

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINARIA  
Colegiado de Pós- Graduação em Ciência Animal**

**DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DAS CÉLULAS  
TRONCO MESENQUIMAIS DO TECIDO ADIPOSEO DE  
RATAS SOB EFEITO DA LACTAÇÃO E DA PROLACTINA**

**KARINA PESSOA OLIVEIRA**

**Belo Horizonte  
2017**

**Karina Pessoa Oliveira**

**Diferenciação de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas sob efeito da lactação e da prolactina**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal  
Área: Patologia Animal  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Natália de Melo Ocarino

**Belo Horizonte**  
**Escola de Veterinária-UFMG**  
**2017**

Oliveira, Karina Pessoa, 1986 –  
O48d Diferenciação de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas  
sob efeito da lactação e prolactina / Karina Pessoa Oliveira. – 2017  
54p.: il.

Orientadora: Natália de Melo Ocarino  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais , Escola de  
Veterinária  
Inclui bibliografia.

1.Rato como animal de laboratório – Teses. 2.Células tronco mesenquimais  
– Teses. 3. Lactação – Teses. 4. Prolactina – Teses. Ocarino, Natália de Melo.  
II.Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária. III. Título .

CDD- 636.089607

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**KARINA PESSOA OLIVEIRA**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovada em 17 de Fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

*Natália de Melo Ocarino*

Prof<sup>a</sup>. Natália de Melo Ocarino  
Presidente - Orientador

*Rogéria Serakides*

Prof<sup>a</sup>. Rogéria Serakides  
Escola de Veterinária - UFMG

*Carla Maria Osório Silva*

Dr<sup>a</sup>. Carla Maria Osório Silva  
Doutorado - UFMG

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por sempre guiar meus passos na dura jornada que é viver, me mantendo firme e motivada na busca de um sonho e me levantando nos momentos em que me faltaram força e coragem para continuar a caminhar.

Ao meu maior exemplo de mulher, minha mãe amada Maria do Carmo, minha maior inspiração! Se hoje chego ao fim de mais uma etapa importante da vida, é porque você esteve ao meu lado desde o início como minha maior incentivadora. Sua presença é constante em minha mente e em meu coração. Minha vitória é sua também, afinal, você me deu a vida e me ensinou a amar!

Ao meu padrasto e segundo pai Itamar, que sempre acreditou no meu potencial, mesmo quando eu não acreditei.

Ao meu pai Edson, que mesmo morando longe, sempre esteve presente nas minhas maiores vitórias, me apoiando e me amando.

Aos meus amados irmãos, Ana Maria e Carlos Eduardo e meu lindo sobrinho Pedro, vocês se fazem presente em meu coração todos os dias, nossos laços não são apenas de sangue, são de alma. Sinto muito por ser sempre a irmã/tia que está longe nas reuniões da família, mas meu amor por vocês é incondicional.

À Jan Felipe, meu namorado, companheiro e amigo, obrigada por deixar tudo e topou viver esse sonho comigo, dividindo as alegrias e as angústias que são morar longe da família. Tudo se tornou mais fácil porque você esteve ao meu lado.

Aos meus avós Lula e Donete, exemplo de pessoas amorosas, de caráter e de abdicção pela família. Sou grata a Deus por tê-los comigo. Às minhas avós Carminha, Monte e Francisquinha e aos meus tios Robson e Carlson, que estão no céu olhando por mim e me protegendo. Aos meus tios Iara, Ricardo e Zé Carlos, e primos, vocês são a melhor família que eu poderia ter.

Aos meus sogros Adê e Jan Cláudio, aos meus cunhados Rique, Dayvid e Aline e a pequena Valentina, que me acolheram com muito amor em sua família.

À professora Natália Ocarino, que aceitou o desafio de me orientar e que fez isso com maestria, me guiando e me lapidando com extrema paciência e dedicação no árduo caminho que é a vida acadêmica. Seus ensinamentos foram mais que os da sala de aula, foram verdadeiras lições para a vida.

À professora Rogéria Serakides, que me acolheu e me ajudou pacientemente no aprendizado da patologia veterinária e na minha evolução como pessoa.

À Amanda Maria, uma pessoa abençoada que tive o prazer de conhecer em Belo Horizonte. Não tenho palavras para agradecer toda a ajuda, a recepção, os ensinamentos, a amizade e os bons momentos que passamos juntas dentro e fora da universidade. Você é minha irmã mineira preferida!!!

Ao pessoal do Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal da Escola de Veterinária da UFMG, Cíntia, Loris, Juneo, Carla, Alisson, Camila, Gabriela, Isabela e Júlia. Quantos apertos e quantos bons momentos passamos juntos, obrigada pela ajuda e disposição nesses dois anos.

Aos professores da Patologia por todos os ensinamentos transmitidos nestes anos com extrema dedicação, me estimulando sempre a buscar o conhecimento.

Ao “povo da Patologia”, são muitas histórias para contar e muitas boas memórias para serem recordadas sempre. Javier, meu amigo *toddynho*, companheiro de aventuras patológicas, o ombro amigo na hora do desespero dos diagnósticos morfológicos, das correrias antes das aulas e das longas noites no microscópio, sentirei falta de você e do seu “portunhol”. Às “meninas”, Camila, Claudinha, Mary, Tati, Amandita, Michelle, Luisa e Letícia e meninos Ricardo, Mateus, Carlos, vou sentir falta das gargalhadas na sala 207 e da tensão antes da JPC.

Às técnicas do laboratório Leimar, Mariana e Natália, ao técnico da necropsia, Luiz e às funcionárias Bete e Vitalina, os meus sinceros agradecimentos pela ajuda e pelos bons papos nos intervalos.

Às residentes e ex-residentes Thais, Bia, Pâmela e Dyeime, por compartilharem sempre bons casos e ótimas conversas. Ao residente Daniel, ou simplesmente Daniboy, meu amigo das Alagoas, companheiro de patologia, de casa e de vida, vou sentir falta da convivência diária na faculdade e no nosso lar também!

À UFAL, aos amigos e colegas, técnicos e professores da Unidade Viçosa-AL, por me ajudarem a buscar a minha melhoria como veterinária e como pessoa.

Aos amigos vets e não vets Rafael, Filipe, Micha, Maria Lopes, Maria Elvira Luana, Markus e Jéssica pela boa convivência, amizade e bons *drinks* nesses anos de moradia em BH.

Às amigas-irmãs Deby e Alice, por suportarem minhas ladainhas todos esses anos e por fazerem os meus dias mais felizes.

Aos componentes titulares Profa. Dra. Rogéria Serakides e Dra. Carla Osório e aos suplentes Prof. Dr. Juneo Freitas e Profa. Dra. Eliane, pela prontidão em compor a banca para avaliação deste trabalho.

À Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (Fapemig), a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (Capes) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro destinado a realização deste trabalho. Agradeço também à Escola de Veterinária e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

---

## SUMÁRIO

---

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	6
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	8
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	11
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>OBJETIVOS</b> .....	14
<b>CAPÍTULO 1</b> .....	15
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
1. Morfofisiologia óssea .....	15
2. A lactação .....	16
2.1 Alterações no tecido adiposo decorrentes da lactação .....	16
3. Prolactina .....	17
3.1 Controle e regulação neuroendócrina da prolactina .....	17
3.2 Efeito da prolactina no metabolismo endócrino durante a lactação .....	18
4. Alterações ósseas associadas a hiperprolactinemia .....	19
5. Células tronco mesenquimais do tecido adiposo e diferenciação osteogênica .....	21
<b>CAPÍTULO 2: Efeito da lactação na diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas</b> .....	24
Resumo.....	24
Introdução .....	25
Material e Métodos .....	26
Resultados .....	30
Discussão .....	32
<b>CAPÍTULO 3: Diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo cultivadas com diferentes concentrações de prolactina</b> .....	35
Resumo.....	35
Introdução .....	35
Material e Métodos .....	36
Resultados .....	39
Discussão .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	43
<b>ANEXO</b> .....	54

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ALP: fosfatase alcalina  
ANOVA: análise de variância  
BCIP: *5-cromo-4-chloro-3'indolylphosphatase p-toluidine salt*  
BMPs: proteínas morfogenéticas do osso  
cGMP: monofosfato cíclico de guanosina  
CTM: célula tronco mesenquimal  
CTM-MO: célula tronco mesenquimal da medula óssea  
CTM-TA: célula tronco mesenquimal do tecido adiposo  
DEPC: diethylpirocarbonato  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
dPRL: prolactina decidual  
EGF: fator de crescimento epidermal  
ePRL: prolactina extra-pituitária  
FACS: *Fluorescence- activated cell sorting*  
FGF: fator de crescimento fibroblástico  
FSH: hormônio folículo-estimulante  
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase  
GH: hormônio do crescimento  
GHRH: hormônio liberador do hormônio do crescimento  
GnRH: hormônio liberador de gonadotropina  
GRP: peptídeo liberador de gastrina  
HCl: ácido clorídrico  
hPL: lactogênio placentário humano  
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina  
IL: interleucina  
INF: interferon  
LH: hormônio luteinizante  
LPL: lipoproteína lipase  
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno  
MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]  
NBT: *nitro-blue tetrazolium chloride*  
OPG: osteoprotegerina  
PBS: solução tampão de fosfato padrão  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PIFs: fatores inibidores de prolactina  
pPRL: prolactina pituitária  
PRFs: fatores liberadores de prolactina  
PRL: prolactina  
PRLr: receptor de prolactina  
PTHrP: peptídeo relacionado ao paratormônio  
RANKL: receptor ativador NF-kapa beta ligante  
RNA: ácido ribonucléico  
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa

Runx-2: fator de transcrição 2 relacionado ao Runt  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SFB: soro fetal bovino  
SNK: *Student Newman Keuls*  
T3: triiodotironina  
TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$   
TNF: fator de necrose tumoral  
TRH: hormônio liberador de tireotropina  
VIP: peptídeo intestinal vasoativo

---

## LISTA DE TABELAS

---

### Capítulo 2

Tabela 1:	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real baseados no mRNA de <i>Rattus norvegicus</i> .....	29
-----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

### Capítulo 3

Tabela 1:	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real baseados no mRNA de <i>Rattus norvegicus</i> .....	39
-----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### Capítulo 2

- Figura 1. CTM-TA de ratas controle e lactante aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. (A) Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão). (B) Atividade de fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão). (C) Síntese de colágeno (média  $\pm$  desvio padrão). \*p < 0,05..... 30
- Figura2. CTM-TA de ratas controle e lactante aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. (A) Porcentagem de nódulos mineralizados/campo (média  $\pm$  desvio padrão). (B) Porcentagem de células/campo (média  $\pm$  desvio padrão). \*p < 0,05..... 31
- Figura 3. Quantificação relativa da expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) em CTM-TA de ratas controle e lactante aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. (A) Osteopontina, (B) Sialoproteína óssea, (C) BMP-2, (D) Osteocalcina, (E) Fosfatase alcalina, (F) Colágeno tipo I. \*p < 0,05..... 32

### Capítulo 3

- Figura 1. CTM-TA tratadas com diferentes doses de prolactina aos 21 dias de diferenciação. (A) Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão). (B) Porcentagem de nódulos mineralizados /campo (média  $\pm$  desvio padrão). (C) Porcentagem de células /campo (média  $\pm$  desvio padrão). \*p < 0,05..... 40
- Figura2. Quantificação relativa da expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) em CTM-TA tratadas com diferentes doses de prolactina aos 21 dias de diferenciação. (A) Fosfatase alcalina, (B) Osteopontina, (C) Osteocalcina, (D) Sialoproteína óssea, (E) BMP-2, (F) Colágeno tipo I. \*p < 0,05..... 41
-

## RESUMO

Foram realizados dois experimentos distintos. O experimento 1 avaliou o efeito da lactação sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas. O experimento 2 avaliou a diferenciação osteogênica das CTM-TA sob efeito de duas concentrações de prolactina. No experimento 1, foram utilizadas 10 ratas Wistar distribuídas em dois grupos: 1) controle e 2) lactante. Aos 30 dias de lactação, os animais de ambos os grupos foram eutanasiados para a coleta do tecido adiposo visceral e extração das CTM. As células foram cultivadas em meio osteogênico por 7, 14 e 21 dias. Foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno, porcentagem de nódulos de mineralização e de células por campo e a quantificação dos transcriptos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I por RT-PCR tempo real. As médias foram comparadas pelo teste SNK e as diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . O grupo lactante apresentou maior conversão do MTT em cristais de formazan aos 7, 14 e 21 dias e atividade da fosfatase alcalina e síntese de colágeno aos 14 dias. O grupo lactante apresentou maior porcentagem de nódulos de mineralização em relação ao controle, porém com menor porcentagem de células. A lactação promoveu aumento da expressão de osteopontina em todos os tempos, de sialoproteína aos 7 e 21 dias e de BMP-2 aos 21 dias. No entanto, a lactação reduziu a expressão de osteocalcina em todos os períodos. Conclui-se que as CTM-TA de ratas lactantes apresentaram maior potencial osteogênico caracterizado por aumento da síntese de matriz mineralizada e da expressão de proteínas colagênicas e não colagênicas da matriz. No experimento 2, as CTM-TA foram cultivadas em meio osteogênico com e sem adição de prolactina e distribuídas em três grupos: 1) CTM-TA (controle), 2) CTM-TA com adição de 100ng/mL de prolactina e 3) CTM-TA com adição de 300ng/mL de prolactina. Aos 21 dias de diferenciação, foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, porcentagem de nódulos de mineralização e de células por campo e quantificação dos transcriptos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I por RT-PCR tempo real. A adição de prolactina reduziu a conversão do MTT no grupo 3 e aumentou a porcentagem de células/campo nos grupos 2 e 3, porém sem aumentar significativamente a porcentagem de nódulos de mineralização e a expressão dos transcritos gênicos para colágeno tipo I e para as proteínas não colagênicas. Conclui-se que a adição de prolactina nas concentrações de 100ng/mL e 300ng/mL não altera a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas apesar de aumentar a celularidade da cultura.

**Palavras chave:** célula tronco, gestação, lactação, prolactina, tecido adiposo, rata, diferenciação osteogênica.

## ABSTRACT

Two different experiments were performed. Experiment 1 evaluated the effect of lactation on the osteogenic differentiation of rats adipose derived-mesenchymal stem cells (ADSCs). Experiment 2 evaluated the osteogenic differentiation of ADSCs under the effect of two concentrations of prolactin. In experiment 1, ten Wistar rats were divided into two groups: 1) control, and 2) lactating. At 30 days of lactation, both groups were euthanized and samples of visceral adipose tissue were collected for ADSC extraction. ADSC was grown in osteogenic medium for 7, 14 and 21 days. The tests of MTT conversion into formazan crystals, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, percentage of mineralized nodules and cells per field and quantification of genic transcript for alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, BMP-2, and collagen I by RT-PCR real time were made. The means were compared by the SNK test and the differences were considered significant if  $p < 0.05$ . The lactating group had an increase in the conversion of MTT into formazan crystals at 7, 14 and 21 days. Alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in the lactating group were greater only at 14 days. The lactation group had a higher percentage of mineralization nodules than control group, and a decrease in the percentage of cells. Lactation promoted increased in osteopontin expression at all times, bone sialoprotein at 7 and 21 days and BPM-2 only at 21 days. However, lactation reduced the expression of osteocalcin in all periods. It is concluded that the cells of lactating rats presented a greater osteogenic potential characterized by an increase of the mineralized matrix synthesis. In the experiment 2, ADSCs were grown in a medium with and without the addition of prolactin and distributed into three groups: 1) CTM-TA (control), 2) CTM-TA with addition of 100ng/mL prolactin, and 3) CTM-TA with addition of 300ng/mL prolactin. At 21 days of differentiation, the tests of MTT conversion into formazan crystals, percentage of mineralized nodules and cells per field and quantification of genic transcript for alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, BMP-2, and collagen I by RT-PCR real time were made. The addition of prolactin reduced the conversion of MTT in group 3 and increased the percentage of cells/field in the groups 2 and 3, however without significantly increasing the percentage of nodules of mineralization and the expression of the genic transcription for for alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, BMP-2, and collagen I. It is concluded that the addition of prolactin in concentrations of 100ng/mL and 300ng/mL does not change the osteogenic differentiation to the CTM-TA of female rats despite of increasing the cellularity of the culture.

**Keywords:** stem cell, pregnancy, lactation, prolactin, adipose tissue, rat, osteogenic differentiation

## INTRODUÇÃO

A gestação e a lactação são eventos fisiológicos que demandam do organismo da mãe significativas mudanças metabólicas a fim de manter a homeostase materna e o desenvolvimento e crescimento fetal adequados (Kalkwarf e Specker, 2002). Em ambas as situações, o aumento da secreção de prolactina causa hiperprolactinemia fisiológica, que tem sido considerada importante causa de perda óssea em humanos e animais (Zuni *et al.*, 1999; Coss *et al.*, 2000; Dolinska *et al.*, 2010; Suntornsaratoon *et al.*, 2010). Por isso, os efeitos da prolactina sobre o metabolismo ósseo tem sido alvo de pesquisas nos últimos anos (Bataille-Simoneau *et al.*, 1996; Alder *et al.*, 1998; Charoenphandhu *et al.*, 2008; Bu *et al.*, 2015).

