

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado dos cursos de Pós-Graduação

EFEITO *IN VITRO* DA TRIIODOTIRONINA (T3)
NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E
CONDROGÊNICA DAS CÉLULAS TRONCO DO
TECIDO ADIPOSEO DE EQUINOS

Débora de Oliveira Spila

Belo Horizonte
2019

Débora de Oliveira Spila

Efeito in Vitro da Triiodotironina (T3) na Diferenciação Osteogênica e Condrogênica das Células Tronco do Tecido Adiposo de Equinos

Defesa de dissertação apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área: Clínica Médica de Equinos

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Coorientadoras: Profa. Dra. Renata Maranhão e Profa. Dra. Natália de Melo Ocarino

Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2019

S756e Spila, Débora de Oliveira, 1989-

Efeito in vitro da triiodotironina (t3) na diferenciação osteogênica e condrogênica das células tronco do tecido adiposo de equinos [manuscrito] / Thaynara Parente de Carvalho. - 2019.

57 f. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides

Coorientadoras: Renata Maranhão, Natália de Melo Ocarino

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Equino - Teses. 2. Triiodotironina - Teses. 3. Células tronco mesenquimais - Teses.
4. Hormônios tireoidianos - Teses. 5. Tecido adiposo I. Serakides, Rogéria. II. Maranhão, Renata de Pino Albuquerque. III. Ocarino, Natália de Melo. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD - 636.108 96

FOLHA DE APROVAÇÃO

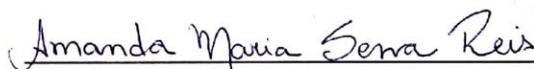
DÉBORA DE OLIVEIRA SPILA

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 MEDICINA E CIRURGIA VETERINÁRIAS .

Aprovada em 28 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:



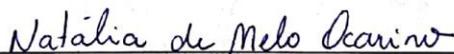
Prof^ª. Rogéria Serakides
Presidente - Orientador



Prof^ª. Amanda Maria Sena Reis
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof^ª. Raffaella Bertoni Cavalcanti Teixeira
Escola de Veterinária - UFMG



Prof^ª. Natália de Melo Ocarino
Escola de Veterinária - UFMG

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Mãe e ao Pai divinos, que nos preencheu com o sopro de vida e nos fez seres dotados de tantas bênçãos e amor. Meu coração transborda de gratidão.

Aos meus pais da terra, Rosana e Daniel, que apoiaram minha jornada e minhas decisões não deixando que me faltasse nada para realizar mais uma conquista, e às minhas irmãs que são fontes de inspiração na minha trajetória.

Gratidão às professoras, Rogéria, Renata e Natália, por me darem esta oportunidade e por serem guias nos momentos de novos aprendizados e por suas disponibilidade e dedicação.

Aos meus amados amigos de jornada, Betto, Sara, Manu, Lorena, Fabrício, Camila, Kênia e Fabiana, por estarem presentes nos momentos mais desafiadores, por conseguirem sempre me tirar um sorriso, me dar um conselho indo para o R.U, enxugar minhas lágrimas nas horas de aflição, mandar memes descolados, fazer os melhores encontros numa varanda e por cuidar do meu bem estar nas horas de descanso, com amor peculiar de cada um. Cada momento, feliz e triste, valeu a pena tendo vocês por perto. É tanto amor que me falta palavras!

Às companheiras de laboratório, Carla, Natalia, Layla, Flavia, Gabriela, Bruna, Talita, Juneo e Amanda, por terem me ensinado, por serem exemplo de pessoas do bem e por terem uma conduta profissional exemplar, assim como a Andréia, os funcionários da esterilização e as meninas da residência na Clínica de Equinos que foram sempre prestativos.

Dou graças aos meus companheiros de quatro patas Odin, Frida, Sirius e Tata que me proporcionaram momentos de descontração, amor e relaxamento nos meus dias em casa.

Agradeço à Pantera, Criolo, Trovão, Brisa, Aurora, Habib, Boulton e uma fêmea que não registrei o nome, que foram os equinos utilizados neste estudo e à todos os autores de cada *paper*, essenciais para que este projeto ocorresse, sou eternamente grata por vocês terem sido tão cooperativos, generosos, amáveis e por compartilhar seus aprendizados.

Agradeço ao pessoal da Nova Acrópole, do Jardim do Beija flor e aos meus mestres divinos que me ajudaram a alcançar ensinamentos maravilhosos nestes dois anos, cruciais nas horas desafiadoras e de plenitude, ensinamentos estes que são essenciais para meu crescimento humano.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos e à FAPEMIG e CNPq pelo auxílio financeiro para execução do projeto.

Agradeço por último, meu pequeno bebê (Gaia) que esteve comigo nesta trajetória por lindas 12 semanas e que agregou algo muito valioso: *o amor a cada instante de vida*, por mais desafiador e dolorido que este seja. Quando o instante se vai, ele deixa as lições da alma, recheadas de pura luz.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas	04
Lista de figuras	05
Resumo	07
Abstract	09
Introdução	11
Objetivos	14
1. Revisão de literatura	15
1.1. Células tronco.....	16
1.1.1. Diferenciação osteogênica.....	17
1.1.2. Diferenciação condrogênica.....	19
1.2. Hormônios tireoideanos.....	22
1.3. Uso de células tronco em doenças osteoarticulares.....	24
2. Material e Métodos	26
2.1. Infra-estrutura e animais.....	26
2.2. Coleta do tecido adiposo subcutâneo.....	27
2.3. Isolamento e expansão das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em meio indiferenciado.....	28
2.4. Experimento 1: Cultivo das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em meio de diferenciação osteogênica com e sem adição de triiodotironina	29
2.4.1. Redução do MTT em formazan	30
2.4.2. Atividade da fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT	30
2.4.3. Densidade celular (porcentagem célula/campo).....	30
2.4.4. Porcentagem de matriz mineralizada.....	30
2.5. Experimento 2: Cultivo das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em meio de diferenciação condrogênica com e sem adição de triiodotironina.....	31
2.5.1. Redução do MTT em formazan.....	31
2.5.2. Atividade da fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT.....	32
2.5.3. Porcentagem de células/campo e de matriz PAS+	32
2.6. Análise estatística.....	32
3. Resultados	32
3.1. Caracterização das CTM-TA.....	32
3.2. Experimento 1.....	33
3.2.1. Redução do MTT em Formazan.....	33
3.2.2. Atividade da Fosfatase Alcalina.....	35
3.2.3. Densidade celular (porcentagem célula/campo).....	35
3.2.4. Porcentagem de Matriz mineralizada.....	37
3.3. Experimento 2	39
3.3.1. Redução d MTT em Formazan.....	39
3.3.2. Atividade da Fosfatase Alcalina.....	40
3.3.3. Porcentagem de células/campo e de matriz PAS+.....	41
4. Discussão	43
5. Referências Bibliográficas	46
6. Anexos	54
6.1. Aprovação do comitê de ética.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Aggrecan - proteoglicano de sulfato de condroitina
ALP - fosfatase alcalina
BCIP - nitro-blue tetrazolium chloride
BMP - proteína morfogenética óssea
BMP-2 - proteína morfogenética óssea 2
DMEM – meio mínimo essencial
CT - células Tronco
CTM-TA - células tronco mesenquimais do tecido adiposo
CTM-TO - células tronco mesenquimais da medula óssea
HT - hormônio da tireoide
IGF-1 - fator de crescimento semelhante a insulina 1
ISCT - *International Society for Cellular Therapy*
NBT - 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt
nM - nanomolar
NTC-CTA - Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal
MEC - matriz extracelular
MSC - mesenchymal Stem Cells
MSC-AT- mesenchymal Stem Cells Adipose Tissue
MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
Osx - osterix
PAS – ácido periódico de schiff
PTH - hormônio da paratireóide
Runx2 - Runt-related transcription factor 2
SNK - Student-Newman-Keuls
Sox-9 - ranscription fator Sox-9
TGF- β 1 - fator de transformação do crescimento beta 1
TR α - receptor do hormônio da tireoide alfa
TR β - receptor do hormônio da tireoide beta
T3 - triiodotironina
T4 - tiroxina
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
Vitamina D3- colecalciferol
Wnt – canonical Wingless

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Procedimento cirúrgico de coleta de tecido adiposo subcutâneo de equinos. (A) tricotomia da região do músculo glúteo dorsal, (B) anestesia local em L invertido, (C) incisão e coleta do tecido adiposo, (D) fragmento do tecido adiposo em meio de cultura com <i>DMEM</i> para transporte até o laboratório.	28
Figura 2	Preparo do tecido adiposo de equino para isolamento e expansão das células tronco mesenquimais. (A) fragmentação do tecido adiposo e (B) digestão do tecido adiposo em colagenase tipo I 0,15%.	29
Figura 3	Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos. (A) CTM-TA indiferenciadas com fenótipo semelhante a fibroblasto (25x). (B) CTM-TA em meio de diferenciação osteogênica aos 21 dias, com formação de nódulos mineralizados enegrecidos (Von kossa, 12,5x). (C) CTM-TA em meio de diferenciação condrogênica aos 14 dias, com matriz condrogênica fortemente PAS+ (PAS, 12,5x)	33
Figura 4	Redução de MTT em cristais de Formazan (média + desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênica aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. * $p \leq 0,05$	34
Figura 5	Atividade da fosfatase alcalina (média + desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênica aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. * $p \leq 0,05$	35
Figura 6	Porcentagem de células/campo em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênica aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. * $p \leq 0,05$	36
Figura 7	Fotomicroscopia das culturas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos (Hematoxilina-eosina, Bar=500 μ m). Aos sete dias, os grupos controle (A), tratado com 0,01nM de T3 (B) e tratado com 1000nM de T3 (C) apresentam porcentagem de células/campo semelhante. Aos 14 dias, o grupo 0,01nM (E) apresenta menor densidade celular em comparação aos grupos controle (D) e tratado com 1000nM de T3 (F). Aos 21 dias, o grupo tratado com 1000nM de T3 (I) apresenta menor densidade celular em comparação aos grupos controle (G) e tratado com 0,01nM de T3.	37
Figura 8	Porcentagem de matriz mineralizada/campo (média + desvio padrão) coradas pela técnica de Von Kossa, em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênica aos 14 (A) e 21 (B) dias. * $p \leq 0,05$	38
Figura 9	Fotomicroscopia das culturas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos com nódulos de mineralização corados de preto (Von kossa, Bar=500 μ m). Aos 14 dias, (A) grupo controle, (B) tratado com 0,01nM de T3 e (C) tratado com 1000nM de T3, com menor quantidade de nódulos no grupo tratado com 0,01nM de T3. Aos 21 dias, (D) grupo controle, (E) tratado com 0,01nM de T3 e (F) tratado com 1000nM de T3 com quantidade semelhante de nódulos de mineralização.	39

Figura 10	Redução de MTT em cristais de Formazan (média + desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$	40
Figura 11	Atividade da fosfatase alcalina (média + desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$	40
Figura 12	Porcentagem de células/campo em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$	41
Figura 13	Porcentagem de matriz PAS+/campo (média + desvio padrão), em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$	42
Figura 14	Fotomicroscopia das culturas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos coradas pelo PAS (PAS, Bar=500 μ m). Aos sete dias, (A) grupo controle, (B) tratado com 0,01nM de T3 e (C) tratado com 1000nM de T3, com maior densidade celular nos grupos tratados. Aos 14 dias, (D) grupo controle, (E) tratado com 0,01nM de T3 e (F) tratado com 1000nM de T3, com menor quantidade de matriz PAS+ no grupo tratado com 1000nM de T3.	42

RESUMO

A adição de hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, dentre outros em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) tem o objetivo de aumentar a proliferação, induzir a diferenciação e diminuir o tempo de cultivo. Além disso, células tronco (CT) com maior potencial osteogênico ou condrogênico são células com maior capacidade de sintetizar, *in vitro*, matriz mineralizada e cartilaginosa, respectivamente. O efeito da adição da triiodotironina (T3) em culturas de CTM sob diferenciação osteogênica e condrogênica já foi testado com bons resultados em células de ratos e humanos. Assim, uma hipótese é que o uso de CT, com maior potencial de diferenciação osteogênico ou condrogênico, poderia aumentar as chances de recuperação ou acelerar o tratamento de doenças ou alterações que afetam os tecidos ósseo e cartilaginoso, respectivamente. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da T3 em duas concentrações (0,01nM e 1000nM) comparadas ao grupo controle sobre a diferenciação osteogênica e condrogênica das CTM do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos. No primeiro experimento, avaliou-se o efeito da T3 sobre a diferenciação osteogênica das CTM-TA, por meio dos ensaios de avaliação da atividade da fosfatase alcalina (ALP); da viabilidade celular e da densidade celular, bem como a formação de nódulos mineralizados aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. No segundo experimento, avaliou-se o efeito da T3 sobre a diferenciação condrogênica das CTM-TA, através da avaliação da atividade da fosfatase alcalina; do metabolismo mitocondrial; da densidade celular e da porcentagem de matriz condrogênica aos sete e 14 dias. Em ambos os experimentos, foi realizada ANOVA com comparação das médias pelo teste SNK. Diferenças entre grupos foram consideradas significativas se $p \leq 0,05$. No primeiro experimento, aos sete dias, não houve diferenças entre grupos com relação a nenhuma das variáveis estudadas. Aos 14 dias, a menor concentração de T3 (0,01nM) reduziu a densidade celular e o número de nódulos de mineralização, apesar de aumentar a atividade da ALP e o metabolismo mitocondrial. A maior concentração de T3 (1000nM) aumentou a atividade da ALP, sem alterar o número de nódulos mineralizados, em comparação ao controle. Aos 21 dias, a menor concentração de T3 aumentou a atividade da ALP, sem alterar os demais parâmetros, em comparação ao controle. A maior concentração de T3 (1000nM) reduziu o metabolismo mitocondrial e a densidade celular, sem alterar o número de nódulos de mineralização em comparação ao controle. No segundo experimento, aos sete dias, as duas concentrações de T3 aumentaram a densidade celular em comparação ao controle, sem alterar os demais parâmetros estudados. Aos 14 dias, a maior concentração de T3 (1000nM) reduziu o metabolismo mitocondrial, a atividade da ALP, a densidade celular e

a porcentagem de matriz condrogênica PAS+, em comparação ao controle. Conclui-se que a adição de T3 nas culturas de CTM-TA de equinos não aumenta a diferenciação osteogênica ou condrogênica, podendo causar inclusive efeito negativo sob a densidade celular e a síntese de matriz, dependendo da concentração do hormônio e do tempo de cultivo.

