

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**EFEITOS IN VITRO DA KISSPEPTINA (KP-10) NA
DIFERENCIAÇÃO E EXPRESSÃO DE MARCADORES
OSTEOGÊNICOS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS ADULTAS**

Laís Bitencourt Guimarães

BELO HORIZONTE

2022

**EFEITOS IN VITRO DA KISSPEPTINA (KP-10) NA
DIFERENCIAÇÃO E EXPRESSÃO DE MARCADORES
OSTEOGÊNICOS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS
DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS ADULTAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Maria Sena Reis

Co-orientadores: Profa. Dra. Rogéria Serakides e Dr. Daniel Portela Dias Machado

BELO HORIZONTE

2022

043

Guimarães, Laís Bitencourt.

Efeitos in vitro da kisspeptina (Kp-10) na diferenciação e expressão de marcadores osteogênicos de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas [manuscrito] / Laís Bitencourt Guimarães. – 2022.

69 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Maria Sena Reis. Co-orientadores: Profa. Dra. Rogéria Serakides e Dr. Daniel Portela Dias Machado.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Neuropeptídeos. 3. Kisspeptinas. 4. Células-Tronco Mesenquimais. 5. Osteogênese. 6. Roedores. I. Reis, Amanda Maria Sena. II. Serakides, Rogéria. III. Machado, Daniel Portela Dias. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

ATA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 441 DE LAÍS BITENCOURT GUIMARÃES

Realizou-se, no dia 24 de fevereiro de 2022, às 9 horas, no formato *on-line*, a defesa de Dissertação, intitulada **"EFEITOS IN VITRO DA KISSPEPTINA (Kp-10) NA DIFERENCIAÇÃO E EXPRESSÃO DE MARCADORES OSTEOGÊNICOS DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS"**, apresentada por Laís Bitencourt Guimarães, número de registro 2020673716, graduado no curso de MEDICINA VETERINÁRIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Natália de Melo Ocarino** – Escola de Veterinária/UFMG; **Profa. Milene Alvarenga Rachid** – ICB/UFMG; **Profa. Rogéria Serakides** – Escola de Veterinária/UFMG – COORIENTADORA; **Residente Pós-Doc Dr. Daniel Portela Dias Machado** – ICB/UFMG – COORIENTADOR; **Profa. Amanda Maria Sena Reis** – ICB/UFMG – ORIENTADORA.

A Comissão considerou a Dissertação:

☒ **Aprovada**

☐ **Reprovada**

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2022.

* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Mestre só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Dissertação, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de Diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Mestrado.



Documento assinado eletronicamente por Rogéria Serakides, Professora do Magistério Superior, em 24/02/2022, às 16:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Natália de Melo Ocarino, Professora do Magistério Superior, em 24/02/2022, às 17:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Amanda Maria Sena Reis, Professora do Magistério Superior, em 27/02/2022, às 17:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Milene Alvarenga Rachid, Servidor(a), em 27/02/2022, às 18:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Daniel Portela Dias Machado, Usuário Externo, em 07/03/2022, às 22:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1273919 e o código CRC 0F300DEB.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, à minha família, aos meus amigos e aos meus colegas de trabalho pela amizade, companheirismo e por estarem diariamente presentes na minha vida, permitindo que eu tenha forças e coragem para seguir em frente, sempre em busca de evolução.

Agradeço em especial à minha orientadora, profa Amanda Maria Sena Reis, que me deu todo suporte, orientação e teve paciência durante este longo processo de trabalho em que ela esteve presente e disponível durante todo o tempo, sendo sempre excepcional tanto como pessoa, como profissionalmente.

Aos meus coorientadores, profa Rogéria Serakides, por ceder gentilmente o Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular para a efetivação do nosso trabalho e pelo auxílio na elaboração do nosso artigo; e ao Dr. Daniel Portela Dias Machado, por auxiliar tanto durante todo o processo do nosso trabalho, com os experimentos, com os cálculos farmacológicos, os gráficos e as figuras.

Agradeço também aos integrantes do nosso grupo de pesquisa pelo auxílio, apoio e disposição em ajudar sempre quando necessário e pelo companheirismo durante este período.

Agradeço à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento do projeto.

RESUMO

A kisspeptina é um neuropeptídeo que se liga ao receptor GPR54 exercendo diversas funções no organismo, principalmente nos sistemas nervoso e reprodutor. Porém seus efeitos e mecanismos de ação no sistema esquelético permanecem pouco compreendidos. Este estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações de kisspeptina (Kp-10) *in vitro* sobre a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais (CTMs) extraídas da medula óssea (MO) de ratas Wistar adultas. Ratas de 2 meses de idade foram eutanasiadas para extração da MO de ossos longos para obtenção das CTMs. *In vitro*, foram estabelecidos 4 grupos experimentais: Controle e Kp-10 nas concentrações de 0,01µg/ml, 0,05µg/ml e 0,1µg/ml. Após a indução da diferenciação osteogênica, foram avaliadas a viabilidade celular pelo teste do MTT, atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno, porcentagem de área coberta por CTMs/campo, nódulos mineralizados/campo, imunocitoquímica para o receptor GPR54 e avaliação da expressão gênica de colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, Runx-2 e BMP-2 por RT-PCR em tempo real. Observou-se que as CTMs durante a diferenciação osteogênica apresentam receptor GPR54 através do qual Kp-10 se liga promovendo um efeito direto negativo sobre a diferenciação osteogênica. Esse efeito foi observado em todas as concentrações utilizadas (0,01; 0,05 e 0,1 µg/ml) e de forma concentração-dependente, caracterizado pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno, de nódulos mineralizados e pela diminuição da expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e Runx-2. Dessa forma, concluímos que Kp-10 *in vitro* inibe a diferenciação osteogênica de CTMs extraídas da MO de ratas wistar adultas.

Palavras-chave: Neuropeptídeo, CTMs, diferenciação osteogênica, roedores.

ABSTRACT

Kisspeptin is a neuropeptide that binds to the GPR54 receptor, exerting several functions mainly in the nervous and reproductive systems of the body. However, its effects and mechanisms of action on the skeletal system remain poorly understood. This study evaluated the effect of different concentrations of kisspeptin (Kp-10) *in vitro* on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) extracted from the bone marrow (BM) of adult Wistar rats. Two-month-old female rats were euthanized to extract BM from long bones to obtain MSCs. *In vitro*, 4 experimental groups were established: control, and Kp-10 at concentrations of 0.01 $\mu\text{g/mL}$, 0.05 $\mu\text{g/mL}$ and 0.1 $\mu\text{g/mL}$. After induction of osteogenic differentiation, cell viability was evaluated by the MTT test, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, percentage of area covered by MSCs/field, mineralized nodules/field, immunocytochemistry for the GPR54 receptor, and evaluation of gene expression of type I collagen, osteocalcin, osteopontin, bone sialoprotein, RUNX-2, and BMP-2 were done by real-time RT-PCR. It was observed that MSCs have a GPR54 receptor to which Kp-10 binds during osteogenic differentiation, promoting a direct negative effect on osteogenic differentiation. This effect was observed at all concentrations used (0.01, 0.05, and 0.1 $\mu\text{g/mL}$) and in a concentration-dependent manner, characterized by a decrease in the activity of alkaline phosphatase, collagen synthesis, mineralized nodules and by the decreased expression of gene transcripts for type I collagen, osteocalcin, osteopontin, and RUNX-2. We conclude that Kp-10 *in vitro* inhibits the osteogenic differentiation of MSCs extracted from the BM of adult Wistar rats.

Keywords: neuropeptide, MSCs, osteogenic differentiation, rodents

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Lista de genes e iniciadores para RT-PCR em tempo real.....	40
Tabela 2	Resumo dos efeitos da kisspeptina nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1µg/ml na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina (ALP), síntese de colágeno, porcentagem de CTMs por campo, contagem de nódulos mineralizados e na expressão gênica de Runx-2, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e BMP-2 em comparação com o grupo controle.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Desenho esquemático demonstrando os diferentes estágios da osteogênese e a expressão dos genes e proteínas expressos durante este período.....	27
Figura 2	Desenho esquemático da estrutura principal da kisspeptina em humanos, do seu precursor de 145 aminoácidos e as diferentes possibilidades de clivagem.....	31
Figura 3	Redução do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1µg/ml cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. *p<0,05 ** p <0,01.....	42
Figura 4	Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) de culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1µg/ml cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. *p<0,05 ** p <0,01 ***p<0,001.....	43

Figura 5	Síntese do colágeno (média $\pm$ desvio padrão) de culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 μ g/ml cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. *p<0,05 ** p<0,01.....	44
Figura 6	Porcentagem de área coberta por CTM/campo (média $\pm$ desvio padrão) (Acima) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa (abaixo) em culturas de CTMs dos grupos controle (A) e tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 (B), 0,05 (C) e 0,1 μ g/ml (D) cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 7, 14 e 21 dias. Bar: 58,5 μ m. *p<0,05 ** p<0,01.....	45
Figura 7	Número de nódulos mineralizados/campo (média $\pm$ desvio padrão) (acima) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa (abaixo) em culturas de CTMs dos grupos controle (A) e tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 (B), 0,05 (C) e 0,1 μ g/ml (D) cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias. Bar: 58,5 μ m. ** p<0,01.....	46
Figura 8	Comparação da quantificação relativa (média $\pm$ desvio padrão) dos transcritos gênicos para Runx-2, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e BMP-2 pela técnica de qRT-PCR em culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 μ g/ml cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias. *p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001.....	47
Figura 9	Imunocitoquímica demonstrando ausência de marcação pelo anti-GPR54 nas CTMs indiferenciadas (A) e marcação pelo anticorpo anti-GPR54 nas CTMs após diferenciação osteogênica aos 21 dias (B). Bar: 23,64 μ m.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

ARC: núcleo arqueado

AVPV: núcleo periventricular anteroventral

BCIP: *5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*

BMPs: proteínas morfogenéticas do osso

BMP-2: proteína morfogenética do osso 2

BMP-4: proteína morfogenética do osso 4

BMP-6: proteína morfogenética do osso 6

BMP-7: proteína morfogenética do osso 7

BMP-9: proteína morfogenética do osso 9

Cbfa1: gene core-bendigo factor family 1

Cbfa-1/Runx-2: fator ligante de núcleo A1/fator de transcrição 2 relacionado ao Runt

CEUA: Comissão de Ética em Experimentação Animal

CTE: células tronco embrionárias

CTP: células tronco pluripotentes

CTPE: células tronco pluripotentes embrionárias

CON: grupo controle

CTMs: células tronco mesenquimais

CFU-F: células formadoras de colônias semelhantes a fibroblastos

DAB: diaminobenzidina

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DNA: ácido desoxirribonucleico

DQ: MHC classe II

ER α : receptor de estrógeno alfa

ER β : receptor de estrógeno beta

EUA: Estados Unidos da América

FA: fosfatase alcalina

FACS: Facial Action Coding System

FGF: fator de crescimento fibroblástico

GnRH: hormônio liberador de gonadotrofina

GPR54: Receptor acoplado à proteína G para Kiss1

HE: Hematoxilina e Eosina

HPG: eixo hipotálamo-hipófise-gonadal
IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL: interleucina
IL-11: interleucina 11
KISS1: Kisspeptina
KISS1R: receptor acoplado a proteína G para Kiss1
KP-10: peptídeo derivado de KISS1 de 10 aminoácidos
KP-13: peptídeo derivado de KISS1 de 13 aminoácidos
KP-14: peptídeo derivado de KISS1 de 14 aminoácidos
KP-52: peptídeo derivado de KISS1 de 52 aminoácidos
KP-54: peptídeo derivado de KISS1 de 54 aminoácidos, metastina
LCT-PO: Laboratório de Células Tronco e Patologias Ósseas
LH: hormônio luteinizante
MO: medula óssea
MTT: {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]}
NCT-TC: Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular
NFAT2: Fator nuclear para células T ativas
N-CAM: proteína de superfície de osteoblastos
NBT: *nitro-blue tetrazolium chloride*
NFATc4: fator de transcrição para BMP-2
OPG: osteoprotegerina
OSX: Osterix
PBS: solução tampão de fosfato padrão
RANKL: receptor ativador NF-kappa beta ligante RNA: ácido ribonucleico
RNA: ácido ribonucleico
RPM: rotações por minuto
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real
Runx-2: fator de transcrição 2 relacionado ao Runt
SDS: detergents for protein solubilization
SFB: soro fetal bovino
SMADS: proteínas intracelulares
SMAD 1: proteína intracelular 1
SMAD 5: proteína intracelular 5
SMAD 9: proteína intracelular 9

SOST: esclerostina

SOX: SRY-box

TGF β : fator de crescimento transformador beta

THY-1: proteína de superfície dos osteoblastos

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

WNT: via de sinalização Wingleless

SUMÁRIO

RESUMO.....	05
ABSTRACT.....	06
LISTA DE TABELAS.....	07
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE ABREVIATURAS.....	09
INTRODUÇÃO.....	13
REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1. Tecido ósseo.....	15
1.1. Componentes do tecido ósseo.....	15
2. Formação óssea.....	17
3. Células Tronco.....	20
3.1. Características das Células Tronco.....	20
3.2. Tipos de Células Tronco.....	21
3.2.1. Células Tronco Pluripotentes.....	21
3.2.2. Células Tronco Mesenquimais.....	22
3.3. Diferenciação osteogênica das CTMs.....	25
4. Kisspeptina.....	28
4.1. Kisspeptina e seus efeitos no tecido ósseo e em CTMs.....	32
OBJETIVOS.....	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	35
RESULTADOS.....	41
DISCUSSÃO.....	49
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	55
ANEXO.....	68

INTRODUÇÃO

A kisspeptina (Kiss1) é um neuropeptídeo muito abundante no sistema nervoso central, especialmente no sistema límbico, na hipófise e no hipotálamo apresentando diversas funções (DOCKRA, 2004). Ela foi isolada pela primeira vez da placenta humana como o ligante endógeno do receptor GPR54 acoplado à proteína G mais tarde designado como receptor 1 da kisspeptina (Kiss1R) e a sua primeira ação biológica foi a supressão metastática em melanomas (LEE & WELCH, 1997; LEE et al, 1996; KOTANI et al, 2001). Posteriormente, vários estudos demonstraram o papel da kisspeptina no sistema reprodutivo, sendo considerada um dos principais reguladores do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal (HPG) (ROSEWEIR & MILLAR, 2009; MILLAR & NEWTON, 2013; HERBISON, 2016) com potencial terapêutico em indivíduos com hipogonadismo (GEORGE et al, 2010) e em mulheres que apresentam amenorreia e/ou infertilidade (DHILLO et al, 2007).

O neuropeptídeo Kiss1 é derivado de um peptídeo precursor de 145 aminoácidos, que, quando processado, origina um peptídeo de 54 aminoácidos (Kp-54) em humanos ou 52 aminoácidos (Kp-52) em animais (ROSEWEIR & MILLAR, 2009). Este peptídeo pode ser clivado em peptídeos com fragmentos carboxilo-terminais com 10, 13 e 14 aminoácidos, sendo que o de maior atividade biológica intrínseca é o que possui 10 aminoácidos, denominado, então, como Kp-10 (ROSEWEIR & MILLAR, 2009).

Pesquisas recentes observaram uma associação entre neurônios kisspeptinérgicos, receptores para estrógeno e o sistema esquelético. Esses estudos mostraram que a ablação do receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$) no hipotálamo basal medial promove um fenótipo ósseo robusto em camundongos fêmeas resultando em tecidos ósseos trabecular e cortical excepcionalmente fortes. A perda de $ER\alpha$ em células que expressam kisspeptina (Kiss1) foram suficientes para promover o fenótipo ósseo, identificando assim os neurônios Kiss1 como um nó crítico neste poderoso circuito neuroesquelético (HERBER et al., 2019). No entanto, os efeitos e mecanismos de ação direta da Kp-10 sobre as células ósseas e suas precursoras permanecem pouco compreendidos.

As células-tronco mesenquimais (CTMs) são células multipotentes, precursoras de diversos tecidos (SLACK, 2018; SELL, 2013) dentre eles, o tecido ósseo podendo dar origem a osteoblastos e outras células de linhagem mesodérmica como condrócitos, fibroblastos, adipócitos e mioblastos (ZAIDI, 2007; APPASANI et al, 2011; SLACK, 2018). Estas células podem ser obtidas de tecidos maduros (ALVES et al, 2016), sendo os principais meios de obtenção a medula óssea (MO) e o tecido adiposo (ALVES et al, 2016; SELL, 2013).

Atualmente, tem-se conhecimento que a Kp-10 apresenta efeito na migração de CTMs modulando a progressão tumoral (GOLZAR F., et al, 2015). Este efeito na migração de CTMs in vitro e in vivo pode ser positivo ou negativo, dependendo da concentração de Kp-10 administrada (GOLZAR F. et al, 2015). Além disso, estudos in vitro observaram que concentrações elevadas deste neuropeptídeo administradas por um curto período estimulam positivamente a diferenciação neuronal de células tronco embrionárias da linhagem R366.4 de *macaco rhesus* (HUMA et al, 2013; 2017) e a diferenciação osteogênica de CTMs da linhagem C3H10T1/2 de camundongos (SON et al., 2018).

Diante disso, realizamos este estudo com o intuito de verificar qual seria o efeito desse neuropeptídeo em concentrações baixas por um período prolongado na diferenciação osteogênica das CTMs extraídas da MO de ratas adultas. Para tanto, utilizamos as análises de viabilidade celular pelo teste do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, porcentagem de área coberta por CTMs/campo, nódulos mineralizados/campo, imunocitoquímica para o receptor GPR54 e avaliação da expressão gênica de colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, Runx-2 e BMP-2 por RT-PCR tempo real.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Tecido ósseo

O osso é um órgão metabolicamente ativo que desempenha funções de proteção, suporte de órgãos vitais, reserva metabólica de minerais, produção de hormônios, regulação do pH do sangue e sustentação do corpo (DOBLARÉ et al., 2004; PORTER et al., 2009; BLUMER et al., 2021). Ele é constituído por uma variedade de tecidos, como os tecidos hematopoético, adiposo, nervoso, cartilagenoso e, dentre eles, o tecido ósseo (PORTER et al., 2009).