É de concordância da maioria desses estudos que esse hormônio apresenta algum efeito sobre o osso, porém os resultados dessas pesquisas são contraditórios, devido à heterogeneidade na idade dos indivíduos estudados, número de gestações, duração do período lactacional e pelo sítio ósseo analisado, bem como os parâmetros utilizados para avaliação do metabolismo ósseo.

Os efeitos da prolactina sobre o osso independem da origem da hiperprolactinemia (Bussade *et al.*, 2007; Bolanowski *et al.*, 2010). Estudos prospectivos demonstraram que durante a gestação e lactação, ocorre redução significativa da densidade mineral óssea e que mulheres jovens com altos níveis de prolactina apresentam densidade mineral óssea semelhante à das mulheres na pós-menopausa (Alder *et al.*, 1998). Indivíduos com prolactinomas, os quais possuem elevados níveis de prolactina circulante, também apresentam aumento do metabolismo ósseo com consequente perda óssea (Colao *et al.*, 2000). Entretanto, contraditoriamente, ratas ovariectomizadas tratadas com prolactina apresentaram aumento da densidade mineral óssea (Dolinska *et al.*, 2010). Somando-se à isso, a identificação de receptores para prolactina em células de osteossarcoma sugere suaprovável participação no aumento da atividade osteoblástica (Bataille-Simoneau *et al.*, 1996).

Em virtude dosefeitos contraditórios e bidirecionais da prolactina, sugere-se que seu efeito sobre o osso dependa da sua concentração e da célula-alvo sobre a qual esteja atuando. Baseado nisso, duas hipóteses tem sido discutidas para explicar o mecanismo pelo qual a prolactina atua no metabolismo ósseo. Primeiramente, a perda óssea advinda da hiperprolactinemia seria decorrente do aumento da reabsorção óssea mediada pela deficiência de estrógeno induzida pela hipersecreção de prolactina (Biller *et al.*, 1992; Naliato *et al.*, 2005). No entanto, essa hipótese vem sendo contestada, uma vez que pesquisas demonstraram que mulheres com hiperprolactinemia não apresentam melhora das alterações ósseas após a restauração da função endócrina gonadal (Klibanski *et al.*, 1988; Schlechte *et al.*, 1992). Outra via de atuação que tem sido discutida é que a prolactina agiria diretamente influenciando a síntese de matriz óssea, uma vez que receptores para este hormônio foram identificados em osteoblastos (Charoenphandhu *et al.*, 2008).

Mas, semelhantemente ao efeito da prolactina *in vivo*, a ação *in vitro* desse hormônio sobre o osteoblasto também é dependente da dose e do período de atuação da prolactina (Seriwatanachai *et al.*, 2009). Seriwatanachai *et al.*, (2009) demonstrou que prolactina, em doses que mimetizam os níveis alcançados no período lactacional, adicionada em culturas de pré-osteoblastos promoveu aumento da expressão de genes da diferenciação osteogênica. Contudo, este resultado foi observado apenas no estágio inicial da diferenciação sendo revertido mais tardiamente, sugerindo que os efeitos da prolactina nessas células sejam dose e período-dependente.

Ao final da lactação, ratas apresentam intensa osteoporose caracterizada por hipoplasia e hipotrofia osteoblástica . Além disso, há também hipoplasia da medula óssea (Serakides *et al.*, 2008), o que sugere que na lactação também haja comprometimento das células precursoras dos osteoblastos.

Os osteoblastos se originam das células tronco mesenquimais (CTM) que são células multipotentes, encontradas entre as células diferenciadas de vários tecidos, incluindo o tecido ósseo. Elas possuem a função de se auto-renovarem e de se diferenciarem, originando os tipos celulares que compõem este órgão (Grove *et al.*, 2004).

O tecido adiposo (Zuk *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2008) é fonte considerável de células tronco mesenquimais com enorme potencial para serem utilizadas no tratamento de várias doenças, inclusive em defeitos ou reparos ósseos. Apesar das CTM do tecido adiposo (CTM-TA) serem semelhantes às CTM da medula óssea (CTM-MO) com relação à morfologia e à expressão de marcadores de superfície (Nakanishi *et al.*, 2011), alguns pesquisadores têm maior preferência pelo tecido adiposo como fonte de CTM em decorrência deste tecido apresentar maior número destas células e pelo fato de serem obtidas do produto das lipoaspirações, sem haver necessidade de se realizar um procedimento invasivo, visando exclusivamente à obtenção das CTM (Zuk *et al.*, 2001). Além disso, *in vitro*, as CTM-TA se proliferam mais rapidamente (Nakanishi *et al.*, 2011), demoram mais tempo para entrar em senescência, apresentando maior habilidade para serem criopreservadas, quando comparadas as CTM da medula óssea (Carvalho *et al.*, 2008; Mambelli *et al.*, 2009).

Os principais fatores que estimulam a diferenciação de CTM em células osteoprogenitoras têm sido alvo de pesquisas. Hoje, sabe-se que a proliferação e a diferenciação tanto *in vitro* quanto *in vivo* das CTM em osteoblastos estão sob o comando de vários fatores que vêm sendo cada vez mais investigados (Lindblad, 2001). Esses fatores são sinais celulares internos e externos representados por genes (Iglézias *et al.*, 2004; Nakanishi *et al.*, 2011), fatores de crescimento (Ito *et al.*, 2008; Angel-Mosqueda *et al.*, 2015), estímulo mecânico (Payushina *et al.*, 2006) e alguns hormônios, dentre eles a prolactina (Freeman *et al.*, 2000).

Embora receptores para prolactina já tenham sido identificados em CTM, nenhum estudo sobre os efeitos da lactação e/ou da prolactina isolada sobre a diferenciação osteogênica das CTM do tecido adiposo foi encontrado na literatura, sendo este um dos objetivos do presente estudo. Assim, estudando a diferenciação osteogênica das CTM na lactação e os efeitos *in vitro* da prolactina na diferenciação osteogênica das CTM utilizando concentrações variadas, poder-se-á inferir sobre a participação deste hormônio no metabolismo ósseo durante a gestação e lactação.

## **OBJETIVOS**

### **Capítulo 2**

Avaliar a influência da lactação no potencial de diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de ratas adultas.

### **Capítulo 3**

Avaliar a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo, sob efeito de duas concentrações da prolactina que mimetizam àquelas encontradas no sangue de ratas gestantes e lactantes, a fim de inferir sobre a participação isolada deste hormônio na diferenciação das CTM-TA em células osteoprogenitoras.

## CAPÍTULO 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Morfofisiologia óssea

O osso é um tecido metabolicamente ativo e sua higidez depende do equilíbrio entre os processos anabólico, caracterizado pela síntese e mineralização da matriz, e catabólico responsável pela reabsorção da matriz e dos minerais (Canalis *et al.*, 1991). O tecido ósseo é constituído por três tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (Robling *et al.*, 2006; Datta *et al.*, 2008).

Os osteoblastos derivam-se das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO), que inicialmente dão origem a pré-osteoblastos e consequentemente aos osteoblastos (Clarke, 2008). Os osteoblastos são células responsáveis pela síntese da matriz óssea não mineralizada, denominada osteóide, constituída basicamente por colágeno tipo I e proteínas não colagênicas, como osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea. Aproximadamente 70% da matriz é imediatamente mineralizada e o restante é mineralizado gradativamente (Roach, 1994; Clarke, 2008). Outra função importante dos osteoblastos é a regulação da atividade osteoclástica, mediada pela síntese de osteoprotegerina (OPG) e expressão do receptor ativador NF-kapa beta ligante (RANKL). A ativação desse receptor coordena a reabsorção óssea através da osteoclasia (Simonet *et al.*, 1997).

A partir do momento que a matriz óssea é sintetizada, os osteoblastos vão ficando envoltos por ela, sendo então denominados osteócitos. Os osteócitos perdem a capacidade de síntese de matriz (Clarke, 2008) e assumem as funções de manutenção da viabilidade do osso e de reabsorção óssea profunda pelo processo de osteólise osteocítica. Esse mecanismo é essencial para a homeostase do cálcio e de outros minerais (Doty, 1981; Clarke, 2008).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da fusão de células precursoras hematopoiéticas (monócitos/macrófagos) (Simonet *et al.*, 1997). Essas células precursoras sintetizam interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), potentes estimuladores da osteoclastogênese e da atividade osteoclástica (Boyle *et al.*, 2003). Os osteoclastos estão localizados na superfície de trabéculas, nos canais de Havers alojados nas lacunas de *Howship* (Simonet *et al.*, 1997) e possuem a função de reabsorção óssea superficial por osteoclasia (Miyamoto e Suda, 2003).

Por ser um tecido metabolicamente dinâmico, os processos anabólico e catabólico são controlados por vários fatores, dentre eles citocinas (IL-1, I-L4, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (Canalis *et al.*, 1991), fatores de crescimento (IGF, FGF, TGF- $\beta$ ) (Baylink *et al.*, 1993), estímulo mecânico (Ocarino *et al.*, 2008; Schulte *et al.*, 2013) e hormônios (Boeloni *et al.*, 2009; Calis *et al.*, 2014). Esses fatores agem direta ou indiretamente sobre os tipos celulares que compõem o tecido ósseo e/ou nas células tronco mesenquimais, influenciando positiva ou negativamente os processos anabólico e catabólico bem como a diferenciação das CTM em osteoblastos (Roach, 1994; Clarke, 2008).

Sabe-se que a massa óssea de um indivíduo é influenciada pela genética, além de fatores como nutrição, idade (Karlsson *et al.*, 2001), atividade física e perfil hormonal (Sowers, 1996; Ensom *et al.*, 2002), tanto em condições patológicas quanto fisiológicas. Alterações ósseas osteopênicas vem sendo relacionadas a duas condições fisiológicas importantes tanto em mulheres quanto em animais, os períodos de gestação e de lactação (Sowers, 1996; Karlsson *et al.*, 2005).

## 2. A lactação

A preparação da glândula mamária para a lactação se inicia muito antes da gestação. O desenvolvimento inicial ocorre ainda na vida fetal sob o efeito do hormônio do crescimento (GH) e durante a puberdade sob influência da hipófise e dos ovários (Goffin *et al.*, 2002). À exceção de todo o desenvolvimento intra-uterino, as principais fases de desenvolvimento da glândula estão diretamente relacionadas à reprodução e ocorrem na pré e pós-puberdade, gestação e lactação (Freeman *et al.*, 2000; Goffin *et al.*, 2002). A interação entre hormônios, como o hormônio do crescimento, o peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) e a prolactina, além de fatores como o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator transformador do crescimento alfa (TGF- $\alpha$ ) e os receptores de estrógeno, que agem dentro do próprio tecido mamário, são capazes de promover mudanças na morfologia e na dinâmica das células alveolares (Freeman *et al.*, 2000; Goffin *et al.*, 2002; Guelho *et al.*, 2016).

Os níveis de PRL na mãe são crescentes à medida do avanço da gestação, atingindo seu pico na lactação (Hovey *et al.*, 2000). Em mulheres, os níveis de PRL aumentam em até 10 vezes durante a gestação e lactação quando comparados aos valores encontrados em mulheres não gestantes, que varia de 5-20ng/mL (Hovey *et al.*, 2000). Já em roedores, a concentração de prolactina é cerca de 20-60 ng/mL em animais não gestantes atingindo um valor cinco vezes maior no período da lactação (Amenomori *et al.*, 1970).

A PRL desempenha papel importante na lactogênese em todas as suas fases, desde a preparação e proliferação das células epiteliais da glândula mamária até a produção e secreção do colostro e do leite materno, incluindo toda a transição de nutrientes durante os diferentes momentos da lactação (Neville *et al.*, 2001). O estímulo sensorial da amamentação é conduzido até o hipotálamo, bloqueando a síntese e a liberação de dopamina, enquanto os núcleos paraventriculares são estimulados a produzir e liberar o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que é estimulante da prolactina (Fazekas *et al.*, 2000). Tanto a prolactina quanto o lactogênio placentário são necessários para o desenvolvimento mamário na gestação, e com a diminuição da concentração do lactogênio após a remoção da placenta, a prolactina se faz necessária para a manutenção da lactação na maioria das espécies (Neville *et al.*, 2001).

### 2.1 Alterações no tecido adiposo decorrentes da lactação

A lactação requer tanto aumento da oferta de nutrientes quanto o desenvolvimento de mecanismos que assegurem a utilização preferencial de nutrientes pela glândula mamária (Gunderson, 2014). O período lactacional é caracterizado pela secreção aumentada de prolactina e ocitocina, supressão do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal e hipoinsulinemia (Vernon, 1988). A diminuição da secreção de estrógeno e progesterona é um pré-requisito para lactogênese, porque estes esteróides sexuais inibem os efeitos lactogênicos da PRL (Wajchenberg, 2000). A prolactina atua localmente na glândula mamária para estimular a síntese e secreção de componentes do leite, mas também diminui a lipogênese no fígado e no tecido adiposo, aumentando a disponibilidade de glicose e lactato, precursores lipogênicos, para a glândula mamária (Hovey e Aimó, 2010).

Durante a gestação, as mulheres exibem um aumento de gordura intra-abdominal (Straughen *et al.*, 2013) que é utilizada como fonte de energia durante a lactação (King *et al.*, 2000). Sabe-se que o tecido adiposo intra-abdominal ou visceral, é metabolicamente mais ativo que outros depósitos de gordura em outras partes do corpo (King *et al.*, 2000).

A lipoproteína lipase (LPL) é uma enzima da família das lipases com função de hidrolisar moléculas de triglicerídeos encontradas nas partículas de lipoproteínas para facilitar a captação de ácidos graxos pelos adipócitos (Wajchenberg, 2000). Durante a gestação, a concentração de LPL é maior nos principais sítios de acúmulo de tecido adiposo nas mulheres: glúteos, região abdominal e femoral. Durante a lactação, os níveis de LPL diminuem nesses sítios e aumentam na glândula mamária e esse efeito regulatório está a cargo de vários hormônios, dentre eles a prolactina (Machida *et al.*, 1990).

### 3. Prolactina

A prolactina (PRL) é um hormônio peptídeo, composto por 197-199 aminoácidos e sintetizado pelos lactotrofos na adenohipófise, envolvido em mais de 200 funções fisiológicas e patológicas, estando presente em todos os vertebrados e possuindo uma estrutura fortemente homóloga ao hormônio do crescimento e ao lactogênio placentário (Fiore *et al.*, 1984; Ben-Johnatan *et al.*, 2006; Guelho *et al.*, 2016).

Além da secreção na hipófise anterior (pPRL), a expressão de genes para a PRL já foi identificada em outras regiões do sistema nervoso central, células do sistema imunológico, células epiteliais da glândula mamária, miométrio, decídua, placenta, glândula lacrimal, timo, baço (Feng *et al.*, 1998), glândulas sudoríparas (Choy *et al.*, 1997) sendo classificada como prolactina extrapituitária (ePRL). A PRL também já foi encontrada em muitos fluidos corpóreos além do soro sanguíneo como líquido cefalorraquidiano (LCR), líquido amniótico, lágrimas, leite e suor (Ben-Johnatan *et al.*, 2006).

#### 3.1 Controle e regulação neuroendócrina da prolactina

O processo de neuroregulação da síntese e secreção da PRL pelos lactotrofos na adenohipófise é multifatorial e está sob o controle de diversos fatores estimuladores e inibidores (Kentroti e McCann, 1996; Emiliano e Fudge, 2004; Eigler e Ben-Shlomo, 2014). Tal processo regulador é controlado pelo sistema hipotalâmico-hipofisário, através de vias neuroendócrinas, autócrina ou parácrina (Ben-Johnatan *et al.*, 2006).

O principal fator inibidor da síntese e secreção de prolactina pituitária (pPRL) é a dopamina, que é secretada pelos neurônios infundibulares do hipotálamo (Eigler e Ben-Shlomo, 2014). Essa ação inibitória já foi demonstrada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Meller *et al.*, 1991) e é mediada pela via D2 dos receptores de dopamina na superfície dos lactotrofos (Goswami *et al.*, 2009).

Os receptores D2 fazem parte de uma família de proteínas transmembrana que utilizam a dopamina como ligante e tais receptores possuem, geralmente, ação inibitória sobre a adenilciclase e também ação sobre a regulação do cálcio intracelular (Freeman *et al.*, 1994). A ativação da adenilciclase com formação do AMP cíclico é a via principal utilizada pela maioria dos hormônios protéicos. O hormônio, uma vez ligado a um receptor específico localizado na membrana celular de uma célula-alvo, provoca a ativação desta enzima. A adenilciclase converte parte do ATP intracelular em AMP cíclico e este, enquanto presente no interior da célula, promove uma série de alterações fisiológicas como: ativação enzimática, alterações da permeabilidade da membrana celular, ativação de síntese protéica e aumento na secreção celular (Calejo *et al.*, 2013).

Além do controle da síntese e secreção de pPRL, a dopamina e os agonistas dopaminérgicos seletivos também demonstram importância na regulação da transcrição do gene da PRL e da

proliferação de lactotrofos (Elsholtz *et al.*, 1991). Os mecanismos intracelulares que regulam o processo proliferativo de lactotrofos, são os mais variados, tais como: inibição da adenilciclase e das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), ativação de fosfatases, aumento dos canais de K<sup>+</sup> voltagem-dependentes e diminuição dos canais de Ca<sup>++</sup> voltagem-dependentes (Elsholtz *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2004).

