso. A previsão de ativação ou inibição de uma via canônica ou função biológica foi baseada na pontuação z . O IPA[®] calcula automaticamente os escores z baseados em analitos expressos diferencialmente em nosso conjunto de dados e as informações armazenadas na Base de Conhecimento da *Ingenuity* [22,23].

2.7 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicado para confirmar a reprodutibilidade dos resultados. A avaliação estatística foi realizada com *Graph Pad Software Inc.* (San Diego, CA, EUA). Os resultados da

atividade de ALP, quantificação de cálcio, expressão relativa de RNAm e quantificação de proteínas de todos os grupos foram comparados através de análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste post hoc de Tukey. As diferenças entre os conjuntos de dados com $p < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significativas. As análises estatísticas foram realizadas comparando todos os tratamentos em cada tempo experimental separadamente.

3. Resultados

Os resultados de ALP, mineralização de matriz, qPCR e *western blotting* dos grupos OM, BMP-2 e MC3T3-E1 foram publicados anteriormente [20]. No entanto, dada a importância desses grupos de controle, incluímos seus resultados no presente estudo para facilitar as comparações.

3.1 RA aumentou a atividade de ALP

A atividade de ALP atingiu um pico para todos os grupos no dia 7, com o MC3T3-E1 mostrando a maior quantificação. O RA promoveu a maior atividade de ALP em todos os períodos experimentais (dias 7, 14, 21 e 28) ($p < 0,001$) em comparação com os tratamentos BMP-2 e BMP-2+RA (Figura 1A).

3.2 BMP-2+RA aumentou a deposição de cálcio na matriz extracelular

A coloração com Von Kossa revelou que todos os grupos exibiram uma mineralização de matriz extracelular detectável no dia 21 (Figura 1B1-B5).

A quantificação de cálcio não mostrou deposição detectável na matriz extracelular no dia 5 (dados não apresentados). No dia 12, o controle MC3T3-E1 mostrou a maior produção de cálcio enquanto que entre os grupos testados, o tratamento com BMP-2+RA promoveu os níveis de cálcio mais elevados ($p < 0,0001$). Ao dia 23, OM, BMP-2 e MC3T3-E1 demonstraram níveis de cálcio semelhantes, que foram significativamente aumentados em comparação com os grupos RA ou BMP-2+RA ($p < 0,0001$). No dia 32, o grupo BMP-2+RA exibiu os níveis mais elevados de cálcio em comparação com os grupos teste e controle ($p < 0,0005$) (Figura 1C).

3.3 BMP-2+RA aumentou a expressão relativa de mRNA da osteocalcina e osteonectina

No dia 7, BMP-2+RA mostrou os níveis mais elevados de expressão da osteocalcina ($p = 0,0042$) e da osteonectina ($p = 0,0030$). Não houve diferença na expressão de RNAm da osteocalcina e da osteonectina entre todos os grupos nos dias 14 ($p = 0,3317$; $p = 0,0983$, respectivamente), 21 ($p = 0,1154$, $p = 0,4422$, respectivamente) e 28 ($p = 0,7041$; $p = 0,2414$, respectivamente) (Figura 2A e Figura 2B).

3.4 Expressão de proteínas relacionadas aos osteoblastos

A Figura 3 mostra que, no dia 7, o grupo tratado com BMP-2 expressou o maior nível de Smad1, seguido pelos grupos RA, BMP-2+RA, OM e MC3T3-E1 ($p < 0,0001$). No dia 14, a expressão mais elevada foi demonstrada pela BMP-2, seguida por MC3T3-E1, BMP-2+RA, RA e OM ($p < 0,0001$). No dia 21, a BMP-2 apresentou a maior expressão de Smad1, seguida por RA, OM, BMP-2+RA e MC3T3-E1 ($p < 0,0001$). Finalmente, RA demonstrou a expressão mais elevada no dia 28, seguida por BMP-2+RA, MC3T3-E1, BMP-2 e OM ($p < 0,0001$).

Em relação a Smad4, as células do controle MC3T3-E1 demonstraram os níveis de expressão mais elevados, seguidos por ASCs tratados com BMP-2+RA, BMP-2, OM e RA ($p < 0,0001$) no dia 7. No dia 14, BMP-2+RA apresentou os maiores níveis de expressão, seguido por BMP-2, RA, MC3T3-E1 e OM ($p < 0,0001$). No dia 21, o MC3T3-E1 apresentou o maior nível de expressão seguido pelos tratamentos com BMP-2+RA, OM, RA e BMP-2 ($p < 0,0001$). No dia 28, o grupo BMP-2 + RA mostrou a maior expressão de Smad4, seguida dos grupos MC3T3-E1, RA, OM e BMP-2 ($p < 0,0001$).

O MC3T3-E1 exibiu a expressão mais elevada de Smad1/5/8 fosforiladas nos dias 7 e 14 ($p < 0,0001$). Entre os grupos teste, BMP-2+RA expressou mais destas proteínas no dia 7, seguido por RA ($p < 0,0001$). No dia 14, o tratamento com RA induziu a maior expressão de Smad1/5/8 fosforiladas, seguido por BMP-2+RA ($p < 0,0001$). Não houve expressão destas proteínas no grupo OM, no dia 7, e no grupo BMP-2 aos dias 7 e 14. No dia 21, o tratamento com RA exibiu os níveis mais elevados de Smad1/5/8 mais fosforiladas, seguidos por BMP-2 e OM ($p < 0,0001$), enquanto que não foi observada expressão nos grupos BMP-2+RA e MC3T3-E1. Estas Smads fosforiladas não foram detectados em nenhum grupo no dia 28.

Considerando-se a BMP-4, nenhum grupo foi capaz de expressar este fator de crescimento no dia 7. No dia 14, a BMP-2 demonstrou o nível mais elevado de BMP-4, seguido por RA, BMP-2+RA, MC3T3-E1 e OM ($p < 0,0001$). No dia 21, o grupo OM exibiu a expressão mais elevada de BMP-4, seguido pelos grupos BMP-2+RA, BMP-2 e RA ($p < 0,0001$). O tratamento com OM demonstrou o maior nível de BMP-4, seguido por RA, BMP-2, MC3T3-E1 e BMP-2 + RA ao dia 28 ($p < 0,0001$).