O tecido ósseo é um tecido dinâmico constituído por uma matriz óssea mineralizada (DOBLARÉ et al., 2004; PORTER et al., 2009) com capacidade regenerativa, e que está sob a influência de diversos fatores sistêmicos (ex. calcitonina, paratormônio (PTH), vitamina D, estrogênio, glicocorticóides e hormônios tiroideanos), locais (ex. fatores de crescimento e citocinas) e ambientais (ex. estímulos mecânicos) (DOBLARÉ et al., 2004; ZAIDI, 2007; SILVA et al., 2015; BLUMER et al., 2021). Seu dinamismo se dá por sua capacidade de remodelação (DOBLARÉ et al., 2004; SILVA et al., 2015), que permite que ele funcione como uma reserva ativa de minerais (ZAIDI, 2007). Sua capacidade regenerativa faz com que, em caso de traumas ou fraturas, a reparação seja realizada a partir da formação de um novo tecido ósseo ao invés de formar uma cicatriz constituída apenas por tecido conjuntivo fibroso (DOBLARÉ et al., 2004). Participam desse processo três tipos celulares distintos e com funções específicas: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (ROBLING et al., 2006; DATTA et al., 2008; BLUMER et al., 2021).

1.1. Componentes do Tecido ósseo

Os constituintes celulares deste tecido são células da linhagem osteoblástica, responsáveis pela formação e mineralização da matriz óssea, e da linhagem osteoclástica, responsáveis por sua reabsorção (DOBLARÉ et al., 2004; ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011; BLUMER et al., 2021). As células da linhagem osteoblástica têm origem nas células mesenquimais indiferenciadas presentes no perióstio e na medula óssea, também conhecidas como células-tronco mesenquimais (CTMs) (ZAIDI, 2007; DOBLARÉ et al., 2004). De acordo com a necessidade do organismo, o tecido

ósseo é formado ou neoformado, seja no período de desenvolvimento, crescimento do indivíduo, nos processos de reparo devido a ocorrência de lesões ou fraturas, ou mesmo pela necessidade metabólica do organismo (ZAIDI, 2007). Os osteoblastos quando maduros e no interior das lacunas ósseas são denominados como osteócitos (COWIN, 1999; ZAIDI, 2007; BREELAND et al., 2020).

As células da linhagem osteoclástica são grandes células multinucleadas, derivadas das células-tronco hematopoéticas multipotentes, presentes na medula óssea, e estão ligadas à reabsorção óssea (DOBLARÉ et al., 2004; ZAIDI, 2007). Esta reabsorção ocorre através da remoção de matriz extracelular em excesso ou antiga e mantém a homeostase mineral do organismo ao reabsorver a extensa superfície dos ossos (ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011; SILVA et al., 2015).

O tecido ósseo é continuamente modificado por meio de ciclos de formação e reabsorção ósseas (DOBLARÉ et al., 2004; APPASANI et al., 2011; BLUMER et al., 2021). Estes ciclos estão intimamente relacionados e equilibrados em um organismo saudável, sendo este equilíbrio crucial para o desenvolvimento e manutenção adequados do tamanho, forma e integridade óssea (ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011). Por ser composto por uma matriz colagenosa com capacidade de mineralização, o tecido ósseo é o maior reservatório de cálcio e fósforo do organismo, sendo capaz de garantir a homeostase dos níveis séricos destes minerais no sangue (ZAIDI, 2007; BLUMER et al., 2021).

O processo de remodelação óssea ocorre durante a sua neoformação, momento em que há o equilíbrio nos processos de formação e reabsorção, no qual o excesso de tecido neoformado é removido, através da reabsorção óssea, e uma nova estrutura óssea mecanicamente eficiente é formada (DOBLARÉ, et al., 2004; APPASANI et al., 2011; BLUMER et al., 2021). Na remodelação óssea que ocorre nas ocasiões em que há desequilíbrio mineral, o osso é reabsorvido ou neoformado, com o intuito de regular os níveis séricos de minerais, principalmente do íon cálcio. Nesse processo o equilíbrio mineral é priorizado com relação à estrutura mecânica, podendo ocorrer, como consequência, patologias osteodegenerativas (ZAIDI, 2007; APPASANI et al, 2011). Nestes casos, há um desequilíbrio da proporção entre osteoblastos/osteoclastos que levam a alterações na matriz óssea, como, por exemplo, a diminuição da densidade

mineral e/ou mudanças em relação à diversidade de proteínas não colagenosas nos ossos (ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011).

2. Formação óssea

A formação óssea tem início durante o desenvolvimento embrionário (APPASANI et al., 2011; BREELAND et al., 2020). Ela pode ocorrer a partir de um molde de tecido cartilaginoso - ossificação endocondral - ou diretamente, a partir das células osteoprogenitoras - ossificação intramembranosa (BREELAND et al., 2020; BLUMER et al., 2021). A formação óssea endocondral acontece através da diferenciação de células progenitoras osteocondrais que dão origem a condrócitos que posteriormente sofrem apoptose, dando lugar às células osteoprogenitoras, que chegam ao molde cartilaginoso através de vasos sanguíneos e se diferenciarão em osteoblastos (PERCIVAL et al., 2013; BREELAND et al., 2020). Já a formação óssea intramembranosa ocorre a partir de células progenitoras mesenquimais, que darão origem diretamente aos osteoblastos (BREELAND et al., 2020). Ambos os tipos de ossificação são seguidos pela deposição de matriz osteóide e sua mineralização (ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011; BLUMER et al., 2021).

Inicialmente, no processo da osteoblastogênese, há uma determinação para que uma célula tronco mesenquimal (CTM) se torne uma célula osteoprogenitora (ZAIDI, 2007). Esta determinação ocorre através da ativação de vários genes e fatores de crescimento, e dentre eles estão as Wingless-ints (Wnts) (ZAIDI, 2007; BREELAND et al., 2020) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011). As BMPs possuem a capacidade de ativar toda a cascata de eventos que conduzem à formação de matriz óssea (BREELAND et al., 2020). Essas proteínas têm sido implicadas no processo regulador osteogênico devido às suas atividades mitogênicas e de diferenciação. Dentre elas, as BMPs 2, 4, 6, 7 e 9 são consideradas osteoindutoras, promovem o aumento da formação de nódulos mineralizados e do teor de cálcio em culturas *in vitro*. Já a combinação das BMPs com os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) aumenta sinergicamente o potencial osteogênico em culturas de CTMs extraídas da medula óssea de ratos (HANADA et al., 1997; LUU et al., 2007).

As BMPs induzem os processos de osteogênese a partir da ativação do gene core-binding factor alpha 1 (Cbfa1) (BREELAND et al., 2020), também denominado como

fator de transcrição 2 relacionado a Runt (Runx2) (APPASANI et al., 2011). Por apresentar estas características, estas proteínas, quando adicionadas ao meio de cultura, apresentaram bons resultados na indução da diferenciação osteogênica de CTMs (APPASANI et al., 2011).

O Runx 2 é considerado o principal fator de transcrição para o osteoblasto. Ele define o prosseguimento da diferenciação de uma CTM para a formação do osteoblasto e não para outro tipo celular. Além disso, ele atua como uma plataforma para citocinas e hormônios para a maturação dos osteoblastos (ZAIDI, 2007). Sua atuação se dá através da fosforilação de Smads por BMPs e pelo fator de crescimento transformador beta (TGF β) (ZAIDI, 2007; BREELAND et al., 2020). Outros fatores de transcrição envolvidos no processo de diferenciação osteogênica das CTMs são o osterix (OSX) e a esclerostina (SOST) (BREELAND et al., 2020). O OSX age em etapas posteriores da diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos e é regulado por BMP-2 e Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). Este regulador atua através de interação com o fator nuclear para células T ativas (NFAT2). O NFAT2 ativado, se liga ao OSX e estimula a osteoblastogênese e consequentemente a formação óssea (ZAIDI, 2007).

O momento da indução da osteogênese por vezes coincide com a elevada expressão de diversos hormônios e citocinas, como o paratormônio (PTH), prostaglandina, interleucina 11 (IL-11), IGF-1 e receptores de TGF- β (ZAIDI, 2007). Após a determinação da indução das células osteoprogenitoras são formados os pré-osteoblastos (APPASANI et al., 2011). Em comparação com as CTMs, estas células apresentam menor capacidade mitótica, e elas passam, nesta fase, a expressar fosfatase alcalina (FA) e a secretar colágeno tipo I, além de outras proteínas da matriz não colagenosa, como a osteonectina e a osteopontina (ZAIDI, 2007). Desta forma, dá-se início à produção da matriz óssea, que também pode ser denominada como matriz osteóide (ZAIDI, 2007). O colágeno tipo I, além de ser considerado vital para a flexibilidade e resistência óssea, é caracterizado por ser a principal proteína estrutural do osso, representando cerca de 90% da matriz osteóide (APPASANI et al., 2011; LICINI et al., 2019). Esta proteína é um dos principais marcadores dos pré-osteoblastos presentes nesta fase da diferenciação (APPASANI et al., 2011).

A matriz osteóide, inicialmente, é caracterizada por ser uma matriz não mineralizada, que é posteriormente calcificada promovendo dureza ao osso (BREELAND et al.,

2020). Ela é composta em sua maior parte por proteínas colagenosas, mas as proteínas não colagenosas apresentam também papel essencial, tendo funções estruturais, de sinalização ou mecânicas (LICINI et al., 2019). A medida em que a matriz osteóide é mineralizada, os osteoblastos são aprisionados em lacunas ósseas, ou osteoplastos, e amadurecem, dando origem a osteoblastos maduros (BREELAND et al., 2020). Com o passar do tempo eles são, então, denominados como osteócitos (COWIN, 1999; BREELAND et al., 2020). Os osteócitos são as células mais numerosas presentes nos ossos, e, assim como os osteoblastos, detém a função de produzir matriz óssea, e desta forma, também produzem proteínas não colagenosas, mas nesta fase já não expressam fosfatase alcalina (APPASANI et al., 2011; BREELAND et al., 2020; ZAIDI, 2007). Dentro das lacunas ósseas, os osteócitos possuem uma função essencial de mecanotransdução (BREELAND et al., 2020). Eles se comunicam por meio de junções comunicantes (junções gap) mediadas por conexina através de seus prolongamentos citoplasmáticos ligados à rede canalicular (ZAIDI, 2007). Por meio desta comunicação, eles são estimulados a ativar o processo de remodelação óssea de forma a responder a alterações no meio, ou a tensões mecânicas externas (ZAIDI, 2007).

Tanto os osteoblastos maduros quanto os osteócitos não apresentam capacidade de proliferação. Ambos compartilham a função de produzir matriz osteóide, sintetizando proteínas como o colagénio tipo I, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, entre outras. As proteínas não colagênicas tem papel fundamental na mineralização da matriz óssea. Estas proteínas servem como base aderente para a deposição do componente inorgânico da matriz, promovendo sua mineralização (BREELAND et al., 2020; LICINI et al., 2019).

A osteopontina é uma proteína não colagênica produzida por osteoblastos logo no início da diferenciação osteogênica (MCKEE e NANJI, 1996; DONZELLI et al., 2007). Ela está presente na matriz osteóide mineralizada, e há indícios que ela tenha papel fundamental na mineralização do tecido ósseo, através de sua interação com outras proteínas presentes na matriz, como o colágeno e a osteocalcina (LICINI et al., 2019). A osteocalcina por sua vez é a proteína não colagênica mais abundante na matriz osteóide (LICINI et al., 2019). Já no início do processo de mineralização tecidual ela é produzida por osteoblastos em menor quantidade, e sua síntese é aumentada durante a maturação da matriz mineralizada, tendo indícios do seu envolvimento com a progressão do

processo de mineralização tecidual (AKSU et al., 2008; LICINI et al., 2019). A sialoproteína óssea é uma proteína não colagênica multifuncional envolvidas na adesão, proliferação e migração celular e no controle da mineralização (DONZELLI et al., 2007). É expressa por osteoblastos recém diferenciados (GANSS et al., 1999) e está presente na matriz óssea mineralizada (HEINEGARD E OLDBERG, 1989). Além disso, há indícios de sua participação nos processos de remodelação óssea (LICINI et al., 2019).

3. Células tronco

As células tronco são células que originam e mantém órgãos e tecidos, através de sua replicação (SLACK, 2018; SELL, 2013). Estas células se dividem naturalmente de forma a permitir a manutenção de um número constante de “células-tronco reserva” (self-renewal) que geram células-tronco-filhas idênticas às células-tronco-mães, e que garantem um contingente fixo de células tronco por toda a vida do indivíduo (SLACK, 2018; SELL, 2013; APPASANI et al., 2011). Além desse tipo de divisão, concomitantemente, elas possuem a habilidade de se dividir dando origem às células especializadas, que são responsáveis por originar tecidos e órgãos e, também, pela reposição das células especializadas perdidas nestes tecidos, seja por ocorrência de lesão ou por renovação natural (SLACK, 2018; SELL, 2013).

As células tronco estão presentes por toda a vida do indivíduo e, portanto, podem ser encontradas desde o embrião até a vida pós-natal adulta, estando presente em diversos tecidos (SELL, 2013). Elas podem ser coletadas e cultivadas em meios de cultura, o que é de fundamental importância para sua manutenção fora do organismo (SLACK, 2018). Esta possibilidade se dá através da utilização de meios complexos, especializados, que fornecem os nutrientes necessários, e de antibióticos e antifúngicos que impedem a contaminação destas culturas por microrganismos indesejáveis (SLACK, 2018).

3.1. Características das Células tronco

Segundo SLACK (2018), para serem classificadas como células-tronco, estas células precisam dispor de algumas características básicas: capacidade de se reproduzir; de gerar progênie destinada a se diferenciar em outros tipos celulares funcionais;

persistirem no tecido por longos períodos; e serem reguladas pelo ambiente imediato em que estão presentes.

A capacidade destas células em sobreviver por longos períodos, faz com que elas possam se manter por toda a vida do indivíduo e com que seja possível sua replicação in vitro por tempo ilimitado (SLACK, 2018; SELL, 2013). Elas sobrevivem em microambiente específico e, então, para sua manutenção, controle de divisão e diferenciação, é necessário a utilização de meios de cultura e substratos específicos e adequados (SLACK, 2018).

3.2. Tipos de células tronco

Existem diferentes tipos de células tronco no organismo, desde sua concepção, até o período pós-natal (SLACK, 2018; SELL, 2013). Inicialmente, no zigoto, durante as primeiras divisões do blastômero, é observada a presença de células que são classificadas como totipotentes. Este tipo celular apresenta maior capacidade de diferenciação, podendo originar todos os tipos celulares do organismo, incluindo os tecidos do trofotoderma (APPASANI et al., 2011; SELL, 2013; SLACK, 2018), tecido o qual é responsável por originar a porção fetal da placenta (SELL, 2013; APPASANI et al., 2011). Após várias divisões, o blastocisto é formado, e nele há presença de células consideradas células tronco pluripotentes embrionárias (CTPE). Estas células também possuem ampla capacidade de diferenciação e capacidade de replicação indefinida, podendo se diferenciar em qualquer tipo celular especializado, exceto os tecidos do trofotoderma (APPASANI et al., 2011; SELL, 2013; SLACK, 2018).

No embrião, a partir de quatro semanas e na vida pós-natal adulta são encontrados em diversos tecidos com a característica de renovação tecidual contínua, células classificadas como células tronco multipotentes ou unipotentes (SELL, 2013; APPASANI et al., 2011). Os tipos celulares multipotentes permanecem com uma capacidade, ainda que limitada, de originar alguns tipos celulares especializados, já as células unipotentes não possuem capacidade, quando em condições normais no organismo, de se diferenciarem em outros tipos de tecido, a não a ser àquele em que se encontra (APPASANI et al., 2011; SELL, 2013; SLACK, 2018).

3.2.1. Células tronco pluripotentes

As células tronco pluripotentes (CTP) são identificadas por possuírem uma capacidade elevada de diferenciação em diversos tipos de tecidos. Elas podem ser de origem embrionária, ou ainda, induzidas in vitro (SLACK, 2018; APPASANI et al., 2011).

As CTPE, são aquelas naturalmente encontradas no embrião, derivadas da massa celular interna do blastocisto, e cultivadas a partir deste (SELL, 2013; APPASANI et al., 2011). Estas células apresentam a capacidade de replicação indefinida e podem dar origem a tecidos derivados das três camadas celulares germinativas primárias: endoderma, ectoderma e mesoderma (SELL, 2013; APPASANI et al., 2011). Já as CTP induzidas in vitro são estimuladas a partir da inoculação de genes indutores de pluripotência (oct-4, sox-2, klf-4 e c-Myc) em culturas de células somáticas, possibilitando a obtenção de células tronco com características semelhantes às embrionárias, a partir de células adultas obtidas de um organismo vivo (APPASANI et al., 2011; SLACK, 2018).

Além desta classificação, alguns autores consideram as células tronco mesenquimais (CTMs) como células multipotentes ou pluripotentes (APPASANI et al., 2011; SELL, 2013; SLACK, 2018), mesmo estando presentes após a vida adulta do indivíduo, por elas possuírem a capacidade, in vitro, de diferenciação em outros tipos celulares, além do tipo daquele tecido em que se encontra, são as chamadas células tronco de pluripotência induzida (APPASANI et al., 2011; SLACK, 2018). Essa condição não acontece naturalmente no organismo in vivo (APPASANI et al., 2011; SLACK, 2018).

3.2.2. Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais (CTMs) podem ser obtidas através da coleta de tecidos embrionários e adultos de animais e humanos (APPASANI et al., 2011; SELL, 2013). Uma das principais fontes deste tipo celular, em organismos vivos, é a medula óssea, contudo, elas também podem ser encontradas em outros tipos de tecido, como no tecido adiposo, sangue, cordão umbilical, líquido amniótico (CAMPAGNOLI et al., 2001; SELL, 2013; ALVES et al., 2016), bem como no sistema nervoso central e periférico, pulmão, coração, pâncreas, fígado, baço, rim, timo, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal, músculo esquelético, periósteo, tendão, membrana sinovial, pele, córnea, retina, polpa dentária e ligamento periodontal (JANKOWSKI et al., 2002; JIANG et al., 2002; PRESNELL et al., 2002; CANCEDDA et al., 2003; GUREVITCH

et al., 2003; MURPHY et al., 2003; LUYTEN, 2004; MAYHALL et al., 2004; GROVE et al., 2004; MEIRELLES et al., 2006; HASS et al., 2011; FORONJY E MAJKA, 2012; LEDESMA-MARTÍNEZ et al., 2016).