Outros fatores também podem desempenhar funções defatores inibidores de prolactina(PIF) secundários são a somatostatinae o peptídeo liberador de gastrina (GRP), ambos agindo através da inibiçãoda secreção de PRL através de mecanismos dopaminérgicos (Kentroti e McCann, 1996; Eigler e Ben-Shlomo, 2014). A própria pPRL, pode ainda exercer um feedback negativo em sua própria secreção de forma indireta, estimulando a secreção de dopamina hipotalâmica (Eigler e Ben-Shlomo, 2014).

Os principais fatores estimulatórios da síntese e secreção de pPRL são o hormônio liberador de tireotropina (TRH) (Gershengorn *et al.*, 1981), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) , ocitocina e estrógeno, que atuam de forma seletiva sobre os lactotrofos (Fazekas *et al.*, 2000). Além dos fatores liberadores de prolactina (PRFs) citados, GHRH, GnRH, vasopressina, angiotensina II, galanina e substância P são capazes de aumentar os níveis de PRL por mecanismos ainda pouco elucidados (Emiliano & Fudge, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado que a síntese e secreção de prolactina extra-pituitária (ePRL), em diversos tecidos e órgãos, é regulada por mecanismos diferentes daqueles que regulam a PRLde origem central (Marano *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014; Bu *et al.*, 2015). Dentre as diferenças existentes entre pPRL e ePRL, a ePRL contém 150pb a mais devido à sua transcrição extra-pituitária. No entanto, as duas formas possuem estrutura protéica semelhante e ambas se ligam aos receptores de prolactina (PRLr) da mesma maneira. O controle da síntese e secreção da ePRL está a cargo de citocinas, fatores de transcrição e inibidores que variam de acordo com o sítio o qual a ePRL é proveniente (Marano *et al.*, 2014).Para a prolactina proveniente da decídua (dPRL), por exemplo, a cascata de regulação do AMP cíclico desempenha papel fundamental na regulação, além do interferon- $\gamma$  e da via óxido nítrico- cGMP. A ePRL proveniente da própria glândula mamária possui uma diferente via regulatória: fosfatidilinositol-3-cinase (Marano *et al.*, 2014).

Aparentemente, a existência de ePRL parece ser mais frequente na espécie humana do que em animais (Marano *et al.*, 2014). Além da sua atividade autócrina em células epiteliais da glândula mamária, pouco se sabe sobre o papel fisiológico da ePRL em comparação com as ações associadas à pPRL (Guelho *et al.*, 2016).

### **3.2 Efeito da prolactina no metabolismo endócrino durante a lactação**

A PRL é um dos hormônios de destaque durante as fases de gestação e lactação. Embora em ambas as situações as concentrações séricas de PRL estejam aumentadas, a gestação e a lactação são eventos endocrinologicamente distintos, tendo a PRL efeitos diferentes em cada um deles (Hovey *et al.*, 2003).

A prolactina é mais conhecida devido à sua ação direta sobre a glândula mamária, no entanto, sua atuação durante o avanço da gestação e manutenção da lactação são muito mais amplas. Em mamíferos, a PRL está envolvida na modulação do comportamento do indivíduo tanto nas funções

reprodutivas quanto maternas. Em ratas, por exemplo, a secreção é altamente estimulada na presença dos filhotes (Sobrinho, 1993).

Em roedores, a secreção de prolactina no início da gestação é caracterizada por oscilações na sua concentração, necessárias para a função luteotrófica por estimulação da síntese de progesterona pelo corpo lúteo (Smith *et al.*, 1975). Essas oscilações ocorrem em média duas vezes ao dia até a metade da gestação (10º dia) quando então, o lactogênio placentário (PL) inibe a secreção de pPRL. Em humanos, tanto a pPRL quanto o lactogênio placentário humano (hPL) estão presentes em valores crescentes à que a gestação avança (Toft e Linzer, 2000).

Durante a segunda metade da gestação, o número de PRLr aumenta em células mesenquimais do esqueleto, adrenal e pulmões de fetos humanos e em roedores e subsequentemente em condrócitos, células adrenocorticais e epitélio bronquiolar, demonstrando sua importância no desenvolvimento desses tecidos (Tzeng e Linzer, 1997; Freeman, 1994). O aumento de PRLr no pâncreas é identificado primeiramente na porção exócrina e no epitélio ductal e no fim da gestação, na porção endócrina em células  $\beta$  (Brejle *et al.*, 1994).

Os hormônios lactogênicos estimulam a proliferação e agregação de células  $\beta$  pancreáticas, a transcrição de genes para a produção de insulina e a secreção de insulina glicose-dependente na fêmea (Brejle *et al.*, 1994). De uma forma geral, os PRLr são necessários para manutenção da homeostase da glicose durante a gestação em humanos e roedores. O aumento da lipogênese durante a gestação leva a um aumento da secreção de insulina menos sensível à glicose e mais dependente de lipídios. Isto fornece um mecanismo potencial para manter a secreção de insulina elevada até o momento do parto enquanto as ilhotas são preparadas para uma sensibilidade normal à glicose no período pós-parto (Campino *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 2015).

Durante a segunda metade da gestação, as células alveolares se diferenciam e se polarizam, formando o epitélio secretório, capaz de produzir e secretar leite durante a lactação. O epitélio mamário é composto basicamente por três tipos celulares: as ductais, as alveolares e as mioepiteliais (Freeman *et al.*, 1994; Hovey *et al.*, 2002). Porém, o crescimento da glândula está sob o controle de diversos outros fatores incluindo-se estrógeno, progesterona, insulina, glicocorticóides, GH e lactogênio placentário. O estágio final do desenvolvimento da glândula, o crescimento lóbulo-alveolar, é diretamente regulado pela PRL (Hovey *et al.*, 2002).

Ao final da gestação, a prolactina tem sua secreção aumentada com importante atividade sobre os alvéolos mamários no período pré-parto (Bauman *et al.*, 1980). A galanina é um neuropeptídeo que regula e age sinergisticamente com a PRL derivada da glândula mamária aumentando a diferenciação do epitélio mamário (Freeman *et al.*, 1994; Hovey *et al.*, 2002). O estímulo sensorial da amamentação é conduzido até o hipotálamo, bloqueando a síntese e liberação de dopamina, enquanto os núcleos paraventriculares são estimulados a produzir e liberar peptídeo vasoativo intestinal, que é estimulante da prolactina. Esse mecanismo é contínuo enquanto houver o estímulo de sucção do filhote na glândula mamária.

#### **4. Alterações ósseas associadas a hiperprolactinemia**

A gestação e a lactação são eventos fisiológicos marcados por mudanças hormonais e metabólicas maternas a fim de promover o desenvolvimento e o crescimento fetais, bem como o desenvolvimento da glândula mamária e a produção de leite (Kalkwarf e Specker, 2002). Tanto na gestação quanto na lactação, há o aumento das concentrações séricas de prolactina (PRL),

levando a hiperprolactinemia. Essa hiperprolactinemia fisiológica tem sido apontada como uma causa importante de diminuição da densidade mineral óssea e perda óssea em mulheres e animais (Zuni *et al.*, 1999; Coss *et al.*, 2000; Dolinska *et al.*, 2010; Suntornsaratoon, *et al.*, 2010).

Moller *et al.* (2012) relataram, em mulheres gestantes, diminuição na densidade mineral óssea de 1,8% em vértebras lombares e 3,2% no quadril. Já a perda óssea varia de 2,1% a 9,4% na coluna, 0,9% a 3,9% no quadril e cerca de 2% a 4% no rádio (Karlsson, 2005). Na lactação, dependendo do período, redução da densidade mineral óssea de 5% nas vértebras lombares e 2% no quadril (Moller *et al.* 2012) e perdas ósseas entre 0,4% a 7,5% em vértebras lombares, 2% a 5% no fêmur e 0,2% a 7% no rádio foram descritas (Karlsson, 2005). Porém, Pearson *et al.*, 2004 afirmaram que a perda óssea é mínima e facilmente revertida após o final da lactação. Já Rojano-Mejia *et al.* (2011) e Dursun *et al.* (2006) demonstraram associação negativa entre a duração da lactação e a densidade mineral óssea em mulheres na pós-menopausa. Entretanto, Melton *et al.*, 1993 e Kojima *et al.*, 2002 não conseguiram correlacionar o tempo de lactação com a osteoporose no período de pós-menopausa. Estudos prospectivos demonstraram que durante a gestação e lactação, ocorre redução significativa da densidade mineral óssea e que mulheres jovens com altos níveis de prolactina apresentam densidade mineral óssea semelhante à das mulheres na pós-menopausa (Alder *et al.*, 1998). Os resultados das pesquisas são contraditórios provavelmente pela heterogeneidade na idade dos indivíduos estudados, número de gestações (Gur *et al.*, 2003), duração do período lactacional e pelo sítio ósseo analisado, assim como os parâmetros utilizados para avaliação do metabolismo ósseo.

Dois hipóteses tem sido aventadas para explicar o mecanismo pelo qual a prolactina influencia o metabolismo ósseo. Na primeira, postula-se que a perda óssea advinda da hiperprolactinemia ocorra pelo aumento da reabsorção óssea mediada pela deficiência de estrogênio (Biller *et al.*, 1992; Naliato *et al.*, 2005) uma vez que a hipersecreção de prolactina promove supressão dos níveis do hormônio liberador de gonadotropina (GnRH), hormônio luteinizante(LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH), importantes tanto para a regulação do desenvolvimento e da função gonadal do indivíduo, quanto para a manutenção de hormônios com ação positiva sobre o metabolismo ósseo, como o estrogênio e progesterona (Koike *et al.*, 1991). Entretanto essa hipótese é contestada uma vez que estudos demonstraram que mulheres com hiperprolactinemia não apresentam melhora das alterações ósseas após restauração da função endócrina gonadal (Klibanski *et al.*, 1988; Schlechte *et al.*, 1992). Contraditoriamente, ratas ovariectomizadas tratadas com PRL apresentaram aumento da densidade mineral óssea (Dolinska *et al.*, 2010). A segunda hipótese que vem sendo levantada, é que a prolactina possa influenciar o metabolismo ósseo por agir na atividade osteoblástica uma vez que receptores de prolactina (PRLr) já foram identificados nessas células (Charoenphandhu *et al.*, 2007). Seriwatanachai *et al.*, 2009 demonstraram que prolactina na concentração de 100ng/mL, mimetizando os níveis alcançados no período gestacional, adicionada em culturas de pré-osteoblastos promoveu aumento da expressão de genes da diferenciação osteogênica como Runx-2 e fosfatase alcalina. No entanto, este resultado foi observado apenas no início da diferenciação, sendo revertido nas etapas mais tardias, sugerindo que os efeitos da prolactina nos osteoblastos seja período-dependente. Além disso, a presença de receptores para prolactina em células de osteossarcoma sugere a participação da prolactina no aumento da atividade osteoblástica (Bataille-Simoneau *et al.*, 1996). É provável que esse efeito contraditório e bidirecional da prolactina sobre o osso, seja dependente da concentração e do tipo de célula onde ela está atuando. Mas essa é uma assertiva que ainda necessita ser investigada.

Ao final da lactação, ratas apresentam intensa osteoporose caracterizada por hipoplasia e hipotrofia osteoblásticas (Serakides *et al.*, 2008). Além disso, observa-se hipoplasia da medula óssea, o que sugere que na lactação possa haver comprometimento das células precursoras dos osteoblastos. Sabe-se que os osteoblastos se originam das células tronco mesenquimais e, embora receptores para prolactina já tenham sido identificados em células tronco mesenquimais humanas (Ogheta *et al.*, 2002), nenhum estudo sobre os efeitos da prolactina *in vivo* e *in vitro* na diferenciação osteogênica das CTM do tecido adiposo foi encontrado na literatura. Assim, o questionamento é se o estado de hiperprolactinemia observado na lactação ocasionaria redução da massa óssea por diminuir a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais.

## 5. Células tronco mesenquimais do tecido adiposo e diferenciação osteogênica

As células tronco mesenquimais, conhecidas também como células tronco esqueléticas, células estromais ou ainda células estromais mesenquimais, são células multipotentes capazes de se diferenciar em várias linhagens como osteogênica, condrogênica, adipogênica, dentre outras, além de possuir alta viabilidade e capacidade de auto-renovação com senescência limitada (Asariet *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2016). Essas células podem ser encontradas em vários órgãos e a sua quantidade pode variar de acordo com o local. Dentre os principais sítios de CTM tem-se: sistema nervoso central, pele (Gurevitch *et al.*, 2003; Pombero *et al.*, 2016), sangue periférico, fígado (Liu *et al.*, 2016), trato gastrointestinal (Presnell *et al.*, 2002), sistema nervoso periférico, pâncreas (Mayhallet *et al.*, 2004), vasos sanguíneos, coração (Beltrami *et al.*, 2003), córnea, retina (Grove *et al.*, 2004), músculo esquelético (Jiang *et al.*, 2002), membrana sinovial (Luyten, 2004), pulmão (Cancedda *et al.*, 2003), líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e placenta (Bobis *et al.*, 2006), medula óssea e o tecido adiposo (Murphy *et al.*, 2003).

No tecido adiposo, além dos adipócitos que são as células responsáveis pelo armazenamento lipídico na forma de triglicerol, outros tipos celulares podem ser encontrados dentre eles as células endoteliais, macrófagos, fibroblastos e as células tronco mesenquimais (CTM-TA) (Onate *et al.*, 2013). Esse tecido é considerado sítio importante de extração das CTM por apresentar maior número dessas células e pelo fato dessas células serem obtidas do produto das lipoaspirações, sem haver necessidade de se realizar um procedimento invasivo, visando exclusivamente à obtenção das CTM (Zuk *et al.*, 2001). Além disso, quando cultivadas *in vitro*, as CTM-TA possuem maior taxa de proliferação, entram em senescência mais tardiamente e possuem melhor capacidade de criopreservação quando comparadas as células tronco da medula óssea, por exemplo (Carvalho *et al.*, 2008; Nakanishi *et al.*, 2011).

As CTM-TA podem ser extraídas tanto do tecido adiposo subcutâneo como do intra-abdominal também chamado de visceral pelo método enzimático com utilização de colagenase (Zuk *et al.*, 2001). Após o cultivo em meio indiferenciado, as CTM podem ser induzidas a diferenciação em determinadas linhagens celulares pela adição de meios de cultura específicos para cada linhagem como as linhagens osteogênica (de Girolamo *et al.*, 2007), condrogênica (Ronziere *et al.*, 2010) adipogênica (Qian *et al.*, 2010), dentre outras.

Sabe-se que a proliferação e a diferenciação tanto *in vitro* quanto *in vivo* das CTM em osteoblastos estão sob o comando de fatores como genes, contato físico com as células vizinhas, citocinas, microambiente (Iglézias, 2004), estímulo mecânico (Payushina *et al.*, 2006) e hormônios (Qu *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2006; Boeloni *et al.*, 2009).

Iniciada a diferenciação das CTM em pré-osteoblastos e osteoblastos, esses, sintetizam a matriz óssea que é formada de um componente orgânico, no qual, cerca de 90% é composto por colágeno tipo I e o restante por proteínas não colagênicas como fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea e um componente inorgânico composto majoritariamente por cristais de hidroxiapatita (Roach, 1994).

Durante o processo de diferenciação osteogênica, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, são identificados genes relacionados à atividade proliferativa como *c-fos*, *c-myc* (Liu *et al.*, 2003) e *c-jun* (Stein *et al.*, 1993), seguidos da expressão de genes Runx-2, BMP-2, BMP-4, osterix, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, osteonectina, além de outras proteínas não colagênicas importantes para a mineralização da matriz óssea (Lindblad, 2001; Arrigoni *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2016).

*In vitro*, a diferenciação das CTM em osteoblastos é dependente das condições do meio de cultivo. É necessário um meio básico como o *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) acrescido de antibióticos, antifúngicos e 10% de soro fetal bovino (SFB) para garantir a proliferação das células, além da adição de dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico para a diferenciação das mesmas (Payushina *et al.*, 2006; Panetta *et al.*, 2009). A dexametasona age como indutora da fase inicial da diferenciação (Panetta *et al.*, 2009) enquanto o  $\beta$ -glicerofosfato e o ácido ascórbico são necessários para as fases mais tardias onde ocorre mineralização da matriz extracelular, uma vez que o ácido ascórbico é um co-fator na hidroxilação dos resíduos de lisina e de prolina do colágeno tipo I, aumentando a síntese de proteínas não colagênicas da matriz (Payushina *et al.*, 2006).

Estudos *in vitro* já demonstraram que a adição de hormônios como a triiodotironina (T3) (Boeloni *et al.*, 2009) e o estrogênio (Bland, 2000; Hong *et al.*, 2007) aumentam a diferenciação osteogênica de CTM e que esse efeito é dose-dependente (Bland, 2000; Hong *et al.*, 2007; Boeloni *et al.*, 2009). Sabe-se também que fatores de crescimento como o fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) (Hughes *et al.*, 2006; Ito *et al.*, 2008), e o fator de crescimento epidérmico (EGF) (Angel-Mosqueda *et al.*, 2015), quando adicionados em culturas de CTM, influenciam positivamente a diferenciação osteogênica dessas células.

*In vivo*, a diferenciação osteogênica das CTM em osteoblastos é dependente de um macro ambiente onde se observa a ação direta de inúmeros fatores que influenciam o metabolismo ósseo, como a ação indireta advinda da associação entre esses fatores.