Palavras-chave: células tronco mesenquimais, cavalos, hormônio da tireoide, tecido adiposo, cultivo celular

ABSTRACT

The addition of hormones, growth factors, vitamins, among others additives to cultures of mesenchymal stem cells (MSC) aims to increase proliferation, induce differentiation and decrease the time of culture. In addition, MSC with greater osteogenic or chondrogenic potential are cells with greater ability to synthesize, *in vitro*, mineralized and cartilaginous matrix, respectively. The effect of triiodothyronine (T3) addition to MSC cultures under osteogenic and chondrogenic differentiation has already been tested with good results in rat and human cells. Thus, one hypothesis is that the use of stem cells with greater potential for osteogenic or chondrogenic differentiation could increase the chances of recovery or accelerate the treatment of diseases or alterations affecting bone and cartilage tissues, respectively. The objective of this study was to evaluate the effect of T3 in two concentrations (0,01nM and 1000nM) compared to the control group in the osteogenic and chondrogenic differentiation of the adipose tissue MSC-AT in horses. In the first experiment, the effect of T3 on the osteogenic differentiation of the MSC-AT, based on the results of the alkaline phosphatase (ALP); mitochondrial metabolism, cell density and matrix produced by the MSC-AT was measured by the amount of mineralized nodules at seven, 14 and 21 days. In the second experiment, the effect of T3 on the chondrogenic differentiation of the MSC-AT was evaluated, based on the results of the alkaline phosphatase activity; of mitochondrial metabolism; of the cell density and the percentage of chondrogenic matrix were performed at 7 and 14 days in culture. In both experiments, ANOVA was performed with comparison of the means by the SNK test. Differences between groups were considered significant if $p < 0.05$. In the first experiment, at seven days, there were no differences between groups with respect to any of the variables studied. At 14 days, the lower concentration of T3 (0,01nM) reduced cell density and number of mineralization nodules, although increased ALP activity and mitochondrial metabolism. The higher concentration of T3 (1000nM) increased ALP activity without altering the number of mineralized nodules compared to the control. At 21 days, the lower concentration of T3 increased ALP activity without altering the other parameters in comparison to the control. The higher concentration of T3 (1000nM) reduced the conversion of MTT to formazan and cell density without altering the number of mineralization nodules in comparison to the control. In the second experiment, at seven days, the two concentrations of T3 significantly increased the cell density in comparison to the control without altering the other parameters studied. At 14 days, the higher concentration of T3 (1000nM) reduced the mitochondrial metabolism, ALP activity, cell density and percentage of chondrogenic PAS +

matrix compared to control. It is concluded that the addition of T3 to equine MSC-AT cultures does not increase osteogenic or chondrogenic differentiation and may even cause negative effect under cell density and matrix synthesis, depending on the concentration of the hormone and the time of culture.

Key Words: mesenchymal stem cells, horses, thyroid hormone, adipose tissue, cell culture

INTRODUÇÃO

Com o advento da medicina regenerativa, surgem novas perspectivas de tratamento para várias doenças na medicina humana e veterinária. O uso de células tronco é um dos recursos estudados neste tipo de terapia por sua capacidade clonogênica, de auto renovação e de se diferenciar em um ou mais tipos celulares especializados (Nutti et al., 2016). As pesquisas sobre as terapias regenerativas na espécie equina, incluindo aquelas que vislumbram o uso de células tronco mesenquimais, aumentam em número a cada dia. Estes animais, principalmente os de aptidão atlética, têm predisposição a lesões musculoesqueléticas, como tendinopatias responsáveis por 25% das claudicações e problemas articulares que podem evoluir para osteoartroses, muitas vezes de difícil tratamento, com alto risco de recidivas ou permanentes (Kasashima et al., 1999; Buckwalter, 2002; Frisbie e Smith, 2010). Além disso, as pesquisas em equinos, particularmente no que concerne a este tipo de acometimento, podem trazer informações importantes para a medicina humana, uma vez que há semelhanças entre as duas espécies com relação às lesões, às estruturas anatômicas, à função dos tecidos e às características das células tronco, no que diz respeito à expressão dos marcadores de superfície e ao potencial de proliferação e de diferenciação (Hillmann et al., 2016).

Baseado em sua origem, existem dois tipos de células tronco, as embrionárias e as não embrionárias (células tronco adultas). As células tronco mesenquimais adultas são consideradas multipotentes e apesar de apresentarem menor capacidade de diferenciação, em comparação às células tronco embrionárias (Leeb et al., 2010), podem se diferenciar em vários tipos celulares, sendo inclusive responsáveis pela renovação de vários tecidos (Zago e Covas, 2006).

A adição de hormônios, fatores de crescimento, vitaminas, dentre outros em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) tem o objetivo de aumentar a proliferação, induzir a diferenciação e diminuir o tempo de cultivo. Células tronco com maior potencial osteogênico ou condrogênico são células com maior capacidade de sintetizar, *in vitro*, matriz mineralizada e cartilaginosa, respectivamente (Alves, et al., 2014). Assim, uma hipótese é que o uso de células tronco, com maior potencial de diferenciação osteogênico ou condrogênico, poderia aumentar as chances de recuperação ou acelerar o tratamento de doenças ou alterações que afetam os tecidos ósseo e cartilaginoso, respectivamente (Kim et al., 2009; Hell et al., 2011; Elashry et al., 2018). Muitos fatores influenciam a diferenciação das células tronco

mesenquimas em tecidos especializados, dentre eles já foram estudados o hormônio estrógeno, utilizando CTM de humanos na diferenciação osteogênica e adipogênica (Hong et al., 2007). Song et al. (2011) utilizou em humanos, a BMP-2 juntamente com a vitamina D3, em diferentes concentrações, para investigar o efeito sinérgico delas na diferenciação osteogênica. Youssef et al. (2017) reuniu em uma revisão a importância do fator de crescimento semelhante à insulina no desenvolvimento, na pluripotência e na diferenciação das CTM. Castro et al. (2014) estudaram a combinação da vitamina C com o plasma rico em plaquetas, sendo que o efeito de ambos já havia sido estudado separadamente em culturas de células tronco do tecido adiposo de equino, onde se observou a influência sobre as diferenciações osteogênica e condrogênica, com resultados positivos na expressão dos fatores de transcrição Runx-2 e Sox-9 (Girolamo et al., 2007; Del Bue et al., 2008). O fator de crescimento TGF- β 1 foi estudado na diferenciação osteogênica de CTM de humanos e ratos, demonstrando resultados divergentes entre as duas espécies em algumas análises, sugerindo a importância de se testar fatores que influenciam a cultura celular em modelos animais distintos (Levi et al., 2010).

Os hormônios tireoidianos estão entre os fatores que, se adicionados ao meio de cultura, estimulam a diferenciação das células tronco de algumas espécies, como roedores, pelo fato dessas células apresentarem receptores TR α e TR β específicos para estes hormônios (Gruber et al., 1999). Sabe-se que os hormônios tireoidianos são essenciais para a diferenciação e o metabolismo de vários órgãos e tecidos, incluindo os tecidos ósseo e cartilaginoso (Basset e Williams, 2016). Um desses hormônios, a triiodotironina (T3) é importante tanto para a osteogênese quanto para a condrogênese. Na cartilagem, ele atua na ossificação endocondral e no crescimento linear, inibindo a proliferação celular e estimulando a diferenciação condrogênica hipertrófica e a apoptose celular, além de ativar a sinalização de IGF-1 e Wnt e estimular genes envolvidos na síntese da matriz cartilaginosa. Sobre as células osteoprogenitoras, T3 estimula a proliferação e a diferenciação, além de estimular a síntese e a mineralização da matriz óssea, por aumentar a expressão de proteínas, tais como a osteocalcina, a osteopontina, o colágeno tipo II e a fosfatase alcalina (Basset e Williams, 2016).

Os efeitos da adição de T3 em culturas de CTM já foram testados em células de ratos (Boeloni et al., 2009; Assis et al., 2018) e de humanos (Fernández-Pernas et al., 2016). Nestes estudos, foi demonstrado que a T3 estimula as diferenciações osteogênica e condrogênica. Na diferenciação osteogênica, Boeloni et al. (2009) testaram quatro concentrações de T3 em

células de ratos (0,001nM; 0,01nM; 10nM e 1000nM), obtendo maior diferenciação osteogênica com a adição de 0,01nM de T3 ao meio de cultura. Além de maior atividade da fosfatase alcalina e de maturação do colágeno, houve maior número e diâmetro de nódulos mineralizados. Assis et al. (2018) testaram as concentrações de 0,01nM; 1nM; 100nM, 1000nM na diferenciação condrogênica de células de ratos, observando que a concentração de 0,01nM de T3 aumentou a síntese de matriz condrogênica com 14 e 21 dias de tratamento, sendo este resultado associado à maior expressão de colágeno tipo II e Sox9. Em ambos os estudos, as demais concentrações e tempos apresentaram efeitos semelhantes ou piores em comparação ao controle, principalmente quando utilizou-se concentrações mais altas, concluindo que os efeitos são dose-dependentes. Fernández-Pernas et. al (2016) também observaram que a T3 influencia a diferenciação condrogênica de CTM do cordão umbilical de humanos, obtendo melhores resultados com o uso de 100nM, onde houve maior expressão de colágeno tipo II, aggrecan e maior síntese de matriz condrogênica corada pela safranina O. Em células tronco de equinos, não há estudos que tenham investigado o efeito da T3 na diferenciação osteogênica e condrogênica dessas células, principal objetivo deste projeto.

Com o crescimento vigente do uso de CTM nos tratamentos de lesões musculoesqueléticas em equinos, principalmente aquelas que são de difícil reparo ou que necessitam de uma resposta celular acelerada, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito de duas concentrações diferentes de T3 nas diferenciações osteogênicas e condrogênicas de CTM do tecido adiposo de equinos, buscando além de entender “*in vitro*” a dinâmica destas células diante do estímulo hormonal, verificar se a T3 estimula a diferenciação *in vitro* das CTM, o que certamente aumentariam as expectativas diante da hipótese de que o uso dessas células diferenciadas com T3 possa aumentar o sucesso do tratamento de diversas doenças ou alterações que afetam os tecidos ósseo ou cartilaginoso.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GERAIS

Estudar e comparar o efeito *in vitro* de duas concentrações (0,01nM e 1000nM) da triiodotironina (T3) na diferenciação osteogênica e condrogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de equinos, por meio de dois experimentos distintos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

No experimento 1, avaliar e comparar a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de equinos, cultivadas em meios acrescidos ou não de triiodotironina nas concentrações de 0,01nM, 1000nM, com base nos seguintes ensaios:

- Atividade da fosfatase alcalina (ALP) pelo método BCIP/NBT; análise do metabolismo mitocondrial, pela redução do MTT em formazan e análise da densidade celular, pela determinação da porcentagem de células/campo cultivadas sob lamínulas coradas pela técnica da hematoxilina-eosina aos 7, 14 e 21 dias de cultivo.
- Análise da quantidade de matriz produzida pelas CTM-TA, determinada pelo número de nódulos mineralizados corados pela técnica de Von Kossa aos 14 e 21 dia de cultivo.

No experimento 2, avaliar e comparar a diferenciação condrogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo de equinos, cultivadas em meios acrescidos ou não de triiodotironina nas concentrações de 0,01nM, 1000nM, com base nos seguintes ensaios:

- Atividade da fosfatase alcalina (ALP) pelo método BCIP/NBT; análise do metabolismo mitocondrial, pela redução do MTT em formazan, análise da densidade celular, pela determinação da porcentagem de células/campo e da porcentagem de matriz condrogênica, sendo os dois últimos ensaios realizados em culturas de células sob lamínulas, coradas pela técnica do ácido peróxido de Schiff (PAS).

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Células Tronco

As células tronco são células indiferenciadas capazes de se auto renovar e se diferenciar em vários tipos celulares, podendo ser de origem embrionária ou não (Caplan, 1991; Koch et al., 2009). As células tronco são classificadas como totipotentes, pluripotentes e multipotentes. As totipotentes são representadas pelas células derivadas do zigoto de mamíferos e são capazes de se diferenciar em qualquer tipo celular, incluindo tecidos extra-embrionários. As pluripotentes não são capazes de originar tecidos extra-embrionários e geram apenas células dos folhetos embrionários, ou seja do ectoderma, mesoderma e do endoderma. As células multipotentes diferenciam-se em alguns tipos celulares e são responsáveis pela renovação de certos tecidos (Zago e Covas, 2006).

As células tronco que não são de origem embrionária, também conhecidas como células tronco adultas (CTA) podem ser mesenquimais ou hematopoéticas, tem sua capacidade de diferenciação reduzida quando comparadas às embrionárias. A proliferação das CTA diminui com o avançar da idade do indivíduo, contudo, este tipo celular é utilizado em implantes autólogos, diminuindo as chances de rejeição pelo organismo (Heng et al., 2004 ; Araújo et al., 2005 ; Zago e Covas, 2006). Além disso, as pesquisas com CTA, particularmente de humanos, não encontram obstáculos por questões éticas ou religiosas, e sua utilização não tem sido associada à formação de teratomas, como descrito quando do uso das células tronco embrionárias (McLaren, 2001; Shenfield et al., 2002).

As células tronco mesenquimais são encontradas em vários tecidos em quantidades variáveis e são células multipotentes com capacidade de auto-renovação (Lee e Hui, 2006; Zago e Covas, 2006). Além disso, elas apresentam plasticidade que é a capacidade de adquirir fenótipos de vários tipos celulares, além daqueles presentes no seu tecido de origem, e se aderem em superfície plástica, o que as difere das células tronco hematopoéticas (Vidal, et al., 2006). As CTM expandem-se por várias passagens *in vitro*, apresentam marcadores de superfície específicos e possuem propriedades importantes para o reparo tecidual, dentre elas a capacidade de migrar para outros tecidos e de secretarem citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento. Elas estimulam também outros grupos celulares que desencadearão a secreção e a diferenciação celular, buscando a homeostasia do local acometido (Nauta e Fibbe, 2007; Monteiro et al., 2009; Stewart e Stewart, 2011).