Apesar da medula óssea ser o principal sítio de extração das CTMs, principalmente devido à facilidade de obtenção dessas células (TULI et al., 2002; PAYUSHINA et al., 2006), estas estão presentes em pequenas quantidades, apenas 0,01% a 0,0001% das células presentes na medula óssea pode ser realmente considerada CTMs, sendo essa quantidade maior em indivíduos jovens (PITTENGER et al., 1999; HENG et al., 2004). Além disso, as células estromais da medula óssea são heterogêneas, sendo uma mistura de progenitoras em diferentes estágios de comprometimento com a linhagem mesodérmica e somente uma pequena quantidade com capacidade multipotencial e de autorrenovação (BYDLOWSKI et al., 2009).

As CTMs encontradas na medula óssea são expandidas através de culturas *in vitro*, nas quais são realizadas várias passagens das células aderentes, o que possibilita a expansão deste tipo celular e sua utilização (SELL, 2013). Diferentemente das CTE, as CTMs apresentam uma capacidade limitada de multiplicação *in vitro*, por apresentar deterioração com o tempo e com as passagens celulares (APPASANI et al., 2011). Após a 7-12^a passagens ocorrem alterações no fenótipo celular, proliferação, potencial de diferenciação, expressão gênica, bem como nos marcadores de superfície específicos, demonstrando sinais de senescência. Pesquisadores constataram evidências de que esse processo envolve, encurtamento progressivo dos telômeros, bem como danos ao DNA, estresse oxidativo e ativação da via apoptótica (STENDERUP et al., 2003; BYDLOWSKI et al., 2009; TURINETTO et al., 2016).

Pesquisadores observaram que as CTMs são células formadoras de colônias morfológicamente semelhantes a fibroblastos (CFU-F), que caracterizam-se pela facilidade de crescimento em monocamadas, manutenção de sua multipotencialidade por várias passagens, além da capacidade de emitir prolongamentos e secretar matriz extracelular que permitem a sua adesão à superfície, sobretudo ao plástico das placas e garrafas de cultivo, permitindo assim sua manutenção *in vitro* (FRIDENSTEIN et al., 1974; CAPLAN et al., 1991; PITTENGER et al., 1999; APPASANI et al., 2011; SLACK, 2018).

Macrófagos e fibroblastos presentes na medula óssea também apresentam certa capacidade de aderência a substratos plásticos, mas com as várias trocas do meio de cultura, estas células são removidas. Portanto, este procedimento elimina a heterogeneidade da cultura e, após determinado número de passagens, a cultura torna-se enriquecida pelas células que se autorrenovam, as CTMs. Além disso, elas se caracterizam pela capacidade de se diferenciarem em mais de um tipo de célula mesenquimal, podendo dar origem a células ósseas, cartilagíneas, adiposas ou até mesmo células musculares dependendo dos fatores reguladores presentes no meio (ZAIDI, 2007; APPASANI et al., 2011; SLACK, 2018).

Em adição, as CTMs apresentam uma variedade extensa de marcadores de superfície que as caracteriza. Essa caracterização é feita através da identificação de uma série de marcadores de superfície inespecíficos. Não há atualmente um marcador específico que as caracterize de forma exclusiva (APPASANI et al., 2011), sendo necessário a testagem de diferentes marcadores para identificá-las.

Pesquisadores tem demonstrado que as CTMs possuem expressão de CD105, CD73, CD90 (Thy-1), CD44, CD71, CD106, CD124, CD54, CD144, CD166, CD115, CD29, HLAABC, Sca-1, RT1A (MHC-I) (MAFI et al., 2011; RANERA et al., 2011; LIN et al., 2013; YANG et al., 2014) e Stro-1 (HAYNESWORTH et al., 1992; PANETTA et al., 2009; LIN et al., 2011). Outros marcadores de superfície celular também têm sido expressos positivamente pelas CTMs, como SH2-4, HLA-A, HLAB, HLA-C, HLA-I, DP, EMA, DQ (MHC Classe II), vimentinas, integrinas, ICAM-1, entre outros (MINGUEL et al., 2001; MAFI et al., 2011).

Em contrapartida, podem ser utilizados marcadores para células hematopoéticas, que devem ter resultados negativos nas culturas de CTMs (APPASANI et al., 2011). Alguns destes marcadores são: o CD14, marcador de monócitos e macrófagos; o CD34, marcador de células progenitoras hematopoéticas; CD45, marcador de leucócitos (APPASANI et al., 2011), CD11b (marcador de célula imune), glicoforina-A (marcador de linhagem eritróide), CD14, CD31, CD33 e CD133 (MAFI et al., 2011; RANERA et al., 2011), CD 19 (ou CD 79-alfa), CD117 (marcador de célula-tronco progenitora hematopoiética) e o antígeno leucocitário humano classe II (HLA-II) entre outros (LA ROCCA et al., 2009).

Devido à grande variação na expressão desses marcadores, o International Society for Cellular Therapy definiu que um dos critérios para caracterizar fenotipicamente CTMs é que estas devem expressar CD73, CD90 e CD105, e devem ser negativas para CD34, CD45 e CD14 ou CD11b, sendo este critério de caracterização aceito e utilizado por pesquisadores de todo o mundo (HORWITZ et al., 2005; SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007; LIN et al., 2013). A utilização destes marcadores garante a pureza da cultura de CTMs, pois exclui a possibilidade de contaminação por algum tipo celular de origem hematopoética ou outros proveniente da medula óssea.

3.3. Diferenciação osteogênica das CTMs

Para a diferenciação das CTMs em células da linhagem osteogênica são necessários estímulos que ocorrem naturalmente em um organismo vivo. In vitro, para obtenção de células desta linhagem a partir de CTMs, se faz necessária a suplementação de fatores de crescimento e aditivos apropriados ao meio de cultura (KAWAGUCHI et al., 2005; ZUR et al., 2003).

Algumas substâncias possíveis de serem adicionadas ao meio de cultura, para que se obtenha a diferenciação osteogênica, são agentes osteoindutores como a vitamina D3 e a dexametasona; fatores de mineralização, como o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato; e fatores de crescimento, como as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) (APPASANI et al., 2011; KAWAGUCHI et al., 2005; ZUR et al., 2003). Com a adição de ácido ascórbico, β -glicerofosfato, vitamina D3 e dexametasona ao meio de cultura, em aproximadamente três a quatro semanas é possível obter-se células de origem osteoblástica (ZUR et al., 2003; KAWAGUCHI et al., 2005; APPASANI et al., 2011).

Pesquisadores dividem a diferenciação osteogênica de CTMs in vitro em três etapas: a) proliferação, b) diferenciação, c) maturação e mineralização da matriz extracelular (STEIN & LIAN, 1993; Huang et al., 2007). As CTMs apresentam alta capacidade de proliferação (APPASANI et al., 2011; SLACK, 2018) porém não expressam proteínas características da matriz osteóide. Na primeira etapa da diferenciação osteogênica (1º ao 4º dia) são identificados genes nas células osteoprogenitoras responsáveis pela proliferação como histonas e proto-oncogenes como c-jun, c-fos e c-myc, regulados por ciclinas (STEIN & LIAN, 1993; STEIN et al., 1996). Além disso, o ácido ascórbico

induz a formação de colágeno tipo I que irá constituir a base da matriz extracelular (ARONOW et al., 1990; HOEMANN et al., 2009).

Na segunda etapa, a partir do início da diferenciação, do 5º ao 14º dia, as CTMs passam a diminuir sua capacidade mitótica e começam a expressar as proteínas que marcam seu fenótipo osteoblástico. A dexametasona liga-se a receptores para glicocorticoides presentes na superfície das células osteoprogenitoras, induzindo sua diferenciação (XIAO et al., 1997; COOPER et al., 2008; COUSSENS et al., 2009) e estimulando a síntese de fosfatase alcalina, que é considerada um marcador precoce da diferenciação osteogênica (BRUDER et al., 1998; PAYUSHINA et al., 2006; ZUR et al., 2013) e posteriormente da osteopontina e osteonectina, marcadores envolvidos na ligação de íons cálcio e hidroxapatita durante os processos de mineralização (ZUR et al., 2003). Dessa forma, logo no início da diferenciação osteogênica surgem os principais marcadores de formação óssea que terão resultados positivos nas CTMs em diferenciação osteogênica ou nos pré-osteoblastos: fosfatase alcalina (APPASANI et al., 2011) e colágeno tipo I e posteriormente osteopontina e osteonectina (APPASANI et al., 2011; MCKEE e NINCI, 1996; ZAIDI, 2007).

Na terceira e última etapa (14º ao 28º dia) o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato atuam como fonte local de íons e fosfatos inorgânicos (CHUNG et al., 1992) induzindo as células a atingirem os estágios tardios da diferenciação, promovendo a síntese e a mineralização da matriz extracelular (BELLOWS et al., 1992; BRUDER et al., 1998; AUBIN, 2001; PAYUSHINA et al., 2006; ZUR et al., 2013). Nessa etapa, tem-se o aumento da expressão de sialoproteína óssea e osteocalcina, que são marcadores presentes e específicos para os osteoblastos maduros e osteócitos ativos (APPASANI et al., 2011). Estes marcadores caracterizam estágios tardios da diferenciação osteoblástica (BIANCO et al., 1991; AUBIN & LIU, 1996; ZUR et al., 2013). Dessa forma, os osteoblastos funcionais expressam proteínas colagênicas e não colagênicas, que associadas à deposição de cálcio e fosfato, resultam na formação de nódulos mineralizados (JAISWAL et al 1997; PAYUSHINA et al., 2006; TAE et al., 2006; HUANG et al., 2007).

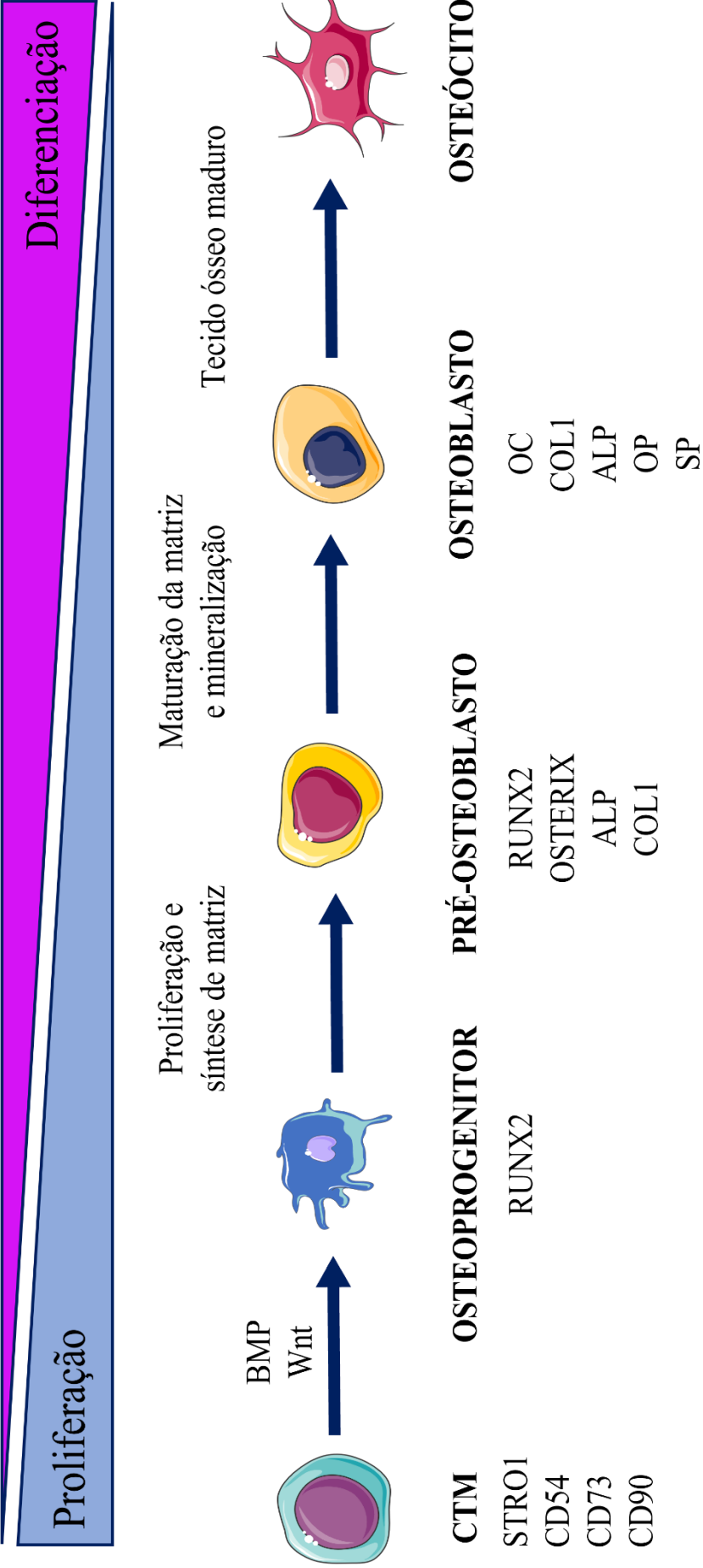


Figura 1. Desenho esquemático demonstrando os diferentes estágios da osteogênese e a expressão dos genes e proteínas expressos durante este período. Os osteoblastos surgem de células-tronco mesenquimais (CTMs) que, sob estímulos adequados se diferencia em células osteoprogenitoras, pré-osteoblasts e osteoblasts maduros. Nesse processo, a matriz óssea é produzida e mineralizada. No final da formação óssea, alguns osteoblasts permanecem incorporados na matriz calcificada como osteócitos. Marcadores específicos são expressos em cada estágio de diferenciação. BMP, Proteína óssea morfogenética; WNT, Wingless-ints; RUNX2, fator de transcrição relacionado a Runt 2; ALP, fosfatase alcalina; COL1, colágeno tipo I; OC, osteocalcina; OP, osteopontina; SP, sialoproteína óssea. Adaptado de Rossi et al., 2021.

4. Kisspeptina

A kisspeptina (Kiss1) é um neuropeptídeo produzido no hipotálamo, que apresenta diversas funções (DOCKRAY, 2004), sendo os neurônios kisspeptinérgicos que expressam mRNA de kiss1 presentes em maior abundância no núcleo arqueado (ARC) e no núcleo periventricular anteroventral (AVPV) do hipotálamo (DUNGAN et al., 2006; HERBISON, 2016).

O neuropeptídeo Kiss1 é derivado de um peptídeo precursor de 145 aminoácidos que, quando processado, origina um peptídeo de 54 aminoácidos (Kp-54) em humanos, também denominado como metastina, ou 52 aminoácidos (Kp-52) em animais (ROSEWEIR e MILLAR, 2009; CIARAMELLA, et al. 2018). Este peptídeo pode ser clivado em peptídeos com fragmentos carboxilo-terminais menores, com 10, 13 e 14 aminoácidos, denominados kisspeptinas, sendo o de maior atividade biológica intrínseca o que possui 10 aminoácidos, denominado, então, como Kp-10 (KOTANI et al., 2001; ROSEWEIR & MILLAR, 2009; CIARAMELLA et al., 2018) (Figura 2). Tanto o Kp-54, quanto o Kp-10, já foram utilizados de forma terapêutica em humanos (MILLAR e NEWTON, 2013) e todos os peptídeos derivados atuam em um mesmo receptor de membrana acoplado à proteína G, denominado inicialmente de GPR54 (LEE et al., 1999; KOTANI et al., 2001; PASQUIER et al., 2014; CIARAMELLA et al., 2018) e atualmente reconhecido como Kiss1r (PASQUIER et al., 2014; HERBISON, 2016; CIARAMELLA et al., 2018).

Sabe-se que a kiss1 está presente em diferentes espécies animais e em humanos (PASQUIER et al., 2014), sendo que diversos tipos celulares em diferentes tecidos apresentam receptor para este peptídeo (PASQUIER et al., 2014; CIARAMELLA et al., 2018), dentre eles as células de tecidos neoplásicos da tireoide (RINGEL et al., 2002), tumores de mama (OLBRICH T et al., 2010), tumores de pâncreas e tecido pancreático normal (MASUI et al., 2004; HAUGE-EVANS et al., 2006), tecido ovariano (HU et al., 2018), placenta (KOTANI et al., 2001; OHTAKI et al., 2001) hipófise (KOTANI et al., 2001) e há grandes indícios da participação da Kiss1 em diversos órgãos com regulação neuroendócrina (KOTANI et al., 2001).

Inicialmente, a Kiss1 foi descrita devido ao seu potencial inibidor metastático em melanomas (LEE et al., 1996; LEE & WELCH, 1997; KOTANI et al., 2001). As pesquisas sobre a atuação da kisspeptina em neoplasias e seu potencial terapêutico para pacientes oncogênicos desde então estão em constante avanço (CIARAMELLA et al., 2018). Atualmente, sabe-se que a kisspeptina tem ampla atuação inibindo a proliferação celular tumoral, além de inibir a migração e invasão celular por células tumorais de diversos tipos de tumores, incluindo melanoma, câncer de tireóide, ovário, bexiga, estômago, pâncreas e pulmão (CIARAMELLA et al., 2018).

Posteriormente, foi observado que a Kiss1 apresenta efeitos significativos no sistema reprodutor. A partir daí, ela teve sua atuação amplamente estudada neste sistema (ROSEWEIR e MILLAR, 2009; MILLAR & NEWTON, 2013; HERBISON, 2016), no qual foi descoberto seu potencial terapêutico em indivíduos com hipogonadismo (GEORGE et al. 2010) e em mulheres que apresentam amenorreia e/ou infertilidade (DHILLO et al., 2007). A Kiss1 atua no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal de forma positiva, estimulando a secreção pulsátil do hormônio LH e FSH (HAN et al., 2015). Estudos com a inativação do receptor para Kiss1 (GPR54), levaram a interrupção na secreção pulsátil deste hormônio, demonstrando sua importância neste sistema (HAN et al., 2015). Além disso, já foi observado que a administração de kiss1 em neurônios GnRH podem levar a um estímulo na secreção do hormônio GnRH (GLANOWSKA & MOENTER, 2015).