No dia 7, o grupo tratado com BMP-2 expressou a quantidade de BMP-7 mais elevada, seguida pelos grupos BMP-2+RA, RA, OM e MC3T3-E1 ($p < 0,0001$). A expressão mais elevada de BMP-7 foi exibida por MC3T3-E1, seguida por BMP-2, RA, OM e BMP-2+RA ao dia 14 ($p < 0,0001$). No dia 21, BMP-2 demonstrou a maior expressão de BMP-7, seguida pelos grupos BMP-2+RA, RA, MC3T3-E1 e OM ($p < 0,0001$). Finalmente, a RA mostrou a expressão mais elevada no dia 28, seguida por OM, BMP-2, MC3T3-E1 e BMP-2+RA ($p < 0,0001$).

3.5 Análise de vias de sinalização

A análise de IPA[®] indicou que a sinalização da BMP foi a principal via envolvida no processo de diferenciação osteogênica *in vitro* observado, com grandes alterações ocorrendo especialmente nos dias 14 e 21 (tabela 1). A diferenciação osteogênica atingiu um pico no dia 14 para o grupo do controle positivo (MC3T3-E1). Comparando-se ao controle negativo (OM), BMP-2+RA, BMP-2 e RA promoveram a regulação positiva da via de sinalização da BMP no dia 14. Nos dias 7, 14 e 21, o tratamento com BMP-2 induziu mais fortemente a via de sinalização da BMP comparada com o tratamento com RA. Em geral, entre os grupos testados, a combinação BMP-2+RA induziu ativamente a sinalização da BMP na maioria dos períodos experimentais (dias 7, 14 e 28).

Além da identificação da via de sinalização envolvida na diferenciação osteogênica, a análise do IPA[®] sugeriu as funções biológicas influenciadas pelos tratamentos (tabelas 2-3). De acordo com estes resultados, o MC3T3-E1, RA e BMP-2+RA aumentaram a diferenciação de células formadoras de osso em comparação com OM no dia 14. Além disso, MC3T3-E1 e RA aumentaram a proliferação de células sanguíneas em comparação com OM, e RA aumentou a migração de células em comparação com OM. MC3T3-E1, BMP-2 e RA aumentaram a quantidade de células quando comparadas com OM. Ainda neste momento, RA pareceu aumentar a sobrevivência celular em

comparação com OM, enquanto que a BMP-2 aumentou a apoptose e a função de necrose em comparação com RA. Ao dia 28, a BMP-2 diminuiu a sobrevivência celular e a função de viabilidade das células em comparação com a AR.

4. Discussão

Apesar dos esforços, a reparação óssea continua sendo um desafio em muitos casos de cirurgias orais e maxilofaciais. A BMP-2 tem sido clinicamente aplicada para estimular a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais e promover a reparação óssea. Além do alto custo da BMP-2, seu uso tem sido relacionado com efeitos adversos [4-6]. Em decorrência da possível utilização do RA para substituir e/ou potencializar os efeitos da BMP-2, este estudo comparou os resultados da BMP-2, RA e BMP-2+RA na diferenciação osteogênica *in vitro* de ASCs e avaliou a(s) via(s) de sinalização envolvida(s) no processo de diferenciação. Entre os grupos, o RA demonstrou maior estímulo na atividade de ALP nos dias 7, 14, 21 e 28. A BMP-2+RA promoveu maior estímulo na mineralização da matriz nos dias 12 e 32; maior expressão de mRNA da osteocalcina e osteonectina no dia 7; maior expressão de Smad4 nos dias 7, 14, 21 e 28; e maior expressão de Smad1/5/8 fosforiladas no dia 7. Além disso, a BMP-2+RA promoveu a ativação da via de sinalização da BMP mais elevada nos dias 7 e 14. Da mesma maneira, no dia 14, os tratamentos com RA e BMP-2+RA aumentaram a ativação da diferenciação de células formadoras de osso em comparação com OM, enquanto que a BMP-2 isoladamente não demonstrou essa capacidade.

Estes resultados aumentam a possibilidade de utilizar RA combinado com BMP-2 para aumentar a diferenciação osteogênica. De acordo com nossos resultados, Wan et al. [12] observaram o aumento da diferenciação osteogênica de ASCs com a associação BMP-2 e RA. Li et al. [13] observaram que o RA estimula a diferenciação dos condrócitos e aumenta os efeitos da BMP. Cowan et al. [14] demonstraram que a BMP-2 associada ao RA acelera a formação óssea *in vivo*. Por outro lado, Hoffman et al. [18] verificaram que a ação da BMP envolve a atenuação da sinalização de AR.

O RA apresentou uma atividade ALP mais elevada do que a BMP-2 e a BMP-2+RA em todos os períodos experimentais, e que as células

MC3T3-E1 (controle positivo) na maior parte dos períodos avaliados. Skillington et al. [8] e Yu et al. [24] também demonstraram que o RA estimula a atividade de ALP. Inversamente, Ogston et al. [16], Takahashi et al. [17] e Bosetti et al. [25] não observaram esta estimulação na atividade de ALP pelo RA. Existem alguns relatos que descrevem a potencialização entre RA e BMP-2 na atividade ALP [8,12,26]. Aqui não foi observada esta potenciação.

Realizamos a coloração de Von Kossa para avaliar a diferenciação osteogênica. Nesta técnica, o corante reage com o fosfato na presença de material ácido e não reage com o cálcio. Apesar deste método ser utilizado em várias publicações científicas, este não é um teste sensível para avaliar a mineralização. Por essa razão, também quantificamos o cálcio na matriz extracelular [27]. De acordo com outros estudos [9,12], BMP-2 e RA potenciaram os efeitos uns dos outros sobre a secreção de cálcio. Adicionalmente, no pico de deposição mineral (dia 32), a concentração de cálcio no grupo BMP-2+RA foi maior do que o controle positivo (MC3T3-E1). Esta cooperação pode ser devida à inibição da diferenciação dos adipócitos, como afirmado por Skillington et al. [8]. Em contraste, Bi et al. [26] observaram mineralização de matriz adicional promovida pela BMP em relação à BMP associada ao RA.

Osteocalcina e osteonectina são importantes componentes da matriz óssea não colágena, considerados marcadores de mineralização osteoblástica [28]. Nossos resultados demonstraram que a BMP-2+RA estimulou a expressão de mRNA da osteonectina e osteocalcina no dia 7. Esta estimulação precoce de mRNA da osteocalcina e osteonectina poderia ser relacionada à maior mineralização na matriz extracelular promovida pela associação de BMP-2 e AR, apesar da baixa atividade de ALP observada neste grupo. Skillington et al. [8] estudando pré-adipócitos observaram que a BMP-2, sozinha ou associada com RA, não foi capaz de induzir nem a expressão de mRNA de osteocalcina nem mineralização da matriz extracelular. Wang et al. [15] estudando células de estroma da medula óssea verificaram que o tratamento com RA não aumentou a expressão de mRNA da osteonectina. Por outro lado, Yu et al. [24] e Yan et al. [29] verificaram que o RA estimulou a expressão de osteocalcina mRNA. Bi et al. [26] demonstraram menor expressão de osteocalcina em células tratadas com RA associada a BMP-2/7 em comparação com células tratadas apenas com BMP-2/7.