As CTM de equinos podem ser encontradas na medula óssea (Vidal, et al. 2006), tecido adiposo (Vidal et al., 2007; Carvalho et al., 2009), sangue periférico (Koerner et al., 2006), cordão umbilical (Guest et al., 2008), líquido amniótico (Iacono et al., 2012), membrana amniótica (Seo et al., 2013), geléia de Warton (Iacono et al., 2012), músculo (Radtke et al., 2013), tendões (Burk et al., 2013b), líquido sinovial (Murata et al., 2014), membrana sinovial (Prado et al., 2015), gengiva/periodonto (Mensing et al., 2011), perióstio (Radtke et al., 2013) e polpa dentária (Ishikawa et al., 2017). As células da medula óssea, tem sido as mais estudadas em diversas espécies, inclusive em equinos, porém uma das desvantagens da utilização desta fonte é devido a técnica cirúrgica de obtenção considerada um procedimento invasivo com riscos de complicações (Muttini et al., 2012; Burk et al., 2013b). Em segundo lugar, a fonte de CTM mais estudada na espécie equina é o tecido adiposo, que requer um procedimento cirúrgico bem menos invasivo para sua obtenção. Ademais, algumas pesquisas demonstram que as células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) podem ser obtidas em maior quantidade, entram em senescência mais tardiamente e apresentam boa capacidade de criopreservação quando comparadas às CTM-MO (Kern et al., 2006; Carvalho et al., 2009).

A *International Society for Cellular Therapy* (ISCT) estabeleceu alguns critérios para a caracterização das CTM em humanos, sendo eles: aderência em superfície plástica, expressão dos marcadores CD105, CD90 e CD73 e não expressão dos marcadores CD45, CD34, CD14 e capacidade para se diferenciarem em osteoblastos, adipócitos e condroblastos (Dominici et al., 2006). Na espécie equina, há dificuldade com relação aos marcadores de superfície, pois há pouca disponibilidade de anticorpos monoclonais específicos para a espécie equina (Barberini et al., 2014). A *ISCT* definiu a expressão dos antígenos de superfície em CTM humanas, sendo eles: CD 29, CD 44, CD 73, CD 90, CD 105, CD 14, CD 34, CD 45, CD 79a e MHC II (Mosna et al., 2010). Em equinos, os as células tronco expressam CD105, CD90, CD29 e CD44. No entanto, as CTM de equinos não tem expressão de CD73, CD34, CD14, CD45, CD79 α e MHC II (Paebst et al., 2014).

1.1.1 Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica é um processo pelo qual as células tronco sofrem estímulos bioquímicos que definirão como essas células se tornarão precursores de células ósseas, os

osteoblastos (Birmingham et al., 2012). Os osteoblastos são células de origem mesenquimal, responsáveis por criar e manter a arquitetura esquelética. Estas células produzem matriz extracelular e regulam a síntese de matriz mineralizada durante a formação inicial do osso e depois a remodelação do mesmo (Neve et al., 2011). O processo para esta diferenciação inicia-se com a formação de células osteoprogenitoras que se diferenciarão em pré-osteoblastos o qual, na sequência, se tornarão osteoblastos maduro e, finalmente, se transformarão em osteócitos (James et al., 2013).

O desenvolvimento progressivo de uma célula osteoblástica imatura para uma madura é caracterizado pela síntese de proteínas osteogênicas e uma sequência de expressão de genes específicos, ocorrendo tal etapa em três períodos distintos: proliferação, maturação, síntese e mineralização da MEC (Neve et al., 2011). Durante este processo, uma série de interações complexas entre sinalizadores parácrinos e endócrinos iniciam os mecanismos moleculares e a ativação de uma série de genes, estabelecendo o fenótipo destas células e providenciando a base para o funcionamento de uma seleção de moléculas durante a osteogênese (Bruder et al., 1998; Rodriguez et al., 2004; Garg et al., 2017).

Os principais eventos durante a diferenciação osteogênica são regulados por fatores de transcrição, principalmente o fator de transcrição Runx2 e osterix (*Osx*) (Govoni, 2015). O Runx2 é envolvido na síntese de proteínas da matriz óssea, direcionando a codificação de colágeno tipo I, osteopontina, sialoproteína óssea e osteocalcina e, mais tardiamente, atuará na formação do osteoblasto maduro (Neve et al., 2011; Fakhry et al., 2013). O *Osx* é adjuvante de Runx2 e um fator de transcrição necessário para a expressão de osteopontina (Chen et al., 2013).

Os fatores sistêmicos parácrinos e endócrinos são essenciais para o processo até a diferenciação em osteoblasto. Estes tipos celulares expressam receptores para vários hormônios incluindo paratormônio (PTH), vitamina D, estrógeno, glicocorticóides e hormônios tiroideanos, os quais regulam sua diferenciação e atividade (Gruber et al., 1999; Neve et al., 2011). Dentre os fatores parácrinos, os mais conhecidos são as proteínas morfogenéticas do osso (BMP) pertencente a super família dos fatores de crescimento transformante β (TGF- β), importantes indutores da diferenciação das CTMs em osteoblastos (Fakhry et al., 2013), fator de crescimento fibroblástico (FGF) o qual promove a expressão de marcadores osteogênicos nas CTM (Birmingham, et al., 2012) e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) implicados na proliferação celular e na síntese de matriz tanto *in*

vitro quanto *in vivo* (Giordano et al., 2000), citocinas moduladoras e Wnt que exercem papel essencial no desenvolvimento e na homeostase da futura formação óssea, aumentando a expressão de Runx2 e ativadoras do fator de transcrição β -catenin, o qual atua na diferenciação osteogênica (Kolf et al., 2007; Fakhry et al., 2013). Esses fatores podem exibir efeitos diferentes e, as vezes, efeitos opostos na modulação do metabolismo celular dependendo do estágio de maturação e do fenótipo celular (Neve et al., 2011). Govoni e colaboradores (2015) relataram que as rotas do processo de diferenciação em equinos é muito semelhante às descritas em outras espécies mais estudadas, como humanos e ratos.

O meio de cultura para promover a diferenciação osteogênica das CTM nos estudos *in vitro*, contém dexametasona, ácido ascórbico e β -glicerofosfato (Chen et al., 2016). Estas substâncias desencadeiam uma cascata de reações transformando as CTM em células com aspecto cubóide osteoblástico, com aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP) e estimulando a síntese e a deposição de cristais de hidroxiapatita na MEC (Bruder et al., 1998).

A dexametasona é um glicocorticóide, essencial para a diferenciação osteogênica. Sua presença permite o controle dos níveis de fosfatase alcalina, o qual permite a síntese de MEC e a expressão de alguns marcadores como o de colágeno tipo I. Ainda não se sabe com precisão sua atuação, porém acredita-se que ela induz os efeitos da transcrição, promovendo a indução de β -catenin, integrina $\alpha 5$, sendo ambos promotores da diferenciação osteoblástica, ativados pelo Runx2. Com relação, ao β -glicerofosfato, ele é hidrolizado pela ALP, sendo fonte crucial de fosfato, o qual formará a matriz mineralizada e permitirá a síntese de proteínas e fosfolípidos. O ácido ascórbico desempenha importante papel como co-fator da hidroxilação dos resíduos da prolina e lisina transformando-os em colágeno, que é a proteína mais abundante na matriz mineralizada (Vater et al., 2011).

A diferenciação osteogênica *in vitro* é dividida em três estágios: o primeiro consiste do dia um ao dia quatro, o qual ocorre aumento do número de células. Este é seguido pela diferenciação que acontecerá entre os dias cinco e 14, caracterizado pela expressão de proteínas e transcrição da ALP. Após este pico dos níveis da ALP, ocorrerá um declínio da mesma. Nesta etapa, também haverá a expressão de colágeno tipo I e a síntese e a mineralização da matriz. O estágio final ocorrerá entre os dias 14 e 28 resultando em alta expressão de osteocalcina e osteopontina, seguida da deposição de cálcio e fosfato (Birmingham et al., 2012).

A adição de fatores de crescimento conjuntamente com o meio de diferenciação osteogênico tem gerado impacto positivo, na maioria dos estudos, no funcionamento e na habilidade de formação da matriz óssea seja no ambiente *in vitro* ou *in vivo* (Govoni, 2016). Dentre estes fatores, a adição da vitamina D ativa Runx2 e Osx em humanos (Maehata et al., 2006), o TGF- β influencia o crescimento celular e desempenha papel essencial no controle da formação óssea pela modulação da síntese e degradação de vários componentes da matriz óssea em ratos (Centrella et al., 1987) e as BMPs que são capazes de induzir a expressão de ALP, colágeno tipo I, osteopontina e sialoproteína óssea em ratos (Cheifetz et al., 1996). Há outras linhas de pesquisa que estudam a adição de hormônios, como a triiodotironina (T3) e os estrógenos, na diferenciação osteogênica, demonstrando seus efeitos e as diferenças com relação as concentrações adicionadas ao meio osteogênico em roedores (Qu et al., 1998; Boeloni et al., 2009).

Na espécie equina há poucos relatos que utilizaram fatores de crescimento com a finalidade de observar melhora na diferenciação osteogênica das CTM. Alguns exemplos são o uso de vitamina C e de plasma rico em plaquetas (PRP) combinados, que demonstraram melhores resultados na expressão de Runx2 e osteonectina aos 14 dias de tratamento (Castro et al., 2014). Seo e colaboradores (2014) testaram em defeitos ósseos induzidos o uso de uma esponja de gelatina de fosfato β -tricalcio associada ou não a CTM e BMP-2 em diferentes concentrações, obtendo melhores resultados quando utilizou-se a associação dos componentes.

1.1.2 Diferenciação condrogênica

A condrogênese é um evento que marca o início do desenvolvimento esquelético com a diferenciação das células tronco em condrócitos (Goldring et al., 2006). Este processo celular ocorre em várias etapas *in vivo*. Primeiramente as CTM recrutadas condensam-se para formar células condroprogenitoras que por sua vez, se diferenciam em condrócitos (Barry et al., 2001; Akiyama, 2008). Este evento é controlado por interações com a matriz circundante, fatores de crescimento, diferenciação e outros fatores ambientais que iniciam ou suprimem as vias de sinalização celular através de fatores de transcrição específicos (Goldring et al., 2005; Hwang et al., 2007).

O desenvolvimento cartilaginoso é controlado por sistemas de padrões de interação envolvendo o FGF, a BMP e as vias de *hedgehog*. Tanto as quinases sinalizadoras positivas

quanto as negativas, fatores de transcrição, como o Sox9 e o Runx2, e as interações entre eles determinam se os condrócitos permanecem como elementos cartilagosos ou sofrem maturação hipertrófica culminando em da ossificação (Goldring et al., 2006).

O processo se dá no início pela condensação de CTMs associada ao aumento da atividade da hialuronidase e ao surgimento das moléculas de adesão celular, a caderina neural (*N-cadherin*) e a molécula de adesão celular neural (*N-CAM*). O TGF- β , que está entre os primeiros sinais na condensação condrogênica, estimula a síntese da fibronectina, que por sua vez regula a *N-CAM* (Barry et al, 2001; Goldring et al., 2006).

As moléculas da MEC interagem com as moléculas de adesão celular para ativar as vias de sinalização intracelular dando início a transição das células condroprogenitoras para a diferenciação em condrócito. A *N-cadherin* e a *N-CAM* desaparecem na diferenciação dos condrócitos e são detectáveis mais tarde apenas nas células pericondriais (Goldring et al., 2006).

O FGF, *hedgehog*, BMP e as vias *Wnt* coordenam a sinalização, sendo esta última uma das primeiras a se manifestar e induzir o *feedback* do FGF (Kolf et al., 2007; Kelly e Jacobs, 2010). As BMPs estabelecem o cenário para a morfogênese óssea iniciando a diferenciação de células condroprogenitoras, mas também regulando os estágios posteriores da maturação de condrócitos e a diferenciação terminal para o fenótipo hipertrófico (Miljkovic et al., 2008). Ao longo da condrogênese, o balanço de sinalização por BMPs e FGFs determina a taxa de proliferação, ajustando assim o ritmo da diferenciação (Goldring et al., 2006).

O fator de transcrição nuclear Sox9, um dos primeiros marcadores expressos em células condroprogenitoras, envolve-se no processo de condensação mesenquimal, proliferação, maturação e produção de matriz pelos condrócitos, principalmente auxiliando na expressão de fatores de transcrição para os colágenos tipo I e tipo II e outras proteínas da matriz condrogênica (Akiyama, 2008; Kelly e Jacobs, 2010).

Após a expansão, a condrogênese *in vitro* é induzida em cultura utilizando meio de cultivo e suplementos como fatores de crescimento cruciais para a diferenciação de CTM. Várias combinações de reagentes têm sido utilizadas. Algumas formulações compreendem apenas o meio combinado com dexametasona e TGF- β , enquanto outros são formadas por um meio mais complexo com alto teor de glucose suplementado com dexametasona, piruvato de sódio

ascórbico-2 fosfato, prolina, insulina-transferrina-selenium -Premix e L-glutamina (Miljkovic et al., 2008; Pelttari et al., 2008; Vater et al., 2011).

Estes estímulos resultam no aparecimento de um fenótipo tipo condrócito caracterizado pela regulação positiva de moléculas específicas de cartilagem como o tipo de colágeno II e IX, *agrecan*, *versican*, *biglycan* e *decorin* (Pelttari et al., 2008). Além desses fatores, um dos principais requisitos envolvidos no aumento da diferenciação condrogênica são o estreito contato célula-a-célula, geralmente atingido por cultura de *pellets* de células (Chamberlain et al., 2007).

No meio de cultura para a diferenciação condrogênica das CTM, a dexametasona é mediada pelo receptor glicocorticóide citoplasmático, que influencia vários processos de diferenciação por induzir ações de fatores de transcrição, sendo o mais importante na diferenciação condrogênica o Sox9 (Heng et al., 2004). O ácido ascórbico causa a hidroxilação de colágeno via modificação dos resíduos de prolina e lisina. Sua adição ao meio de cultura leva ao aumento da proliferação de CTM e aumenta a produção de colágeno tipo II, que é uma das mais importantes proteínas da MEC na cartilagem (Vater et al., 2011). O TGF- β aumenta a expressão de colágeno tipo II, IX e X, *agrecan*, *versican* e *decorin*, através da transmissão de sinais intracelulares pelas proteínas *Smad*, as quais são componentes dos complexos de transcrição (Miazono, 2000). As BMPs desempenham papel importante durante a morfogênese, iniciando a diferenciação de células condroprogenitoras (Vater et al., 2011). O IGF estimula a proliferação de CTM, regula a apoptose celular, induz a expressão de marcadores de condrócitos, aumenta a síntese de proteínas da matriz, incluindo colágeno tipo II e proteoglicanos, e promove a sobrevivência, o desenvolvimento e a maturação dos condrócitos (Boeuf e Richter, 2010; Vater et al., 2011).