Pesquisadores observaram a expressão de receptores para estrógeno α e β em ambas as populações de neurônios kisspeptinérgicos (ARC e AVPV) e demonstraram que roedores de ambos os sexos, submetidos à castração apresentavam maior perfil de expressão de Kiss1 no ARC e que esse aumento era suprimido após a administração de esteroides sexuais (NAVARRO et al., 2005; SMITH et al., 2005). Estes achados indicam que os neurônios kisspeptinérgicos localizados no ARC medeiam o feedback negativo induzido por estrogênio no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, enquanto os neurônios localizados no AVPV medeiam o feedback positivo. Dessa forma, os esteroides sexuais regulam tanto negativamente quanto positivamente a expressão de Kiss1 (SMITH et al., 2005; PINILLA et al., 2012).

Em adição, estudos tem demonstrado o importante papel da Kiss 1 na regulação da homeostase da glicose, controle de peso corporal, além de alterações nas atividades locomotoras em animais que tiveram removida sua sinalização (TOLSON et al., 2014; HUSSAIN et al. 2015; RAMALHO, 2021). A partir desses estudos, pode-se perceber que a kiss1 tem uma ampla atuação no organismo, tendo ação em diferentes órgãos e tecidos, além de promover alterações metabólicas significativas.

Pré-pró-kisspeptina (MM 15,4 kDa)

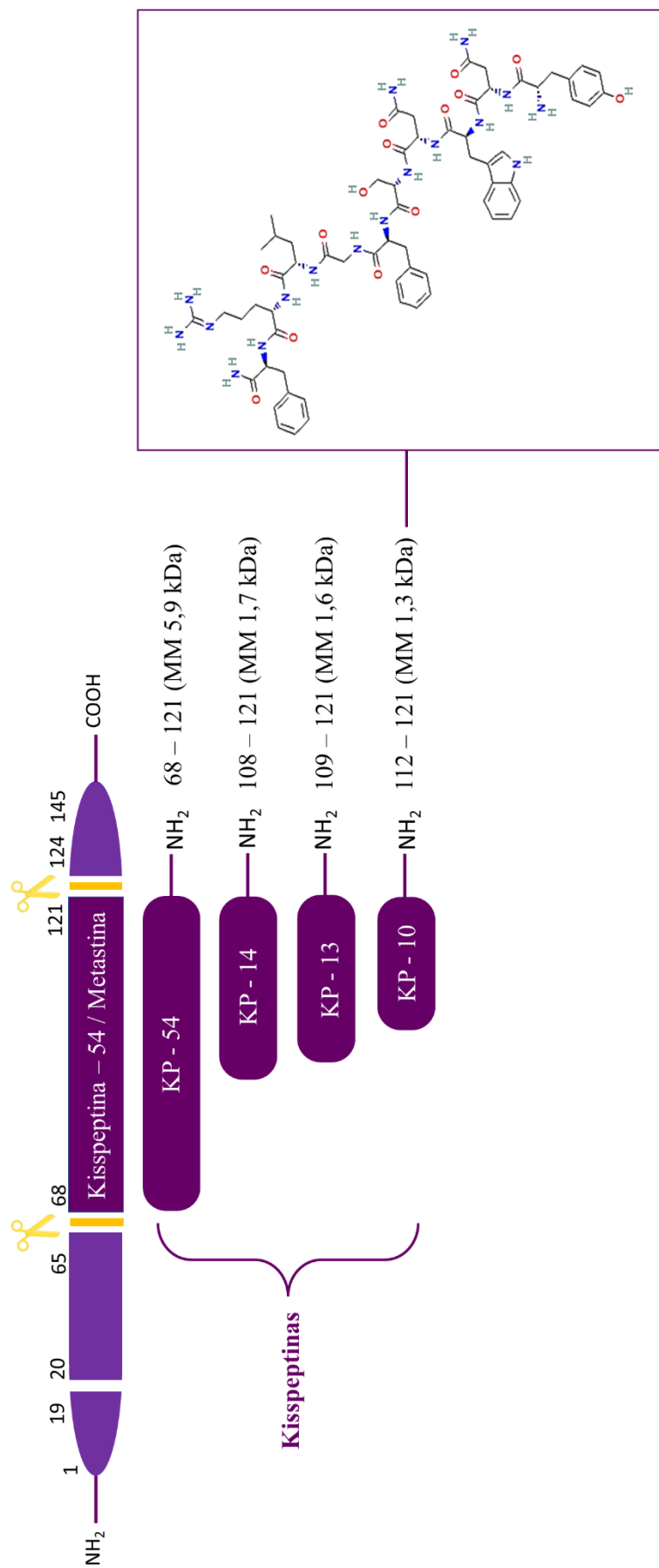


Figura 2. Desenho esquemático da estrutura principal da kisspeptina em humanos, do seu precursor de 145 aminoácidos e as diferentes possibilidades de clivagem. Todas as kisspeptinas são produtos gerados pela clivagem de um precursor comum denominado pré-pró-kisspeptina. A pré-pró-kisspeptina é um peptídeo de 145 aminoácidos, que é clivado nos quatro peptídeos com pesos moleculares mais baixos: KP-54, KP-14, KP-13 e KP-10. Todas as kisspeptinas contêm o motivo RF-amida que pode se ligar e ativar o KISSIR. Adaptado de Hu et al., 2018.

4.1. Kisspeptina e seus efeitos no tecido ósseo e em CTMs

Diante da importante participação da kisspeptina no sistema nervoso e reprodutor atuando no funcionamento e metabolismo de diversos órgãos e tecidos, alguns autores vêm se dedicando a estudos relacionados aos efeitos da kiss1 no tecido ósseo e nas células precursoras, as CTMs (GOLZAR et al., 2015; HUMA et al., 2013; HUMA et al., 2017, HERBER et al., 2019).

Herber e colaboradores, 2019, verificou o envolvimento da kisspeptina na regulação neuroesquelética de camundongos fêmeas. Neste trabalho, foi observado que a ablação do receptor de estrogênio alfa ($ER\alpha$) de neurônios kisspeptinérgicos presentes no hipotálamo basal medial promove um fenótipo ósseo robusto em camundongos fêmeas, resultando em tecidos ósseos trabecular e cortical excepcionalmente fortes. Desta maneira, pôde-se identificar que os neurônios kiss1 atuam como um ponto crítico no circuito neuroesquelético.

Em adição, kisspeptina é capaz de atuar diretamente em células ósseas para prevenir a perda óssea em ratos obesos e reverter a perda óssea provocados pela falta de testosterona em modelo de ratos orquiectomizados (MACARI et al., 2018; RAMALHO, 2021). No primeiro estudo foi observada a expressão de Kiss1r, mas não do gene Kiss1, no fêmur de ratos adultos, sendo a concentração de Kiss1r aumentada em ratos com obesidade (MACARI et al., 2018). O tratamento crônico com kisspeptina também gerou efeito molecular, restabelecendo os níveis de RANKL, OPG e Runx2. O autor sugere um efeito sistêmico da kisspeptina no osso, levando a um balanço geral positivo entre a aposição e a taxa de reabsorção tecidual em condição de ausência de andrógenos (RAMALHO, 2021).

Pesquisadores também demonstraram os efeitos da kiss1 nas CTMs (GOLZAR et al., 2015; HUMA et al., 2013; HUMA et al., 2017). Atualmente, tem-se conhecimento que a Kp-10 apresenta efeito na migração de CTMs, característica através da qual elas modulam a progressão tumoral (GOLZAR et al., 2015). Este efeito na migração de CTMs pode ser positivo ou negativo, dependendo da concentração de Kp-10 administrada. Foi verificado que em altas concentrações de Kp-10 (500 nM), o neuropeptídeo é capaz de reduzir a migração de CTMs, enquanto, em baixas concentrações (10 e 100 nM) há um estímulo dessa migração (GOLZAR et al., 2015).

Além disso, um potencial efeito positivo deste neuropeptídeo já foi observado na estimulação da diferenciação de células tronco embrionárias da linhagem R366.4 de *macaco rhesus* em células-tronco neuronais (HUMA et al., 2013; HUMA et al., 2017) e sobre a diferenciação osteogênica de CTMs da linhagem C3H10T1/2 de embriões de camundongos (SON et al., 2018). Em ambos os trabalhos foram utilizadas altas concentrações de Kp-10 (100 nM e 50 µM) por curto período (24-72 horas). SON e colaboradores observaram a diferenciação das CTMs em osteoblastos através da via de sinalização de BMP2, indicando que a kisspeptina é capaz de promover a diferenciação osteogênica *in vitro*.

Estudos relacionados sobre a atuação da kiss1 no tecido esquelético e sobre as células precursoras, as CTMs são escassos. Sabendo do potencial efeito da Kiss1 no sistema neuroesquelético, realizamos o presente trabalho, para determinar o efeito da Kp-10 em diferentes concentrações na diferenciação osteogênica de CTMs extraída da medula óssea de ratas adultas.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar os efeitos de diferentes concentrações de kisspeptina (Kp-10) in vitro sobre a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs) de ratas Wistar adultas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade celular pelo teste do MTT, bem como a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de colágeno após a diferenciação osteogênica de CTMs de ratas adultas controle e tratadas com kisspeptina in vitro aos sete, 14 e 21 dias.
- Avaliar a porcentagem de área coberta por CTMs/campo e a síntese de nódulos mineralizados de ratas adultas controle e tratadas com kisspeptina in vitro por análise morfométrica aos sete, 14 e 21 dias.
- Avaliar a presença de marcação pelo anticorpo Gpr54 nas CTMs indiferenciadas e diferenciadas controle in vitro aos 21 dias por imunocitoquímica.
- Avaliar os efeitos da kisspeptina in vitro na expressão gênica de colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, Runx-2 e BMP-2 após a diferenciação osteogênica de CTMs de ratas adultas por RT-PCR em tempo real aos 21 dias.

MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o protocolo nº 11/2020 (Anexo 1).

Para a realização do projeto, foram utilizadas a infraestrutura do Laboratório de Células Tronco e Patologias ósseas (LCT-PO) do Instituto de Ciências Biológicas e do Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular (NCT-TC) do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Foram utilizadas 10 ratas Wistar adultas de 2 meses de idade provenientes do Biotério Central da UFMG. Esses animais foram eutanasiados para extração das CTMs da MO. A eutanásia foi realizada através de sobredose anestésica (tiopental 100 mg/kg), administrada por via intraperitoneal.

Extração e cultivo de células tronco mesenquimais (CTMs)

Os animais eutanasiados tiveram seu abdômen inferior, região lombo-sacra e membros pélvicos submetidos à tricotomia, antissepsia local com álcool 70% e iodopovidona. Eles foram, então, alocados em fluxo laminar para remoção de seus membros pélvicos através da utilização de instrumental cirúrgico estéril. Os fêmures e tíbias, esquerdos e direitos, de cada rata foram dissecados da musculatura e tecidos adjacentes para extração da MO de forma asséptica. As epífises proximais e distais de cada osso foram seccionadas para facilitar o acesso as diáfises ósseas. Com o auxílio de uma seringa foi realizada a lavagem do canal medular utilizando Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY). As células isoladas foram ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), antibióticos e antifúngicos [gentamicina 60mg/L, penicilina 100U/mL, estreptomicina 10µg/mL e anfotericina B 250µg/L (Merck, Alemanha)] e cultivadas em garrafas T75. As células foram cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, com trocas rotineiras do meio de cultivo realizadas duas vezes por semana, sendo tripsinizadas quando atingiram 80-90% de confluência (REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

Caracterização fenotípica de CTMs por análise de FACS

As células da quarta passagem foram colhidas com tripsina, centrifugadas a 1400 g por 10 min e ressuspendidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS 0,15M) a 1×10^6 células/poço. Alíquotas de células foram incubadas com anticorpos primários ou de controle individuais por 30 min a 4°C. As células foram lavadas em PBS e incubadas com um anticorpo secundário conjugado com fluoróforo por 30 min a 4°C. As amostras foram submetidas ao citômetro FACScan (Becton Dickinson), e os dados foram analisados usando o software CellQuest (Becton Dickinson). Os seguintes anticorpos primários foram usados: anti-CD45 (clone 69 mouse) anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5F/B9 mouse), antiCD54 (clone 1A29 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) (REIS et al., 2015).

Cultivo das CTMs em meio de diferenciação osteogênico

Após confirmação da pureza das células por citometria de fluxo, estas foram centrifugadas por 10 minutos a 1400 g e contadas em câmara de Newbauer. Posteriormente à contagem, as células foram distribuídas em sextuplicatas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^4 células/cm² para realização de análise de viabilidade celular pelo teste do MTT e atividade da fosfatase alcalina; em placas de 6 poços na concentração de 3×10^4 células/cm² para análise da síntese de colágeno, porcentagem de área coberta por CTMs/campo, contagem de nódulos mineralizados e imunocitoquímica para o receptor GPR54, sendo este último teste realizado apenas com CTMs indiferenciadas e o grupo controle após 21 dias de diferenciação osteogênica. As células também foram alocadas em quadruplicatas em garrafas T25 na concentração 25×10^4 células/cm² para realização de RT-PCR em tempo real. Nestes recipientes foram distribuídos e definidos os quatro grupos experimentais a serem avaliados: controle e Kp-10 nas concentrações de 0,01µg/mL, 0,05µg/mL e 0,1µg/mL. Após 48 horas em meio de cultivo de indiferenciação e obtenção de 40% de confluência o meio osteogênico passou a ser utilizado como meio de cultivo. Este consistiu de DMEM acrescido de 10% de SFB (Gibco), antibióticos e antifúngicos [gentamicina 60mg/L, penicilina 100U/mL, estreptomicina 10µg/mL e anfotericina B 250µg/L], além de suplementação com ácido ascórbico 50µg/mL, β-glicerofosfato 10mM (Merck, Germany) e dexametasona 10nM (Sigma). A kp-10 foi adicionada ao meio de cultivo

osteogênico e foram realizadas trocas rotineiras do meio duas vezes por semana. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por sete, 14 e 21 dias para realização das análises (REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

Teste de redução do MTT em cristais de formazan

O teste de metabolismo celular foi realizado aos sete, 14 e 21 dias. Após o descarte do meio de cultura das placas de 24 poços, foi acrescido 210 µL de meio de cultura osteogênico com 10% de SFB, específico para cada grupo, em cada poço. Foi, então, acrescentado 170µL de MTT {brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]} (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) (5mg/mL). As placas foram incubadas por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e, após este período, foi observado a formação de cristais de formazan ao microscópio. Posteriormente, foram acrescentados 210 µL de solução detergente SDS 10% HCl (Synth, São Paulo, SP, Brasil), as placas foram incubadas *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂ e o conteúdo da solução obtida foi transferido para placas de 96 poços (100µL/poço), formando duplicatas de cada um dos 24 poços. A leitura foi realizada em espectrofotômetro com detector de leitura para comprimento de onda de 595nm (LU et al., 2008; SU et al., 2013; REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

Avaliação da Atividade de Fosfatase alcalina

A avaliação da atividade de fosfatase alcalina foi realizada aos sete, 14 e 21 dias. Os 24 poços das placas foram lavados com PBS 0,15M estéril (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e cada poço foi acrescido de 200µL de solução de BCIP/NBT, sendo 1mL de NBT (*nitro-blue tetrazolium chloride*) e 1ml de BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'- indolylphosphate p-toluidine salt*) (Invitrogen, Camarillo, CA, USA) acrescidos de 8ml de PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brasil). As placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por duas horas e, então, foram acrescentados 200 µL de solução detergente SDS 10% HCl (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Após incubação *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂, o sobrenadante da solução obtida foi transferido para placas de 96 poços (100µL/poço), formando duplicatas de cada um dos 24 poços, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com detector de leitura para comprimento de onda de 595nm (REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

Síntese de Colágeno

A avaliação da síntese do colágeno foi realizada aos sete, 14 e 21 dias. Cada poço, das placas de seis poços, foi lavado com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e foi acrescido 4mL de solução de Bouin (Merk, Germany). As placas foram incubadas por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, os poços foram lavados durante 15 minutos com água corrente, e após secagem foi acrescentado 2ml de Sirius Red (Reagent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As placas foram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente e o corante foi removido. Os poços foram, então, lavados duas vezes com solução de 0,01N de HCl (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e foi adicionado 300 µL de NaOH 0,5M (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Após incubação por 30 minutos em temperatura ambiente, a solução obtida foi transferida para placas de 96 poços (100µL/poço), formando duplicatas de cada poço, e a leitura foi realizada em espectrofotômetro com detector de leitura para comprimento de onda de 540nm (REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

Porcentagem de área coberta por CTMs/campo

A avaliação da porcentagem de área coberta por CTMs/campo foi determinada aos sete, 14 e 21 dias. As placas de seis poços com lamínula de 22 x 22 mm, foram lavadas com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e fixadas em paraformaldeído a 4% (Synth, São Paulo, SP, Brasil) por 24 horas. Após a fixação, as placas foram coradas pela coloração de hematoxilina-eosina (H&E). A porcentagem de CTMs/campo foi realizada através da análise de 30 campos utilizando a objetiva de 10x, com o auxílio de uma grátula de 121 pontos, sobreposta à secção citológica (REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

Avaliação da síntese de nódulos mineralizados

A avaliação de nódulos mineralizados foi determinada aos 21 dias. As placas de seis poços com lamínula de 22 x 22 mm, foram lavadas com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e fixadas em paraformaldeído a 4% (Synth, São Paulo, SP, Brasil) por 24 horas. Após a fixação, as placas foram coradas pela técnica de Von Kossa. Para esta coloração, as placas e lamínulas foram lavadas em água destilada com posterior adição de solução de nitrato de prata 5% (Synth, São Paulo, SP, Brasil). Após esse procedimento aos poços foram mantidos expostos a luz (lâmpada de 100 watts), pelo

período de duas horas. Posteriormente, os poços foram lavados com água corrente e o nitrato de prata residual foi neutralizado com a adição de tiosulfato de sódio a 5% (Synth, São Paulo, SP, Brasil). As lamínulas foram contra coradas com eosina. A contagem dos nódulos mineralizados foi realizada através da análise de 30 campos utilizando a objetiva de 10x, com o auxílio de uma grátula de 121 pontos, sobreposta à secção citológica (REIS et al., 2015; MELO et al., 2020).