Estes achados diferentes poderiam ser devidos aos diferentes tipos de células analisadas.

Além de avaliar a diferenciação osteogênica de ASCs, estudamos o efeito de diferentes tratamentos na expressão de Smads. As ASCs tratadas com BMP-2+RA mostraram maior expressão de Smad4 do que as células tratadas com BMP-2 ou RA isoladamente. Inversamente, as ASCs tratadas com BMP-2 exibiram maior expressão de Smad1 do que o RA sozinho ou associado com BMP-2. No entanto, a análise de Smad1/5/8 fosforiladas é muito mais importante do que Smad1, uma vez que a fosforilação indica a ativação destas proteínas. Demonstramos que a BMP-2+RA regulou as expressões de Smad1/5/8 fosforiladas no início do processo de diferenciação. Além disso, as ASC tratados com BMP-2+RA demonstraram um padrão de expressão semelhante ao MC3T3-E1 (controle positivo), descontinuando a expressão de Smads fosforiladas a partir do dia 21, o que pode estar relacionado com um comprometimento de linhagem de osteoblastos. Estes resultados corroboram que o mecanismo molecular de sinalização entre o RA e a BMP é a via de sinalização da BMP, como indicado pela análise IPA®.

A interpretação da diferenciação osteogênica com base na análise de marcadores osteogênicos separadamente é muito desafiadora, devido à dificuldade de entender e correlacionar todos os resultados com o processo de diferenciação como um todo. No presente trabalho, aplicamos o *software* IPA® para determinar as vias de sinalização envolvidas na diferenciação osteogênica e avaliar o processo de forma mais abrangente. O IPA® calcula a probabilidade de que os analitos estejam envolvidos em percursos particulares e compare com o número total de ocorrências desses analitos em todas as anotações de função armazenadas na Base de Conhecimento do Ingenuity. Demonstramos que, tanto o RA quanto a BMP-2, isoladamente ou em associação, usaram a via de sinalização da BMP para diferenciação osteogênica, de acordo com Yang et al. [30]. Adams et al. [31] demonstraram que o RA parecia estimular a transcrição do gene de colágeno do tipo-X, em parte estimulando a via de sinalização da BMP e em parte através de mecanismos independentes da BMP. Liu et al. [11] observaram que a osteogênese modulada pelo RA ocorre por meio da via de sinalização Wnt / β -catenina. Por outro lado, Sheng et al. [32] propuseram que o RA aumenta a interação entre Smad1 fosforilada e

sua ubiquitina E3 ligases, resultando na ubiquitinação da Smad1 fosforilada e na degradação proteasomal, sugerindo um mecanismo pelo qual o RA suprime a sinalização da BMP/Smad. Estes resultados diferentes podem resultar do fato de que a sinalização da BMP é de tipo celular específico e dependente de contexto celular, uma vez que Yang et al. [30] estudaram células de osteossarcoma 143B, Adams et al. [31] avaliaram condrócitos de esternos de pintos embrionários, Liu et al. [11] empregaram pré-adipócitos 3-T3-L1, e Sheng et al. [32] avaliaram células P19C6, um subclone do carcinoma embrionário de camundongo.

Observou-se também que a BMP-2+RA regulou positivamente a via de sinalização da BMP em relação aos tratamentos BMP-2 e RA nos dias 7 e 14. Inversamente, ao dia 21, BMP-2 e RA regularam positivamente a via de sinalização da BMP comparado com BMP-2+RA. A razão para este achado é possivelmente relacionada com o comprometimento precoce da linhagem osteoblástica de ASCs sob tratamento com BMP-2+RA, descontinuando a expressão de marcadores osteogênicos, similarmente ao que sugerimos nos achados das Smads fosforiladas. De acordo com os resultados do IPA[®], os tratamentos com RA e BMP-2+RA aumentaram a ativação da diferenciação de células formadoras de osso em relação ao controle negativo (OM), enquanto que BMP-2 não demonstrou essa capacidade. Já foi observado anteriormente que a adição de BMP-2 ao ascorbato e β -glicerofosfato não aumentou a diferenciação osteogênica de ASCs humanas [33], de acordo com outros relatos [33, 34]. A indução osteogênica promovida por BMP-4 e BMP-7 endógenas produzidas pelas ASCs também no grupo OM poderia ser uma explicação possível para este achado. Em outras palavras, a BMP-4 e BMP-7 endógenas associadas ao ascorbato e ao β -glicerofosfato poderiam resultar em uma diferenciação osteogênica similar as ASCs tratados com BMP-2 exógena.

5. Conclusões

Os resultados indicam que a BMP-2+RA melhor induziu a diferenciação osteogênica de ASCs humanas. Este achado fortalece a possibilidade de usar a BMP-2 combinada ao RA para melhorar a reparação óssea em cirurgias orais e maxilofaciais. Adicionalmente, esta associação pode permitir o uso de doses reduzidas de BMP-2, possivelmente

minimizando os efeitos adversos induzidos pela BMP-2 e os custos do tratamento. Devem ser realizados futuros experimentos que avaliem a capacidade da BMP-2 combinada com o RA para melhorar a reparação óssea em animais, sendo necessária também mais investigações para determinar os mecanismos de sinergia entre BMP-2 e RA na reparação óssea.

Conflito de interesse e fonte de financiamento

Este trabalho foi parcialmente apoiado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia / SEBRAE / FINEP (outorga 23080.039510 / 2007-12). Os autores não têm relações financeiras relacionadas a quaisquer produtos envolvidos neste estudo. Os autores negam conflitos de interesse neste estudo.