Sabe-se que as proteínas morfogênicas do osso (BMP) são fatores importantes para o recrutamento de células osteoprogenitoras (Zhao *et al.*, 2012). As BMPs são glicoproteínas pertencentes à família TGF- $\beta$  envolvidas no recrutamento, proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras, sendo encontradas em grande quantidade na matriz mineralizada. Mesmo já tendo sido identificadas mais de 20 tipos de BMPs, as BMP 2, 4, 6, 7 e 9 são consideradas as mais importantes para a diferenciação das CTM. As BMPs 2 (Hanada *et al.*, 1997) e 9 exercem efeito osteoindutivo, sendo importantes reguladoras do processo de reparação óssea além de estimularem a diferenciação de CTM (Zhao *et al.*, 2012).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) atua no recrutamento de CTM, na formação e remodelação ósseas (Hughes *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014) e exerce efeito parácrino sobre o TGF- $\beta$  no controle da proliferação, diferenciação osteoblástica e na produção da matriz extracelular. O TGF- $\beta$  interage com receptores transmembrana serina/treonina quinase recrutando e estimulando

a proliferação das células osteoprogenitoras durante os estágios iniciais da formação óssea. (Hughes *et al.*, 2006).

Os hormônios também agem de forma fundamental na manutenção do metabolismo ósseo. Os hormônios tireoidianos, assim como os hormônios sexuais, controlam a expressão de genes nos osteoblastos aumentando a atividade da fosfatase alcalina, a produção de colágeno tipo I, das proteínas não colagênicas (Bland, 2000) e de fatores de crescimento semelhantes à insulina (Bilezikian *et al.*, 1996) aumentando subsequentemente a síntese e a mineralização da matriz óssea (Allain *et al.*, 1992).

Outro hormônio cujo efeito no metabolismo ósseo vem sendo estudado é a prolactina. Estudo *in vitro* demonstrou que prolactina em concentrações que mimetizam os níveis alcançados no período lactacional, adicionada em culturas de osteoblastos, promoveu aumento da expressão de genes importantes na diferenciação osteogênica no início do processo, sugerindo um possível efeito dose e período-dependente (Seriwatanachai *et al.*, 2009). Entretanto seu papel na diferenciação osteogênica das CTM não é conhecido, sendo esse um dos objetivos dessa dissertação.

## CAPÍTULO 2

### **Efeito da lactação na diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas**

*Effect of lactation on osteogenic differentiation of rats adipose-derived mesenchymal stem cell*

#### **RESUMO**

A lactação promove um quadro de hiperprolactinemia fisiológica que vem sendo considerada como causa de perda óssea em humanos e animais. Ratas em fase de lactação apresentam hipoplasia e hipotrofia osteoblásticas com conseqüente redução da massa óssea. Como os osteoblastos advêm da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais (CTM), o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da lactação na diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas, a fim de verificar se as CTM estão envolvidas na gênese da osteopenia do período lactacional. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (protocolo 378/2012). Foram utilizadas 10 ratas Wistar distribuídas em dois grupos: 1) controle e 2) lactante. Aos 30 dias de lactação, o grupo 2 foi eutanasiado juntamente com o grupo controle e foi realizada a coleta de tecido adiposo visceral para extração das CTM. As células foram cultivadas em meio osteogênico por 7, 14 e 21 dias de diferenciação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em cada período experimental foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno, porcentagem de nódulos de mineralização e de células por campo e quantificação dos transcritos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I por RT-PCR tempo real. Foi realizada ANOVA com comparação das médias pelo teste SNK. As diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ . O grupo lactante apresentou maior conversão do MTT em cristais de formazan aos 7, 14 e 21 dias e maior atividade da fosfatase alcalina e síntese de colágeno aos 14 dias de diferenciação. O grupo lactante apresentou maior porcentagem de nódulos de mineralização em relação ao grupo controle, porém com menor porcentagem de células. A lactação promoveu aumento da expressão de osteopontina em todos os tempos, e de sialoproteína aos 7 e 21 dias e BMP-2 aos 21 dias. No entanto, a lactação reduziu a expressão de osteocalcina em todos os períodos. Conclui-se que a osteopenia observada durante a lactação não é decorrente da redução da diferenciação osteogênica das CTM em células osteoprogenitoras, uma vez que as CTM-TA de ratas lactantes apresentaram maior potencial osteogênico caracterizado por aumento da síntese de matriz mineralizada e da expressão de proteínas colagênicas e não colagênicas da matriz.

Palavras-chave: células tronco, lactação, prolactina, tecido adiposo, rata

#### **ABSTRACT**

*Lactation induces a physiological hyperprolactinemia, which has been related to bone loss in human and animals. Lactating rats present osteoblastic hypoplasia and hypotrophy with reduced bone mass. As osteoblasts are derived from osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSC), the objective of this study was to evaluate the effects of lactation on osteogenic differentiation of rats adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs), in order to verify if MSC are involved in genesis of the osteopenia in the lactation period. The project was approved by the Ethics Committee in Animal Experimenting at Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)*

(protocol 378/2012). Ten Wistar rats were divided into two groups: 1) control, and 2) lactating. At 30 days of lactation, both groups were euthanized and samples of visceral adipose tissue were collected for ADSC extraction. ADSC was grown in an osteogenic medium for 7, 14 and 21 days. The tests of MTT conversion into formazan crystals, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, percentage of mineralized nodules and cells per field and quantification of gene transcript for alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, BMP-2, and collagen I by RT-PCR real time were made. The means were compared by the SNK test and the differences were considered significant if  $p < 0.05$ . The lactating group had an increase in the conversion of MTT into formazan crystals at 7, 14 and 21 days. Alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in the lactating group were greater only at 14 days. The lactating group had a higher percentage of mineralization nodules than control group, and a decrease in the percentage of cells. Lactation promoted increased expression of osteopontin at all times, bone sialoprotein at 7 and 21 days and BMP-2 only at 21 days. However, lactation reduced the expression of osteocalcin in all periods. It is concluded that the osteopenia observed during lactation is not due to the reduction of the osteogenic differentiation of ADSCs in osteoprogenitor cells, since the cells of lactating rats presented a greater osteogenic potential characterized by an increase of the mineralized matrix synthesis and the expression of collagenic and non-collagenic proteins from the matrix

*Keywords: stem cell, lactation, prolactin, adipose tissue, rat*

## INTRODUÇÃO

A lactação é um evento fisiológico marcado por mudanças hormonais e metabólicas maternas a fim de promover o desenvolvimento da glândula mamária e a produção de leite (Kirwan *et al.*, 2002). Na lactação, há o aumento das concentrações séricas de prolactina (PRL), levando a hiperprolactinemia (Hovey *et al.*, 2000). Essa hiperprolactinemia fisiológica tem sido apontada como uma causa importante de diminuição da densidade mineral óssea e perda óssea em mulheres e animais (Zuni *et al.*, 1999; Coss *et al.*, 2000; Dolinska *et al.*, 2010; Suntornsaratoon *et al.*, 2010). Dependendo do período lactacional, redução da densidade mineral óssea de 5% nas vértebras lombares e 2% no quadril (Moller *et al.* 2012) e perdas ósseas entre 0,4% a 7,5% em vértebras lombares, 2% a 5% no fêmur e 0,2% a 7% no rádio foram descritas (Karlsson, 2005). Entretanto, os resultados de pesquisa são contraditórios provavelmente pela heterogeneidade na idade dos indivíduos estudados, duração do período lactacional e pelo sítio ósseo analisado bem como os parâmetros utilizados para avaliação do metabolismo ósseo.

Postula-se que a perda óssea advinda dessa hiperprolactinemia ocorra pelo aumento da reabsorção óssea mediada pela deficiência de estrogênio induzida pela hipersecreção de prolactina (Biller *et al.*, 1992; Naliato *et al.*, 2005). Porém, essa hipótese vem sendo contestada, uma vez que mulheres com hiperprolactinemia não apresentam melhora das alterações ósseas após restauração da função endócrina gonadal (Klibanski *et al.*, 1988; Schlechte *et al.*, 1992; Wardlaw e Bilezikian, 1992; Deligeoroglou *et al.*, 2010). Ao contrário, ratas ovariectomizadas tratadas com prolactina apresentaram aumento da densidade mineral óssea (Dolinska *et al.*, 2010).

O efeito da prolactina em culturas de osteoblastos, células responsáveis pela síntese de matriz óssea, também é contraditório ora induzindo aumento da expressão de genes da diferenciação osteogênica como o Runx-2, fosfatase alcalina e osteocalcina, ora induzindo diminuição dos mesmos genes, influenciando também na expressão de fatores osteoclastogênicos

(Charoenphandhu *et al.*, 2008; Seriwatanachai *et al.*, 2009; Wongdee *et al.*, 2011). Esses resultados indicam que esse efeito contraditório e bidirecional da prolactina sobre o osso, seja dependente da concentração desse hormônio, do tempo e do tipo de célula onde ele está atuando.

Ao final da lactação, ratas apresentam intensa osteoporose caracterizada por hipoplasia e hipotrofia osteoblásticas associada a hipoplasia da medula óssea (Serakides *et al.*, 2008). Esse resultado sugere que, na lactação, possa haver comprometimento das células precursoras dos osteoblastos. Sabe-se que os osteoblastos se originam das células tronco mesenquimais (Clarke, 2008) e a participação das CTM na gênese das doenças ósseas osteopênicas induzidas por endocrinopatias como o hipo e o hipertireoidismo já foi comprovada (Boeloni *et al.*, 2009; Boeloni *et al.*, 2010; Hell *et al.*, 2011; Boeloni *et al.*, 2013a; Boeloni *et al.*, 2013b; Boeloni *et al.*, 2013c; Boeloni *et al.*, 2015). Assim, a hipótese a ser testada é se o estado de hiperprolactinemia, decorrente da lactação promove redução da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais em osteoblastos ocasionando ou contribuindo para a perda óssea observada em mulheres e animais.

Durante a gestação, as mulheres apresentam aumento de gordura intra-abdominal (Straughen *et al.*, 2013) que será utilizada como fonte de energia durante a lactação para a produção de leite (Lovelady *et al.*, 2006). O tecido adiposo passa por diversas transformações metabólicas para suprir a demanda energética da fêmea durante a lactogênese e sabe-se que a prolactina possui atividade marcante no metabolismo lipídico (Campino *et al.*, 1999). O tecido adiposo tem sido eleito como uma das principais fontes de CTM e essas, quando cultivadas *in vitro*, possuem maior taxa de proliferação e entram em senescência mais tardiamente quando comparadas as células tronco da medula óssea (Carvalho *et al.*, 2008; Nakanishi *et al.*, 2011).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da lactação no potencial de diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de ratas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração e cultivo das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas lactantes em DMEM

Foram utilizadas 10 ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* adultas mantidas em caixas plásticas onde receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Após um período de adaptação, as ratas foram separadas em dois grupos experimentais: 1) controle (n=5) e 2) lactante (n=5). As fêmeas do grupo lactante foram submetidas diariamente à citologia vaginal (Marcondes *et al.*, 2002) para verificar em qual fase do ciclo estral elas se encontravam. As que se apresentaram em proestro/estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas. Após as 12 horas, foram realizados esfregaços vaginais, diariamente. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. As ratas de ambos os grupos foram eutanasiadas com sobredose de xilazina e quetamina sendo as ratas gestantes eutanasiadas no 30º dia de lactação juntamente com o grupo controle. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo 378/2012).

Imediatamente após a eutanásia, a extração de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Zuk *et al.*, 2002; Gomide *et*

*al.*,2011). O tecido adiposo visceral foi colhido assepticamente em fluxo laminar em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, N.Y., USA) acrescido de antibióticos e antimicóticos (gentamicina 60 µg/L, anfotericina B 25 µg/L, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Merck, Germany). O tecido foi cortado em pequenos fragmentos, transferido para um tubo contendo colagenase (Collagenase Type I, Gibco, Grand Island, N.Y., USA) 0,15% diluída em solução tampão de fosfato padrão (PBS) 0,15M e incubado por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, agitando-o a cada 15 minutos. Posteriormente foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 1400g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em DMEM enriquecido com antibióticos, antimicótico e 10% soro fetal bovino e cultivado em garrafas T75 (TPP – Techno PlasticProducts, Trasadingen, Switzerland) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

#### Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo

Células cultivadas até a terceira passagem em DMEM foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400g por 10 minutos. As células foram ressuspenso numa concentração de  $1 \times 10^6$  células em PBS e transferidas para placas de 96 poços (TPP- Techno PlasticProducts, Trasadingen, Switzerland) com anticorpo primário por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com PBS e incubadas com um anticorpo secundário com conjugado fluorescente (AlexaFluor 488, Molecular Probes, OR, USA) por 30 minutos a 4°C. As amostras foram analisadas utilizando-se citômetro FACScan (Becton Dickinson, NY, USA) e os dados foram analisados utilizando Cellquest software Becton Dickinson. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD54 (clone 1A29 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Metodologia de acordo com (Boeloni *et al.*, 2013a).

#### Cultivo das CTM-TA em meio de diferenciação osteogênica

Após o cultivo inicial em DMEM e quatro passagens com obtenção de confluência de 80 a 90%, as células aderidas foram tripsinizadas, contadas e distribuídas em placas de seis e 24 poços e em garrafas T25 ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>3</sup>), de acordo com o ensaio a ser realizado. O meio básico foi substituído por meio osteogênico, que consistia em DMEM acrescido de antibióticos, antimicótico, 10% de soro fetal bovino e enriquecido com ácido ascórbico (50µg/ml), β-glicerofosfato (10mM) e dexametasona (0,1µM). Após 7,14 e 21 dias de diferenciação, foram realizados os testes de conversão de MTT em cristais de formazan, a avaliação da porcentagem de nódulos de mineralização e de células/campo, bem como a expressão relativa dos transcriptos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I por RT-PCR em tempo real.

#### Teste de redução do MTT em cristais de formazan

Para cada grupo experimental, foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM-TA/cm<sup>2</sup> em placas de 24 poços com meio osteogênico. Ao final dos períodos experimentais de diferenciação, as culturas foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210 µL de meio osteogênico em cada poço e 170 µL de MTT (5 mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210 µL de SDS (sódio dodecil sulfato) com 10% HCl que

permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100 µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595 nm. O teste foi realizado em seis repetições.

#### Atividade de fosfatase alcalina

Para cada grupo experimental, foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM-TA/cm<sup>2</sup> em placas de 24 poços com meio osteogênico. Ao final dos períodos experimentais de diferenciação, as culturas foram submetidas ao teste de atividade de fosfatase alcalina. Após 7, 14 e 21 dias de diferenciação, as células foram lavadas em PBS 0,15M e em cada poço foram adicionados 200 µL da solução de BCIP/NBT (Zymed Laboratories, CA, USA). As culturas foram mantidas a 37° C e 5% CO<sub>2</sub> por 2 horas. Em seguida, 100 µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços e o produto foi analisado a 595 nm. Foram determinados a média e desvio padrão para cada grupo experimental. O teste foi realizado em seis repetições.

#### Porcentagem de nódulos de mineralização e porcentagem de células/campo

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo, em três repetições, sobre lamínulas estéreis dentro de placas de 6 poços com meio osteogênico durante 7, 14 e 21 dias. Ao término, os poços foram lavados em PBS, as lamínulas fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas e posteriormente lavadas em água destilada. Depois de adicionada solução de nitrato de prata a 5% (Nitrato de prata P.A. LabSynth, São Paulo, Brasil) os poços foram expostos à luz por duas horas. As placas foram lavadas com água destilada e o nitrato de prata residual foi neutralizado por uma solução de tiosulfato de sódio a 5% (Tiosulfato de sódio P.A., LabSynth, São Paulo, Brasil). As células foram contra-coradas com eosina. Posteriormente, foi determinado o percentual de nódulos de mineralização e o número de células/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica (Zeiss KPL, 10x), contendo uma grátula com 121 pontos e objetiva de 10x em 40 campos tomados em toda a extensão da lamínula. A média e o desvio padrão foram determinados para cada grupo experimental. Os testes foram realizados em seis repetições.

#### Quantificação relativa dos transcriptos gênicos da diferenciação osteogênica pelo RT-PCR tempo real

A quantificação da expressão gênica relativa de fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2, colágeno tipo I nas CTM-TA foi comparada entre os grupos experimentais aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. A extração do RNA total das células foi feita em três garrafas T25 por grupo pelo uso do Trizol (Life Technologies, CA, USA). O método de extração consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células por cinco minutos à temperatura ambiente, para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de 10 segundos de homogeneização, três minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases, em que a fase incolor superficial continha RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 30 minutos à temperatura de -80°C, seguida de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi, então, lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 10.500 g por cinco minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água DEPC (água tratada com dimetilpirocarbonato, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) livre de RNase, incubado a

56°C em termobloco por 10 minutos e imediatamente armazenado a -80°C. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se *kit* comercial (SuperScript™ III Platinum® Two-StepqRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA), sendo que se utilizou 1 µg de RNA total para a síntese de cDNA com um volume final de 20 µL. Realizaram se, ainda, as reações de PCR em tempo real utilizando-se 2 µL de cDNA, 5 pM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente syber Green (SuperScript™ III Platinum® Two-StepqRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA) em um volume final de 25 µL de reação, no aparelho *SmartCycler System* (SmartCycler® System, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica, a média e o desvio padrão foram determinados em quatro repetições para cada grupo experimental usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , em que os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*.