RT- PCR em tempo real

A expressão dos transcritos gênicos para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, Runx-2 e BMP-2 foi avaliada através da técnica de RT-PCR em tempo real. A média e o desvio padrão foram determinados em quadruplicata para cada grupo experimental. As células cultivadas em garrafas T25 tiveram seu RNA extraído através da utilização de Trizol (Gibco, Gran Island, NY) de acordo com as instruções do fabricante. 1 µg de RNA foi convertido em cDNA por meio de um termociclador Smart Cycler II (Cepheid) utilizando-se o kit Superscript IV VILO™ Master Mix (11756050; Thermofisher). O cDNA sintetizado foi amplificado nas reações subsequentes de qPCR utilizando-se SYBR Green (kit Platinum® SYBR® GREEN qPCR SuperMix-UDG; 11733038 Thermofisher) no equipamento Applied Biosystems 7.500 com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 s a 95°C e 30s a 60°C. No final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT. A expressão gênica foi calculada utilizando o método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, onde os valores das amostras foram calculados em relação a valores de GAPDH Ct. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *rattus norvegicus*. Os primers específicos usados estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Lista de genes e iniciadores para RT-PCR em tempo real

Gene	Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
GAPDH	foward: CAACTCCCTCAAGATTGTCA GCAA reverse: GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
Colágeno tipo I	foward: GCAAGGTGTTGTGCGATGACG reverse: GGGAGACCA CGA GGACCA GAG	NM_000088
BMP-2	foward: TAGTGACTTTTGGCC ACGACG reverse: GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG	NM_017178
Sialoproteína óssea	foward: TGTCCTTCTGAACGGGTTTC reverse: CTTCCCCATACTCAACCGTG	NM_012587.2
Osteocalcina	foward: CATCTATGGCACCACCGTTT reverse: AGAGAGAGGGAACA GGGAGG	NM_013414.1
Osteopontina	foward: ATCTACCATTCGGATGAATCT reverse: TCAGTCCATAAGCCAA GCTATCA	AB001382
Runx-2	foward: GCGTCAACACCATCATCTG reverse: CAGACCAGCA GCA CTCCATC	NM_004348

Imunocitoquímica para o receptor GPR54

Para a realização da imunocitoquímica foram cultivadas em lamínulas de 22 x 22 mm estéreis CTMs indiferenciadas em placa de seis poços com meio de cultura composto apenas por DMEM acrescido de 10% do SFB, e CTMs cultivadas em meio de diferenciação osteogênico pelo período de 21 dias. Foi utilizado o anticorpo anti-GPR54 na diluição de 1:50 por meio da técnica da estreptavidinabiotina-peroxidase (Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA).

Após 21 dias, as lamínulas com as células aderidas foram fixadas em álcool 70% por 24 horas. Posteriormente, foram lavadas em água corrente e em PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brasil) por um período de 5 minutos. Após este período, elas foram submetidas ao soro bloqueio peroxidase, composto por 6ml de água oxigenada e 194ml de metanol, pelo período de 30 minutos, em temperatura ambiente, protegidas de luz. Posteriormente, foi utilizado soro bloqueio do kit (Ultra vision Block, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) e as lamínulas foram incubadas em câmara úmida, em temperatura ambiente por 30 minutos, período após o qual foi adicionado o anticorpo anti-GPR54, mantendo-as em câmara úmida sob refrigeração, *overnight*. No controle negativo o anticorpo primário foi substituído por PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brasil). No dia seguinte, o anticorpo secundário (Biotin Goat, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) foi incubado pelo período de 45 minutos e a estreptavidina-peroxidase

(Streptavidin Peroxidase, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) pelo período de 30 minutos. O cromógeno utilizado foi a diaminobenzidina (DAB Substrate system, Lab Vision Corp., Fremont, CA, USA) pelo período de 60 minutos. As lamínulas foram contra-coradas com hematoxilina. Foi realizada análise qualitativa das células, quanto a presença ou ausência de marcação para o receptor GPR54.

Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK) (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$ (Sampaio, 1998).

RESULTADOS

Caracterização fenotípica de CTMs por análise de FACS

A caracterização fenotípica das CTMs da MO indicou que 97,81% das células não apresentaram expressão para CD45. Entretanto houve expressão para CD73, CD54, e CD90 em 91,96%, 95,12%, e 88,57% das células, respectivamente.

Teste de redução do MTT em cristais de formazan

Aos sete dias todos os grupos tratados com Kp-10 (0,01, 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram um decréscimo significativo do MTT em cristais de formazan, em comparação ao grupo controle. Aos 14 dias os grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um decréscimo significativo do MTT em cristais de formazan, em comparação ao grupo controle. Já aos 21 dias os grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram um decréscimo significativo do MTT em cristais de formazan, em comparação ao grupo controle (Figura 3).

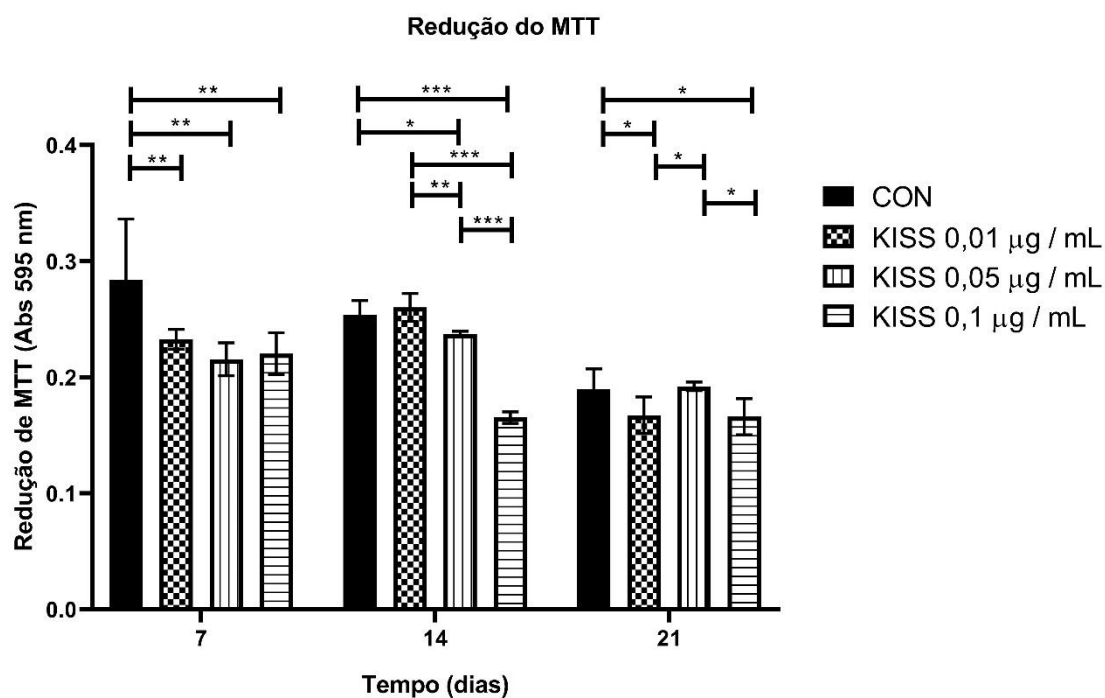


Figura 3. Redução do MTT em cristais de formazan (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Avaliação da atividade da Fosfatase Alcalina

Aos sete dias, os grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao grupo controle. Aos 14 e 21 dias, todos os grupos tratados com Kp-10 (0,01, 0,05 e 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao grupo controle, sendo esse efeito concentração-dependente (Figura 4).

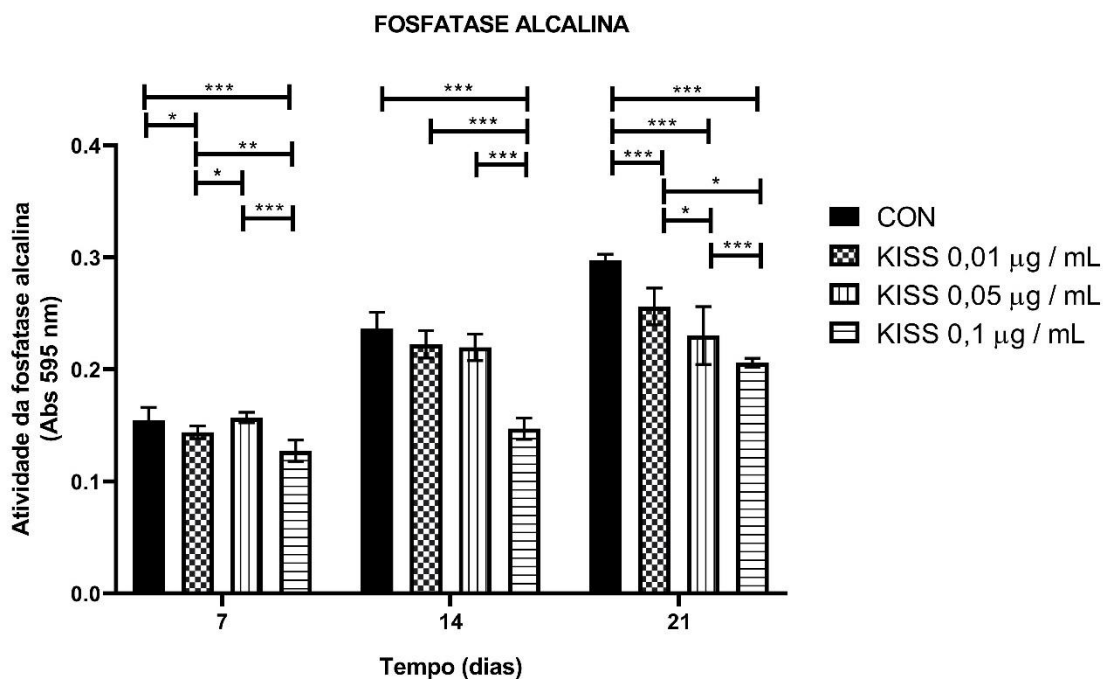


Figura 4. Atividade da fosfatase alcalina (média $\pm$ desvio padrão) de culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 µg/mL cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. *p<0,05 ** p<0,01 *** p<0,001.

Síntese de Colágeno

Aos sete dias, os grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 e 0,1 µg/mL apresentaram síntese de colágeno significativamente menor em comparação ao grupo controle. Aos 14 dias, o grupo tratado com Kp-10 na concentração de 0,05 µg/mL apresentou síntese de colágeno significativamente maior em comparação ao grupo controle, enquanto a concentração de 0,1 µg/mL apresentou um decréscimo significativo da síntese de colágeno. Aos 21 dias apenas a concentração de 0,1 µg/mL apresentou uma diminuição significativa na síntese de colágeno em relação ao grupo controle (Figura 5).

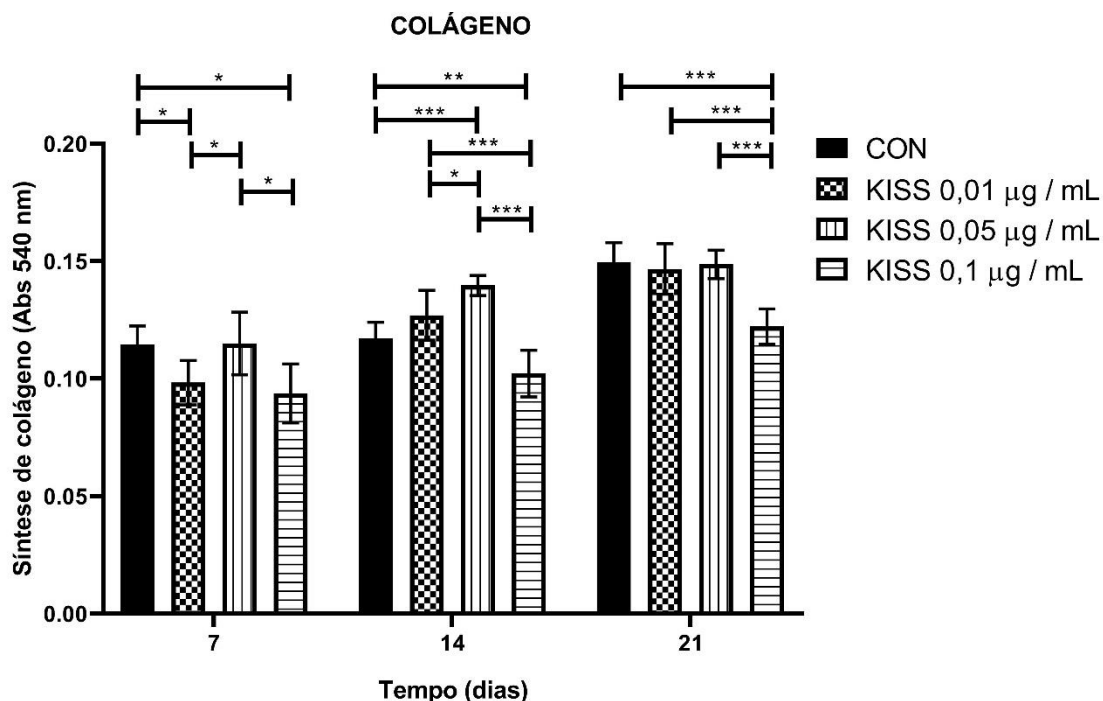


Figura 5. Síntese do colágeno (média $\pm$ desvio padrão) de culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1µg/mL cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Porcentagem de área coberta por CTM/campo

Aos sete dias, foi observada uma redução significativa na porcentagem de área coberta por CTMs/campo em todos os grupos tratados com Kp-10 (0,01, 0,05 e 0,1µg/mL) em comparação com o grupo controle. Aos 14 dias, foi observado uma redução significativa na porcentagem de área coberta por CTMs/campo nos grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,05 e 0,1µg/mL, em comparação com o grupo controle. No entanto, aos 21 dias, não foi observada diferença significativa na porcentagem de área coberta por CTMs/campo dos diferentes grupos tratados com Kp-10 em comparação com o grupo controle (Figura 6).

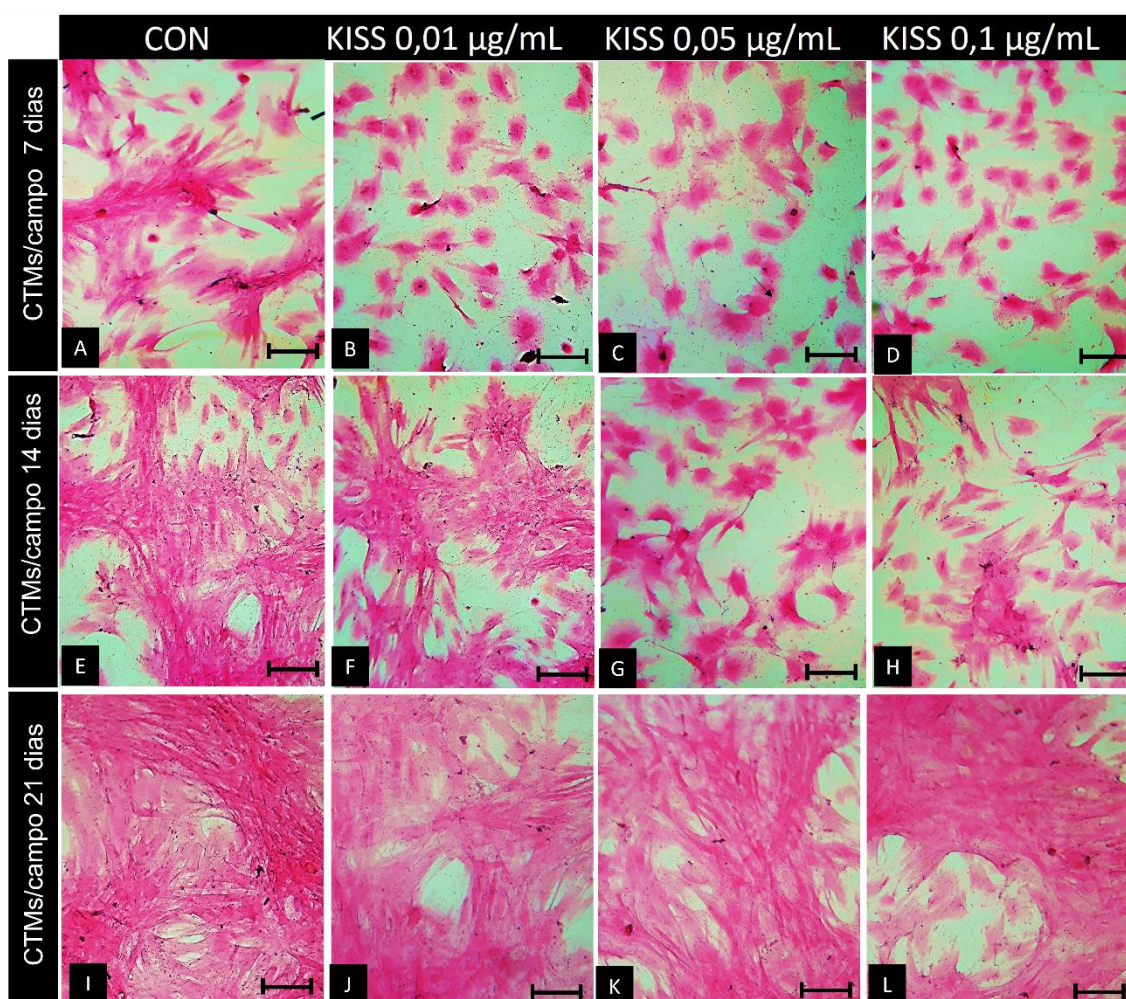
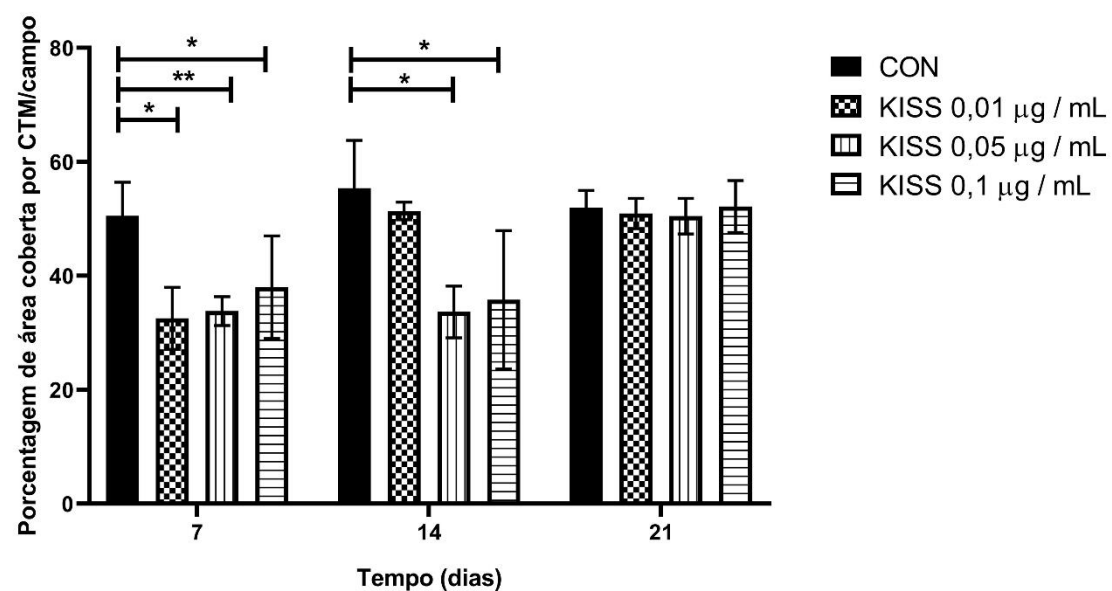


Figura 6. Porcentagem de área coberta por CTM/campo (média $\pm$ desvio padrão) (acima) e fotomicroscopia das CTMs coradas em hematoxilina e Eosina (abaixo) em culturas de CTMs dos grupos controle (A, E, I) e tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 (B, F, J), 0,05 (C, G, K) e 0,1 µg/mL (D, H, L) cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 7, 14 e 21 dias. Bar: 58,5 µm. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$.