References

- [1] M.R. Urist, Bone: Formation by autoinduction, *Science* (80-.). 150 (1965) 893–899. doi:10.1007/978-1-4471-5451-8_114.
- [2] N. Alonso, D.Y. Tanikawa, R. da S. Freitas, L. Canan Jr, T.O. Ozawa, D.L. Rocha, Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients, *Tissue Eng Part C Methods*. 16 (2010) 1183–1189.
- [3] W.G. Wang J, Guo J, Liu J, Wei L, BMP-functionalised coatings to promote osteogenesis for orthopaedic implants, *Int J Mol Sci*. 15 (2014) 10150–10168.
- [4] M.M. Shah, M.D. Smyth, A.S. Woo, Adverse facial edema associated with off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cranial reconstruction for craniosynostosis, *J. Neurosurg. Pediatr*. 1 (2008) 255–257. doi:10.3171/PED/2008/1/3/255.
- [5] P.J. Boyne, R.E. Marx, M. Nevins, G. Triplett, E. Lazaro, L.C. Lilly, M. Alder, P. Nummikoski, A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation., *Int. J. Periodontics Restorative Dent*. 17 (1997) 11–25.
- [6] R. Vaidya, J. Carp, A. Sethi, S. Bartol, J. Craig, C.M. Les, Complications of anterior cervical discectomy and fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Eur. Spine J*. 16 (2007) 1257–1265. doi:10.1007/s00586-007-0351-9.

- [7] H.H. Conaway, P. Henning, U.H. Lerner, Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis, *Endocr Rev.* 34 (2013) 766–797.
- [8] J. Skillington, L. Choy, R. Derynck, Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes, *J Cell Biol.* 159 (2002) 135–146.
- [9] W. Zhang, Z.-L. Deng, L. Chen, G.-W. Zuo, Q. Luo, Q. Shi, B.-Q. Zhang, E.R. Wagner, F. Rastegar, S.H. Kim, W. Jiang, J. Shen, E. Huang, Y. Gao, J.-L. Gao, J.-Z. Zhou, J. Luo, J. Huang, X. Luo, Y. Bi, Y. Su, K. Yang, H. Liu, H.H. Luu, R.C. Haydon, T.-C. He, B.-C. He, Retinoic Acids Potentiate BMP9-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells, *PLoS One.* 5 (2010) e11917. doi:10.1371/journal.pone.0011917.
- [10] L. Zhang, Q. Zhou, N. Zhang, W. Li, M. Ying, W.-J. Ding, B. Yang, Q. He, E2F1 impairs all-trans retinoic acid-induced osteogenic differentiation of osteosarcoma via promoting ubiquitination-mediated degradation of RAR α , *Cell Cycle.* 13 (2014) 1277–1287. doi:10.4161/cc.28190.
- [11] Y. Liu, Y. Liu, R. Zhang, X. Wang, F. Huang, Z. Yan, M. Nie, J. Huang, Y. Wang, Y. Wang, L. Chen, L. Yin, B. He, Z. Deng, All-trans retinoic acid modulates bone morphogenetic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/ β -catenin signaling pathways., *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 47 (2014) 47–56. doi:10.1016/j.biocel.2013.11.018.
- [12] D.C. Wan, Y.-Y. Shi, R.P. Nacamuli, N. Quarto, K.M. Lyons, M.T. Longaker, Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 12335–40. doi:10.1073/pnas.0604849103.
- [13] X. Li, E.M. Schwarz, M.J. Zuscik, R.N. Rosier, A.M. Ionescu, J.E. Puzas, H. Drissi, T.-J. Sheu, R.J. O’Keefe, Retinoic Acid Stimulates Chondrocyte Differentiation and Enhances Bone Morphogenetic Protein Effects through Induction of Smad1 and Smad5, *Endocrinology.* 144 (2003) 2514–2523. doi:10.1210/en.2002-220969.
- [14] C.M. Cowan, O.O. Aalami, Y.-Y. Shi, Y.-F. Chou, C. Mari, R. Thomas, N. Quarto, R.P. Nacamuli, C.H. Contag, B. Wu, M.T. Longaker, Bone Morphogenetic Protein 2 and Retinoic Acid Accelerate *in Vivo* Bone Formation, Osteoclast Recruitment, and Bone Turnover, *Tissue Eng.* 11 (2005) 645–658. doi:10.1089/ten.2005.11.645.

- [15] A. Wang, X. Ding, S. Sheng, Z. Yao, Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375 (2008) 435–9. doi:10.1016/j.bbrc.2008.08.036.
- [16] N. Ogston, A. Harrison, H.F. Cheung, B. Ashton, G. Hampson, Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics, *Steroids*. 67 (2002) 895–906. doi:10.1016/S0039-128X(02)00054-5.
- [17] T. Takahashi, N. Kamiya, N. Kawabata, M. Takagi, The effect of retinoic acid on a zinc finger transcription factor, AJ18, during differentiation of a rat clonal preosteoblastic cell line, ROB-C20, into osteoblasts, *Arch. Oral Biol.* 53 (2008) 87–94. doi:10.1016/j.archoralbio.2007.07.007.
- [18] L.M. Hoffman, K. Garcha, K. Karamboulas, M.F. Cowan, L.M. Drysdale, W.A. Horton, T.M. Underhill, BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling, *J. Cell Biol.* 174 (2006).
- [19] A.C.C. Cruz, T. Caon, Á. Menin, R. Granato, F. Boabaid, C.M.O. Simões, Adipose-derived stem cells incorporated into platelet-rich plasma improved bone regeneration and maturation in vivo, *Dent. Traumatol.* 31 (2015) 42–48. doi:10.1111/edt.12134.
- [20] A.C. Cruz, M.L. Silva, T. Caon, C.M. Simoes, Addition of bone morphogenetic protein type 2 to ascorbate and beta-glycerophosphate supplementation did not enhance osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells, *J Appl Oral Sci.* 20 (2012) 628–635.
- [21] O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall, Protein measurement with the folin phenol reagent, *J Biol Chem.* 193 (1951) 265–275.
- [22] R. Rai, S.K. Chauhan, V.V. Singh, M. Rai, G. Rai, RNA-seq Analysis Reveals Unique Transcriptome Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Distinct Autoantibody Specificities, *PLoS One.* 11 (2016) e0166312. doi:10.1371/journal.pone.0166312.
- [23] N. Mullapudi, B. Ye, M. Suzuki, M. Fazzari, W. Han, M.K. Shi, G. Marquardt, J. Lin, T. Wang, S. Keller, C. Zhu, J.D. Locker, S.D. Spivack, Genome Wide Methylome Alterations in Lung Cancer, *PLoS One.* 10 (2015) e0143826. doi:10.1371/journal.pone.0143826.
- [24] Y. Yu, L. Al-Mansoori, M. Opas, Optimized osteogenic differentiation protocol from R1 mouse embryonic stem cells in