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real

<b>Genes</b>	<b>Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')</b>	<b>Nº acesso</b>
<i>Fosfatase alcalina</i>	<i>forward</i> : CTAGTTCCTGGGAGATGGTA <i>reverse</i> : GTGTTGTACGTCTTGGAGAGA	NM 013059.1
<i>Osteopontina</i>	<i>forward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT <i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA	AB 001382
<i>Osteocalcina</i>	<i>forward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT <i>reverse</i> : AGAGAGAGGGGAACAGGGAGG	NM 013414.1
<i>Sialoproteína óssea</i>	<i>forward</i> : TGTCTTCTGAACGGGTTTC <i>reverse</i> : CTTCCCCATACTCAACCGTG	NM 012587.2
<i>BMP-2</i>	<i>forward</i> : TAGTGACTTTTGGCC ACGACG <i>reverse</i> : GCTCCGCTGTTTGTGTTTG	NM 017178
<i>Colágeno tipo I</i>	<i>forward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG <i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG	NM 000088
<i>GAPDH</i>	<i>forward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM 002046

#### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado com fatorial 2x3 (dois grupos e três períodos). Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio-padrão. As médias foram comparadas pelo teste de SNK (Student-Newman-Keuls) utilizando o programa *GraphpadInstat 3.05* (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). As alterações na expressão medidas pelo RT-PCR tempo real foram comparadas pelo teste de SNK. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### *Caracterização fenotípica das CTM-TA*

90,26% das células apresentaram expressão para CD90, 99,24% das células apresentaram expressão para CD73, 91,90% das células apresentaram expressão para CD54 e somente 3,04% das células apresentaram expressão para CD45.

### *Conversão do MTT em cristais de formazan*

As células dos animais lactantes apresentaram maior conversão do MTT em cristais de formazan quando comparadas ao controle aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação (Figura 1).

### *Atividade da fosfatase alcalina (BCIP/NBT)*

O grupo lactante demonstrou maior atividade de fosfatase alcalina em relação ao controle apenas aos 14 dias de diferenciação (Figura 1).

### *Síntese de colágeno*

O grupo lactante demonstrou maior síntese de colágeno em relação ao controle apenas aos 14 dias de diferenciação (Figura 1).

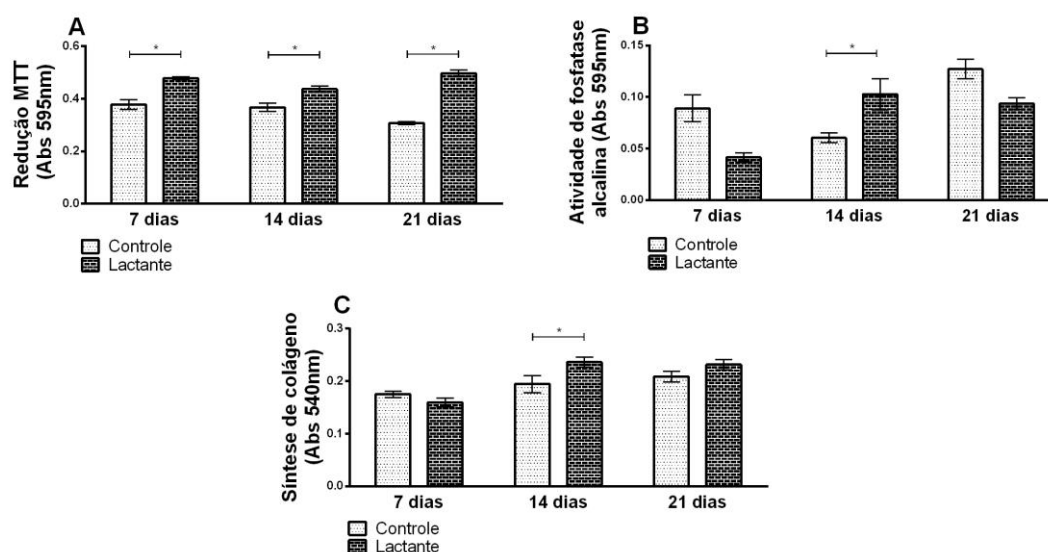


Figura 1. CTM-TA de ratos controle e lactante aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. (A) Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão). (B) Atividade de fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão). (C) Síntese de colágeno (média  $\pm$  desvio padrão). \* $p < 0,05$ .

### *Porcentagem de nódulos de mineralização e porcentagem de células/campo*

A porcentagem de nódulos mineralizados por campo foi significativamente maior no grupo lactante comparado ao controle em todos os tempos experimentais. Entretanto, as células dos animais lactantes demonstraram menor porcentagem de células por campo em relação ao controle aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação (Figura 2).

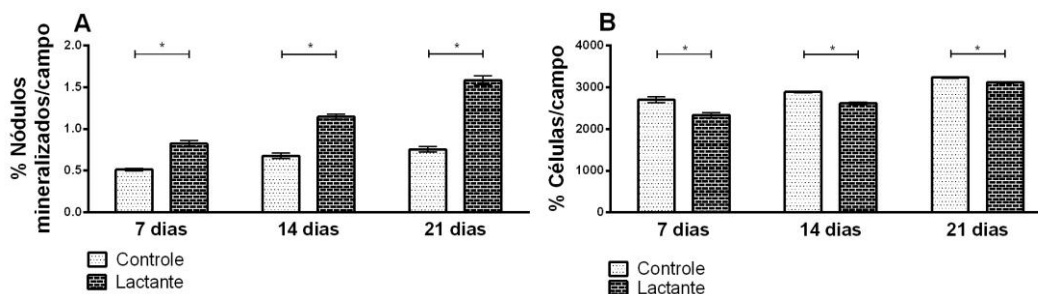


Figura 2. CTM-TA de ratas controle e lactante aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. (A) Porcentagem de nódulos mineralizados/campo (média  $\pm$  desvio padrão). (B) Porcentagem de células/campo (média  $\pm$  desvio padrão). \* $p < 0,05$ .

*Quantificação relativa dos transcritos gênicos da diferenciação osteogênica pelo RT-PCR tempo real*

A lactação promoveu aumento da expressão de osteopontina em todos os tempos e de sialoproteína aos 7 e 21 dias, e BMP-2 aos 21 dias. No entanto, a lactação reduziu a expressão de osteocalcina em todos os períodos, além de fosfatase alcalina aos 7 e 14 dias e não alterou a expressão de colágeno tipo I.

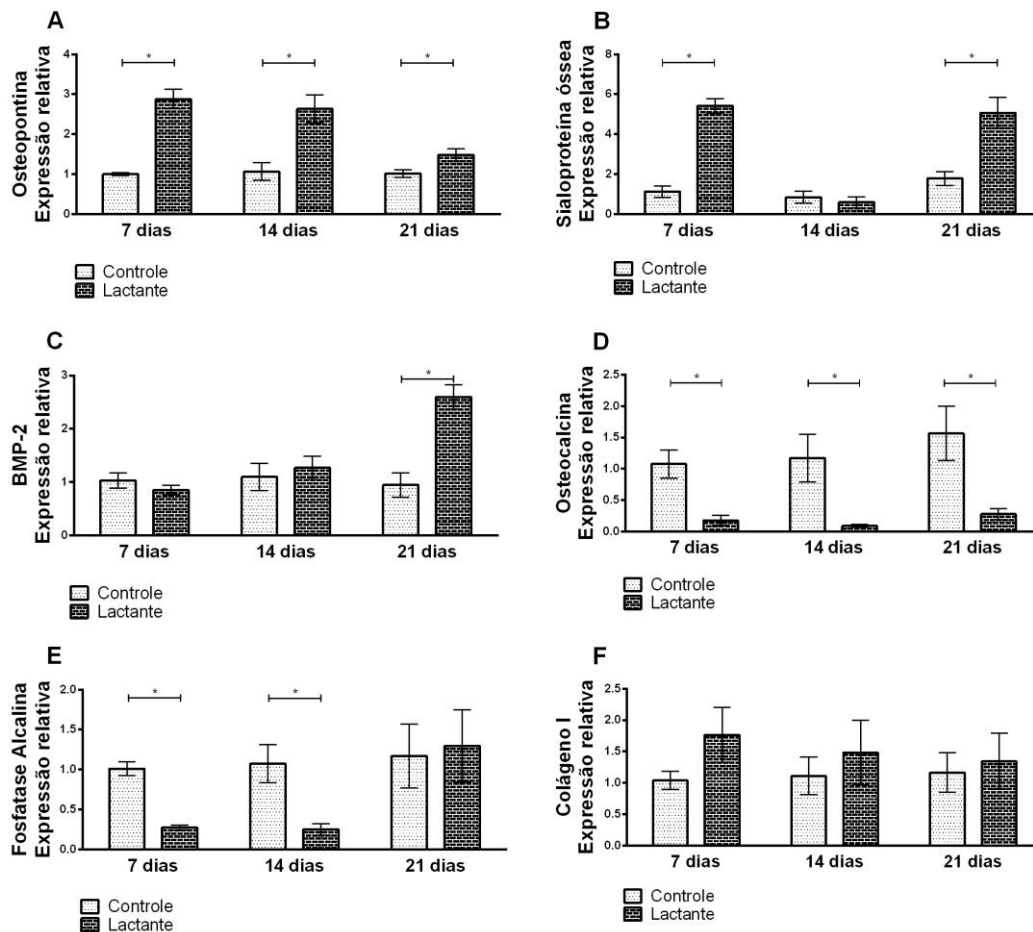


Figura 3. Quantificação relativa da expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) em CTM-TA de ratas controle e lactante aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. (A) Osteopontina, (B) Sialoproteína óssea, (C) BMP-2, (D) Osteocalcina, (E) Fosfatase alcalina, (F) Colágeno tipo I. \* $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

No experimento realizado, a caracterização fenotípica demonstrou que a células cultivadas expressaram características compatíveis com células tronco mesenquimais, sendo que, os valores encontrados estão de acordo com aqueles recomendados pelo comitê da International Society for Cellular Therapy, descartando-se a possibilidade de que outros tipos celulares contidos no tecido adiposo como fibroblastos, células hematopoiéticas e células endoteliais (Dominici *et al.*, 2006), tenham contaminado o cultivo de células tronco.

A conversão do MTT em cristais de formazan no grupo lactante foi maior que o controle, em todos os tempos experimentais apesar da redução da celularidade da cultura aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação quando comparados ao grupo controle. O MTT é um teste que avalia a viabilidade celular (Berridge *et al.*, 2005), uma vez que a redução do MTT em formazan é dependente do metabolismo mitocondrial e da ação da enzima succinato desidrogenase (Berridge *et al.*, 2005). Sabe-se que a principal fonte energética celular durante a lactação é proveniente do

tecido adiposo e que o aumento da concentração sérica de prolactina aumenta a taxa de lipólise corporal com consequente aumento da liberação de ácidos graxos. O maior efeito lipolítico da prolactina é claramente observado durante a lactação, período no qual a prolactina atinge seu pico (Flint *et al.*, 1981; Carre e Binart, 2014). Essa maior disponibilidade de substrato energético para o metabolismo mitocondrial, durante a lactação, pode explicar a maior conversão do MTT em cristais de formazan quando comparado ao grupo controle mesmo com menor celularidade da cultura.

Sobre a celularidade da cultura, postula-se que os processos de diferenciação e proliferação celular são eventos inversamente correlacionados (Matushansky *et al.*, 2003). A medida que as células vão se tornando mais diferenciadas, ocorrem mudanças tanto na demanda energética quanto na função celular, incitando complexas alterações de natureza gênica no processo de mitose, tornando esta função mais lenta e aumentando o intervalo entre os ciclos mitóticos, culminando em menor celularidade (Agathocleous e Harris, 2013). Assim, a menor celularidade do grupo lactante sugere uma fase de diferenciação osteogênica mais avançada, hipótese que pode ser reforçada pela maior síntese dos nódulos de mineralização. Entretanto, com base nos testes de MTT e celularidade, não é possível determinar se o menor número de células no grupo lactante foi decorrente de menor proliferação ou de maior apoptose celular.

A atividade de fosfatase alcalina teve aumento no grupo gestante apenas aos 14 dias de diferenciação, enquanto a expressão do seu transcrito gênico foi reduzido aos 7 e 14 dias, igualando-se ao controle aos 21 dias. A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima que está presente na membrana dos osteoblastos e participa da síntese e mineralização da matriz óssea (Vieira, 1999). Coss *et al.* (2000) e Seriwatanachai *et al.* (2008) demonstraram que osteoblastos submetidos à ação direta da prolactina tem atividade de ALP reduzida. As diferenças apresentadas entre os resultados da atividade de ALP e sua expressão gênica na cultura das ratas lactantes podem ser explicadas uma vez que fatores relacionados a exportação do mRNA do núcleo para o citoplasma, estabilidade do mRNA e manutenção da sua integridade até o local de tradução, bem como fatores relacionados diretamente à própria tradução podem causar variações na tradução de um mRNA em proteína (Fabian *et al.*, 2010). Fato é que, apesar da menor expressão do transcrito gênico para a fosfatase alcalina ter sido menor no grupo lactante quando comparado ao controle aos sete e 14 dias, a atividade dessa enzima foi superior aos 14 dias de diferenciação.

Fato semelhante pode ter ocorrido quanto à síntese do colágeno, maior constituinte da matriz, que foi maior aos 14 dias no grupo lactante, porém sem alteração da expressão do seu transcrito em todos os tempos analisados. Apesar disso, não houve comprometimento da formação de matriz pelas células dos animais lactantes, pelo contrário, houve maior formação de nódulos mineralizados neste grupo demonstrando maior síntese e mineralização da matriz.

A lactação também influenciou positivamente a expressão de osteopontina, com maior expressão em todos os tempos analisados. A osteopontina é uma importante fosfoproteína, que possui domínios ligantes de cálcio, estando diretamente relacionada à mineralização da matriz (Sase *et al.*, 2012). Charoenphandhu *et al.* (2008) relataram não haver alteração da expressão gênica de osteopontina e osteocalcina em cultura de osteoblastos com adição de prolactina em doses que mimetizam a lactação. Ao contrário, em nosso estudo, a osteocalcina, uma proteína da matriz expressa mais tardiamente pelos osteoblastos, teve sua expressão diminuída nos três tempos experimentais. Isso sugere que, fatores de crescimento, como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que está aumentado em função da neovascularização da glândula mamária na lactação, possa estar atuando sinergisticamente com a prolactina *in vivo*, favorecendo a

diminuição da expressão gênica da osteocalcina (Strayhorn *et al.*, 1999). Apesar dos diversos estudos sobre a osteocalcina na diferenciação osteogênica das células tronco, detalhes sobre sua regulação gênica permanecem ainda desconhecidos (Chen *et al.*, 2011). Viereck *et al* (2002) demonstraram que pré-osteoblastos humanos cultivados com BMP-2, apresentavam diminuição da expressão gênica de osteocalcina. Em nosso estudo, a expressão de BMP-2 foi aumentada apenas aos 21 dias, porém, a expressão da osteocalcina pode já ter sido influenciada pela BMP-2.

A expressão de sialoproteína óssea aos 7 e 21 dias foi significativamente maior no grupo lactante. Sabe-se que a BMP-2 exerce importante efeito osteoindutivo, sendo uma das proteínas reguladoras da diferenciação de CTM em osteoblastos e mediadora da expressão de outras proteínas da matriz óssea, como a sialoproteína óssea (Hanada *et al.*, 1997).

Com isso, conclui-se que, apesar da lactação ser associada à redução da massa óssea, o mecanismo pelo qual essa osteopenia ocorre não é devido a redução da diferenciação osteogênica das CTM em células osteoprogenitoras, uma vez que as CTM-TA de ratas lactantes apresentaram maior potencial osteogênico caracterizado por aumento da síntese e mineralização da matriz e maior expressão de importantes transcritos como osteopontina, sialoproteína óssea e BMP-2.

## CAPÍTULO 3

### Diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo cultivadas com diferentes concentrações de prolactina

*Osteogenic differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells cultured with different concentrations of prolactin*

#### RESUMO

O objetivo foi avaliar o efeito *in vitro* da prolactina no potencial osteogênico de células tronco mesenquimais do tecido adiposo visceral (CTM-TA) de ratas. CTM-TA foram cultivadas em meio osteogênico com e sem adição de prolactina e distribuídas em três grupos: 1) CTM-TA (controle), 2) CTM-TA com adição de 100ng/mL de prolactina e 3) CTM-TA com adição de 300ng/mL de prolactina. Aos 21 dias de diferenciação, foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, porcentagem de nódulos de mineralização e de células por campo e quantificação dos transcriptos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I por RT-PCR tempo real. A adição de prolactina reduziu a conversão do MTT no grupo 3 e aumentou a porcentagem de células/campo nos grupos 2 e 3, porém sem aumentar significativamente a porcentagem de nódulos de mineralização e a expressão dos transcritos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I. Conclui-se que a adição de prolactina nas concentrações de 100ng/mL e 300ng/mL não altera a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas apesar de aumentar a celularidade da cultura.