Fatores hormonais também podem influenciar a diferenciação condrogênica, como visto na osteogênica, porém poucas pesquisas tem sido desenvolvidas neste campo. A adição de paratormônio (PTH) em CTM de humanos demonstrou ter efeito inibitório nas fases iniciais da diferenciação condrogênica pela baixa regulação de ALP e expressão de colágeno tipo I e II (Weiss et al, 2010), assim como a presença de estradiol que suprimiu a condrogênese (Jenei-Lanzl et al., 2010). Contudo no estudo desenvolvido por Assis et al. (2018), baixas concentrações de T3 aumentam a síntese de matriz condrogênica, a expressão de Sox9 e de colágeno tipo II em culturas de CTM de ratos.

1.2 Hormônios Tireoidianos

Os hormônios tiroideanos (HT) são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de vários tecidos e órgãos (Yen, 2001). A fonte dos HT é a tireóide que secreta predominantemente a tiroxina (T4) a qual, após passar por um processo de desiodação, se transforma em triiodotironina, sendo que esta apresenta atividade biológica cinco vezes superior a da T4 (Nunes, 2003; Basset e Williams, 2016).

A síntese e a secreção dos HT são primariamente reguladas por um sistema de *feedback* negativo que envolve o hipotálamo, a hipófise e a tireoide (Yen, 2001). O hormônio liberador de tirotrófina (TRH) é produzido no hipotálamo. Pelo sistema hipotálamo-hipofisário, o TRH é transportado para a adeno-hipófise, ligando-se em receptores específicos onde induz a síntese e a secreção de hormônio tireotrófico (TSH), o qual interage com receptores na membrana da célula folicular tiroideana, levando a expressão de proteínas que sintetizam os HT (Nunes, 2003; Murphy e Williams, 2004).

Os HT desencadeiam efeitos biológicos marcantes em vários sistemas, elevando suas atividades, de forma geral, pelo aumento da expressão e ativação de enzimas do metabolismo oxidativo, pelo transporte iônico, atuando de forma ativa no eixo de ação do IGF-I e como modificador da expressão de genes específicos, além de outras ações não genômicas (Yen, 2001; Nunes, 2003).

Os HT são importantes no desenvolvimento e manutenção dos tecidos ósseos e cartilagosos, influenciando o crescimento e a diferenciação celular. Com relação aos mecanismos de ação, os hormônios tireoidianos regulam várias vias de sinalização de fatores de crescimento, incluindo o IGF-I, o FGF, o *hedgehog* e o *Wnt*, os quais influenciam o crescimento e o desenvolvimento esquelético (Kim e Mohan, 2013; Basset e Williams, 2016).

Os HT se ligam a receptores nucleares TR α e TR β , presentes na maioria das células, inclusive nas CTMs e nas linhagens osteoblásticas e condroblásticas, sendo sua presença comprovada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Basset e Williams, 2016). Quando ocorre a ligação na membrana, os HT, principalmente a T3, funcionam como fatores de transcrição que desencadeiam várias ações celulares (Harvey et al., 2002; Mello e Tuan 2006).

A triiodotironina desencadeia, por mecanismos complexos que envolvem inúmeros fatores autócrinos e parácrinos, ações fundamentais nos processos de proliferação e diferenciação dos

osteoblastos (Williams, 2013). Sua ação induz a expressão de osteocalcina, de prolina e de colágeno tipo I e III; estimula a atividade dos osteoblastos, aumentando os níveis de ALP na MEC (Banovac e Koren, 2000); auxilia na ação do IGF-I e das metaloproteinases (MMP), aumentando suas expressões nos osteoblastos, que sintetizarão a matriz óssea (Lakatos et al., 1993); além de colaborar com a produção de citocinas (Vargas et al., 1997; Yen, 2001; Harvey et al., 2002; Murphy e Williams, 2004).

Com relação às CTMs, para que haja a diferenciação na linhagem osteoblástica, é necessária a indução dos fatores Runx2 e Ost (Basset e Williams, 2016). A diferenciação subsequente é regulada por várias vias de sinalização, sendo uma delas acionada pela ação da T3 (Williams, 2013). Embora as CTMs e as células da linhagem osteoblástica respondam aos estímulos *in vitro* da adição de T3 no meio de cultura, a ação pode variar dependendo do local de coleta, como demonstrado por Milne et al. (1998) que comparou culturas de células da medula óssea do fêmur e das vértebras de ratos; com o estágio de diferenciação celular, havendo diferença quando comparada a resposta ao hormônio em células osteoprogenitoras e osteoblásticas maduras de ratos (Ohishi et al., 1994); e com a dose e duração do tratamento hormonal como observado por Boeloni et al. (2009) que utilizou culturas de CTM de ratos administrando quatro concentrações da T3 (1, 10, 10^3 ou 10^5 pM) em três períodos (sete, 14 e 21 dias) distintos, constatando ação estimuladora, inibitória ou nula sobre a diferenciação osteogênica.

A ação da T3 nas linhagens condrogênicas é semelhante a que ocorre com as linhagens osteogênicas. Os receptores TR α 1 e TR β 1 são expressos em condrócitos em repouso e em proliferação na placa de crescimento, sugerindo que essas células são alvos diretos das ações da T3 (Kim e Mohan, 2013). A T3 regula a proliferação, a organização de colunas de condrócitos, promove a diferenciação terminal hipertrófica e induz a calcificação da matriz cartilaginosa (Harvey et al., 2002). O início da condrogênese requer a sinalização da BMP e do fator de transcrição Sox9. O *hedgehog* age estimulando a expansão clonal das condrócitos, contudo também atua aumentando a sinalização para os hormônios tireoidianos, que inibem a proliferação subsequente, enquanto estimulam a diferenciação hipertrófica (Kim, 2013; Basset e Williams, 2016). A T3 estimula a síntese e a produção de proteoglicanos da matriz cartilaginosa da placa de crescimento, de ALP e a expressão de colágeno X (Harvey et al., 2002; Karl et al., 2014). Porém assim como ocorre na diferenciação osteogênica *in vitro*, na condrogênese, a ação da T3 também varia conforme a espécie, o grau de confluência celular,

o estágio de diferenciação celular, o número de passagens e a concentração e duração do tratamento (Basset e Williams, 2016; Assis et al., 2017).

1.3 Uso de Células Tronco em doenças osteoarticulares

Os equinos são uma das espécies mais utilizadas pelo homem nas competições de esporte. Por serem animais submetidos a grande exigência de sua performance atlética, estão mais predispostos à lesões musculoesqueléticas, muitas vezes, de difícil tratamento e com alto risco de recidivas (Johnson et al., 1994; Frisbie e Smith, 2010). A osteoartrite (OA) é uma das lesões degenerativas mais comuns na espécie equina e que pode se associar a outras injúrias como a síndrome do navicular, periostite, osteocondroses e laminite, levando à redução ou parada da função atlética e à perdas econômicas substanciais (Borjesson e Peroni, 2011; Broeckx et al., 2014; Souza, 2016). A estrutura muscular avantajada e a capacidade atlética dos cavalos podem criar forças biomecânicas notavelmente elevadas dentro das articulações o que pode resultar na destruição irreversível da cartilagem articular, membrana sinovial, cápsula articular, ligamentos de suporte e na formação de osteófitos e esclerose do osso subcondral (Bolam et al., 2004; Ardanaz et al., 2016).

Estas alterações osteocartilaginosas acometem várias espécies, com etiologias distintas entre elas em alguns casos, porém com componentes da fisiopatologia comuns a todas (Burk et al., 2013a). A espécie equina é um dos modelos experimentais mais bem aceitos para entender os mecanismos deste tipo de injúria no homem, pois possuem alguns componentes morfológicos semelhantes ao dos humanos, como a espessura de cartilagem das articulações, além de apresentarem corriqueiramente este tipo de afecção, sem ser necessário a indução para realizar investigações dos mecanismos (Carmona e Prades, 2009; Burk et al., 2013a).

A regeneração da cartilagem articular apresenta desafios únicos devido à sua pouca vascularização e inervação, levando a uma capacidade de cura intrínseca lenta e, na maioria das vezes, ineficiente. O tecido produzido através dos processos de reparo consiste tipicamente em tecido cicatricial ou fibrocartilaginoso que não possui as propriedades mecânicas necessárias para resistir aos esforços fisiológicos (Borjesson e Peroni, 2009; Watts, 2014). Embora o evento inicial nem sempre seja claramente definido, fatores bioquímicos, genéticos, relacionados à idade, dinâmica hormonal, metabolismo, neurologia e biomecânica podem contribuir para a progressão da doença (Bolam et al., 2006).

Uma das características deste tipo de lesão é a inflamação intensa que desempenha um importante papel na progressão da doença, pois a secreção de mediadores pró-inflamatórios acelera a degradação da cartilagem (Ribitsch et al., 2010; Barrachina et al., 2017). Acredita-se que a lesão primária inicia com a lesão óssea, ocorrendo microfraturas que levam à esclerose do osso subcondral e ao aumento das tensões na cartilagem articular, culminando em danos cíclicos e reparo ineficaz, o qual resulta em estado progressivamente mais catabólico no qual resultará a osteoartrite (Bolam et al., 2006).

A cascata de eventos mecânicos e bioquímicos é mediada por citocinas, enzimas proteolíticas e outras substâncias pró-inflamatórias (Carmona e Prades, 2009). A interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral α (TNF- α) promovem quimiotaxia e degranulação de leucócitos, aumentam a expressão de mediadores pró-inflamatórios adicionais, incluindo prostaglandina E2 (PGE2), leucotrieno B4 (LTB4), bradicinina e óxido nítrico e aumentam a atividade de várias enzimas proteolíticas que degradam a cartilagem articular, principalmente as metaloproteinases da matriz (MMPs), causando estresses mecânicos e oxidativos, envelhecimento e/ou apoptose de condrócitos (Noth et al., 2008; Carmona e Prades, 2009). Nas CTM, essas citocinas inibem a expressão do fator de transcrição de diferenciação osteoblástica e condroblástica, Runx2 e Sox9, e reduz a atividade da ALP (Barrachina et al., 2017). Neste processo, ocorre um desequilíbrio entre os peptídeos que promovem a síntese de componentes da MEC da cartilagem articular e aqueles que induzem a remodelação desses componentes, por exemplo o TGF- β e os fatores de crescimento semelhantes à insulina (Carmona e Prades, 2009). Apesar dos esforços consideráveis realizados no desenvolvimento de inibidores dessas moléculas para uso no tratamento da OA, o sucesso clínico em relação à prevenção da degradação da matriz cartilaginosa ou da restauração da cartilagem na OA ainda não foi alcançado (Noth et al., 2008).

Os tratamentos convencionais se concentram em aliviar a inflamação e controlar a dor, com o uso de drogas analgésicas, glucosaminas, sulfato de condroitina e ácido hialurônico (Ardanaz et al., 2016). Quando se detecta severa degeneração, abordagens cirúrgicas (curetagem, remoção de osteófitos e artrodese) são realizadas, porém estas também visam apenas aliviar os sintomas e a recuperação clínica, sem induzir a regeneração real da articulação afetada (Broeckz et al., 2014; Grassel e Lorenz, 2014).

As terapias com CTMs tem ganhado impulso como tratamento de escolha para muitas lesões ortopédicas em equinos, não apenas por sua capacidade de diferenciação mas também por

suas propriedades tróficas e imunomoduladoras, que possibilitam um tipo de terapia com caráter regenerativo, prevenindo a formação de cicatrizes (Borjesson e Peroni, 2011; Ardanaz et al., 2016; Barrachina et al., 2017). O objetivo deste tipo de terapia é restaurar a arquitetura estrutural normal e a função biomecânica do tecido lesionado (Frisbie et al., 2007).

As CTMs possuem imunofenótipos, fatores tróficos bioativos e mediadores inflamatórios que atuam na inibição da formação de cicatriz, inibem a apoptose, aumentam a angiogênese e estimulam as células progenitoras intrínsecas a restaurar a função local (Noth et al, 2008; Watts, 2014). Imunologicamente, elas interagem com outras células, como linfócitos T e B, células *natural killer* e células dendríticas (Borjesson e Peroni, 2011); têm afinidade pelo tecido articular danificado e estudos *in vivo* na espécie equina confirmaram a sua capacidade de localizar e participar do reparo de estruturas articulares danificadas, incluindo ligamentos cruzados, lesões de meniscos e cartilagem (Noth et al., 2008; Frisbie e Smith 2010).

O desenvolvimento contínuo de estratégias de engenharia de tecidos procurou combinar células tronco com vários suportes e fatores de estimulação condrogênicos para produzir um tecido funcional que poderia ser usado para reparar defeitos na cartilagem (Diekman e Guilak, 2013; Watts, 2014). O uso de células *in vitro* podem ser melhoradas pelo uso de *scaffolds*, fatores de crescimento solúveis, ácidos nucleicos ou estimulação mecânica (Ribitsch et al., 2010; Grassel e Lorenz, 2014). Contudo, é necessário o entendimento da dinâmica destes suplementos e de seus usos combinados com as terapias celulares, pois tais abordagens são complexas dentro das perspectivas biológicas, médicas e regulatórias, sendo desafiador ainda no atual contexto o reparo das lesões osteocartilaginosas (Wilke et al., 2007; Noth et al., 2008).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Infra-estrutura e animais

O projeto utilizou as bases físicas e a infra-estrutura do Núcleo de Células Tronco e Terapia Celular Animal (NCT-TCA) do Complexo de Pesquisa Avançada do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias e da Clínica de Equinos do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O projeto foi aprovado pela

Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (protocolo 362/17 do CEUA/UFMG) (Anexo 6.1).

Para a extração das CTM-TA foram utilizados quatro equinos jovens e saudáveis, sem raça definida, com média de idade de $2,4 \pm 1,08$ anos, sendo dois machos e duas fêmeas, com peso médio de $277,5 \pm 44,93$ Kg.