Contagem de nódulos mineralizados

Aos 21 dias, houve um decréscimo significativo na contagem de nódulos mineralizados de todos os grupos tratados com Kp-10 em comparação com o grupo controle. Este decréscimo foi concentração-dependente, sendo o grupo em que foi administrada a maior concentração de Kp-10 (0,1 μ g/mL) o que apresentou menor contagem de nódulos mineralizados (Figura 7).

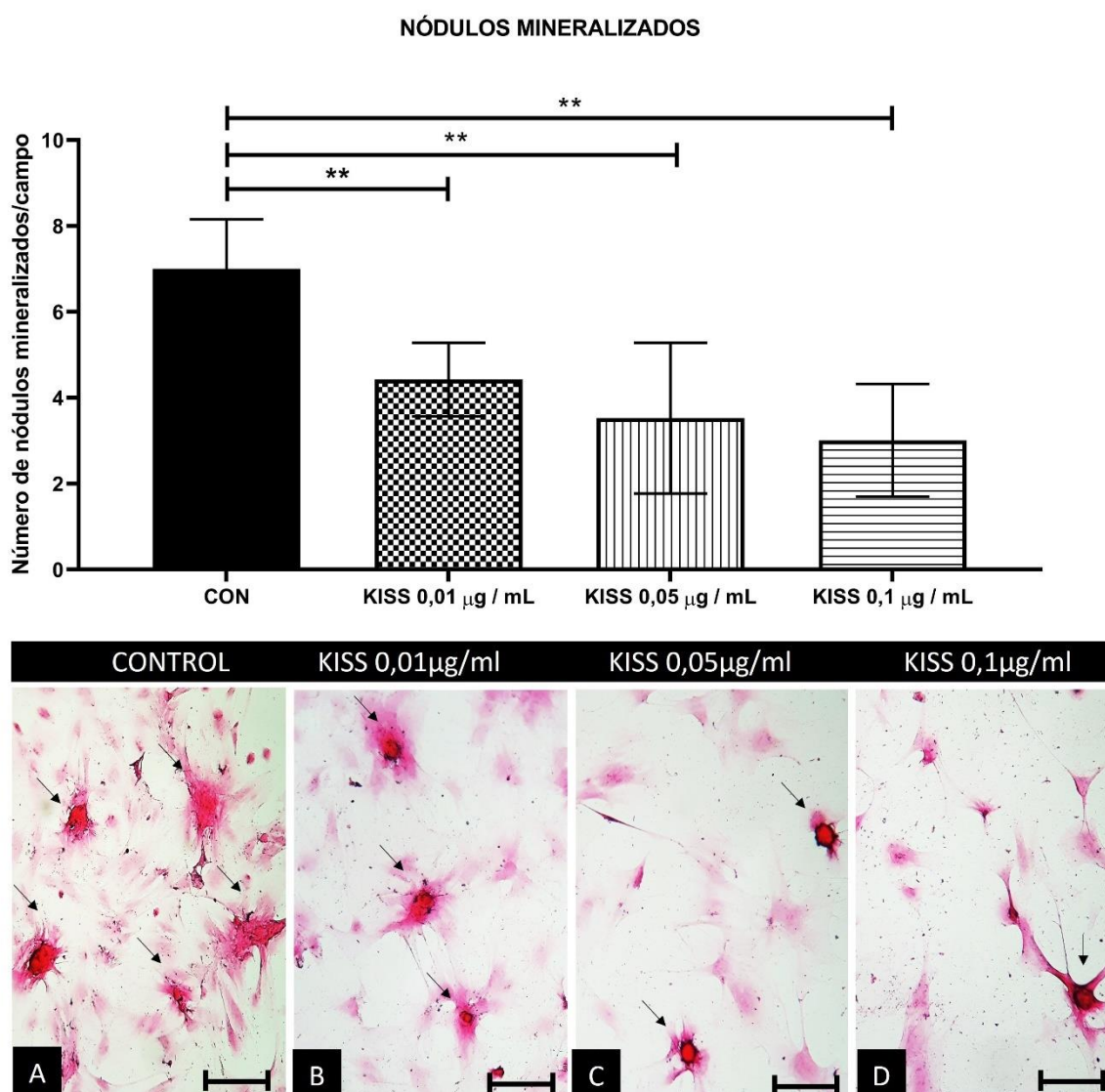
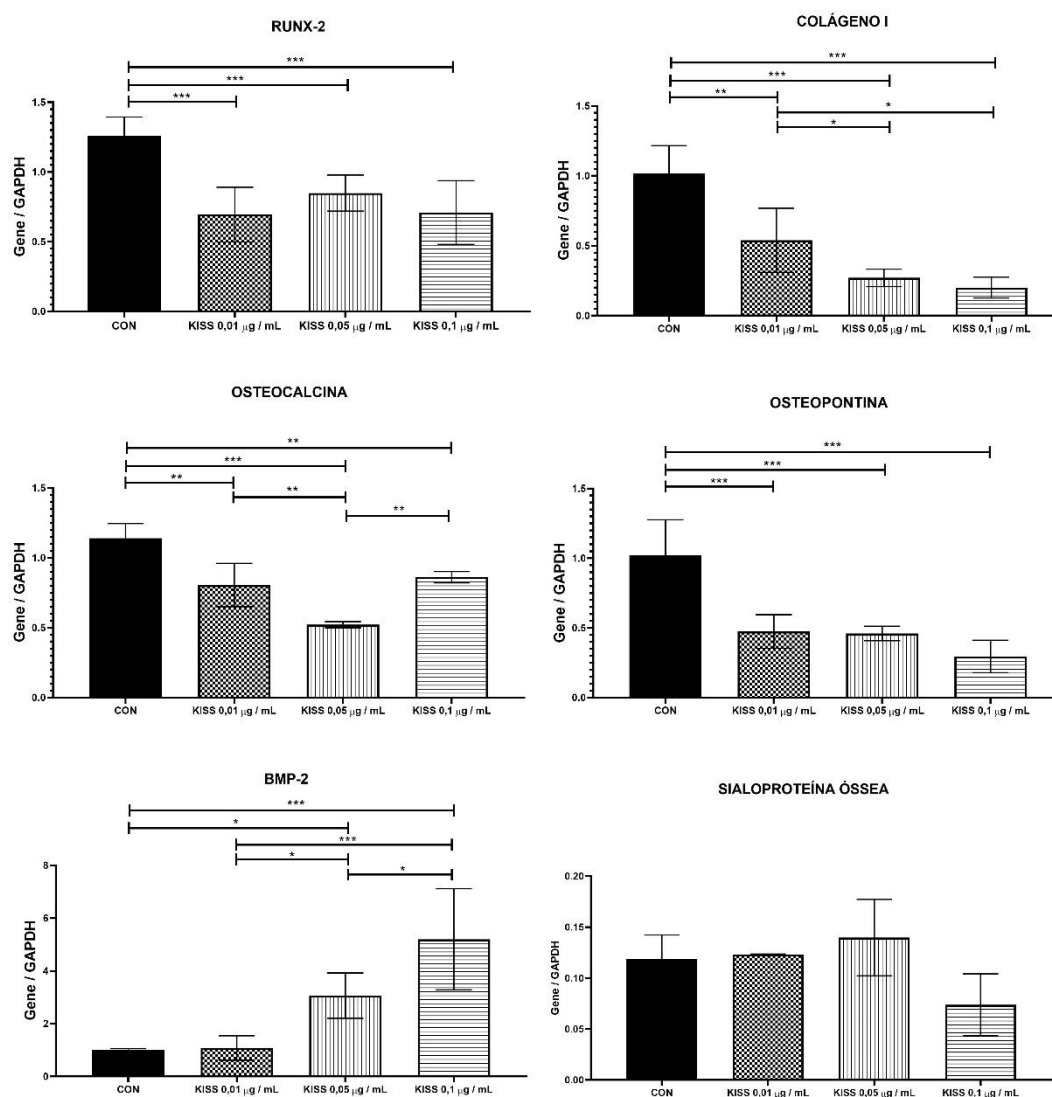


Figura 7. Número de nódulos mineralizados/campo (média $\pm$ desvio padrão) (acima) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa (abaixo) em culturas de CTMs dos grupos controle (A) e tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 (B), 0,05 (C) e 0,1 μ g/mL (D) cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias. Bar: 58,5 μ m. ** p < 0,01.

Avaliação da expressão de transcritos gênicos por RT-PCR em tempo real

Aos 21 dias, observou-se que todos os grupos tratados com Kp-10 apresentaram declínio significativo na expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e Runx-2 em comparação com o grupo controle. Não houve diferença significativa no transcrito gênico sialoproteína óssea em nenhum dos grupos tratados com Kp-10 em relação ao grupo controle. Com relação ao transcrito gênico BMP-2 diferentemente do observado nos demais genes, os grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,05 e 0,1 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram aumento significativo em sua



expressão quando comparado ao grupo controle (Figura 8).

Figura 8. Comparação da quantificação relativa (média $\pm$ desvio padrão) dos transcritos gênicos para Runx-2, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, BMP-2 e sialoproteína óssea pela técnica de qRT-PCR em culturas de CTMs dos grupos controle (CON) e tratados com Kp-10 (KISS) nas concentrações

de 0,01, 0,05 e 0,1 μ g/mL cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$.

Imunocitoquímica para o receptor GPR54

Aos 21 dias, foi observada marcação pelo anticorpo anti-GPR54 nas CTMs após diferenciação osteogênica, diferentemente do observado nas CTMs indiferenciadas, nas quais não houve marcação (Figura 9).

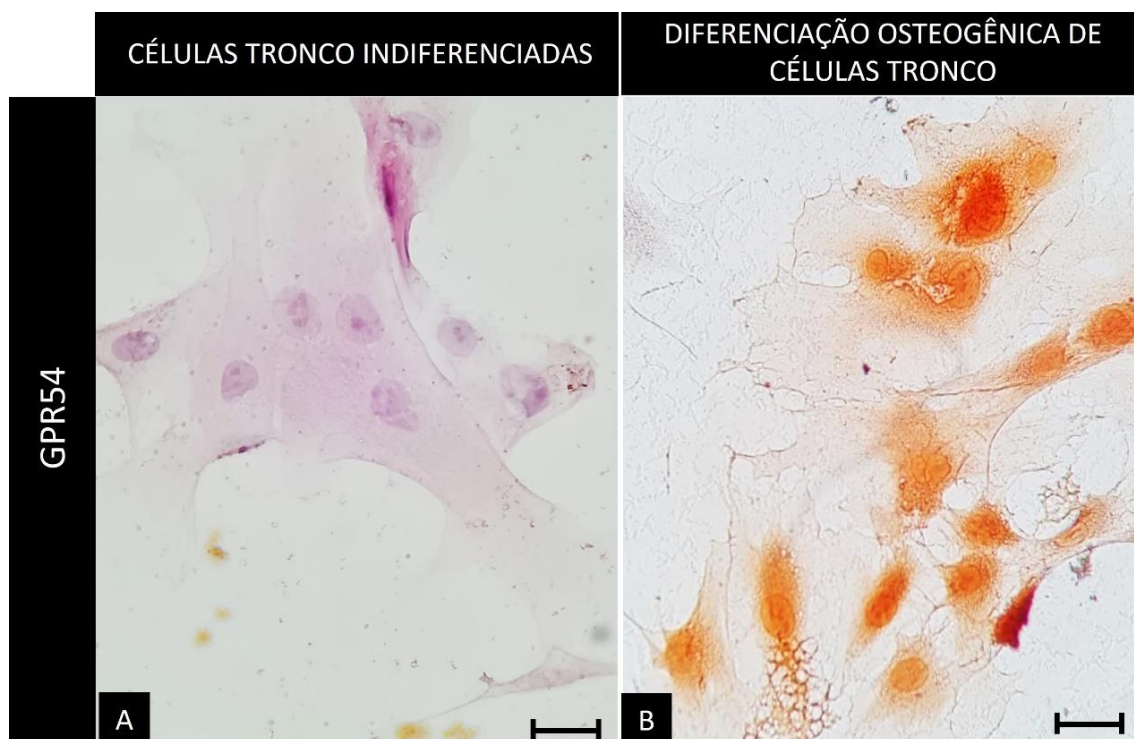


Figura 9. Imunocitoquímica com ausência de marcação do receptor GPR54 nas CTMs indiferenciadas (A) e marcação do receptor GPR54 nas CTMs após diferenciação osteogênica (B). Bar: 23,64 μ m.

Tabela 2. Resumo dos efeitos da kisspeptina nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1µg/mL na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina (ALP), síntese de colágeno, porcentagem de CTMs por campo, contagem de nódulos mineralizados e na expressão gênica de Runx-2, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, BMP-2 e sialoproteína óssea em comparação com o grupo controle.

Concentrações	KP-10 de 0,01 µg/ml			KP-10 de 0,05 µg/ml			KP-10 de 0,1 µg/ml		
Dias	7	14	21	7	14	21	7	14	21
Redução do MTT	↓	.	↓	↓	↓	.	↓	↓	↓
Atividade ALP	↓	↓	↓	.	↓	↓	↓	↓	↓
Síntese de Colágeno	↓	.	.	.	↑	.	↓	↓	↓
(%) CTMs/campo	↓	.	.	↓	↓	.	↓	↓	.
Nódulos mineralizados	.	.	↓	.	.	↓	.	.	↓
Runx-2	.	.	↓	.	.	↓	.	.	↓
Colageno tipo I	.	.	↓	.	.	↓	.	.	↓
Osteocalcina	.	.	↓	.	.	↓	.	.	↓
Osteopontina	.	.	↓	.	.	↓	.	.	↓
BMP-2	.	.	.	.	.	↑	.	.	↑
Sialoproteína óssea	.	.	.	.	.	.	.	.	.

DISCUSSÃO

Estudos anteriores demonstraram que a Kp-10 é capaz de atuar em diferentes sistemas entre eles o nervoso e o reprodutor (KOTANI et al, 2001; MILLAR & NEWTON, 2013; HERBISON, 2016). Porém seus efeitos e mecanismos de ação no sistema esquelético permanecem pouco compreendidos.

Os resultados do presente estudo são inéditos e interessantes, pois observou-se um efeito direto negativo da Kp-10 nas concentrações de 0,01; 0,05 e 0,1 µg/mL, que equivalem a 7,67; 38,35 e 76,7nM, respectivamente, sobre a diferenciação osteogênica de CTMs extraídas da MO de ratas adultas. Esse efeito foi observado em todas as concentrações utilizadas e de forma concentração-dependente, caracterizado pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno, de nódulos mineralizados e pela diminuição da expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e Runx-2.

Diferentemente do presente trabalho, outros pesquisadores observaram efeitos positivos da Kp-10 *in vitro* sobre a diferenciação neuronal de células tronco embrionárias da linhagem R366.4 de *macaco rhesus* (HUMA, et al, 2013; 2017) e sobre a diferenciação osteogênica de CTMs da linhagem C3H10T1/2 de camundongos (SON et al., 2018). No entanto, nesses trabalhos foram utilizadas concentrações elevadas de Kp-10 (100 nM e 50 μ M) por curto período (24-72 horas). Além disso, é importante ressaltar que foram utilizadas células de embriões de macacos e camundongos, diferente do presente trabalho onde foram utilizadas CTMs de ratas adultas.

GOLZAR e colaboradores em 2015 mostraram que Kp-10 nas concentrações de 10, 100 ou 500 nM apresenta efeitos na migração de CTMs modulando a progressão tumoral e que esse efeito *in vitro* e *in vivo* pode ser positivo ou negativo, dependendo da concentração de Kp-10 administrada. Neste estudo os pesquisadores observaram que a maior concentração de Kp-10 (500 nM) reduziu a migração de CTMs, enquanto, concentrações menores (10 e 100 nM) estimularam a migração e a progressão tumoral provavelmente através de diferentes efeitos na expressão de CXCR4. Em nosso estudo, concluímos que o efeito *in vitro* direto na Kp-10 em baixas concentrações inibe a diferenciação osteogênica de CTMs e pode ser distinto daquele observado em concentrações mais elevadas como demonstrado por outros pesquisadores.