**Palavras-chave:** células tronco, diferenciação osteogênica, prolactina, rata

#### ABSTRACT

*The objective was to evaluate the in vitro effect of prolactin in osteogenic potential of mesenchymal stem cells of the visceral adipose tissue (CTM-TA) in female rats. CTM-TA was grown in a medium with and without the addition of prolactin and distributed into three groups: 1) CTM-TA (control), 2) CTM-TA with addition of 100ng/mL of prolactin and 3) CTM-TA with addition of 300ng/mL of prolactin. At 21 days of differentiation, the tests of MTT conversion into formazan crystals, percentage of mineralized nodules and cells per field and quantification of genic transcript for alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, BMP-2 and collagen I by RT-PCR real time were made. The addition of prolactin reduced the conversion of MTT in group 3 and increased the percentage of cells/field in the groups 2 and 3, however without significantly increasing the percentage of nodules of mineralization and the expression of the genic transcription for alkaline phosphatase, osteopontin, osteocalcin, bone sialoprotein, BMP-2 and collagen I. It is concluded that the addition of prolactin in concentrations of 100ng/mL and 300ng/mL does not change the osteogenic differentiation of the CTM-TA of female rats despite of increasing the cellularity of the culture.*

**Keywords:** stem cells, osteogenic differentiation, prolactin, rat

#### INTRODUÇÃO

A hiperprolactinemia fisiológica que ocorre durante a gestação e a lactação vem sendo associada a perda óssea em mulheres e animais (Zuni *et al.*, 1999; Coss *et al.*, 2000; Dolinska *et al.*, 2010), com redução significativa da densidade mineral óssea. A redução da massa óssea observada em

mulheres gestantes varia de 2,1% a 9,4% na coluna; 0,9% a 3,9% no quadril e cerca de 2% a 4% no rádio (Karlsson *et al.*, 2001). Na lactação, foram descritas perdas ósseas entre 0,4% a 7,5% nas vértebras lombares, 2% a 5% no fêmur e 0,2% a 7% no rádio (Karlsson *et al.*, 2001; Karlsson *et al.*, 2005). Mulheres jovens com altos níveis sanguíneos de prolactina apresentam densidade mineral óssea semelhante à das mulheres na pós-menopausa (Alder *et al.*, 1998) e indivíduos com elevados níveis de prolactina, decorrentes de prolactinoma, também apresentam aumento do metabolismo ósseo com consequente perda óssea (Colao *et al.*, 2000). Mas, é provável que o efeito da prolactina seja dependente das suas concentrações e do tipo celular sobre o qual esteja atuando. Pois ao contrário das pesquisas onde o aumento da prolactina está associado à osteopenia (Alder *et al.*, 1998; Colao *et al.*, 2000), células de osteossarcoma, que sabidamente apresentam receptores para prolactina, quando cultivadas com esse hormônio demonstram aumento da atividade osteoblástica (Bataille-Simoneau *et al.*, 1996).

A gênese da osteopenia decorrente da hiperprolactinemia ainda não foi totalmente elucidada. Estudos com adição de diferentes concentrações de prolactina em culturas de osteoblastos, células que expressam receptores para esse hormônio (Charoenphandhu *et al.*, 2007), têm demonstrado resultados contraditórios, havendo ora aumento da expressão de genes da diferenciação osteogênica como Runx-2, fosfatase alcalina, osteocalcina e ora diminuição da expressão desses genes (Charoenphandhu *et al.*, 2008; Seriwatanachai *et al.*, 2009). Alguns pesquisadores demonstraram que a perda óssea devido ao aumento da reabsorção óssea, advindo da hipersecreção de prolactina, é mediado pela deficiência de estrógeno (Biller *et al.*, 1992; Naliato *et al.*, 2005). Mas, essa assertiva já foi contestada, uma vez que mulheres com hiperprolactinemia não apresentam melhora das alterações ósseas após restauração da função endócrina gonadal (Klibanski *et al.*, 1988; Schlechte *et al.*, 1992). É possível que a osteopenia advinda do excesso de prolactina seja causada por redução da síntese de matriz óssea, uma vez que em ratas ao final da lactação, há hipoplasia e hipotrofia de osteoblastos (Serakides *et al.*, 2008). Como os osteoblastos originam-se das células tronco mesenquimais (CTM), a redução do seu número nos ossos de ratas em lactação fomenta a hipótese deste estudo de que a osteopenia, advinda do excesso de prolactina, possa ser decorrente do seu efeito sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais.

Vários estudos já demonstraram a participação das células tronco mesenquimais na gênese das osteopenias induzidas por endocrinopatias como o hipo e o hipertireoidismo (Boeloni *et al.*, 2010; Boeloni *et al.*, 2013a; Boeloni *et al.*, 2013b; Boeloni *et al.*, 2013c; Boeloni *et al.*, 2015). Embora receptores para prolactina já tenham sido identificados em células tronco mesenquimais humanas (Ogheta *et al.*, 2002) este parece ser o primeiro estudo que investigou os efeitos da prolactina na diferenciação osteogênica das CTM do tecido adiposo. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, sob a diferenciação osteogênica das CTM, duas concentrações da prolactina que mimetizam aquelas encontradas no sangue de ratas gestantes e lactantes a fim de inferir sobre a participação isolada deste hormônio nas CTM.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Extração e cultivo das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em DMEM

Foram utilizadas três ratas *Wistar (Rattus norvegicus)* com 45 dias de idade eutanasiadas com sobredose de uma associação de anestésico e tranquilizante (cloridrato de quetamina 40mg/kg e cloridrato de xilazina 10mg/kg) intraperitoneal. Todos os procedimentos descritos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (protocolo 378/2012).

Imediatamente após a eutanásia, a extração de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Zuk *et al.*, 2002; Gomide *et al.*, 2011). O tecido adiposo visceral foi colhido assepticamente em fluxo laminar em Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Grand Island, N.Y., USA) acrescido de antibióticos e antimicóticos (gentamicina 60 µg/L, anfotericina B 25 µg/L, penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL (Merck, Germany). O tecido foi cortado em pequenos fragmentos, transferido para um tubo contendo colagenase (Collagenase Type I, Gibco, Grand Island, N.Y., USA) 0,15% diluída em solução tampão de fosfato padrão (PBS) 0,15M e incubado por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, agitando-o a cada 15 minutos. Posteriormente foi realizada a centrifugação por 10 minutos a 1400g. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em DMEM enriquecido com antibióticos, antimicótico e 10% soro fetal bovino e cultivado em garrafas T75 (TPP – Techno PlasticProducts, Trasadingen, Switzerland) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

#### Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo

Células cultivadas até a terceira passagem em DMEM foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400g por 10 minutos. As células foram ressuspenso numa concentração de  $1 \times 10^6$  células em PBS e transferidas para placas de 96 poços (TPP- Techno PlasticProducts, Trasadingen, Switzerland) com anticorpo primário por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com PBS e incubadas com um anticorpo secundário com conjugado fluorescente (AlexaFluor 488, Molecular Probes, OR, USA) por 30 minutos a 4°C. As amostras foram analisadas utilizando-se citômetro FACScan (Becton Dickinson, NY, USA) e os dados foram analisados utilizando Cellquest software Becton Dickinson. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD54 (clone 1A29 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). De acordo com a metodologia descrita por Boeloni *et al.*, 2013a.

#### Cultivo das CTM-TA em meio de diferenciação osteogênica com e sem adição de prolactina

Após o cultivo inicial em DMEM e quatro passagens com obtenção de confluência de 80 a 90%, as células aderidas foram tripsinizadas, contadas e distribuídas em placas de seis e 24 poços e em garrafas T25 ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>3</sup>). O meio básico foi substituído por meio osteogênico, que consistia em DMEM acrescido de antibióticos, antimicótico, 10% de soro fetal bovino e enriquecido com ácido ascórbico (50µg/ml), β-glicerofosfato (10mM) e dexametasona (0,1µM). Após a adição do meio osteogênico, foram constituídos três grupos experimentais com adição de diferentes concentrações de prolactina (Prolactin human, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA): 1) grupo CTM-TA (controle), 2) grupo CTM-TA com adição de 100ng/mL de prolactina e 3) grupo CTM-TA com adição de 300ng/mL de prolactina, cultivados em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. As concentrações de prolactina (PRL) foram determinadas conforme estudos realizados por Seriwatanachai *et al* (2009) e Ritchie *et al* (1998) e são valores que mimetizam àqueles alcançados na gestação e lactação de ratas, respectivamente. Após 21 dias de diferenciação, foram realizados os testes de conversão de MTT em cristais de formazan, a avaliação da porcentagem de nódulos de mineralização e de células/campo, bem como a expressão relativa dos transcriptos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo I por RT-PCR em tempo real.

#### Teste de redução do MTT em cristais de formazan

Para cada grupo experimental, foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM-TA/cm<sup>2</sup> em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes concentrações de prolactina (100ng/mL e 300ng/mL). Ao final do período de 21 dias de diferenciação, as culturas foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210 µL de meio osteogênico em cada poço e 170 µL de MTT (5 mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210 µL de SDS (sódio dodecil sulfato) com 10% HCl que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100 µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595 nm. O teste foi realizado em triplicata.

#### Porcentagem de nódulos de mineralização e porcentagem de células/campo

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo, em três repetições, em placas de 6 poços com lamínulas estéreis em meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes concentrações de prolactina durante um período de 21 dias. Ao término, os poços foram lavados em PBS, as lamínulas fixadas em paraformaldeído a 4% por 24 horas e posteriormente lavadas em água destilada. Depois de adicionada solução de nitrato de prata a 5% (Nitrato de prata P.A. LabSynth, São Paulo, Brasil) os poços foram expostos à luz por duas horas. As placas foram lavadas com água destilada e o nitrato de prata residual foi neutralizado por uma solução de tiosulfato de sódio a 5% (Tiosulfato de sódio P.A., LabSynth, São Paulo, Brasil). As células foram contracoradas com eosina. Posteriormente, foi determinado o percentual de nódulos de mineralização e o número de células/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica (Zeiss KPL, 10x), contendo uma grátula com 121 pontos e objetiva de 10x em 40 campos tomados em toda a extensão da lamínula. A média e o desvio padrão foram determinados para cada grupo experimental. Os testes foram realizados em triplicata.

#### Quantificação relativa dos transcriptos gênicos da diferenciação osteogênica pelo RT-PCR tempo real

A quantificação da expressão gênica relativa de fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2, colágeno tipo I nas CTM-TA foi comparada entre os três grupos experimentais aos 21 dias de diferenciação. A extração do RNA total das células foi feita em três garrafas T25 por grupo, pelo uso do Trizol (Life Technologies, CA, USA). O método de extração consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células por cinco minutos à temperatura ambiente, para completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio, seguido de 10 segundos de homogeneização, três minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000 g por 15 minutos a 4°C, para separação em três fases, em que a fase incolor superficial continha RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5 mL de álcool isopropílico e incubação por 30 minutos à temperatura de -80°C, seguida de centrifugação a 12.000 g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi, então, lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 10.500 g por cinco minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água DEPC (água tratada com dimetilpirocarbonato, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) livre de RNase, incubado a 56°C em termobloco por 10 minutos e imediatamente armazenado a -80°C. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria.

Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se *kit* comercial (SuperScript™ III Platinum® Two-StepqRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA), sendo que se utilizou 1 µL de RNA total para a síntese de cDNA com um volume final de 20 µL. Realizaram-se, ainda, as reações de PCR em tempo real utilizando-se 2 µL de cDNA, 5 pM de cada iniciador e 12,5 µL do reagente syber Green (SuperScript™ III Platinum® Two-StepqRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA) em um volume final de 25 µL de reação, no aparelho *SmartCycler System* (SmartCycler® System, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA). Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tabela 1). A expressão gênica, a média e o desvio padrão foram determinados em triplicata para cada grupo experimental usando o método 2-ΔΔCT, em que os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*.

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos primers para RT-PCR tempo real

<b>Genes</b>	<b>Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')</b>	<b>Nº acesso</b>
<i>Fosfatase alcalina</i>	<i>forward</i> : CTAGTTCCTGGGAGATGGTA <i>reverse</i> : GTGTTGTACGTCTTGGAGAGA	NM 013059.1
<i>Osteopontina</i>	<i>forward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT <i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA	AB 001382
<i>Osteocalcina</i>	<i>forward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT <i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG	NM 013414.1
<i>Sialoproteína óssea</i>	<i>forward</i> : TGTCTTCTGAACGGGTTTC <i>reverse</i> : CTTCCCCATACTCAACCGTG	NM 012587.2
<i>BMP-2</i>	<i>forward</i> : TAGTGACTTTTGGCC ACGACG <i>reverse</i> : GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG	NM 017178
<i>Colágeno tipo I</i>	<i>forward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG <i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG	NM 000088
<i>GAPDH</i>	<i>forward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM 002046

#### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio-padrão. As médias foram comparadas pelo teste SNK (Student-Newman-Keuls) utilizando o programa *Graphpad Instat 3.05* (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). As alterações na expressão medidas pelo RT-PCR tempo real foram comparadas pelo teste SNK. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Caracterização fenotípica das CTM-TA

As células extraídas do tecido adiposo apresentaram características fenotípicas compatíveis com células tronco mesenquimais, ou seja, 90,26% das células apresentaram expressão para CD90, 99,24% das células apresentaram expressão para CD73, 91,90% das células apresentaram expressão para CD54 e somente 3,04% das células apresentaram expressão para CD45.

#### Conversão do MTT em cristais de formazan

O grupo de CTM-TA diferenciado com adição de 300ng/mL apresentou menor conversão do MTT em relação ao controle. O grupo 2 não apresentou diferença quando comparado ao grupo controle (Figura 1).

#### Determinação da porcentagem de células/campo e de nódulos mineralizados

A adição de prolactina no meio osteogênico promoveu efeito positivo aumentando significativamente a porcentagem de células nos grupos 100ng/mL e 300ng/mL em relação ao controle. Entretanto, não houve diferença na porcentagem de nódulos mineralizados entre os grupos que receberam prolactina e o controle (Figura 1).

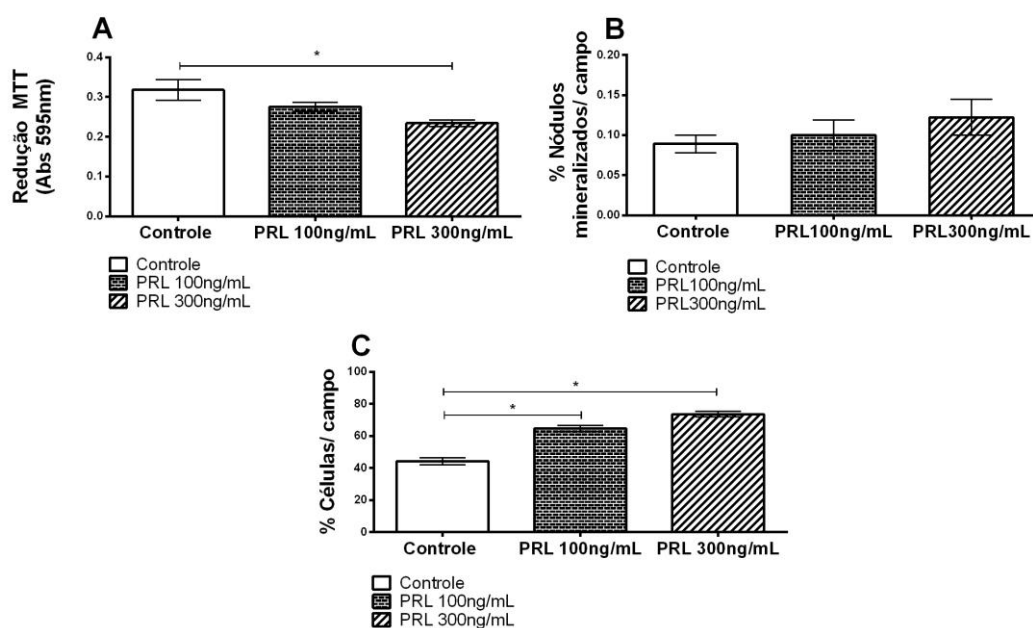


Figura 1. CTM-TA tratadas com diferentes doses de prolactina aos 21 dias de diferenciação. (A) Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão). (B) Porcentagem de nódulos mineralizados/campo (média  $\pm$  desvio padrão). (C) Porcentagem de células/campo (média  $\pm$  desvio padrão). \* $p < 0,05$ .

#### Quantificação relativa dos transcriptos gênicos da diferenciação osteogênica pelo RT-PCR tempo real

A adição de prolactina no meio osteogênico não alterou a expressão dos transcriptos gênicos para fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea, BMP-2 e colágeno tipo 1 quando comparado ao grupo controle (Figura 2).