2.2 Coleta do tecido adiposo subcutâneo

Para a coleta do tecido adiposo subcutâneo, os animais permaneceram em baias por 12 horas, sem acesso a comida e com água *ad libitum*. Foi realizada a aplicação de 10.000UI de soro antitetânico intramuscular por animal. Após este período, foram realizadas sedação com cloridrato de detomidina (2ug/Kg i.v.) e anestesia local na região do músculo glúteo dorsal com lidocaína 2%, procedendo a técnica de L invertido, mantendo-os em tronco de contenção (Carvalho et al., 2009). Foram realizadas tricotomia (20cm x 20cm) e antissepsia adequadas da pele sob o músculo glúteo dorsal, na base da cauda do lado direito. Realizou-se incisão de aproximadamente 10cm de comprimento, 15cm paralela à coluna vertebral, com lâmina de bisturi nº11 (Carvalho et al., 2009). Após a dissecação da pele e do subcutâneo, foram coletados aproximadamente 5g de gordura que foram transferidos para tubo Falcon estéril contendo 50mL de DMEM com baixa glicose (Gibco, USA) enriquecido com antibiótico e antimicótico (Figura 1). A pele foi suturada com fio de nylon 2/0 em ponto simples separado e foi realizado curativo com solução de clorexidina a 0,02%, seguida do uso diário de *spray* repelente, até a remoção dos pontos com 10 dias. Sistemicamente, foi administrada fenilbutazona (4,4 mg/kg i.v.), por três dias.



Figura 1. Procedimento cirúrgico de coleta de tecido adiposo subcutâneo de equinos. (A) tricotomia da região do músculo glúteo dorsal, (B) anestesia local em L invertido, (C) incisão e coleta do tecido adiposo, (D) fragmento do tecido adiposo em meio de cultura com *DMEM* para transporte até o laboratório.

2.3 Isolamento e expansão das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em meio indiferenciado

Imediatamente após a coleta, as amostras de cada animal foram transferidas para a capela de fluxo laminar onde o tecido adiposo foi fragmentado e incubado com colagenase I 0,15% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em solução tampão fosfato (PBS) 0,15M por 60 minutos a 37°C e 5% de CO₂, agitando a cada 15 minutos (Figura 2). O conteúdo foi centrifugado por 10 minutos a 1400g, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em DMEM com baixa glicose, acrescido de gentamicina (60µg/L), penicilina (100U/mL), estreptomicina (100µg/L), anfotericina (25µg/L) e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células de cada animal foram colocadas, separadamente, em garrafas T75 e cultivadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado a cada dois dias até

confluência de 80-90%, momento em que as células de dois animais foram tripsinizadas e misturadas formando um *pool* de células para a realização do experimento 1 e as células dos outros dois animais para a realização do experimento 2 (Alves et al., 2014; Alipour et al., 2016).

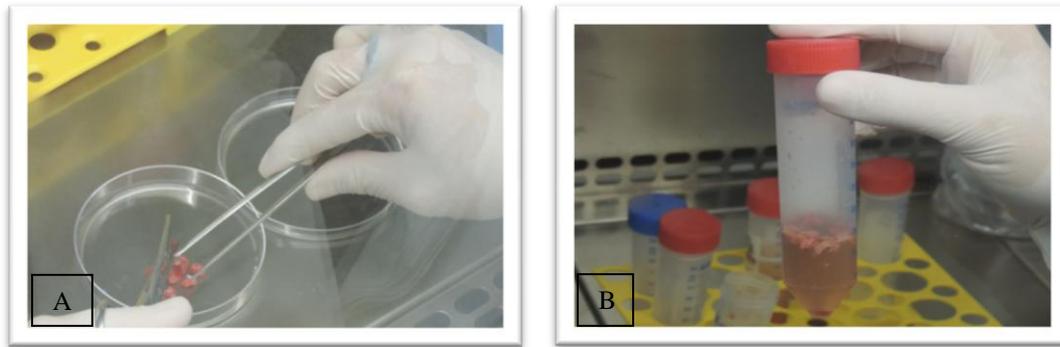


Figura 2. Preparo do tecido adiposo de equino para isolamento e expansão das células tronco mesenquimais. (A) fragmentação do tecido adiposo e (B) digestão do tecido adiposo em colagenase I 0,15%.

2.4 Experimento 1: Cultivo das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em meio de diferenciação osteogênica com e sem adição de triiodotironina

Após o cultivo inicial do *pool* de células em meio indiferenciado e quatro passagens, as células aderidas foram tripsinizadas, contadas e distribuídas em placas de 24 poços (1×10^4 células/poço). O meio básico foi substituído por meio osteogênico, que consistia em DMEM baixa glicose acrescido de gentamicina (60 μ g/L), penicilina (100U/mL), estreptomina (100 μ g/L), anfotericina (25 μ g/L), 10% de SFB e enriquecido com ácido ascórbico (0,2mM), β -glicerofosfato (10mM) e dexametasona (0,1 μ M). Após a adição do meio osteogênico, foram constituídos três grupos experimentais com adição de diferentes concentrações de 3,3',5-triiodo-L-thironina (T3) (Sigma-Aldrich): 1) grupo diferenciado (controle), 2) grupo diferenciado com adição de 0,01nM de T3 e 3) grupo diferenciado com adição de 1000 nM de T3. As concentrações de T3 foram determinadas conforme estudos realizados por Boeloni et al. 2009 e Assis et al. 2018. Os meios foram trocados a cada dois dias e as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, por sete, 14 e 21 dias para realização dos testes de conversão de MTT em formazan, atividade de fosfatase alcalina e análise da densidade celular. A análise da matriz mineralizada foi realizada aos 14 e 21 dias de diferenciação.

2.4.1 Redução do MTT em formazan

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes concentrações de T3. Ao final de sete, 14 e 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_2 . 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_2 . Posteriormente, 100 μL /poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595 nm (Reis et al., 2017). Foram determinados média e desvio padrão para cada grupo experimental. O teste foi realizado em seis repetições.

2.4.2 Atividade da fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes concentrações de T3. Ao final dos períodos experimentais, as culturas foram submetidas ao teste de atividade de fosfatase alcalina. 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_2 por 2 horas. Em seguida, 100 μL /poço foram transferidos para placas de 96 poços e o produto foi analisado a 595 nm (Alves et al., 2014). Foram determinados média e desvio padrão para cada grupo experimental. O teste foi realizado em seis repetições.

2.4.3 Densidade celular (porcentagem de células/campo)

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com lamínulas estéreis durante sete, 14 e 21 dias. Ao término, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 24 horas e coradas pela hematoxilina-eosina. A densidade celular foi quantificada em 8 campos na objetiva de 10x com auxílio de uma grátula de 121 pontos (Reis et al., 2017). Foram determinados média e desvio padrão para cada grupo experimental. O teste foi realizado em seis repetições.

2.4.4 Porcentagem de matriz mineralizada

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com lamínulas estéreis durante 14 e 21 dias. Ao término, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas em solução de paraformaldeído 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 (100W) 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. A porcentagem de matriz mineralizada foi quantificada em 8 campos na objetiva de 10x com auxílio de uma gráticula com 121 pontos (Reis et al., 2017). Foram determinados média e desvio padrão para cada grupo experimental. O teste foi realizado em seis repetições.

2.5 Experimento 2: Cultivo das células tronco mesenquimais do tecido adiposo em meio de diferenciação condrogênica com e sem adição de triiodotironina

Após o cultivo inicial do *pool* de células em meio indiferenciado e quatro passagens as células aderidas foram tripsinizadas, contadas e distribuídas em placas de 24 poços (1×10^4 células/poço). O meio básico foi substituído por meio condrogênico constituído de DMEM baixa glicose, 1% de SFB, 0,0125g/100mL de BSA (albumina de soro bovino), (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1 μ L/100mL da solução de Piruvato de Sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 65 μ L/100mL de Tansferrina (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10 μ L/100mL de dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e 200 μ L/100mL de insulina.

Após a adição do meio condrogênico, foram constituídos três grupos experimentais com adição de diferentes concentrações de 3,3',5-triiodo-L-thironina (T3) (Sigma-Aldrich): 1) grupo diferenciado (controle), 2) grupo diferenciado com adição de 0,01nM de T3 e 3) grupo diferenciado com adição de 1000 nM de T3. As concentrações de T3 foram determinadas conforme estudos realizados por Alves et al., 2014; Assis et al., 2017. Os meios foram trocados a cada dois dias e as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% CO₂, por sete, 14 e 21 dias para realização dos testes de função mitocondrial pelo MTT e atividade de fosfatase alcalina (Reis et al., 2017). As análises da densidade celular e da porcentagem de matriz PAS positivas foram realizadas aos sete e 14 dias de diferenciação.

2.5.1 Redução do MTT em formazan

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com meio condrogênico, acrescido ou não de diferentes concentrações de T3. Ao final de sete, 14 e 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 conforme descrito no experimento 1 (Reis et al., 2017).

2.5.2 Atividade da fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com meio condrogênico, acrescido ou não de diferentes concentrações de T3. Ao final de sete, 14 e 21 dias de diferenciação, as culturas foram submetidas ao ensaio de BCIP/NBT conforme descrito no experimento 1 (Reis et al., 2017).

2.5.3 Porcentagem de células/campo e de matriz PAS+

Para cada grupo experimental, foram cultivadas 1×10^4 CTM-TA por poço em placas de 24 poços com lamínulas estéreis durante sete e 14 dias. Ao término, as lamínulas foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas em paraformaldeído a 4%. As células foram avaliadas quanto à morfologia e quanto à formação de matriz condrogênica (glicosaminoglicanos) PAS positiva. Foram determinados a porcentagem de matriz condrogênica PAS positiva e o número de células/campo em seis campos, utilizando objetiva de 10x com auxílio de uma gráticula de 121 pontos (Assis et al., 2017). Foram determinados media e desvio padrão para cada grupo experimental. O teste foi realizado em seis repetições.

2.6. Análise estatística

O delineamento utilizado foi o inteiramente casualizado. Foi feita a análise de variância (ANOVA), determinando para cada variável a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK), considerando diferenças significativas para $p \leq 0,05$ (Sampaio, 2015).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterização das CTM- TA

Antes mesmo da adição da T3, durante o cultivo e a expansão das CTM-TA dos equinos foi observado que as células apresentavam aderência plástica logo nas 24 horas após a colheita e

nas primeiras 48 horas, as células aderentes indiferenciadas já começavam a apresentar um fenótipo semelhante a fibroblasto (Figura 3A). Após o terceiro repique, as células em meio osteogênico e condrogênico apresentaram morfologia mais cuboidal envoltas por matriz. Aos 21 dias de cultura em meio osteogênico, era possível evidenciar grandes nódulos de mineralização corados de negro pela técnica de Von Kossa (Figura 3B) e aos 14 dias de cultivo em meio condrogênico, a matriz condrogênica era fortemente positiva pela coloração de PAS (Figura 3C).

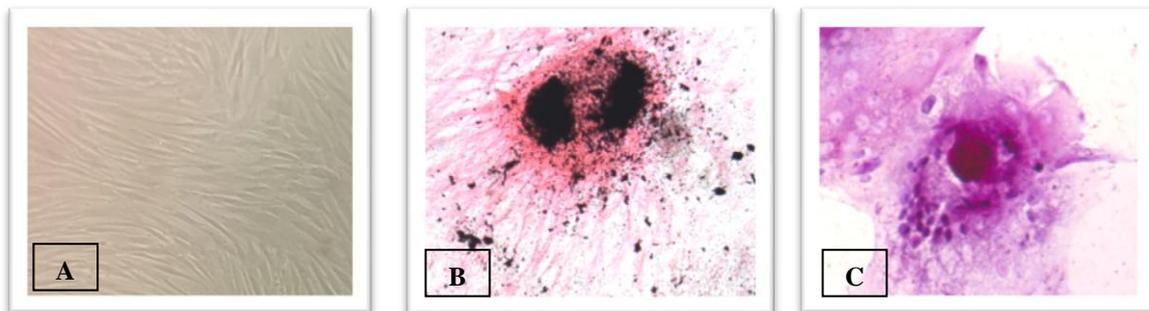


Figura 3. Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos. (A) CTM-TA indiferenciadas com fenótipo semelhante a fibroblasto (25x). (B) CTM-TA em meio de diferenciação osteogênica aos 21 dias, com formação de nódulos mineralizados enegrecidos (Von kossa, 12,5x). (C) CTM-TA em meio de diferenciação condrogênico aos 14 dias, com matriz condrogênica fortemente PAS+ (PAS, 12,5x).

3.2 Experimento 1

3.2.1 Redução de MTT em formazan

Aos sete dias, a redução do MTT em formazan não diferiu significativamente entre grupos. No entanto, aos 14 dias, as CTM-TA tratadas com 0,01nM de T3 apresentaram aumento significativo da conversão do MTT em formazan, em comparação ao controle e ao grupo tratado com 1000nM de T3 ($p \leq 0,05$). Aos 21 dias, a maior concentração de T3 (1000nM) reduziu significativamente a conversão do MTT em formazan, em comparação aos demais grupos ($p \leq 0,05$) e não houve diferença significativa entre o controle e o tratado com 0,01nM de T3 (figura 4).