- vitro., *Differentiation*. 89 (2015) 1–10.
doi:10.1016/j.diff.2014.12.003.
- [25] M. Bosetti, M. Sabbatini, A. Calarco, A. Borrone, G. Peluso, M. Cannas, Effect of retinoic acid and vitamin D3 on osteoblast differentiation and activity in aging, *J. Bone Miner. Metab.* 34 (2016) 65–78. doi:10.1007/s00774-014-0642-2.
- [26] W. Bi, Z. Gu, Y. Zheng, L. Wang, J. Guo, G. Wu, Antagonistic and synergistic effects of bone morphogenetic protein 2/7 and all-trans retinoic acid on the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells, *Dev. Growth Differ.* 55 (2013) 744–754. doi:10.1111/dgd.12090.
- [27] L.F. Bonewald, S.E. Harris, J. Rosser, M.R. Dallas, S.L. Dallas, N.P. Camacho, B. Boyan, A. Boskey, Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation, *Calcif. Tissue Int.* 72 (2003) 537–547. doi:10.1007/s00223-002-1057-y.
- [28] S. Ivanovski, H.R. Haase, P.M. Bartold, Expression of Bone Matrix Protein mRNAs by Primary and Cloned Cultures of the Regenerative Phenotype of Human Periodontal Fibroblasts, *J Dent Res.* 80 (2001) 1665–1671. <http://www.dentalresearch.org>. (accessed January 24, 2017).
- [29] Q. Yan, Y. Li, N. Cheng, W. Sun, B. Shi, Effect of retinoic acid on the function of lipopolysaccharide-stimulated bone marrow stromal cells grown on titanium surfaces, *Inflamm. Res.* 64 (2015) 63–70. doi:10.1007/s00011-014-0784-7.
- [30] Q.-J. Yang, L.-Y. Zhou, Y.-Q. Mu, Q.-X. Zhou, J.-Y. Luo, L. Cheng, Z.-L. Deng, T.-C. He, R.C. Haydon, B.-C. He, All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation, *Int. J. Oncol.* 41 (2012) 153–60. doi:10.3892/ijo.2012.1426.
- [31] S.L. Adams, K.M. Pallante, Z. Niu, A.J. Cohen, J. Lu, P.S. LeBoy, Stimulation of type-X collagen gene transcription by retinoids occurs in part through the BMP signaling pathway, *J. Bone Joint Surg. Am.* 85–A Suppl (2003) 29–33.
- [32] N. Sheng, Z. Xie, C. Wang, G. Bai, K. Zhang, Q. Zhu, J. Song, F. Guillemot, Y.-G. Chen, A. Lin, N. Jing, Retinoic acid regulates bone morphogenetic protein signal duration by promoting the degradation of phosphorylated Smad1, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 18886–18891. doi:10.1073/pnas.1009244107.
- [33] S.J. Song, O. Jeon, H.S. Yang, D.K. Han, B.S. Kim, effects of culture

conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells, *J Microbiol Biotechnol.* 17 (2007) 1113–1119.

- [34] P. Zuk, Y.F. Chou, F. Mussano, P. Benhaim, B.M. Wu, Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells, *Connect Tissue Res.* 2 (2011) 119–132.

Tabela 1: Via de sinalização da BMP em 7, 14, 21 e 28 dias.

BMP signaling pathway - Day 7			BMP signaling pathway - Day 21		
Observation	Z-score	p value	Observation	Z-score	p value
OM v MC3T3-E1	0		OM v MC3T3-E1	0	
BMP-2 v MC3T3-E1	0		BMP-2 v MC3T3-E1	0	
RA v MC3T3-E1	0		RA v MC3T3-E1	0	
BMP-2+RA v MC3T3-E1	0		BMP-2+RA v MC3T3-E1	0	
BMP-2 v OM	0		BMP-2 v OM	1.342	5.14E-11
RA v OM	0		RA v OM	0.447	5.14E-11
BMP-2+RA v OM	0		BMP-2+RA v OM	-1.342	5.14E-11
BMP-2 v RA	1	4.51E-09	BMP-2 v RA	0.447	5.14E-11
BMP-2 v BMP-2+RA	-1	4.51E-09	BMP-2 v BMP-2+RA	1.342	5.14E-11
RA v BMP-2+RA	-1	4.51E-09	RA v BMP-2+RA	0.447	5.14E-11
BMP signaling pathway - Day 14			BMP signaling pathway - Day 28		
Observation	Z-score	p value	Observation	Z-score	p value
OM v MC3T3-E1	-2	4.41E-9	OM v MC3T3-E1	0	
BMP-2 v MC3T3-E1	0		BMP-2 v MC3T3-E1	0	
RA v MC3T3-E1	-1	4.41E-9	RA v MC3T3-E1	0	
BMP-2+RA v MC3T3-E1	-1	8.8E-9	BMP-2+RA v MC3T3-E1	0	
BMP-2 v OM	1	5.14E-11	BMP-2 v OM	0	
RA v OM	2.236	5.14E-11	RA v OM	1	8.8E-9
BMP-2+RA v OM	1.342	4.41E-9	BMP-2+RA v OM	2	8.8E-9
BMP-2 v RA	1	8.8E-9	BMP-2 v RA	-1	8.8E-9
BMP-2 v BMP-2+RA	-1	8.8E-9	BMP-2 v BMP-2+RA	-2	8.8E-9
RA v BMP-2+RA	-0.447	5.14E-11	RA v BMP-2+RA	0	

Valores positivos de z indicam regulação positiva (cor laranja). Valores negativos de z indicam regulação negativa (destacados na cor azul).

Tabela 2: Funções biológicas evidenciadas pelo IPA^a no dia 14.