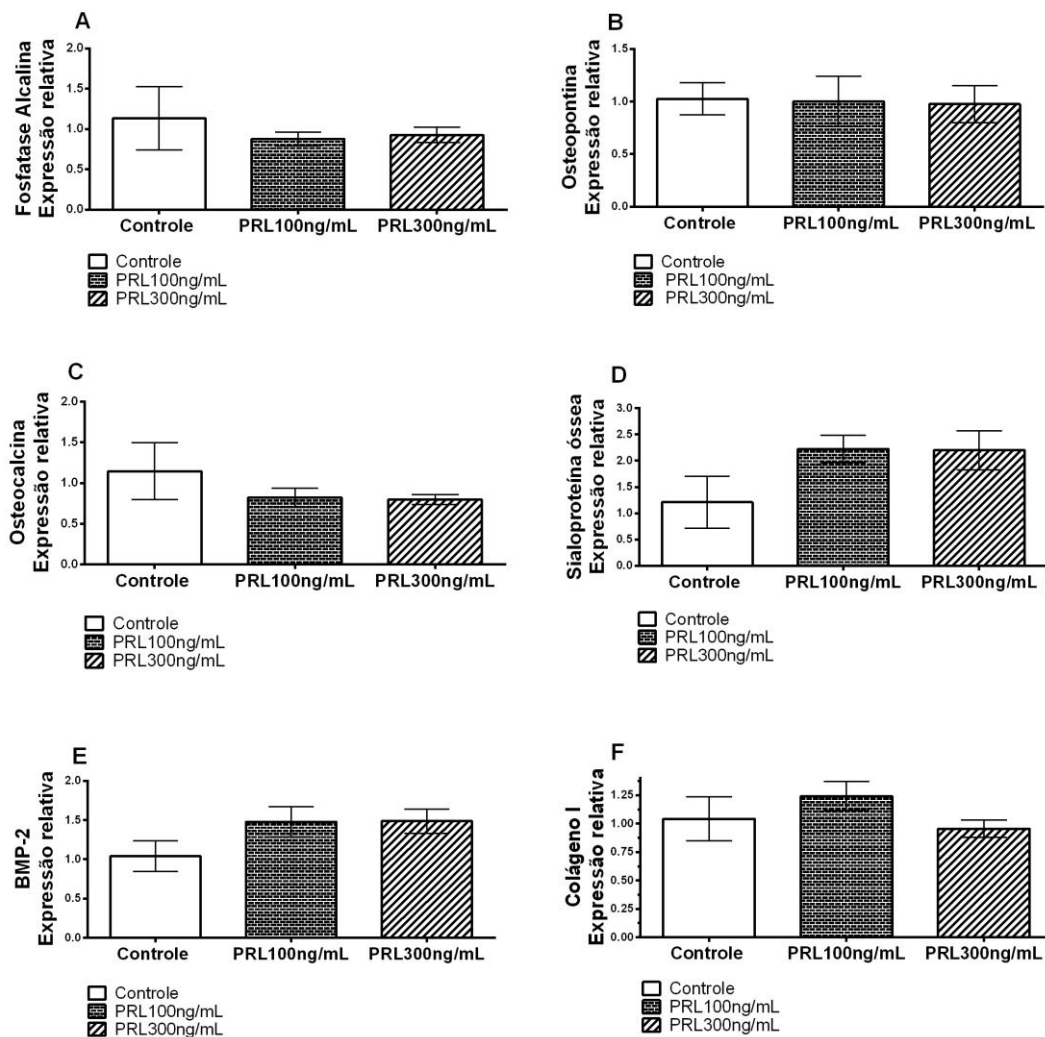


Figura 2. Quantificação relativa da expressão gênica (média  $\pm$  desvio padrão) em CTM-TA tratadas com diferentes doses de prolactina aos 21 dias de diferenciação. (A) Fosfatase alcalina, (B) Osteopontina, (C) Osteocalcina, (D) Sialoproteína óssea, (E) BMP-2, (F) Colágeno tipo I. \* $p < 0,05$ .

## DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica demonstrou que as células utilizadas apresentaram características compatíveis com a de células tronco mesenquimais, ou seja, mais de 90% das células apresentaram expressão de superfície para CD90, CD73 e CD54 e menos de 5% apresentaram marcação para CD45 que é expresso em células hematopoiéticas. Esses resultados estão em conformidade com o que é preconizado pelo Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy garantindo que o experimento foi realizado com cultura de células tronco. Tal caracterização é importante, pois a fração estromal vascular extraída do tecido adiposo contém além das CTM-TA, outros tipos celulares como células endoteliais, fibroblastos e células hematopoiéticas (Dominici *et al.*, 2006).

A prolactina na concentração de 300ng/mL reduziu a conversão do MTT em cristais de formazan mesmo tendo aumentado a celularidade, caracterizada pelo aumento da porcentagem de células por campo. O ensaio do dimetiltiazol (MTT) é um método colorimétrico quantitativo que baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima ativa em mitocôndrias, em converter o sal hidrossolúvel de tetrazolium sendo um ensaio dependente do metabolismo mitocondrial. O ensaio de MTT tem sido utilizado para avaliar a viabilidade celular (Berridge *et al.*, 2005), no entanto, no presente estudo não se pode dizer que a concentração de 300ng/mL de prolactina tenha reduzido a viabilidade celular, uma vez que a porcentagem de células/campo ao final dos 21 dias de cultivo, foi significativamente maior em comparação ao controle.

A adição de prolactina na cultura de CTM-TA, nas duas concentrações estudadas, não alterou a expressão de transcritos gênicos da diferenciação osteogênica, bem como a formação dos nódulos mineralizados. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar se a adição de prolactina *in vitro* não alteraria a produção da proteína resultante da expressão desses transcritos gênicos. Mas, é provável que não haja entre grupos diferença na expressão protéica também, uma vez que a síntese de matriz mineralizada não diferiu significativamente entre grupos.

Os principais fatores que estimulam a diferenciação de CTM em células osteoprogenitoras vêm sendo estudados. Sabe-se que a proliferação e a diferenciação tanto *in vitro* quanto *in vivo* das CTM em osteoblastos estão sob o comando de vários fatores (Lindblad, 2001) como genes, fatores de crescimento, estímulo mecânico e alguns hormônios (Payushina *et al.*, 2006). Esses fatores podem agir de forma direta ou indireta nas diversas fases da diferenciação osteogênica (Qu *et al.*, 1998; Hughes *et al.*, 2006; Boeloni *et al.*, 2009) e pouco ainda se sabe qual o papel da PRL em cada uma destas etapas e se tal ação é dose-dependente. Nossos resultados demonstram que a ação da prolactina *in vitro* sobre as CTM parece ser diferente da ação desse hormônio em culturas de osteoblastos, apesar de terem sido utilizadas concentrações similares de prolactina. A adição de prolactina nas concentrações de 100 e 300ng/mL aumentou a celularidade, mas não promoveu alterações significativas dos parâmetros que permitem avaliar a diferenciação osteogênica das CTM, o que sugere que a prolactina talvez estimule mais a atividade proliferativa do que a diferenciação osteogênica das CTM. No entanto, não se pode afastar que a redução da diferenciação osteogênica das CTM seja um dos mecanismos responsáveis pela redução da massa óssea observada nos períodos de hiperprolactinemia da gestação e lactação, uma vez que *in vivo*, a hiperprolactinemia pode ter efeito indireto sobre a diferenciação osteogênica das CTM por reduzir as concentrações de estrógeno, progesterona e gonadotrofinas, hormônios esses que têm ação direta e positiva sobre a diferenciação osteogênica das CTM (Quet *al.*, 1998; Porter *et al.*, 2000; Dolinska *et al.*, 2010; Callies *et al.*, 2014; Grachev *et al.*, 2015).

Conclui-se que a adição de prolactina nas concentrações de 100ng/mL e 300ng/mL não altera a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas, apesar de aumentar a celularidade da cultura.

## REFERENCIAS

- AGATHOCLEOUS, M; HARRIS, WA. Metabolism in physiological cell proliferation and differentiation. *Cell*, v.23, n.10, p.484-492, 2013.
- ALDER, RA; EVANI R; MANSOURI, A.; *et al.* Relative effects of prolactin excess and estrogen deficiency on bone in rats. *Metabolism*, v.47, p. 425-428, 1998.
- ALLAIN, TJ; CHAMBERS, TJ; FLANAGAN, AM; *et al.* Triiodothyronine stimulates rat osteoclastic bone reabsorption by an indirect effect. *Journal of Endocrinology*. n.133, p. 327-331, 1992.
- ANGEL-MOSQUEDA, C; GUTIERREZ-PUENTE, Y; LOPEZ-LOZANO, AP; *et al.* Epidermal growth factor enhances osteogenic differentiation of dental pulp stem cells in vitro. *Head and Face Medicine*, v.11, p. 29-35, 2015.
- AMENOMORI, Y.; CHEN, C.L.; MEITES, J. Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinology*, v.86, p.506-510, 1970.
- ARRIGONI, E; LOPA, S; GIROLAMO, L; *et al.* Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell Tissue Research*, n.338, p.401-411, 2009.
- ASARI, T; FURUKAWA, KI; TANAKA, S; *et al.* Mesenchymal stem cells isolation and characterization from human spinal ligaments. *Biochemical and Biophysical Research Communications*., v.417, p.1193-1999, 2012.
- BATAILLE-SIMONEAU, N; GERLAND, K; CHAPPARD, D; *et al.* Expression of prolactin receptors in human osteosarcoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 229; p.323-238, 1996.
- BAUMAN, DE; CURRIE, WB. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation: a review of mechanisms involving homeostasis and homeorhesis. *Journal of Dairy Science*, v.63, p.1514-1529, 1980.
- BAYLINK, DJ; FINKELMAN, RD; MOHAN, S. Growth factors to stimulate bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.8, n. 2, p. 565-572, 1993.
- BELTRAMI, AP; BARLUCCHI, L; TORELLA, D. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, v.114, p.763-766, 2003.
- BEN-JONATHAN, N; HUGO, ER; BRANDEBOURG, TD; *et al.* Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. V.17, n.3, p.110-116, 2006.
- BERNARD, V; YOUNG, J; CHANSON, P; *et al.* New insights in prolactin: pathological implications. *Nature Reviews Endocrinology*. v.11, p.265-275, 2015.
- BERRIDGE, M.V.; HERST, P.M.; TAN, A.S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, v.11, p.127-152, 2005.

- BILEZIKIAN, JP; RAIZS, LG; RODAN, GA Principles of bone biology. San Diego: *Academic Press*, p. 1398, 1996.
- BILLER, BM; BAUM, HB; ROSENTHAL, DI; *et al.* Progressive trabecular osteopenia in woman with hyperprolactinemic amenorrhea. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*.v.75, p.692-697, 1992.
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clinical Science*. n.98, p.217-240, 2000.
- BOBIS, S; JAROCHA, D; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, n.44, p. 215-230, 2006.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; MELO, AB; *et al.* Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Hormone Research*, n.2, v.72, p. 88-97, 2009.
- BOELONI, JN; SILVA, JF; MAGALHÃES, FC; *et al.* Efeitos sítio-ósseos dependentes no fêmur e vértebras de ratas com disfunções tireoidianas. *Acta Ortopédica Brasiliensis*, v.18, n.5, p.291-294, 2010.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; GOES, AM; *et al.* Efeito *in vitro* da triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.57, n.2, p.98-111, 2013a.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; GOES, AM; *et al.* Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.57, p.62-70, 2013b.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; SILVA, JF; *et al.* Osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells of ovariectomized and non-ovariectomized female rats with thyroid dysfunction. *Pathology Research Practice*., v.209, p.44-51, 2013c.
- BOELONI, JN; OCARINO, NM; GOES, AM; *et al.* In vitro effects of triiodothyronine on the reduced osteogenic potential of bone marrow mesenchymal stem cells of rats with osteoporosis. *Brazilian Journal of Veterinary Pathology*, v.8, n.76-87, 2015.
- BOYLE, WJ; SIMONET, WS; LACEY, DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.423, p.337-342, 2003.
- BU, G; LIANG, X; LI, J; *et al.* Extra-pituitary PRL and prolactin like receptor in chickens and zebrafish. *General and Comparative Endocrinology*, v.220, 145-153, 2015.
- BREJLE, TC; PARSONS, JA; SORENSON, SL. Regulation of islet beta-cell proliferation by prolactin in rat islets. *Diabetes*, v.43, p.263-273, 1994.
- CALEJO, A.I.; JORGACEVSKI, J.; KUCKA, M.; *et al.* cAMP-mediated stabilization of fusion pores in cultured rat pituitary lactotrophs. *Journal of Neuroscience*, v.1, n.33, p.8068-8078, 2013.

CALIS, M; DEMIRTAS, TT; ATILLA, P; *et al.* Estrogen as a novel agent for induction of adipose-derived stem cells for osteogenic differentiation: in vivo bone tissue engineering study. *Plastic and Reconstructive Surgery*, p. 499-510, 2014.

CAMPINO, C; TORRES, C; AMPUERO, S; *et al.* Bioactivity of prolactin isoforms: lactation and recovery of menses in nursing women. *Human Reproduction*, n.14, p.898-905, 1999.

CANALIS, E.; MCCARTHY, T.L.; CENTRELLA, M. *et al.* Growth factors and cytokines in bone cell metabolism. *Annual Review of Medicine*, v.42, p.17.24, 1991.

CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P. *et al.* Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology*. n. 22, p.81-91, 2003.

CARRE N., BINART N. Prolactin and adipose tissue. *Biochimie*. 2014, 97, 16-21

CARVALHO, KAT.; CURY, CC.; OLIVEIRA, L. *et al.* Evaluation of boné marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. *Transplant Procedures*, n.40, p.839-841, 2008

CHAROENPHANDHU, N; TEERAPORNPUNTAKIT, J; METHAWASIN, M; *et al.* Prolactin decreases expression of Runx2, osteoprotegerin, and RANKL in primary osteoblasts derived from tibiae of adult female rats. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, v.86, p.240- 248, 2008.

CHEN, H; HAYS, E; LIBOON, J; *et al.* Osteocalcin gene expression is regulated by wild-type p53. *Calcified Tissue International*, v.89, p.411-418, 2011.

CHOY, VJ; NIXON, AJ; PEARSON, AJ. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in ovine skin and changes during the wool follicle growth cycle. *Journal of Endocrinology*, v.155, n.2, p.265-275, 1997.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of The American Society of Nephrology*, v.3, p.131-139, 2008.

COLAO, A; DI SOMMA, C; LOCHE, S *et al.* Prolactinomas in adolescents: persistence of boné loss after 2 years of prolactin normalization. *Clinical Endocrinology*, v.52, p.319-327, 2000.

COSS D; YANG L; KUO CB; *et al.* Effects of prolactin on osteoblast alkaline phosphatase and bone formation in the development rat. *American Journal of Physiological Endocrinology and Metabolism*, n.279, p.1216-1225, 2000.

DELIGEOROGLU, E; ATHANASOPOULOS, N; TSIMARIS, P; *et al.* Evaluation and management adolescent amenorrhea. *Annals of New York Academy of Sciences*. n.1205, p. 23-32, 2010.

DATTA, HK; NG, WF; WALKER, JA; *et al.* The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*. V.61, p.577-587, 2008.

- DE GIROLAMO, L.; SARTORI, M.F.; ALBISETTI, W.; *et al.* Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. v. 1, n. 2, p.154-157, 2007.
- DOLINSKA, B; SUSZKA-SWITEK, A; DRAGAN, S., *et al.* The influence of prolactin on bone mineral density (BMD) and some biochemical markers of ovariectomized rats. *Journal of Animal Science* v.55, p.83-88, 2010.
- DOMINICI, M; LE BLANC K; MUELLER, I; *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006, 4, 315-317
- DOTY, SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcified Tissue International*. V.33, n.1, p.509-512, 1981.
- DURNSUN, N; AKIN, S; DURSUN, E; *et al.* Influence of duration of total breastfeeding on bone mineral density in a Turkish population: does the priority of risk factors differ from society to society? *Osteoporosis International*, v.17, p.651-655, 2006.
- EIGLER, T; BEN-SHLOMO, A. Somatostatin system: molecular mechanisms regulating anterior pituitary hormones. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.52, p.1-19, 2014.
- ELSHOLTZ, HP; LEW, AM; ALBERT, PR; *et al.* Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. Dual signaling pathways required for D2 receptor-regulated expression of the prolactin gene. *Journal of Biological Chemistry*, v.266, n.34, 22919-22925, 1991.
- EMILIANO, AB; FUDGE, JL. From galactorrhea to osteopenia: rethinking serotonin-prolactin interactions. *Neuropsychopharmacology*, v.29, p.833-846, 2004.
- ENSOM, MH; LIU, PY; STEPHENSON, MD. Effect of pregnancy on bone mineral density in healthy women. *Obstetrical and Gynecological Survey*, v.57, p.99-111, 2002.
- FABIAN, MR; SONENBERG, N; FILIPOWICZ, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, v.79, p.351-379, 2010.
- FAZEKAS, I; BACSY, E; VARGA, I; *et al.* Effect of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) on growth hormone (GH) and prolactin (PRL) release and cell morphology in human pituitary adenoma cell cultures. *Folia Histochemica Cytobiologica*, v.38, p.119-127, 2000.
- FENG, JC; LOH, TT; SHENG, HP. Lactation increases prolactin receptor expression in spleen and thymus of rats. *Life Science*, v.63, n.2, p.111-119, 1998.
- FIORE, CE; DAGATA, R; MALATINO, SL. Prolactin and calcium metabolism: influence of hyperprolactinemia on immunoreactive parathyroid hormone levels in men and in the rat. *Journal of Endocrinological Investigation*, v.6, p.647-652, 1984.

FLINT, D.J.; CLEGG, R.A.; VERNON, R.G. Prolactin and the regulation of adipose-tissue metabolism during lactation in rats. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.22, p.265-275, 1981.

FREEMAN, M.E. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. The physiology of reproduction. *New York: Raven Press*. p.1893-1928, 1994.