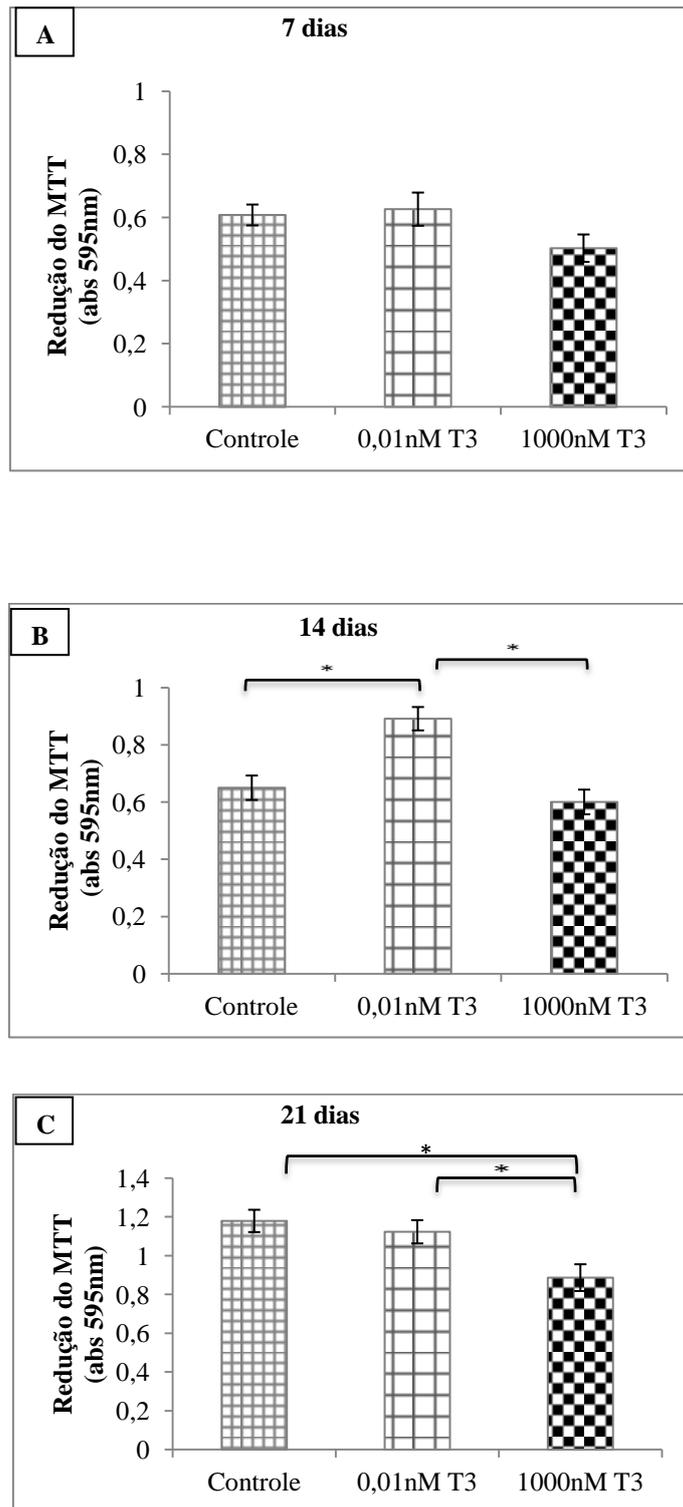


Figura 4. Redução de MTT em cristais de Formazan (média \pm desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. * $p \leq 0,05$

3.2.2 Atividade da fosfatase alcalina

Aos sete dias, a atividade da fosfatase alcalina não diferiu significativamente entre grupos. Aos 14 dias, os grupos tratados com as duas concentrações de T3 apresentaram aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina em comparação ao controle ($p \leq 0,05$). No entanto, aos 21 dias, somente o grupo tratado com a menor concentração de T3 (0,01nM) apresentou aumento significativo da atividade da fosfatase alcalina em comparação ao controle e ao tratado com 1000nM de T3 ($p \leq 0,05$) (Figura 5).

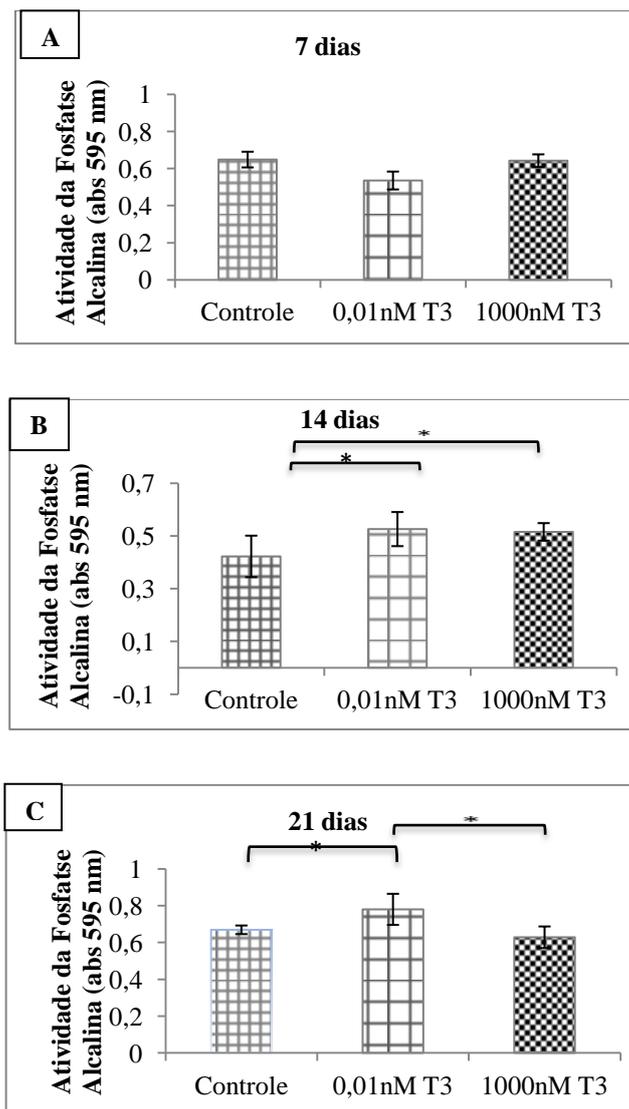


Figura 5. Atividade da fosfatase alcalina (média \pm desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. * $p \leq 0,05$

3.2.3 Densidade celular (porcentagem de células/campo)

Aos sete dias, a densidade celular não diferiu significativamente entre grupos (Figura 7). No entanto, redução significativa da porcentagem de células/campo foi observada aos 14 dias no grupo tratado com 0,01nM de T3 e aos 21 dias no grupo tratado com 1000nM, em comparação ao controle ($p \leq 0,05$) (Figura 6).

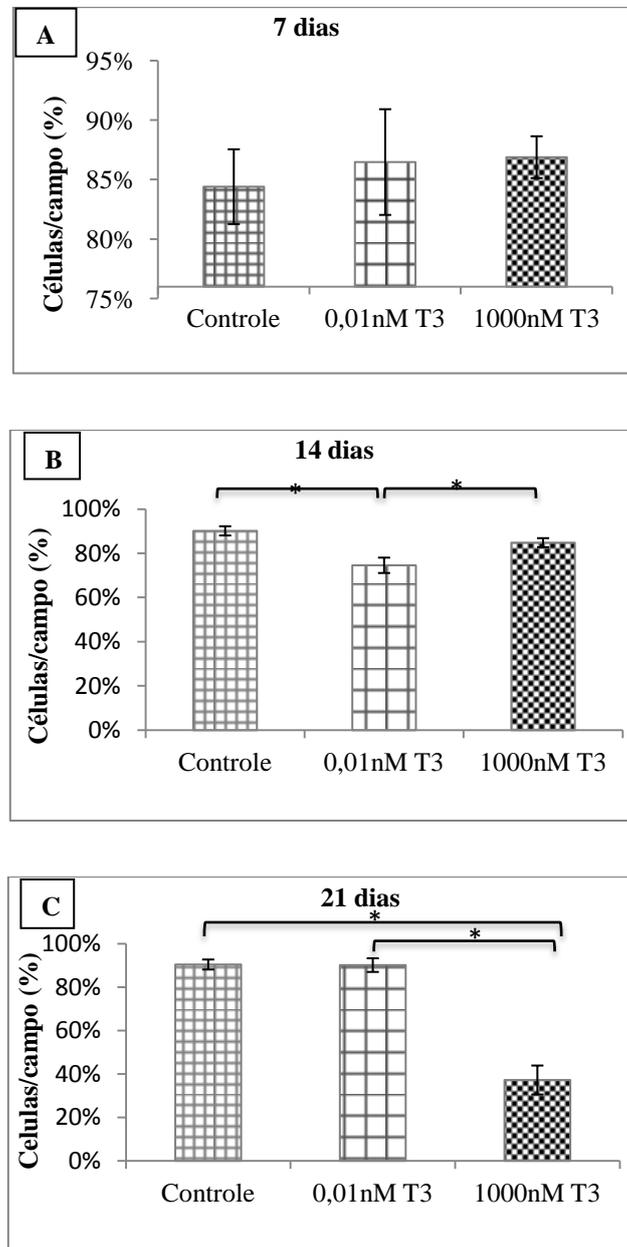


Figura 6. Porcentagem de células/campo em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. * $p \leq 0,05$

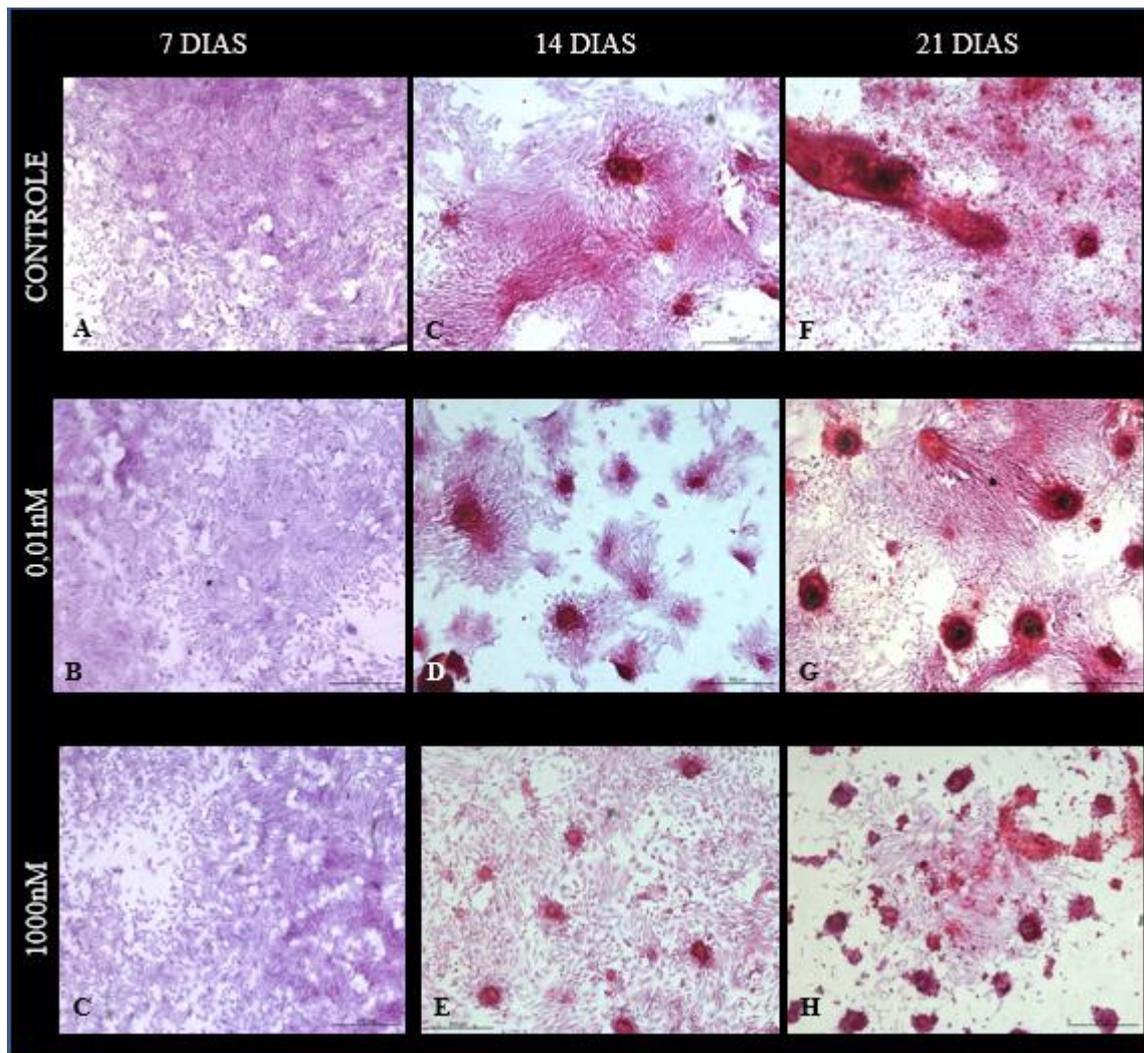


Figura 7. Fotomicroscopia das culturas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos (Hematoxilina-eosina, Bar=500 μ m). Aos sete dias, os grupos controle (A), tratado com 0,01nM de T3 (B) e tratado com 1000nM de T3 (C) apresentam porcentagem de células/campo semelhante. Aos 14 dias, o grupo 0,01nM (E) apresenta menor densidade celular em comparação aos grupos controle (D) e tratado com 1000Nm de T3 (F). Aos 21 dias, o grupo tratado com 1000nM de T3 (I) apresenta menor densidade celular em comparação aos grupos controle (G) e tratado com 0,01nM de T3.

3.2.4 Porcentagem de matriz mineralizada

Aos 14 dias, o grupo tratado com 0,01nM de T3 apresentou redução significativa da porcentagem de matriz mineralizada, em comparação ao controle ($p \leq 0,05$). Aos 21 dias, embora menor no grupo tratado com 0,01nM de T3, a porcentagem de matriz mineralizada (figura 9) não diferiu significativamente entre grupos (figura 8).