No nosso estudo, a caracterização fenotípica das células extraídas da MO demonstrou que estas apresentaram características semelhantes e compatíveis com a de CTMs segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, ou seja, expressaram CD54, CD73, CD90 e quase não expressaram CD45 (PITTENGER et al., 1999; SCHÄFFLER & BÜCHLER, 2007). Além disso, apresentaram capacidade de adesão a superfície plástica das garrafas de cultivo, apresentaram aspecto fibroblastóide quando indiferenciadas e se diferenciaram em osteoblastos quando cultivadas em meio para diferenciação osteogênica. Esse conjunto de características permitiram comprovar a pureza da cultura de CTMs.

Após determinar a pureza das CTMS estas foram cultivadas em meio osteogênico para estimular sua diferenciação, que foi avaliada por meio de parâmetros como atividade de fosfatase alcalina, expressão de genes como Runx-2 e síntese e mineralização da matriz extracelular. Além desses parâmetros as células também foram avaliadas com relação a

celularidade e viabilidade celular pela porcentagem de células após a diferenciação/campo e ensaio de redução do MTT em cristais de formazan, respectivamente.

Nos ensaios de redução do MTT em cristais de formazan, as células de todos os grupos tratados com Kp-10 apresentaram menor redução em pelo menos dois dos períodos de análise do cultivo. A redução do MTT em cristais de formazan é um ensaio que avalia a viabilidade celular por meio da atividade enzimática da succinato desidrogenase presente em mitocôndrias de células viáveis (ALTMAN, 1976; HOLT et al., 1987). Mas este ensaio sofre influência da celularidade da cultura. Sendo assim, não se pode afastar a possibilidade da redução de MTT em cristais de formazan nos grupos tratados com Kp-10 aos 7 e 14 dias ter sido influenciada pela redução da celularidade. HUMA e colaboradores, 2013, verificaram que Kp-10 em diferentes concentrações (0,1, 1,0, 10,0 e 100 nM) diminui o número de células embrionárias da linhagem R366.4 sugerindo um papel antiproliferativo no crescimento dessas células. Este resultado sugere que o tratamento com a Kp-10 inibe o crescimento celular nos períodos iniciais da diferenciação osteogênica das CTMs. Aos 21 dias, os grupos tratados com Kp-10 nas concentrações de 0,01 e 0,1µg/mL apesar de ainda apresentarem menor redução do MTT em cristais de formazan, já não apresentavam diferença na porcentagem de células/área em comparação ao grupo controle. Essa redução do MTT pode ser explicada pela menor atividade dessas células que demonstraram uma diminuição da diferenciação osteogênica em relação ao controle como por exemplo na análise dos nódulos mineralizados.

A contagem de nódulos mineralizados aos 21 dias apresentou decréscimo em todos os grupos tratados com Kp-10 em comparação com o controle de forma concentração-dependente. Além disso também houve diminuição da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e diminuição da expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e Runx-2. Estes resultados indicam que, nas concentrações testadas, a Kp-10 atuou de forma negativa na diferenciação das CTMs em osteoblastos.

Durante a osteogênese, há aumento na expressão de genes e na produção de proteínas específicas que funcionam como sinalizadores para esse processo. A síntese de colágeno tipo I é um dos eventos iniciais na via de diferenciação osteoblástica, que por sua vez

induz a expressão de importantes fatores de transcrição como o Runx-2 e a fosfatase alcalina (XIAO et al., 1998; AUBIN, 2001).

O Runx-2 é expresso em altos níveis pelas células osteoprogenitoras (KIM et al., 1999; TAKEDA et al., 2001; VAES et al., 2006) bem como, em osteoblastos (DUCY et al., 1997). Estudos tem demonstrado a importância da atividade transcricional do Runx-2 na regulação de genes *in vivo* e *in vitro*. Estes genes pertencem principalmente ao grupo das proteínas da matriz extracelular óssea, tais como osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea bem como os fatores de crescimento e seus receptores como a osteoprotegerina e o TGF, entre outros (DUCY et al., 1997; JAVED et al., 2001; KERN et al., 2001; STOCK et al., 2004; TAKAGI et al., 2004; VAES et al., 2006; MOIOLI et al., 2007). A proteína morfogenética óssea (BMP-2) também têm sido implicada no processo regulador osteogênico devido às suas atividades mitogênicas e de diferenciação. Dentre elas, a BMPs-2 é considerada osteoindutora, promovendo o aumento da formação de nódulos mineralizados e do teor de cálcio em culturas *in vitro* (LUU et al., 2007). Dessa forma, a avaliação desses fatores é muito importante durante o processo da diferenciação osteogênica.

No presente estudo, aos sete dias de cultivo, o tratamento com Kp-10 nas concentrações de 0,01 e 0,1 µg/mL acarretou menor atividade da fosfatase alcalina em comparação ao controle. Aos 14 e 21 dias, todos os grupos tratados com Kp-10 (0,01, 0,05 e 0,1 µg/mL) apresentaram atividade da fosfatase alcalina menor, sendo esse efeito concentração-dependente.

A expressão da fosfatase alcalina também têm sido relacionada com as isoformas de Runx-2 (HARADA et al., 1999). A fosfatase alcalina óssea pode ser encontrada ligada às proteínas de superfícies dos osteoblastos (Thy-1 e N-CAM) por meio de ligações covalentes com complexos lipídicos de fosfoinositol na membrana plasmática, sugerindo seu envolvimento nas sinalizações transmembrana. Além disso, a fosfatase alcalina pode ser encontrada livre na matriz mineralizada (AUBIN, 2001; CLARKE, 2008), sendo sua função a de aumentar as concentrações locais de fósforo, remover os inibidores do crescimento dos cristais de hidroxiapatita ou modificar as fosfoproteínas para controlar a sua capacidade de atuar como nucleadores. A fosfatase alcalina também tem sido associada à regulação da proliferação, migração e diferenciação de células da linhagem osteoblástica, sendo considerada um marcador precoce da diferenciação

osteogênica (HUI et al., 1996; BRUDER et al., 1998; PAYUSHINA et al., 2006). Dessa forma, os resultados obtidos no presente estudo são sugestivos de que houve diminuição na diferenciação osteogênica precoce de maneira crescente e concentração-dependente, ou seja, quanto maior a concentração de Kp-10 adicionada ao meio de cultura, menor a atividade da fosfatase alcalina.

Aos 21 dias, observou-se que todos os grupos tratados com Kp-10 apresentaram declínio na expressão de transcritos gênicos não só para Runx-2, mas também para o colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina em comparação com o grupo controle, além disso a maior concentração de Kp-10 também promoveu uma diminuição da síntese de colágeno na matriz.

O Runx-2 é um fator essencial para regulação das proteínas colagênicas e não colagênicas, por isso sua redução está intimamente relacionada a redução dos demais parâmetros. As proteínas não colagênicas aparecem em diferentes estágios do processo de formação e mineralização da matriz óssea, sendo a osteopontina e a sialoproteína óssea consideradas marcadores precoces e a osteocalcina marcador tardio da diferenciação osteogênica (DELANY et al., 2003; GERICKE et al., 2005; AKSU et al., 2008; KARAOZ et al., 2009). No presente estudo a Kp-10 está afetando tanto os marcadores precoces quanto tardios da diferenciação osteogênica.

A osteopontina e a sialoproteína óssea são consideradas proteínas multifuncionais, pois estão envolvidas na adesão, na proliferação e migração celular além do controle da mineralização (NANCI et al., 1999; SODEK et al., 2000; DONZELLI et al., 2007). A osteopontina é expressa durante o período de proliferação celular e no início da mineralização (ZOHAR et al., 1998), promovendo a precipitação prematura dos cristais de fosfato de cálcio na matriz colagênica (DOI et al., 1992). Já a sialoproteína óssea é expressa por osteoblastos recém diferenciados (GANSS et al., 1999) e está presente na matriz óssea mineralizada (HEINEGARD & OLDBERG, 1989). A osteocalcina, que é encontrada mais tardiamente no decorrer do processo de mineralização óssea (PRICE et al., 1976; ROACH, 1994; AKSU et al., 2008), caracteriza-se por ser uma proteína que promove a mineralização óssea por meio da regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Essa proteína é expressa apenas pelos osteoblastos maduros durante o processo de síntese da matriz óssea (STEIN & LIAN, 1993; AUBIN et al., 1996). A

redução dessas proteínas *in vitro* reflete no produto final da diferenciação que é a produção dos nódulos mineralizados, como observamos houve redução de nódulos em todas as concentrações de Kp-10.

A avaliação dos genes relacionados com a diferenciação osteogênica por RT-PCR em tempo real permite a quantificação destes genes nos diferentes grupos testados, demonstrando quais genes foram estimulados ou suprimidos com a adição da Kp-10. Diferentemente do observado para os outros genes, o gene BMP-2, apresentou aumento em sua expressão em todos os grupos tratados com Kp-10, quando comparados ao grupo controle, de forma concentração-dependente. Este resultado sugere que a Kp-10 foi capaz de estimular a expressão de BMP-2, enquanto suprimiu os outros genes testados.

SON e colaboradores, 2018, demonstraram que o Kp-10 em concentrações elevadas (50 μ M) estimulam a diferenciação de osteoblastos por meio da expressão e ativação de BMP2 mediada por NFATc4. O fator de transcrição NFATc4 estaria envolvido na regulação da transcrição de BMP2, sendo que a ativação de GPR54 por Kp-10 levaria à ligação de NFATc4 ao promotor BMP2. E o efeito autócrino do BMP2 aumentaria a diferenciação osteogênica por meio da fosforilação de Smad 1/5/9.

Em culturas de CTMs, as BMPs são capazes de estimular a diferenciação osteogênica (SHEA et al 2003; RICKARD et al 1994). Estas proteínas formam uma rede complexa na qual a BMP-2 é indicada como mediadora precoce desta diferenciação, além de possivelmente atuar como reguladora central desta rede (EDGAR et al, 2007). Mesmo sendo essencial, o estímulo isolado de BMP-2 não foi suficiente para aumentar a diferenciação osteogênica nos grupos em que a Kp-10 foi adicionada ao meio de cultura. Isto pode ter ocorrido devido a ação complexa desta rede de proteínas. Acreditamos que a diminuição na expressão do gene Runx-2 tenha impedido uma ação positiva de BMP-2 na diferenciação. Este gene corresponde a um fator de transcrição essencial para a diferenciação osteogênica e atua de forma complementar e a jusante das BMPs (YANG et al 2003). A diminuição do Runx-2 pode estar diretamente relacionada à supressão do estímulo da diferenciação osteogênica pela Kp-10 nas CTMs. Assim como a proteína BMP-2, o Runx-2 também tem efeitos positivos na diferenciação

osteogênica de CTMs, quando adicionada ao meio de cultura, sendo que os efeitos do Runx-2 foram descritos como sendo mais específicos (ZHANG et al 2006).

E para finalizar foi realizada a imunocitoquímica para o marcador de membrana GPR54 que é o marcador para receptor de Kiss1 e através do qual a Kp-10 se liga para atuar em diversos tipos celulares do organismo. A partir da imunocitoquímica verificamos a presença deste marcador nas células após diferenciação osteogênica, diferentemente das CTMs indiferenciadas, que não apresentaram esta marcação. Com este resultado, podemos inferir que a presença do receptor GPR54 se dá durante a diferenciação osteogênica das CTMs, demonstrando o possível meio através do qual a kiss1 possa atuar nas células de origem osteogênica. HUMA e colaboradores, 2013 observaram que a expressão do receptor GPR54 foi aumentando durante a diferenciação neuronal de células tronco embrionárias. Além disso, SON e colaboradores observaram que Kp-10 em concentrações elevadas (50 μ M) estimula a diferenciação osteogênica, porém quando as células eram GPR54^{-/-} houve supressão da diferenciação, mostrando que a Kp-10 promoveu esses efeitos através desse receptor.

Com a realização do presente estudo conseguimos inferir que as CTMs durante a diferenciação osteogênica apresentam receptor GPR54 ao qual Kp-10 se liga e através desse receptor nas concentrações testadas, ela apresenta efeito negativo sobre a osteogênese in vitro, caracterizado pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno, de nódulos mineralizados e pela diminuição da expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e Runx-2.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

AKSU, A.E.; RUBIN, J.P.; DUDAS, J.R.; MARRA, K.G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.*, v.60, p.306-322. 2008.

ALTMAN, F.P. The quantification of formazans in tissue sections by microdensitometry. I. The use of neotetrazolium chloride. *Histochem. J.*, v.8, p.373-381, 1976.

- ALVES, E. G.L.; SERAKIDES, R; BOELONI, J.N., et al. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of Young dogs. *BMC Vet Res.*, v.2, p.190, 2014.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J.N. et al. Estudo comparativo da diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de cães adultos. *Pesquisa Veterinária Brasileira (Online)*., v.36, p.21-32, 2016.
- ALVES, E.G.L.; SERAKIDES, R. ; ROSADO, I. R. et al. Isolamento e cultivo de células-tronco mesenquimais extraídas do tecido adiposo e da medula óssea de cães. *Ciência Animal Brasileira (Online)*., v.18, p.e-34050-34063, 2017.
- APPASANI, K.; APPASANI, R.K. Introduction to stem cells and regenerative medicine. In: *Stem Cells & Regenerative Medicine*. Humana Press, Totowa, NJ. v. p. 3-18, 2011.
- AUBIN, J.E. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v.2, p.81-94, 2001.
- APPASANI, K.; APPASANI R.K., eds. *Stem cells & regenerative medicine: from molecular embryology to tissue engineering*. Springer Science & Business Media, p.3-629, 2010.
- ARONOW, M.A.; GERSTENFELD, L.C.; OWEN, T.A., et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell Physiol.*, v.143, p.213-221, 1990.
- AUBIN, J.E.; LIU, F. The osteoblast lineage. In: Bilezikian, J.P., Raisz, L.G. and Rodan, G.A. (eds.) *Principles of bone biology*. Academic Press, San Diego, CA, USA, p.51-67, 1996.
- AUBIN, J.E. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v.2, p.81-94, 2001.
- BELLOWS, C.G.; HEERSCHKE, J.N. e AUBIN, J.E. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.*, v.17, p.15-29, 1992.
- BIANCO, P.; FISHER, L.W.; YOUNG, M.F. et al. Expression of bone sialoprotein (BSP) in developing human tissues. *Calcif Tissue Int.*, v.49, p.421-426, 1991.
- BLUMER, M.J.F. Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Annals of Anatomy*, v.235, p.151704, 2021.
- BREELAND, G.; SINKLER, M.A.; MENEZES, R.G. Embryology, Bone Ossification. In: *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls, 2020.

- BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N.S. et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop.*, v.355, p.S247-256, 1998.
- BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASSELI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.*, v.31, p.25-35, 2009.
- CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S. et al. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*, v.98, p.2396-2402, 2001.
- CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P. et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*; v.22, p.81-91, 2003.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v. 9, p. 641-650, 1991.
- CHUNG, C.H.; GOLUB, E.E.; FORBES, E.; TOKUOKA, T.; SHAPIRO, I.M. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue Int.*, v.51, p.305- 311, 1992.
- CIARAMELLA, V., DELLA CORTE, C. M., CIARDIELLO, F., & MORGILLO, F. Kisspeptin and cancer: molecular interaction, biological functions, and future perspectives. *Frontiers in endocrinology*, v.9, p.115, 2018.
- CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, v.3, p. S131-139, 2008.
- COOPER, C.; HARVEY, N.; JAVAID, K., et al. Growth and bone development. Nestle. *Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.*, v.61, p.53-68, 2008.
- COUSSENS, A.K.; HUGHES, I.P.; MORRIS, C.P., et al. In vitro differentiation of human calvarial suture derived cells with and without dexamethasone does not induce in vivo-like expression. *J. Cell. Physiol.*, v.218, p.183-191, 2009.
- COWIN S.C. Bone poroelasticity. *J. Biomech.*, v.32, p.217-238, 1999.
- DELANY, A.M.; KALAJZIC, I.; BRADSHAW, A.D., et al. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*, v.144, p. 2588-2596, 2003.
- DHILLO, W.S.; CHAUDHRI, O.B.; THOMPSON, E.L. et al. Kisspeptin-54 stimulates gonadotropin release most potently during the preovulatory phase of the menstrual cycle in women. *J Clin Endocrinol Metab.*, v.92, p.3958-66, 2007.
- DIMITRIOU, R.; GIONNOUDIS, P.V. Discovery and development of BMPs. *Int J Care Injured*. v.36, p.S28-S33, 2005.

- DOBLARÉ, M.; GARCIA, J.M.; GÓMEZ, M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*, v. 71(13-14), p. 1809-1840, 2004.
- DOCKRAY, G.J. The expanding family of -RFamide peptides and their effects on feeding behaviour. *Exp. Physiol.*, v.89, p.229-235, 2004.
- DOI, Y.; HORIGUCHI, T.; KIM, S.H., et al. Effects of non-collagenous proteins on the formation of apatite in calcium beta-glycerophosphate solutions. *Arch. Oral Biol.*, v.37, p.15-21, 1992.
- DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymalstromal cells. *The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy*. v.8, p.315-7, 2006.
- DONZELLI, E.; SALVADE, A.; MIMO, P., et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch. Oral Biol.*, v.52, p.64-73, 2007.
- DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V. et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, v.89, p.747-754, 1997.
- DUNGAN H.M., CLIFTON D.K, STEINER R.A., Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion, *Endocrinology*, v.147, p.1154-1158, 2006.
- EDGAR C.M., CHAKRAVARTHY V., BARNES G., et al. Autogenous regulation of a network of bone morphogenetic proteins (BMPs) mediates the osteogenic differentiation in murine marrow stromal cells. *Bone*, v.40, p.1389, 2007.
- FORONJY, R.F. e MAJKA, S.M. The potential for resident lung mesenchymal stem cells to promote functional tissue regeneration: understanding microenvironmental cues. *Cells.*, v.1, p.874, 2012.
- FRIEDENSTEIN, A.J.; DERIGLAZOVA, U.F.; KULAGINA, N.N. et al., Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol*, v.2, p.83-92, 1974.
- GANSS, B.; KIM, R.H. e SODEK, J. Bone sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.10, p.79-98, 1999.
- GEORGE, J.T.; MILLAR, R.P.; ANDERSON, R.A. Hypothesis: kisspeptin mediates male hypogonadism in obesity and type 2 diabetes. *Neuroendocrinology*, v.91, p.302-307, 2010.
- GERICKE, A.; QIN, C.; SPEVAK, L. et al. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif. Tissue Int.*, v.77, p.45-54. 2005.