FREEMAN, ME; KANYICKSKA, B; LERANT, A; *et al.* Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiology Review*, v.80, p.1523-1531, 2000

GERSHENGORN, MC; HOFFSTEIN ST; REBECCHI, MJ;*et al.* Thyrotropin-releasing Hormone Stimulation of Prolactin Release from Clonal Rat Pituitary Cells. *Journal of Clinical Investigation*, v.67, p.1769-1776, 1981.

GOFFIN, V; BINART, N; TOURAINE, P; *et al.* Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annual Review of Physiology*, v. 64, p.47-67, 2002.

GOMIDE V; ZONARIA AC; BREYNER NM; *et al.* Attachment and proliferation of human-adipose-tissue-derived stem cells on bioactive glass/PVA hybrid scaffolds. *ISRN Materials Science*, 2011.

GOSWAMI, B; PATEL, S; CHATTERJEE, M. Correlation of prolactin and thyroid hormone concentration with menstrual pattern in infertile women. *Journal of Reproduction and Infertility*, v.10, p.207-214, 2009.

GROVE, JE; BRUSCIA, E.; KRAUSE, DS. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, n. 22, p. 487-500, 2004.

GUELHO D.; GOMES L.; PAIVA, I; *et al.* Prolactin and metabolism – a different perspective of a multifunctional hormone. *Endocrinology Diabetes and Metabolism*. 2016.

GUNDERSON, EP. Impact of breastfeeding on maternal metabolism: implications for women with gestational diabetes. *Currents Diabetes Reports*, v.14, n.2, p. 460-465, 2014.

GUR, A; NAS, K; CEVIK, R; *et al.* Influence of number of pregnancies on bone mineral density in postmenopausal women of different age groups. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. v.21, p.234-241, 2003.

GUREVITCH, O.; KURKALLI, BGS.; PRIGOZHINA, T.; *et al.* Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells*, n.21, p. 588-597, 2003.

HANADA, K.; DENNIS, J.E.; CAPLAN, A. Stimulatory effects of basic fibroblasts growth factor and bone morphogenetic protein 2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-

- derived mesenchymal stem cells. *Journal of Bone and Mineral Research*, n.10, v.12, p.1606-1614, 1997.
- HE, S; NAKADA, D; MORRISON, SJ. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annual Review of Cell Development and Biology*, v.25, p.377-406, 2009.
- HELL, RCR; BOELONI, JN; OCARINO, NM; *et al.* Efeito da triiodotironina na expressão das proteínas ósseas durante a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, n.55, p.339-344, 2011.
- HONG, L; COLPAN, A; PEPTAN, IA; *et al.* 17-beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Engineering*. v.13, n. 6, p. 1197-1203, 2007.
- HOVEY RC.; TROTT JF.; VONDERHAAR BK. Establishing a framework for the functional mammary gland: from endocrinology to morphology. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, v.7, p. 17-38, 2000.
- HOVEY, RC; AIMO, L. Diverse and Active Roles for Adipocytes During Mammary Gland Growth and Function. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. V.15, p.270-290, 2010
- HUGHES, FJ; TURNER, W; BELIBASAKIS, G; *et al.* Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology*, n.41, p. 48-72, 2006.
- IGLEZIAS, JCR. Célula-tronco. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba*, n.6, p. 29, 2004.
- ITO, T.; SAWADA, R.; FUJIWARA, Y.; *et al.* FGF-2 increases osteogenic and chondrogenic differentiation potentials of human mesenchymal stem cells by inactivation of TGF- $\beta$  signaling. *Cytotechnology*. v.56, n.1, p.1-7, 2008.
- JIANG, Y; JAHAGIRDAR, BN; REINHARDT, RL; *et al.* Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, n. 418, p. 41-49, 2002.
- KALKWARF, HJ; SPECKER BL. Bone mineral changes during pregnancy and lactation. *Endocrine*. v.17, p.49-53, 2002.
- KARLSSON, MJ; AHLBORG, HG; KARLSSON, C. Female reproductive history and skeleton – a review. *BJOG International Journal Obstetricia and Gynecology.*, v.112, p.851-856, 2005.
- KENTROTI S.; McCANN SM. Role of dopamine in the inhibitory control of growth hormone and prolactin release by gastrin-releasing peptide. *Brain Research Bulletin*, v.39, p. 201-201, 1994.
- KING, JC. Physiology of pregnancy and nutrient metabolism. *American journal of Clinic Nutrition*, v.71, n.5, 1218-1225, 2000.

KIRWAN, JP; HAUGUEL- DE MOUZON, S; LEPERCQ, J; *et al.* TNF-alpha is a predictor of insulin resistance in human pregnancy. *Diabetes*, v.51, n.1, p. 2207-2213, 2002.

KLIBANSKI, A.; BILLER, BM; ROSENTHAL, DI. *et al.* Effects of prolactin and estrogen deficiency in amenorrheic bone loss. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v.67, p.124-30, 1988

KOIKE, K.; MIYAKE, A.; AONO, T.; *et al.* Effect of prolactin on the secretion of hypothalamic GnRH and pituitary gonadotropins. *Hormone Research*. v. 35, n.1, p.5-12, 1991.

KOJIMA, N; DOUCHI, T; KOSHA, S; *et al.* Cross-sectional study of the effects of parturition and lactation on bone mineral density later in life. *Maturitas*. v.25, n.41. p.203-209, 2002.

LI, RZ.; MORENO-LUNA, R; LI, D; *et al.* Human endothelial colony-forming cells serve as trophic mediators for mesenchymal stem cell engraftment via paracrine signaling. *Proceedings of National Academy of Science*, v. 111, n.28, p.10137-10142, 2014.

LINDBLAD, WJ. Stem cells in mammalian repair and regeneration. *Wound Repair and Regeneration*., v. 9, p.423-424, 2001.

LINZER, DI; FISHER, SJ. The placenta and the prolactin family of hormones: regulation of the physiology of pregnancy. *Molecular Endocrinology*.v.13, p.837-840, 1999.

LIU, F; MALAVAL, L; AUBIN, EJ. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *Journal of Cell Science*, v.116, n.9, p. 6711, 2003.

LIU, JF; BAKER, RE; CHOW, W; *et al.* Epigenetic mechanisms in the dopamine D2-receptor-dependent inhibition of the prolactin gene. *Molecular Endocrinology*., v.19, n.7, p.1904-1917, 2004

LIU, WH; REN. LN; NAVARRO-ALVAREZ, N; *et al.* The involving roles of intrahepatic and extrahepatic stem/progenitor cells (SPCs) to liver regeneration. *International Journal of Biological Sciences*. V.12, p.954-963, 2016.

LOVELADY, CA; STEPHENSON, KG; KUPPLER, M; *et al.* The effects of dieting on food and nutrient intake of lactating women. *Journal of American Dietetic Association*. v. 106, p.908-912, 2006.

LUYTEN, FP. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Current Opinion in Rheumatology*, n. 16, p. 599- 603, 2004.

MACHIDA, T; TAGA, M; MINAGUCHI, H. Effect of prolactin (PRL) on lipoprotein lipase (LPL) activity in the rat fetal liver. *Asia-Oceania Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.16, p. 261-265, 1990.

MARANO, RJ; BEN-JONATHAN, N. Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation and functions. *Molecular Endocrinology*, v. 28, n.5, 2014.

MATUSHANSKY, I; RADPARVAR, F; SKOULTCHI, AI. CDK6 blocks differentiation: coupling cell proliferation to the block to differentiation in leukemic cells. *Oncogene*. v. 22, p.4141-4149, 2003.

MAYHALL, EA; PAFFETT-LUGASSY, N; ZON, LI. The clinical potential of stem cells. *Current Opinion in Cellular Biology*, n.16, p. 713-720, 2004.

MELTON, LJ 3<sup>rd</sup>; BRYANT, SC; WAHNER, HW; *et al.* Influence of breastfeeding and other reproductive factors on bone mass later in life. *Osteoporosis International*. V.3, n.2, p.76-83, 1993.

MELLER, E; PUZA, T; MILLER, JC; *et al.* Receptor reserve for D2 dopaminergic inhibition of prolactin release *in vivo* and *in vitro*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 257, p.668-675, 1991.

MOLLER, UK; VIETH STREYM, S, MOSEKILDE, L; *et al.* Changes in bone mineral density and body composition during pregnancy and postpartum. A controlled cohort study. *Osteoporosis International*, v. 23, p.1213–1223, 2012.

MURPHY, JM; FINK, DJ; HUNZIKER, EB; *et al.* Stem cell therapy a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatology*, n.48, p. 3464-3474, 2003.

MYAMOTO, T; SUDA, T. Differentiation and function of osteoclasts. *The Keio Journal of Medicine*, v.52, n.1, p.1-7, 2003.

NALIATO, EC; FARIAS, ML; BRAUCKS, GR; *et al.* Prevalence of osteopenia in men with prolactinoma. *Journal of Endocrinological Investigation*, v. 28, p.12-17, 2005

NAKANISHI, IC; NAGAYA, N; OHNISHI, S. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cell derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circulation Journal*, v.75, p. 2260-2268, 2011.

NEVILLE, MC; MORTON, J; UMEMURA, S. Lactogenesis: The transition from pregnancy to lactation. *Pediatric Clinics Of North America*. n.1, v.48, p. 35-50, 2001.

OCARINO, NM; BOELONI, JN; GOES, AM; *et al.* Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without oxide nitric syntase inhibition. *Nitric Oxide*, n.19, p.320-325, 2008.

ONATE B; VILAHUR, G; CAMINO-LOPEZ S; *et al.* Stem cells isolated from adipose tissue of obese patients show changes in their transcriptomic profile that indicate loss in

- stemcellness and increased commitment to an adipocyte-like phenotype. *BMC Genomics*. v. 14, p. 625, 2013.
- PANETTA, NJ; GUPTA, DM; QUARTO, N; *et al.* Mesenchymal stem cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Medica*, v.51, p.25-41, 2009.
- PAYUSHINA, OV; DOMARATSKAYA, EI; STAROSTIN, VI. Mesenchymal stem cells: sources, fenotypes, and differentiation potencial. *Cell Biology*, n.33, p.6-25, 2006.
- PEARSON, D; KAUR, M; SAN, P; *et al.* Recovery of pregnancy mediated bone loss during lactation. *Bone*. v.34, p.570-578, 2004.
- POMBERO, A; GARCIA-LOPEZ, R; MARTINEZ, S. Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications. *Development Growth Differentiation*. v.58, p.469-480, 2016.
- PRESNELL, SC; PETERSEN, B; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell and Developmental Biology*., n. 13, p. 369-376, 2002.
- QIAN, SW; LI, X; ZHANG, YY; *et al.* Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. *BMC Developmental Biology*, n.10, 2010.
- QU, Q; PERALA-HAEPE, M; KAPANE, A; *et al.* Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*., v. 22, p.201-209, 1998.
- ROACH, HI. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and resorption. *Cellular Biology International*.v.18, n.6, 617-628, 1994.
- ROBLING, AG; CASTILLO, AB; TURNER, CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v.8, p.455-498, 2006.
- ROJANO-MEJIA, D; AGUILAR-MADRID, G; LOPEZ-MEDINA, G; *et al.* Risk factors and impact on boné mineral density in postmenopausal Mexican mestizo women. *Menopause*. v. 18, n.2, p.302-306, 2011.
- RONZIERE, MC; PERRIER, E; MALLEIN-GERIN, F; *et al.* Chondrogenic potential of bone-marrow and adipose tissue-derived adult human mesenchymal stem cell. *Biomedical Materials and Engineering*. v. 20, n. 3, p. 145-158, 2010.
- SASE, SP; GANU, JV; NAGANE, N. Osteopontin: a novel protein molecule. *Indian Medical Gazette*, v. 2, p. 62-66, 2012.
- SCHULTE, FA; RUFFONI, D; LAMBERS, FM; *et al.* Local mechanical stimuli regulate bone formation and resorption in mice at the tissue level. *PLos One*. v.4, n.8, p. 62171-62185, 2013.

SCHLECHTE, J; WALKNER, L; KATHOL, M. A longitudinal analysis of premenopausal bone loss in healthy women and women with hyperprolactinemia. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*, v. 75, n.3, o.698-703, 1992.

SERAKIDES, R; OCARINO, NM; MAGALHÃES, FC; *et al.* Histomorfometria óssea de ratas hipotireoideas lactantes e não-lactantes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.52, n.4, p.677-683, 2008.

SERIWATANACHAI, D; KRISHNAMRA, N; VAN LEEUWEN, JPTM. Evidence for direct effects of prolactin on human osteoblasts: Inhibition of cell growth and mineralization. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.107, p.677-685, 2009.

SIMONET, WS; LACEY, DL; DUNSTAN CR;*et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. v.18, n.2, p.309-319, 1997.

SMITH, MS; FREEMAN, ME; NEILL, JD. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, v.96, p.219-226, 1975.

SOBRINHO, LG. The psychogenic effects of prolactin. *Acta Endocrinologica*. V.129, p.38-40, 1993.

SOWERS, M. Pregnancy and lactation as risk factors for subsequent bone loss and osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, v.11, n.8, p.1052-1060, 1996.

STEIN GS; LIAN JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology Review*, v. 14, n.4, p.424-442, 1993.

STRAUGHEN, JK; TRUDEAU, S; MISRA, VK. Changes in adipose tissue distribution during pregnancy in overweight and obese compared with normal weight women. *Nutrition and Diabetes*, v.3, n.8, p.84, 2013.

STRAYHORN, CL; GARRETT, JS; DUNN. RL; *et al.* Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *Journal of Periodontology*, v.70, n.11, p. 1345-1354, 1999.

SUNTORN SARATOON, P; WONGDEE, K; GOSWAMI, S; *et al.* Bone modeling in bromocriptine-treated pregnant and lactating rats: possible osteoregulatory role of prolactin in lactation. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism*, v.299, n.3, p.426-436, 2010

TOFT, DJ; LINZER, DI. Identification of three prolactin-related hormones as markers of invasive trophoblasts in the rat. *Biology of Reproduction*, v.63, p.519-525, 2000.

TZENG, SJ; LINZER, DI. Prolactin receptor expression in the developing mouse embryo. *Molecular reproduction and development*. v.48, p.45-52, 1997.

VERNON, RJ; TAYLOR, E. Insulin, dexamethasone and their interactions in the control of glucose metabolism in adipose tissue from lactating and nonlactating sheep. *Biochemistry Journal*, v.256, p.509-514, 1988.

VIEIRA, JGH. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v.43, n.6, p.415-422, 1999.

VIERECK, V; SIGGELKOW, H; TAUBER, S; *et al.* Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by, vitamin-D, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, v.86, p. 348-356, 2002.

WAJCHENBERG, BL. Tecido adiposo como glândula endócrina. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, v. 44, n.1, 2000.

WANG, Y; LI, J; BU, G; *et al.* Extra-pituitary prolactin and prolactin –like hormones in zebrafish and chickens. *Physiological Society* , v.31, 2014.

WARDLAW, SL; BILEZIKIAN, JP. Hyperprolactinemia and osteopenia. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v.75, p.690-691, 1992.

WILLIAMS, DC; PAUL, DC, BLACK, LJ. Effects of estrogen and tamoxifen on serum osteocalcin levels in ovariectomized rats. *Bone Mineral*, v.14, p.205-220, 1991.

WONGDEE K.; TULALAMBA W.; THONGBUNCHOO J.; *et al.* Prolactin alters the mRNA expression of osteoblast- derived osteoclastogenic factors in osteoblast-like UMR106 cells. *Molecular and Cellular Biochemistry* v.349, p.195-204, 2011.

YANG, YJ.; LI, XL.; XUE, Y.; *et al.* Bone marrow cells differentiation into organ cells using stem cell therapy. *European Review for Medical and Pharmacological Science*. v.20, p.2899-2907, 2016.

ZUK, PA; ZHU, M; ASHJIAN, P;*et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, v.13, p.4279-4295, 2001.

ZUNI, SN; Di GREGORIO, S; MAUTALEN, C. Bone mass changes during pregnancy and lactation in the rat. *Bone*.v.25, n.6, p.681-685, 1999.

ZHAO, Y; SONG, T; WANG, W; *et al.* P38 and ERK1/2 MAPKs act in opposition to regulate BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal progenitor cells. *Plos One*, n.8, v.7. p.1-14, 2012.

## ANEXO

### Anexo 1: Certificado CEUA/UFMG

 <p><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p>
<p><b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº. 378 / 2012, relativo ao projeto intitulado "COMPARAÇÃO ENTRE O EFEITO IN VITRO DA PROLACTINA E O EFEITO DA GESTAÇÃO E LACTAÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA DE CTM DO TECIDO ADIPOSE", que tem como responsável Natalia de Melo Ocarino, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/04/2013. Este certificado expira-se em 11/04/2018.</p>
<p><b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº. 378 / 2012, related to the Project entitled "COMPARISON BETWEEN THE IN VITRO EFFECT OF PROLACTIN AND THE PREGNANCY AND THE LACTATION IN THE OSTEOGENIC DIFFERENTIATION OF MSC OF ADIPOSE", under the supervision of Natalia de Melo Ocarino, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/04/2013. This certificates expires in 11/04/2018.</p>
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 11/04/2013.</p>
<p>Atenciosamente.</p>
<p>Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/</a></p>
<p>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) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/cetea">www.ufmg.br/bioetica/cetea</a> - <a href="mailto:cetea@prpq.ufmg.br">cetea@prpq.ufmg.br</a></p>