Category: Cellular development, connective tissue development and function, tissue development			
Biological function: DIFFERENTIATION OF BONE-FORMING CELLS			
Observation	p value	Activation z-score	Molecules
OM v MC3T3-E1	2.20E-06	-2	Ca2+,SMAD1,SMAD4,SMAD5
RA v OM	1.24E-07	2	Ca2+,PRKACA,SMAD1,SMAD4,SMAD5
BMP-2+RA v OM	1.24E-07	2	Ca2+,PRKACA,SMAD1,SMAD4,SMAD5
Category: Cellular development, cellular growth and proliferation			
Biological function: PROLIFERATION OF BLOOD CELLS			
Observation	p value	Activation z-score	Molecules
OM v MC3T3-E1	1.05E-05	-2.044	Ca2+,PRL,SMAD4,SMAD5,TAC1
RA v OM	2.23E-06	2.044	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD4,SMAD5,TAC1
Category: Cellular movement			
Biological function: MIGRATION OF CELLS			
Observation	p value	Activation z-score	Molecules
RA v OM	6.94E-07	2.183	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD1,SMAD4,SMAD5,SPARC,TAC1
Category: Tissue morphology			
Biological function: QUANTIFY OF CELLS			
Observation	p value	Activation z-score	Molecules
OM v MC3T3-E1	1.70E-05	-2.286	Ca2+,PRL,SMAD1,SMAD4,SMAD5,TAC1
BMP-2 v OM	6.13E-05	2.272	Ca2+,PRL,SMAD1,SMAD4,SPARC,TAC1
RA v OM	9.25E-06	2.421	Ca2+,PRL,SMAD1,SMAD4,SMAD5,SPARC,TAC1
Category: Cell death and survival			
Biological function: CELL SURVIVAL			
Observation	p value	Activation z-score	Molecules
RA v OM	4.94E-05	2.023	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD1,SMAD4,SPARC
Category: Cell Death and Survival			
Biological function: APOPTOSIS			
Observation	p value	Activation z-score	Molecules
BMP-2 v RA	7.41E-04	2.177	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD4,SPARC,TAC1
Category: Cell Death and Survival			
Biological function: NECROSIS			
Observati	p value	Activation	Molecules

on		z-score	
BMP-2 v RA	7.91E-04	2.021	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD4,SPARC,TAC1

Valores positivos de z indicam aumento de ativação da função biológica e valores negativos de z indicam decréscimo da ativação. (v = versus)

Tabela 3: Funções biológicas evidenciadas pelo IPA* no dia 28.

Category: Cell death and survival

Biological function: CELL SURVIVAL

Observation	p value	Activation z-score	Molecules
BMP-2 v RA	1.79E-05	-2.337	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD1,SMAD4,SPARC

Category: Cell Death and Survival

Biological function: CELL VIABILITY

Observation	p value	Activation z-score	Molecules
BMP-2 v RA	2.50E-04	-2.055	Ca2+,PRKACA,PRL,SMAD4,SPARC

Valores positivos de z indicam aumento de ativação da função biológica e valores negativos de z indicam decréscimo da ativação. (v = versus)

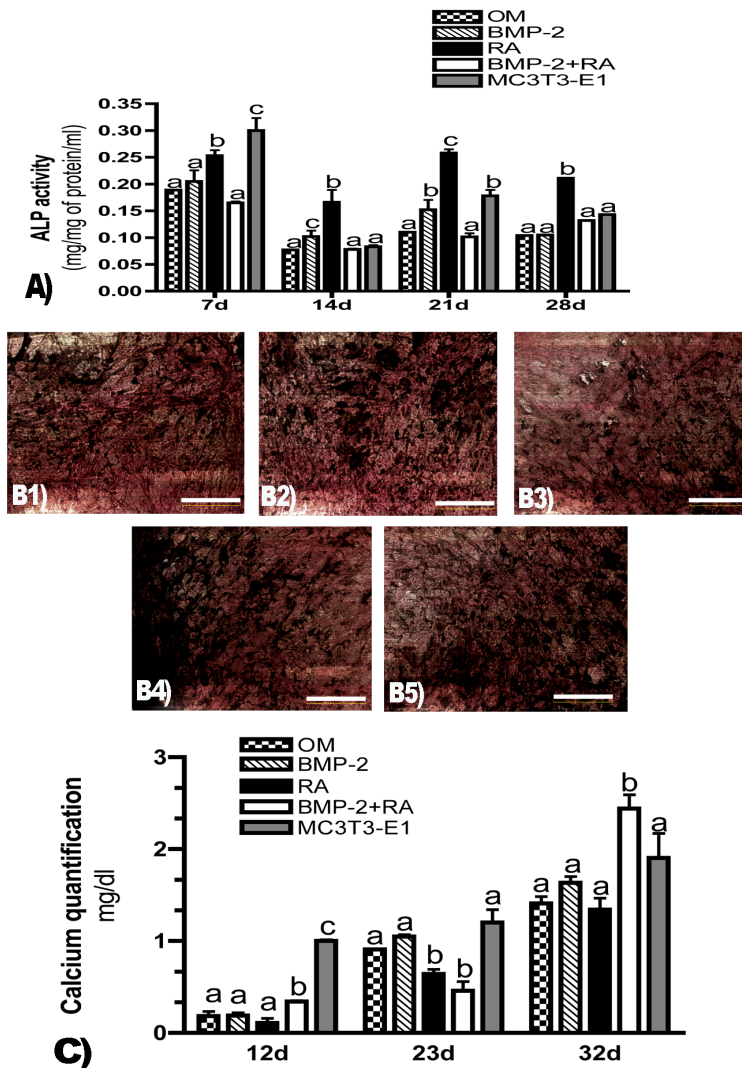


Fig. 1. Avaliação da matriz extracelular. A) Atividade de fosfatase alcalina (ALP) expressa em mg de nitrofenol (pNP) por mg de proteína por mL aos dias 7, 14, 21 e 28. Diferentes letras referem-se a diferenças estatísticas significativas ($p < 0,001$) (ANOVA/Tukey) . As análises estatísticas foram realizadas comparando todos os tratamentos em cada período experimental separadamente. B) Coloração de Von kossa

de ASCs cultivadas durante 21 dias. Bar = 500 um. As áreas negras mostram a presença de fosfato e indicam mineralização da matriz extracelular, sugerindo diferenciação em osteoblastos. As células foram tratadas com OM (B1), OM suplementado com BMP-2 (B2), OM com RA (B3), ou OM suplementado com BMP-2 e RA (B4). As células MC3T3-E1 tratadas com α MEM modificado com ascorbato 5 μ M e β -glicerofosfato 10 mM foram utilizadas como controle positivo (B5). As imagens são representativas de três experimentos independentes; C) Quantificação de cálcio expressa em mg / dL nos dias 12, 23 e 32. As barras representam a média \pm DP de três amostras. Diferentes letras representam diferenças estatísticas significativas ($p < 0,05$) (ANOVA/Tukey) entre os tratamentos em cada período experimental.