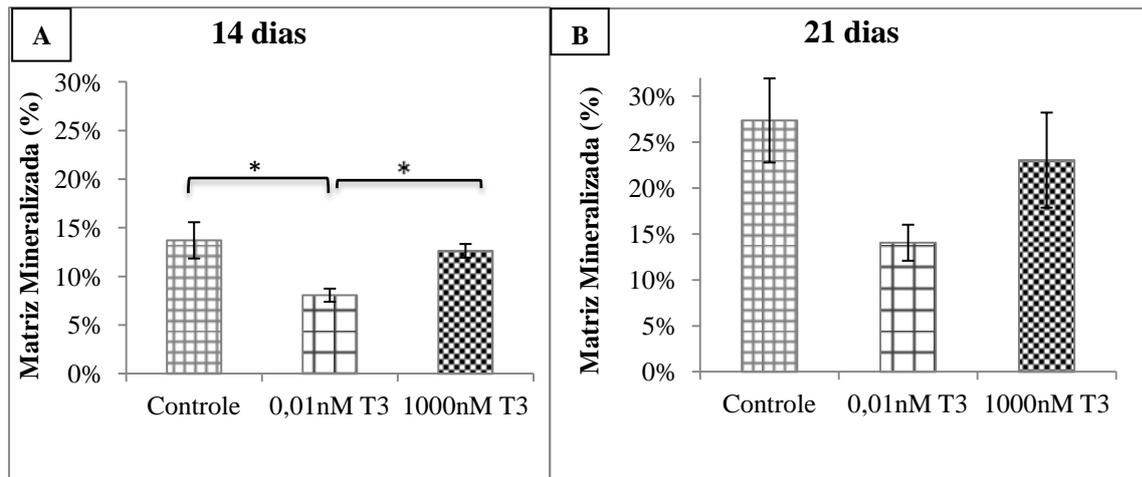


Figura 8. Porcentagem de matriz mineralizada/campo (média \pm desvio padrão) coradas pela técnica de Von Kossa, em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação osteogênico aos 14 (A) e 21 (B) dias. * $p \leq 0,05$

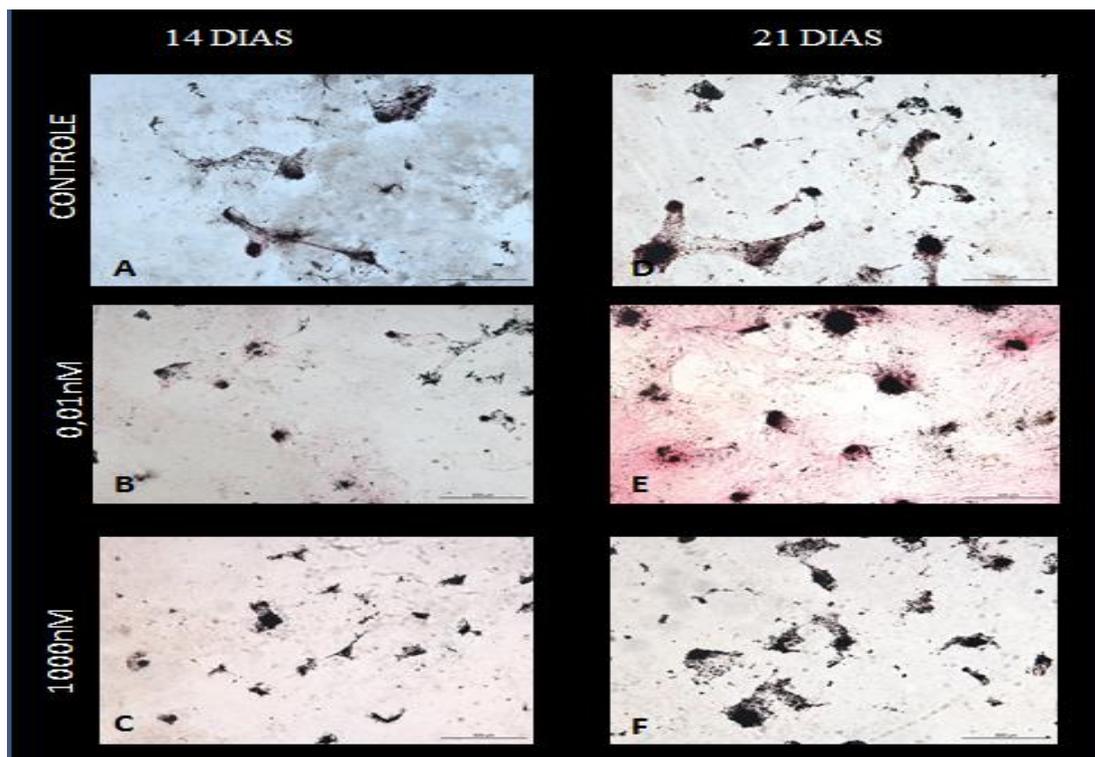


Figura 9. Fotomicroscopia das culturas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos com nódulos de mineralização corados de preto (Von kossa, Bar=500 μ m). Aos 14 dias, (A) grupo controle, (B) tratado com 0,01nM de T3 e (C) tratado com 1000nM de T3, com menor quantidade de nódulos no grupo tratado com 0,01nM de T3. Aos 21 dias, (D) grupo controle, (E) tratado com 0,01nM de T3 e (F) tratado com 1000nM de T3 com quantidade semelhante de nódulos de mineralização.

3.3 Experimento 2

3.3.1 Redução de MTT em formazan

Aos sete dias, a redução do MTT em formazan não diferiu significativamente entre grupos. No entanto, aos 14 dias, o grupo tratado com 0,01nM de T3 apresentou aumento significativo da conversão do MTT em formazan, em comparação ao controle e ao tratado com 1000nM de T3 ($p \leq 0,05$) (figura 10).

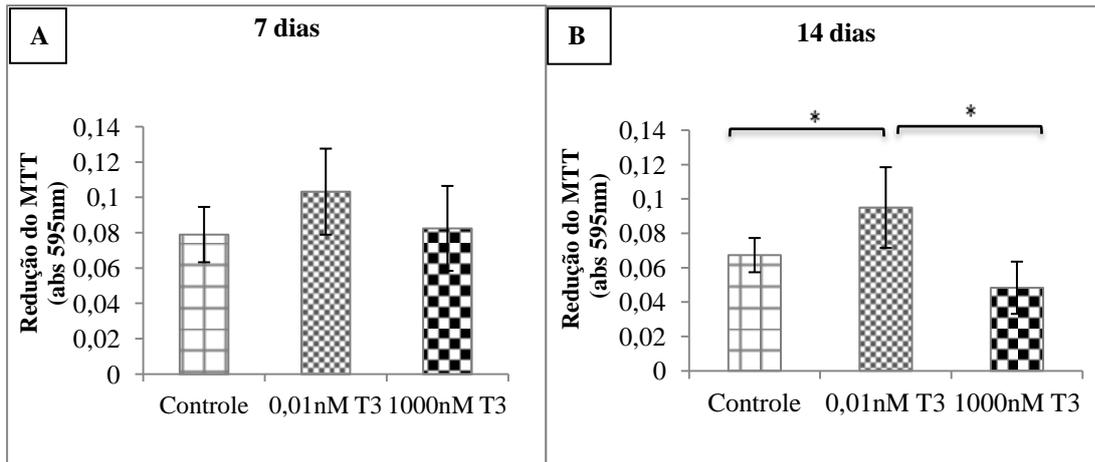


Figura 10. Redução de MTT em cristais de Formazan (média \pm desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$

3.3.2 Atividade da fosfatase Alcalina

Aos sete dias, não houve diferença significativa entre os grupos tratados com relação à atividade da fosfatase alcalina. No entanto, aos 14 dias, o grupo tratado com 1000nM de T3 apresentou redução significativa da atividade da fosfatase alcalina em comparação ao controle e ao tratado com 0,01nM de T3 ($p \leq 0,05$) (figura 11).

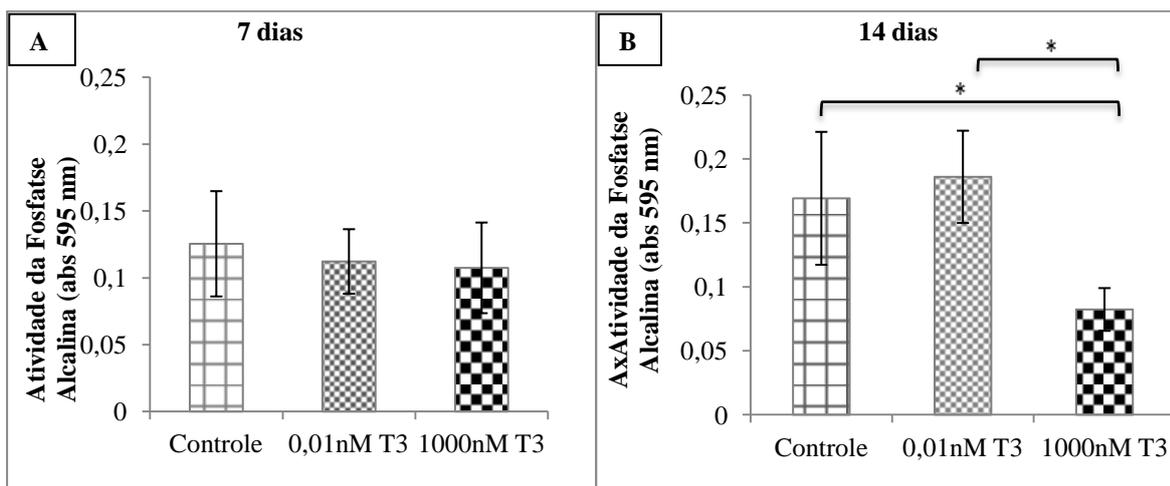


Figura 11. Atividade da fosfatase alcalina (média \pm desvio padrão) em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$

3.3.3 Porcentagem de células/campo e de matriz PAS+

Aos sete dias, os grupos tratados com as duas concentrações de T3 (0,01nM e 1000nM) apresentaram aumento significativo da densidade celular caracterizada pelo aumento da porcentagem de células/campo, em comparação ao controle ($p \leq 0,05$). No entanto, aos 14 dias, a densidade celular não diferiu significativamente entre grupos (figura 12).

Embora aos sete dias a porcentagem de matriz condrogênica PAS+ não tenha diferido significativamente entre grupos, aos 14 dias, o grupo tratado com 1000nM de T3 apresentou porcentagem de matriz PAS+ significativamente inferior em comparação ao controle (Figura 14). Entre os grupos controle e o tratado com 0,01nM de T3 não houve diferença significativa (figura 13).

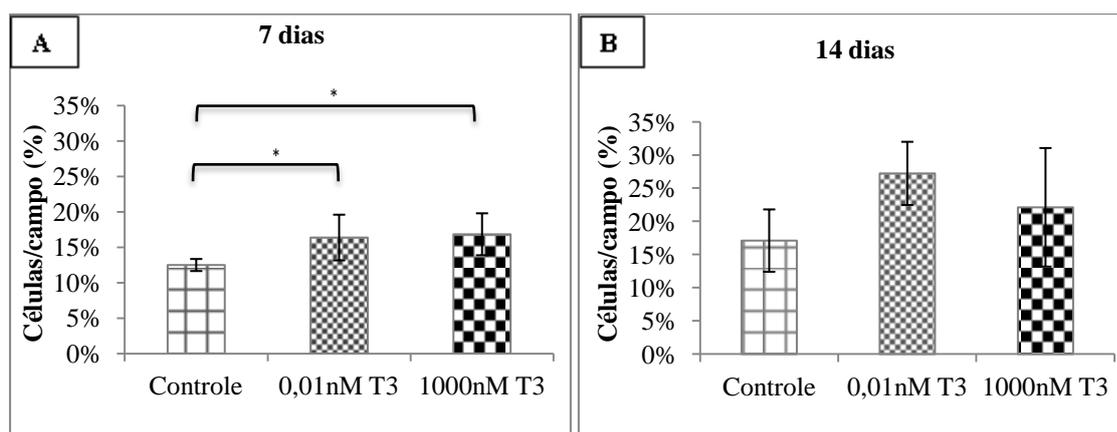


Figura 12. Porcentagem de células/campo em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$

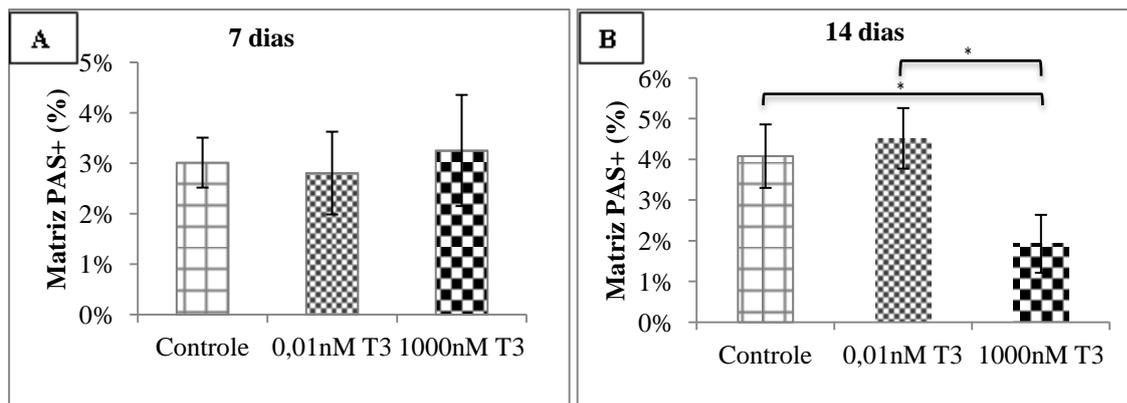


Figura 13 Porcentagem de matriz PAS+/campo (média \pm desvio padrão), em culturas de CTM-TA de equinos dos grupos tratados com triiodotironina (T3) na concentração de 0,01nM e 1000nM e controle (sem T3) em meio de diferenciação condrogênico aos sete (A) e 14 (B) dias. * $p \leq 0,05$

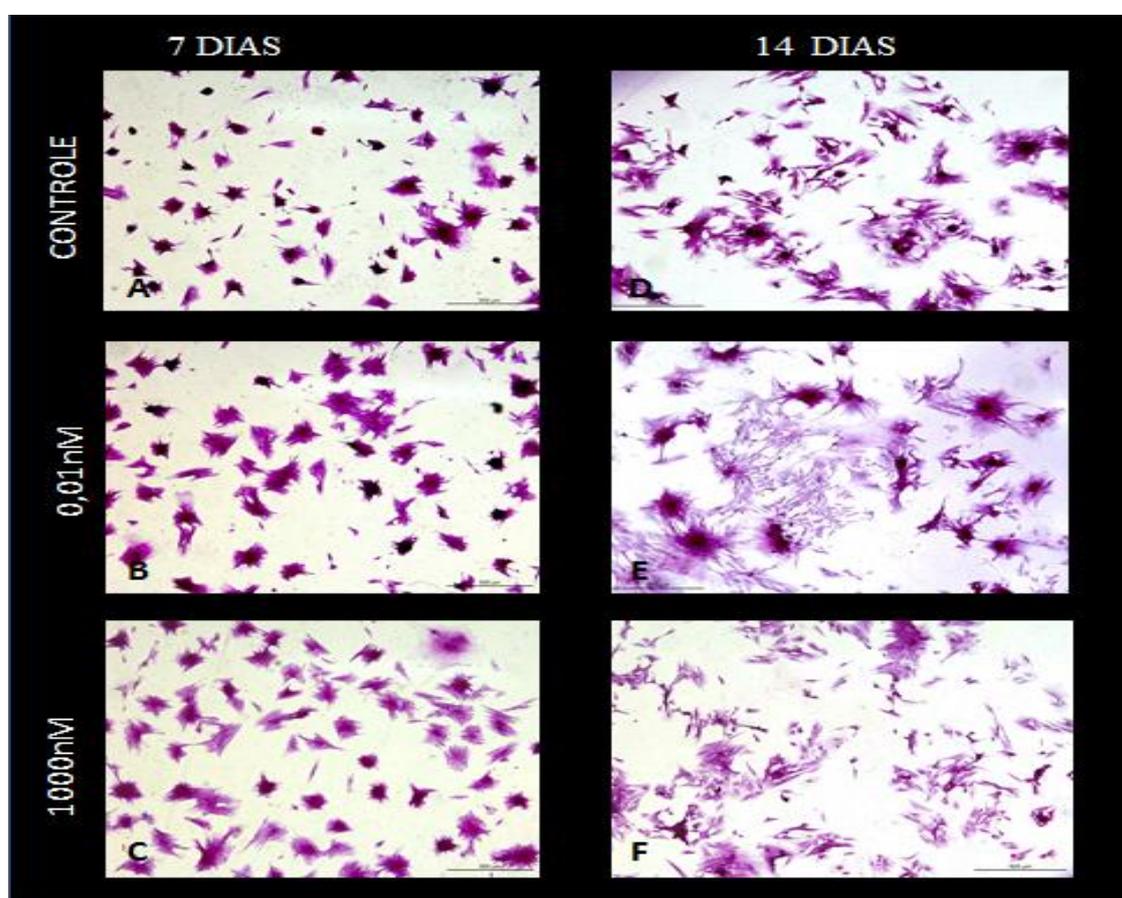


Figura 14. Fotomicroscopia das culturas de células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de equinos coradas pelo PAS (PAS, Bar=500 μ m). Aos sete dias, (A) grupo controle, (B) tratado com 0,01nM de T3 e (C) tratado com 1000nM de T3, com maior densidade celular nos grupos tratados. Aos 14 dias, (D) grupo controle, (E) tratado com 0,01nM de T3 e (F) tratado com 1000nM de T3, com menor quantidade de matriz PAS+ no grupo tratado com 1000nM de T3.