- GOLZAR, F.; JAVANMARD, S. H.; BAHRAMBEIGI, V.; RAFIEE, L. The effect of Kisspeptin-10 on mesenchymal stem cells migration in vitro and in vivo. *Advanced biomedical research*, v.4, p.20, 2015.
- GLANOWSKA, K. M.; MOENTER, S. M. Differential regulation of GnRH secretion in the preoptic area (POA) and the median eminence (ME) in male mice. *Endocrinology*, v. 156, p.231-241, 2015.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem cells*, v.22, p.487-500, 2004.
- GUREVITCH, O.; KURKALLI, B.G.S.; PRIGOZHINA, T.; et al. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells*, v. 21, p.588-97, 2003.
- HAN, S.Y.; MCLENNAN, T.; CZIESELSKY, K.; HERBISON, A.E. Selective optogenetic activation of arcuate kisspeptin neurons generates pulsatile luteinizing hormone secretion. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v.112, p.13109-13114, 2015.
- HANADA, K.; DENNIS, J.E.; CAPLAN, A.I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.*, v.10, p.1606-14, 1997.
- HARADA, H.; TAGASHIRA, S.; FUJIWARA, M. et al., Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 6972-6978, 1999.
- HASS, R.; KASPER, C.; BOHM, S., et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell. Commun. Signal*, v.9, p.12, 2011.
- HAUGE-EVANS, A.C.; RICHARDSON, C.C.; MILNE, H.M.; CHRISTIE, M.R. et al. A role for kisspeptin in islet function. *Diabetologia*, v.49, p.2131-2135, 2006.
- HAYNESWORTH, S.E.; GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V.M. et al. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, v.13, p.81-88, 1992.
- HEINEGARD, D. e GOLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb. J.*, v.3, p.2042-2051, 1989.
- HENG, B.C.; CAO, T.; LEE, E.H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage in vitro. *Stem Cells*, v. 22, p.1152-67, 2004.

- HERBER, C.B.; INGRAHAM, H.A. Should We Make More Bone or Not, As Told by Kisspeptin Neurons in the Arcuate Nucleus. *In Seminars in reproductive medicine.*, v.37, p.147-150, 2019.
- HERBER, C.B.; KRAUSE, W.C.; WANG, L. et al. Estrogen signaling in arcuate Kiss1 neurons suppresses a sex-dependent female circuit promoting dense strong bones. *Nature communications.*, v.10, p.1-11, 2019.
- HERBISON, A.E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nature Reviews Endocrinology.*, v.12, p.452-466, 2016.
- HOEMANN, C.D.; EL-GABALAWY, H. e MCKEE, M.D. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol. Biol.*, v.57, p.318-323, 2009.
- HOLT, P.S.; BUCKLEY, S. e DELOACH, J.R. Detection of the lethal effects of T-2 mycotoxin on cells using a rapid colorimetric viability assay. *Toxicol. Lett.*, v.39, p.301-312, 1987.
- HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M., et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.*, v.7, p.393-395, 2005.
- HU, K.L.; ZHAO, H.; CHANG, H.M. et al. Kisspeptin/kisspeptin receptor system in the ovary. *Frontiers in endocrinology.*, v.8, p.365, 2018.
- HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S., et al. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone*, v.30, p.293-299, 2002.
- HUANG Z, NELSON ER, SMITH RL, GOODMAN SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteroprogenitors] to osteoblasts in vitro. *Tissue Eng.*, v.13, p.2311-2320, 2007.
- HUI, M.Z.; SUKHU, B. e TENENBAUM, H.C. Expression of tissue non-specific alkaline phosphatase stimulates differentiated behaviour in specific transformed cell populations. *Anat. Rec.*, v.244, p.423-436, 1996.
- HUMA, T.; HU, X.; MA, Y. et al. Kisspeptin-10 treatment generated specific GnRH expression in cells differentiated from rhesus monkey derived Lyon NSCs. *Neuroscience*, v.349, p.318-329, 2017.
- HUMA, T.; WANG, Z.; RIZAK, J. et al. Kisspeptin-10 modulates the proliferation and differentiation of the rhesus monkey derived stem cell line: R366. 4. *The Scientific World Journal.* v.2013, p.135470, 2013.

- HUSSAIN, M.A.; SONG, W.J.; WOLFE, A. There is Kisspeptin – And Then There is Kisspeptin. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v.26, p.564-572, 2015.
- JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I. et al. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.*, v.64, p.295-312, 1997.
- JANKOWSKI, R.J.; DEASY, B.M. e HUARD, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.*, v. 9, p. 642-647, 2002.
- JAVED, A.; BARNES, G.L.; JASANYA, B.O., et al. runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol. Cell. Biol.*, v.21, p.2891-2905, 2001.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v.418, p.41-9, 2002.
- KARAOZ, E.; AKSOY, A.; AYHAN, S., et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem. Cell. Biol.*, v.132, p.533-546, 2009.
- KAWAGUCHI, J.; MEE, P.J.; SMITH, A.G. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone*, v.36, p.758-769, 2005.
- KERN, B.; SHEN, J.; STARBUCK, M., et al. Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes. *J. biol. Chem.*, v.276, p.7101-7107, 2001.
- KIM, L.S.; OTTO, F.; ZABEL, B. et. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.*, v.80, p.159-170, 1999.
- KOTANI, M.; DETHEUX, M.; VANDENBOGAERD, A. et al. The metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes kisspeptins, the natural ligands of the orphan G protein-coupled receptor GPR54. *J. Biol. Chem.*, v. 276, p.34631-34636, 2001.
- LA ROCCA, G.; ANZALONE, R., CORRAO, S.; MAGNO, F.; LORIA, T. et al. Isolation and characterization of Oct-4⁺/HLA-G⁺ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem. Cell Biol.*, v.131, p.287-282, 2009.
- LEDESMA-MARTINEZ, E.; MENDOZA-NUNEZ, V.M. e SANTIAGO-OSORIO, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int.*, v.2016, p.4709572, 2016.

- LEE, J.H.; MIELE, M.E.; HICKS, D.J. et al. KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene, *JNCI: Journal of the National Cancer Institute.*, v.88, p.1731-1737, 1996.
- LEE, J.H.; WELCH, D.R. Identification of highly expressed genes in metastasis-suppressed chromosome 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display. *International Journal of Cancer.*, v.71, p.1035-44, 1997.
- LEE, D.K.; NGUYEN, T.; O'NEILL, G.P. et al. Discovery of a receptor related to the galanin receptors. *FEBS letters.*, v.446, p.103-107, 1999.
- LEE, W.S.; SUZUKI, Y.; GRAVES, S.S. et al. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.*, v.17, p.465-75, 2011.
- LICINI, C.; VITALE-BROVARONE, C.; MATTIOLI-BELMONTE, M. Collagen and non-collagenous proteins molecular crosstalk in the pathophysiology of osteoporosis. *Cytokine & growth factor reviews.*, v.49, p.59-69, 2019.
- LIN, Z.; PEREZ, P.; LEI, D., et al. Two-phase analysis of molecular pathways underlying induced pluripotent stem cell induction. *Stem Cells.*, v. 29, p. 1963-1974, 2011.
- LIN, S.; SHEN, H.; JIN, B., et al. Brief report: Blockade of Notch signaling in muscle stem cells causes muscular dystrophic phenotype and impaired muscle regeneration. *Stem Cells*, v.31, p.823-828, 2013.
- LU, P.Z.; LAI, C.Y.; CHAN, W.H. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.*, v.9, p.698-718, 2008.
- LUU, H.H.; SONG, W.X.; LUO, X. et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v.25, p.665-77, 2007.
- LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.16, p.599- 603, 2004.
- MACARI, S. et al. Kisspeptin acts on bone cells to prevent obesity-induced osteopenia. 9th International Congress of Neuroendocrinology, 2018a.

- MAFI, R.; HINDOCHA, S.; MAFI, P., et al. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop. J.*, v. 5, p. 242-248, 2011.
- MASUI, T.; DOI, R.; MORI, T. et al. Metastin and its variant forms suppress migration of pancreatic cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications.*, v.315, p.85-92, 2004.
- MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v.16, p.713-20, 2004.
- MCKEE, M.D.; NANJI, A. Osteopontin: an interfacial extracellular matrix protein in mineralized tissues. *Connective tissue research.*, v.35, p.197-205, 1996.
- MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, v.119, p.2204-2213, 2006.
- MILLAR, R.P.; NEWTON, C.L. Current and future applications of GnRH, kisspeptin and neurokinin B analogues. *Nature Reviews Endocrinology*, v.9, p.451-466, 2013.
- MINGUELL, J.J.; ERICES, A. e CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, v. 226, p. 507-520, 2001.
- MOIOLI, E.K.; HONG, L. e MAO, J.J. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen.*, v.15, p.413-421, 2007.
- MONACO, E.; BIONAZ, M.; RODRIGUES-ZAS, S. et al. Transcriptomics comparison between porcine adipose and bone marrow mesenchymal stem cells during in vitro osteogenic and adipogenic differentiation. *PloS one.*, v.7, p.e32481, 2012.
- MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B. et al. Stem cell therapy a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.48, p.3464-74, 2003.
- NANJI, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J. Struct. Biol.*, v.126, p.256- 269, 1999.
- NAVARRO, V. M. et al. Effects of Kiss-1 peptide, the natural ligand of GPR54, on follicle- 62 stimulating hormone secretion in the rat. *Endocrinology*, v.146, p.1689-1697, 2005.
- OHTAKI, T.; SHINTANI, Y.; HONDA, S. et al. Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature.*, v.411, p.613-617, 2001.

- OLBRICH, T.; ZIEGLER, E.; TÜRK, G. et al. Kisspeptin-10 inhibits bone-directed migration of GPR54-positive breast cancer cells: Evidence for a dose–window effect. *Gynecologic oncology*, v. 119, p. 571-578, 2010.
- PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; QUARTO, N.; LONGAKER, M.T. Mesenchymal stem cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.*, v.51, p.25-41, 2009.
- PARK, S.H.; SIM, W.Y.; MIN, B.H. et al. Chip-based comparison of the osteogenesis of human bone marrow-and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells under mechanical stimulation. *PLoS One.*, v.7, p. e46689, 2012.
- PASQUIER, J.; KAMECH, N.; LAFONT, A.G. et al. Kisspeptin/kisspeptin receptors. *J Mol Endocrinol*, v.52, p.T101-T117, 2014.
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Biology Bulletin*, v.33, p.2-18, 2006.
- PERCIVAL, C.J.; RICHTSMEIER, J.T. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Developmental Dynamics.*, v.242, p.909-922, 2013.
- PINILLA, L.; AGUILAR, E.; DIEGUEZ, C. et al. Kisspeptins and reproduction: physiological roles and regulatory mechanisms. *Physiological reviews.*, v.92, p.1235-1316, 2012.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.*, v.284, p.143-147, 1999.
- PORTER, J.R.; RUCKH, T.T.; POPAT, K.C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology progress.*, v.25, p.1539-1560, 2009.
- PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell Dev. Biol.* v.13, p.369-76, 2002.
- PRICE, P.A.; OTSUKA, A.A.; POSER, J.W. et al. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.73, p.1447-1451, 1976.
- RAMALHO, T.V.N. Efeito protetor da kisspeptina na perda óssea causada pela falta de testosterona em ratos. Dissertação de Mestrado, UFMG, 2021.
- RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMERO, A., et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.144, p.147-154, 2011.

- RICKARD, D.J.; SULLIVAN, T.A.; SHENKER, B.J. et al. Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2. *Dev Biol.*, v.28, p.161-218, 1994.
- RINGEL, M.D.; HARDY, E.; BERNET, V.J. et al. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.*, v 87, p.2399-2402, 2002.
- ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell. Biol. Int.*, v.18, p.617-628, 1994.
- ROSEWEIR, A.K.; MILLAR, R.P. The role of kisspeptin in the control of gonadotrophin secretion. *Human reproduction update.*, v.15, p.203-212, 2009.
- SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells - basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.*, v.25, p.818-827, 2007.
- SELL, S. *Stem Cells Handbook*. 2. ed. New York, USA: Humana Press. p. 1-534, 2013.
- SHEA, C.M.; EDGAR, C.M.; EINHORN, T.A.; GERSTENFELD, L.C. BMP treatment of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells induces both chondrogenesis and osteogenesis. *J Cell Biochem.*, v.27, p.90, 2003.
- SILVA, R.F., SASSO, G.R.S., CERRI, E.S. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.*, v.2015; p.421746, 2015.
- SLACK, J. M. W. *The Science of Stem Cells*. 1. ed. USA: Wiley Blackwell. p. 1-248, 2018.
- SMITH, J. T. et al. Regulation of Kiss1 gene expression in the brain of the female mouse. *Endocrinology.*, v.146, p.3686-3692, 2005.
- SODEK, J.; GANSS, B. e MCKEE, M.D. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 11, p. 279-303, 2000.
- SON, H.E.; KIM, K.M.; KIM, E.J. et al. Kisspeptin-10 (KP-10) stimulates osteoblast differentiation through GPR54-mediated regulation of BMP2 expression and activation. *Sci Rep.*, v. 8, p. 2134, 2018.
- STEIN, G.S. e LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.*, v.14, p. 424-442, 1993.

- STEIN, G.S.; LIAN, J.B.; STEIN, J.L. et al. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev.*, v.76:p.593-629, 1996.
- STENDERUP, K.; JUSTESEN, J.; CLAUSEN, C. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone.*, v.33, p.919-926, 2003.
- STOCK, M.; SCHAFER, H.; FLIEGAUF, M. et al. Identification of novel target genes of the bone-specific transcription factor Runx-2. *J. Bone Miner. Res.*, v.19, p.959-972, 2004.
- SU, S.J.; CHANG, K.L.; SU, S.H. et al. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int. J. Food Sci. Nut.*, v.64, p.429-36, 2013.
- TAE, S.; LEE, S.; PARK, J. et al. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed. Mater.*, v.1, p.63-71, 2006.
- TAKAGI, M.; KAMIYA, N.; TAKAHASHI, T., et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 on gene expression of transcription factors, AJ18 and Runx2 in cultured osteoblastic cells. *J. Mol. Histol.*, v. 35, p. 81-90, 2004.
- TAKEDA, S.; BONNAMY, J.; OWEN, M.J. et al. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.*, v.15, p.467-481, 2001.
- TOLSON, K.P.; GARCIA, C.; YEN, S. et al. Impaired kisspeptin signaling decreases metabolism and promotes glucose intolerance and obesity. *The Journal of clinical investigation.*, v.124, p.3075-3079, 2014.
- TULI, R.; SEGHA TOLESLAMI, M.R.; TULI, S.; WANG, M.L.; HOZACK, W.J.; MANNER, P.A.; DANIELSON, K.G.; TUAN, R.S. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol. Biotechnol.* 2002.
- TURINETTO, V.; VITALE, E. e GIACHINO, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p., 2016.
- VAES, B.L.T.; DUCY, P.; SIJBERS, A.M. et al. Microarray analysis on Runx -2 deficient mouse embryos reveals novel Runx-2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone.*, v.39, p.724-738, 2006.

- XIAO, G.; CUI, Y.; DUCY, P., et al. Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol. Endocrinol.*, v. 11, p. 1103-1113, 1997.
- XIAO, Z.S.; THOMAS, R.; HINSON, T.K., et al. Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor. *Gene.*, v. 214, p. 187-197, 1998.
- YANG, S.; WEI, D.; WANG, D. et al. In vitro and in vivo synergistic interactions between the Runx2/Cbfa1 transcription factor and bone morphogenetic protein-2 in stimulating osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.*, v.18, p.705-715, 2003.
- YANG, Y.; SONG, H.L.; ZHANG, W.; WU, B.J.; FU, N.N.; ZHENG, W.P.; DONG, C.; SHEN, Z.Y. Reduction of acute rejection by bone marrow mesenchymal stem cells during rat small bowel transplantation. *PLoS One.*, v.9, p.e114528, 2014.
- ZAIDI, M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine.*, v.13, p.791-801, 2007.
- ZHANG, X; YANG, M.; LIN, L. et al. Runx2 Overexpression Enhances Osteoblastic Differentiation and Mineralization in Adipose – Derived Stem Cells in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int.*, v.7, p.169-178, 2006.
- ZOHAR, R.; CHEIFETZ, S.; MCCULLOCH, C.A., et al. Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur. J. Oral. Sci.*, v. 106, p. 401-407, 1998.
- ZUR NIEDEN, N.I.; KEMPKA, G.; AHR, Hans J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts. *Differentiation.*, v.71, p.18-27, 2003.

ANEXO

ANEXO 1: APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

 UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CEUA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Prezado(a):	
Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.	
Protocolo CEUA: 11/2020 Título do projeto: Potencial terapêutico da kisspeptina nas alterações ósseas e cartilaginosas causadas pelo hipotireoidismo Finalidade: Pesquisa Pesquisador responsável: Amanda Maria Sena Reis Unidade: Instituto de Ciências Biológicas Departamento: Departamento de Patologia	
Situação atual: Decisão Final - Aprovado	
Aprovado na reunião do dia 16/03/2020. Validade: 16/03/2020 à 15/03/2025. Belo Horizonte, 16/03/2020.	
Atenciosamente,	
Sistema Solicite CEUA UFMG https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/ Universidade Federal de Minas Gerais Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005 31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil Telefone: (31) 3409-4516 www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpg.ufmg.br	