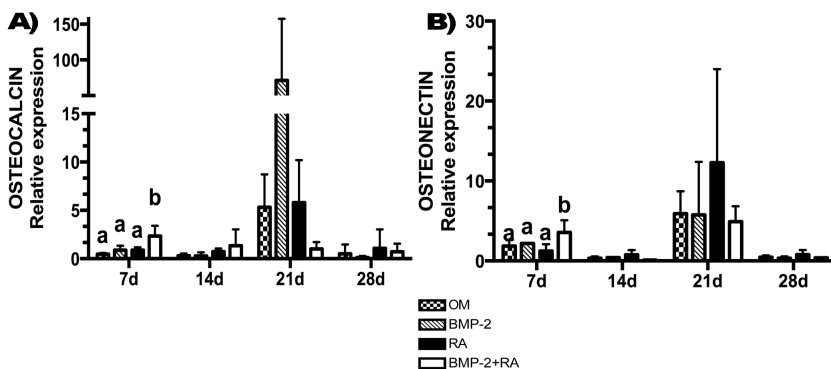


Fig. 2. Expressões relativas de mRNA. As ASCs foram tratadas de acordo com os grupos: OM - meio osteogênico (DMEM, FBS 10%, PSA 1%, ascorbato 250 μ M e β -glicerofosfato 10 mM); BMP-2 - OM e BMP-2 50 ng/mL; RA - OM e ácido trans-retinóico 2,5 μ M (RA); BMP-2+RA-OM, BMP-2 50 ng/mL e RA 2,5 μ M. Os resultados foram normalizados contra osteoblastos humanos (controle positivo). Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos em cada período experimental (ANOVA/Tukey, $p < 0,05$). As barras representam a média \pm DP de três amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

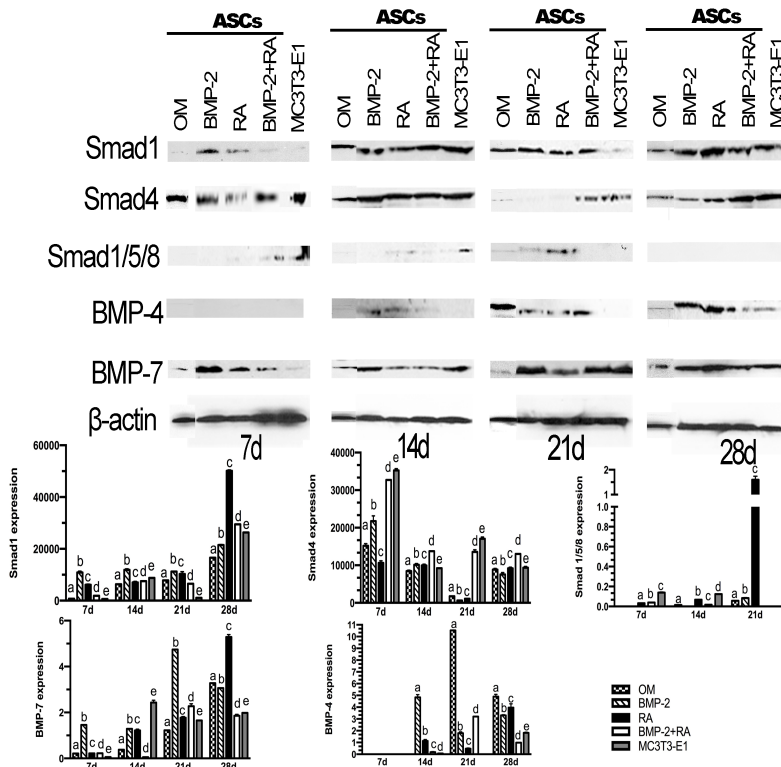


Fig. 3. Expressão de proteínas relacionadas com os osteoblastos. As expressões das proteínas avaliadas por western blotting nos dias 7, 14, 21 e 28 de ASCs tratadas de acordo com os grupos: OM - meio osteogênico (DMEM, FBS 10%, PSA 1%, ascorbato 250 μ M e β - glicerofosfato 10 mM); BMP-2 - OM e BMP-2 50 ng/mL; RA - OM e ácido trans-retinóico 2,5 μ M (RA); BMP-2+RA-OM, BMP-2 50 ng/mL e RA 2,5 μ M. Os resultados foram normalizados contra osteoblastos humanos (controle positivo). As bandas são representativas de três experimentos independentes. As intensidades das bandas foram quantificadas. Diferentes letras representam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (ANOVA / SNK) entre os tratamentos em cada período experimental.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O ácido retinoico aumentou os efeitos da proteína óssea morfogenética do tipo 2 na diferenciação osteogênica das células-tronco derivadas do tecido adiposo humano. Este achado reforça a possibilidade de usar a proteína óssea morfogenética tipo 2 combinada ao ácido retinoico para melhorar o reparo ósseo em cirurgias bucais e maxilofaciais. Além disso, o emprego da proteína óssea morfogenética tipo 2 associada ao ácido retinoico pode permitir o uso de doses reduzidas de proteína óssea morfogenética tipo 2, minimizando os efeitos adversos e os custos relacionados a este fator de crescimento. Experimentos futuros em animais devem ser conduzidos para avaliar a capacidade da proteína óssea morfogenética tipo 2 combinada ao ácido retinoico no reparo ósseo. Da mesma maneira, pesquisas futuras devem ser realizadas para elucidar os mecanismos da proteína óssea morfogenética tipo 2 associada ao ácido retinoico no reparo ósseo.

REFERÊNCIAS

ADAMS, S. L. et al. Stimulation of type-X collagen gene transcription by retinoids occurs in part through the BMP signaling pathway. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, p. 29–33, 2003.

ALONSO, N. et al. Evaluation of maxillary alveolar reconstruction using a resorbable collagen sponge with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in cleft lip and palate patients. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 16, p. 1183–1189, 2010.

BI, W. et al. Antagonistic and synergistic effects of bone morphogenetic protein 2/7 and all-trans retinoic acid on the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. **Development, Growth & Differentiation**, v. 55, n. 9, p. 744–754, dez. 2013.

BONEWALD, L. F. et al. Von Kossa Staining Alone Is Not Sufficient to Confirm that Mineralization In Vitro Represents Bone Formation. **Calcified Tissue International**, v. 72, n. 5, p. 537–547, 1 maio 2003.

BOSETTI, M. et al. Effect of retinoic acid and vitamin D3 on osteoblast differentiation and activity in aging. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 1, p. 65–78, 18 jan. 2016.

BOYNE, P. J. et al. A feasibility study evaluating rhBMP-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. **The International journal of periodontics & restorative dentistry**, v. 17, n. 1, p. 11–25, fev. 1997.

CONAWAY, H. H.; HENNING, P.; LERNER, U. H. Vitamin a metabolism, action, and role in skeletal homeostasis. **Endocr Rev**, v. 34, p. 766–797, 2013.

COWAN, C. M. et al. Bone Morphogenetic Protein 2 and Retinoic Acid Accelerate *in Vivo* Bone Formation, Osteoclast Recruitment, and Bone Turnover. **Tissue Engineering**, v. 11, n. 3–4, p. 645–658, mar. 2005.

CRUZ, A. C. et al. Addition of bone morphogenetic protein type 2 to ascorbate and beta-glycerophosphate supplementation did not enhance osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. **J Appl Oral Sci**, v. 20, n. 6, p. 628–635, 2012.

CRUZ, A. C. C. et al. Adipose-derived stem cells incorporated into platelet-rich plasma improved bone regeneration and maturation in vivo. **Dental Traumatology**, v. 31, n. 1, p. 42–48, 2015.

CRUZ, A. C. C. et al. Adipose-Derived Stem Cells Decrease Bone Morphogenetic Protein Type 2-Induced Inflammation in Vivo. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 3, p. 505–514, 2016.

HOFFMAN, L. M. et al. BMP action in skeletogenesis involves attenuation of retinoid signaling. **The Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 1, 2006.

IVANOVSKI, S.; HAASE, H. R.; BARTOLD, P. M. Expression of Bone Matrix Protein mRNAs by Primary and Cloned Cultures of the Regenerative Phenotype of Human Periodontal Fibroblasts. **J Dent Res**, v. 80, n. 7, p. 1665–1671, 2001.

KHOJASTEH, A. et al. Effects of different growth factors and carriers on bone regeneration: A systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 116, n. 6, p. e405–e423, 2013.

LI, X. et al. Retinoic Acid Stimulates Chondrocyte Differentiation and Enhances Bone Morphogenetic Protein Effects through Induction of Smad1 and Smad5. **Endocrinology**, v. 144, n. 6, p. 2514–2523, jun. 2003.

LIU, Y. et al. All-trans retinoic acid modulates bone morphogenetic protein 9-induced osteogenesis and adipogenesis of preadipocytes through BMP/Smad and Wnt/ β -catenin signaling pathways. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 47, p. 47–56, fev. 2014.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem**, v. 193, p. 265–275, 1951.

MULLAPUDI, N. et al. Genome Wide Methylome Alterations in Lung Cancer. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0143826, 18 dez. 2015.

OGSTON, N. et al. Dexamethasone and retinoic acid differentially regulate growth and differentiation in an immortalised human clonal bone marrow stromal cell line with osteoblastic characteristics. **Steroids**, v. 67, n. 11, p. 895–906, 2002.

PAREKKADAN, B.; MILWID, J. M. Mesenchymal Stem Cells as Therapeutics. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 12, n. 1, p. 87–117, 15 jul. 2010.

RAI, R. et al. RNA-seq Analysis Reveals Unique Transcriptome Signatures in Systemic Lupus Erythematosus Patients with Distinct Autoantibody Specificities. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0166312, 11 nov. 2016.

ROSA, V.; BOTERO, T. M.; NÖR, J. E. Regenerative endodontics in light of the stem cell paradigm. **International Dental Journal**, v. 61, p. 23–28, ago. 2011.

SHAH, M. M.; SMYTH, M. D.; WOO, A. S. Adverse facial edema associated with off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein–2 in cranial reconstruction for craniosynostosis. **Journal of Neurosurgery: Pediatrics**, v. 1, n. 3, p. 255–257, mar. 2008.

SHENG, N. et al. Retinoic acid regulates bone morphogenetic protein signal duration by promoting the degradation of phosphorylated Smad1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 44, p. 18886–18891, 2 nov. 2010.

SKILLINGTON, J.; CHOY, L.; DERYNCK, R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of preadipocytes. **J Cell Biol**, v. 159, p. 135–146, 2002.

SONG, S. J. et al. effects of culture conditions on osteogenic differentiation in human mesenchymal stem cells. **J Microbiol Biotechnol**, v. 17, p. 1113–1119, 2007.

TAKAHASHI, T. et al. The effect of retinoic acid on a zinc finger transcription factor, AJ18, during differentiation of a rat clonal preosteoblastic cell line, ROB-C20, into osteoblasts. **Archives of Oral Biology**, v. 53, n. 1, p. 87–94, jan. 2008.

URIST, M. R. Bone: Formation by autoinduction. **Science**, v. 150, n. 3698, p. 893–899, 1965.

VAIDYA, R. et al. Complications of anterior cervical discectomy and fusion using recombinant human bone morphogenetic protein-2. **European Spine Journal**, v. 16, n. 8, p. 1257–1265, 13 ago. 2007.

WAN, D. C. et al. Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 33, p. 12335–40, 15 ago. 2006.

WANG, A. et al. Retinoic acid inhibits osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 375, n. 3, p. 435–9, 24 out. 2008.

WANG J, GUO J, LIU J, WEI L, W. G. BMP-functionalised coatings to promote osteogenesis for orthopaedic implants. **Int J Mol Sci**, v. 15, p. 10150–10168, 2014.

YAN, Q. et al. Effect of retinoic acid on the function of lipopolysaccharide-stimulated bone marrow stromal cells grown on titanium surfaces. **Inflammation Research**, v. 64, n. 1, p. 63–70, 18 jan. 2015.

YANG, Q.-J. et al. All-trans retinoic acid inhibits tumor growth of human osteosarcoma by activating Smad signaling-induced osteogenic differentiation. **International Journal of Oncology**, v. 41, n. 1, p. 153–60, 3 abr. 2012.

YOUNGER, E. M.; CHAPMAN, M. W. Morbidity at bone graft donor sites. **Journal of orthopaedic trauma**, v. 3, n. 3, p. 192–5, 1989.

YU, Y.; AL-MANSOORI, L.; OPAS, M. Optimized osteogenic differentiation protocol from R1 mouse embryonic stem cells in vitro. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 89, n. 1–2, p. 1–10, 2015.

ZHANG, L. et al. E2F1 impairs all-trans retinoic acid-induced osteogenic differentiation of osteosarcoma via promoting ubiquitination-mediated

degradation of RAR α . **Cell Cycle**, v. 13, n. 8, p. 1277–1287, 15 abr. 2014.

ZHANG, W. et al. Retinoic Acids Potentiate BMP9-Induced Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cells. **PLoS ONE**, v. 5, n. 7, p. e11917, 30 jul. 2010.

ZUK, P. et al. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. **Connect Tissue Res**, v. 2, p. 119–132, 2011.