4. DISCUSSÃO

A coleta do tecido adiposo dos equinos utilizando a técnica descrita, demonstrou ser eficiente para o isolamento e expansão das CTM como descrito por outros autores (Vidal et al., 2007; Carvalho et al., 2009).

No presente estudo, as CTMs foram caracterizadas seguindo alguns dos critérios sugeridos pela *ISCT*, tais como aderência em superfícies plásticas, aparência de células semelhantes a fibroblastos na forma indiferenciada e capacidade para se diferenciar nas linhagens osteogênica e condrogênica (Dominici et al., 2006). A diferenciação osteogênica foi comprovada pela capacidade de produzir matriz mineralizada que se cora de marrom ou negro pela coloração de Von Kossa e a diferenciação condrogênica foi comprovada pela capacidade de sintetizar matriz condrogênica corada pelo PAS, que cora os proteoglicanos da MEC cartilaginosa (Schauwer et al., 2011; Kang et al., 2013).

Em toda a literatura amplamente consultada, não foi encontrado nenhum outro estudo prévio que tenha avaliado o efeito da T3 em culturas de CTM de equinos, com a finalidade de elucidar se este hormônio poderia potencializar a diferenciação osteogênica e condrogênica. A hipótese inicial de que as CTM de equinos pudessem responder positivamente ao estímulo da T3 surgiu do fato de que as CTM apresentam receptores ($TR\alpha$ e $TR\beta$) para os hormônios tireoidianos (Gruber et al., 1999) e que em CTM da espécie humana e de ratos já havia sido observado o aumento *in vitro* da diferenciação osteogênica e condrogênica, sob estímulo da T3. Contudo, surpreendentemente a T3, independente da concentração testada, não aumentou a diferenciação osteogênica e condrogênica das CTM-TA de equinos, causando inclusive efeito negativo sob a densidade celular e a síntese de matriz, dependendo da concentração do hormônio e do tempo de cultivo.

O resultado deste estudo é contrário ao de pesquisas com CTM de ratos, onde a T3 aumentou a diferenciação tanto osteogênica quanto condrogênica (Boeloni et al., 2009; Assis et al., 2018) e aos estudos com CTM do cordão umbilical de humanos, onde a adição *in vitro* da T3 aumentou a diferenciação condrogênica (Férrandez-Pernas et al., 2016). É difícil explicar a razão da diferença entre espécies, com relação a resposta das CTM ao estímulo *in vitro* da T3. As mesmas concentrações de T3 testadas em células humanas e de ratos foram testadas nas CTM de equinos do presente estudo. No entanto, pesquisas realizadas anteriormente já alertavam para a possibilidade de diferença entre espécies com relação à resposta das CTM a fatores adicionados ao meio de cultura. Resultados divergentes na diferenciação osteogênica

foram observados em culturas de CTM de ratos e de humanos sob efeito do fator de crescimento TGF- β 1, demonstrando que as CTM-TA de ratos inibem a osteogênese na presença deste fator e nas CTM-TA de humanos observou-se efeito estimulatório (Levi et al., 2010).

Com relação aos ensaios da diferenciação osteogênica, a menor concentração da T3 (0,01nM) aumentou a conversão do MTT em formazan, o que sugere aumento da atividade mitocondrial e aumentou a atividade da fosfatase alcalina aos 14 dias. Esses dois resultados demonstram maior atividade e metabolismo celular (Berridge et al., 2005). No entanto, nesse mesmo período, a densidade celular e a porcentagem de matriz mineralizada foram menores em comparação ao controle. No entanto, aos 21 dias de tratamento, os resultados desse grupo praticamente se igualaram ao do controle, havendo somente aumento da atividade de ALP do grupo tratado em comparação ao controle. Resultado diferente foi observado no estudo com CTM de ratos realizado por Boeloni et al., (2009), no qual houve aumento da diferenciação osteogênica quando adicionada a mesma concentração de T3 (0,01nM) testada no presente estudo. A redução da densidade celular observada por Boeloni et al., (2009) e o aumento da conversão de MTT e de ALP foram acompanhados por aumento da síntese de matriz mineralizada no grupo de CTM de ratos tratado com 0,01nM de T3. A redução da densidade celular quando acompanhada pelo aumento da síntese de matriz pode ser explicada pelo fato da T3 ter como ação a supressão do período proliferativo e o estímulo da diferenciação das CTM em osteoblastos (Ohishi et al., 1994). Explicação que não se aplica ao presente estudo, em que houve redução tanto da celularidade quanto da síntese de matriz durante a diferenciação osteogênica sob estímulo da T3.

Ainda com relação aos ensaios realizados durante a diferenciação osteogênica, a maior concentração de T3 (1000nM) apesar de aumentar a atividade da ALP aos 14 dias, reduziu a conversão do MTT em formazan aos 14 e 21 dias e a densidade celular aos 21 dias, sem no entanto alterar significativamente a síntese de matriz mineralizada. Boeloni et al., (2009), ao utilizar a mesma concentração de hormônio T3 (1000nM) em CTM-MO de ratos, obteve resultado semelhante, também comprovando que não houve mudanças significativas, tanto positivas quanto negativas, com relação ao controle.

Com relação aos ensaios realizados durante a diferenciação condrogênica, a menor concentração de T3 (0,01nM) aumentou a densidade celular e a conversão do MTT em formazan aos sete e 14 dias, respectivamente, igualando-se ao controle nos períodos

subsequentes. No entanto, não houve aumento da síntese de matriz condrogênica PAS+. A maior concentração de T3 (1000nM), apesar de aumentar também a densidade celular aos sete dias, reduziu a conversão do MTT em formazan, a atividade da ALP e a síntese de matriz condrogênica PAS+ aos 14 dias de cultivo. Ao contrário dos efeitos da T3 sobre culturas de CTM de equinos, Assis et al. (2018) demonstrou aumento da produção de matriz condrogênica em culturas de CTM da medula óssea de ratos tratadas com a mesma concentração de T3, além do aumento da expressão de transcritos gênicos importantes para a diferenciação condrogênica, tais como Sox9 e colágeno tipo II. É provável que a diferença nos resultados entre esses dois estudos, seja decorrente da espécie animal, bem como da fonte de CTM utilizada, uma vez que Assis et al., (2018) utilizou CTM da medula óssea. No entanto, Fernández-Pernas et al., (2016) também observaram que a T3 influencia a diferenciação condrogênica de CTM do cordão umbilical de humanos, obtendo melhores resultados com o uso de 100nM, onde houve maior expressão de colágeno tipo II, agregan e maior síntese de matriz condrogênica corada pela safranina O.

Tanto Boeloni et al., (2009) quanto Assis et al., (2018), que testaram respectivamente, o efeito da T3 na diferenciação osteogênica e condrogênica das CTM, perceberam que algumas concentrações apresentaram efeitos semelhantes ou inferiores em comparação ao controle, principalmente quando utilizou-se concentrações de T3 mais altas, concluindo inclusive que os efeitos foram dose-dependentes. No entanto, no presente estudo, o efeito da T3 sobre a diferenciação e a síntese de matriz osteogênica e condrogênica foram negativos nas duas concentrações utilizadas, observando um efeito não linear, apesar destas diferenciarem 1×10^5 nM uma da outra. Sendo assim, é pouco provável que qualquer concentração de T3 intermediária às duas concentrações testadas, tivesse efeito oposto ao evidenciado neste estudo.

O presente estudo demonstra que apesar do efeito potencializador da T3 na diferenciação osteogênica e condrogênica das CTM de outras espécies, na espécie equina o efeito é bem diferente, o que não justifica a adição da T3 em culturas de CTM-TA de equinos com a finalidade de melhorar a diferenciação osteogênica e condrogênica e aumentar o potencial de síntese das células. Assim, conclui-se que a adição de T3 à culturas de CTM-TA de equinos não aumenta a diferenciação osteogênica ou condrogênica, podendo causar inclusive efeito negativo sob a densidade celular e a síntese de matriz, dependendo da concentração do hormônio e do tempo de cultivo.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIYAMA, H. Control of chondrogenesis by the transcription factor Sox9. *Mod Rheumatol.*, v. 18, n.3, p.213-219, 2008.
- ALIPOUR, F.; PARHAM, A.; MEHRJERDI, H. K.; et al. Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotype and Growth Characteristics. *Cell Journal*, v. 16, n. 4, p. 456-465, 2015.
- ALVES, E. G. L.; SERAKIDES, R.; BOELONI, J. N.; et al. Comparison of the osteogenic potential of mesenchymal stem cells from the bone marrow and adipose tissue of young dogs. *BMC Vet. Res.*, v. 10, n. 190, p.1-9, 2014.
- ARAÚJO, J.D.; FILHO, J.D.A.; CIORLIN, E. et al. A terapia celular no tratamento da isquemia crítica dos membros inferiores. *J. Vasc. Br.*, v.4, p.357-365, 2005.
- ARDANAZ, N.; VÁSQUEZ, F. J.; ROMERO, A.; et al. Inflammatory response to the administration of mesenchymal stem cells in an equine experimental model: effect of autologous, and single and repeat doses of pooled allogeneic cells in healthy joints. *BMC Vet Res.*, v. 12, p. 1-9, 2016.
- ASSIS, H. A.; ELERT, N. C.; AZEVEDO, A. L. B. P.; et al. Dose-dependent effect of triiodothyronine on the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from the bone marrow of female rats. *J Pharm Pharmacol.*, v. 70, n.1, p.89-100, 2018.
- BANOVAC, K.; KOREN, E. Triiodothyronine Stimulates the Release of Membrane-Bound Alkaline Phosphatase in Osteoblastic Cells. *Calcif Tissue Int.*, v. 67, n. 6, p. 460-465, 2000.
- BARBERINI, D. J.; FREITAS, N. P. P.; MAGNONI, M. S.; et al. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, v. 5, n. 25, p. 1-11, 2014.
- BARRACHINA, L.; RECHAMA, A. L.; ROMERO, A.; et al. Inflammation affects the viability and plasticity of equine mesenchymal stem cells: possible implications in intra-articular treatments. *J Vet Sci.*, v.18, n. 1, p. 39-49, 2017.
- BARRY F.; BOYNTON, R. E.; LIU, B.; MURPHY, J. M. Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow: Differentiation-Dependent Gene Expression of Matrix Components. *Exp Cell Res*, v. 268, n. 2, p.189-200, 2001.
- BASSET, J. H.; WILLIAMS, G. R. Role of Thyroid Hormones in Skeletal Development and Bone Maintenance. *Endroc Rev.*, v. 37, n.2, p.135-187, 2016.
- BERRINDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.*, v. 11, p. 127-152, 2005.

- BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G. L.; Mc HUGH, P. E.; et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater.*, v. 12, n. 23, p.13-27, 2012.
- BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; MELO, A. B.; et al. Dose-Dependent Effects of Triiodothyronine on the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Horm Res.*, v. 72, n. 2, p. 88-97, 2009.
- BOEUF, S.; RICHTER, W. Chondrogenesis of mesenchymal stem cells: role of tissue source and inducing factors. *Stem Cell Res. Ther.*, v. 13, n. 1, p. 31-35, 2010.
- BOLAM, C. J.; HURTIG, M. B.; CRUZ, A.; MC EWEN, B. J. Characterization of experimentally induced post-traumatic osteoarthritis in the medial femorotibial joint of horses. *Am J Vet Res.*, v. 67, n. 3, p. 433-447, 2006.
- BORJESSON, D. L.; PERONI, J. F. The Regenerative Medicine Laboratory: Facilitating Stem Cell Therapy for Equine Disease. *Clin Lab Med.*, v. 31, n. 1, p. 109-123, 2011.
- BROECKX S.; ZIMMERMAN, M.; CROCETTI, S.; et al. Regenerative therapies for equine degenerative joint disease: a preliminary study. *Plos One*, v. 9, n. 1, p.1-11, 2014.
- BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N. S.; et al. Mesenchymal Stem Cells in Osteobiology and Applied Bone Regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, v. 355, p.247-256, 1998.
- BUCKWALTER J.A. Articular cartilage injuries. *Clin. Orthop.*, v.402, p.21–37, 2002.
- BURK, J.; BADYLAK, S. F.; KELLY, J.; BREHM, W. Equine cellular therapy--from stall to bench to bedside? *Cytometry A.*, v. 83, n.1, p. 103-113, 2013a.
- BURK, J.; RIBITSCH, I.; GITTEL, C.; et al. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *The Vet. Journal*, v.195, p.98-106, 2013b.
- CAPLAN, A. L. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.
- CARMONA, J.; PRADES, M. Pathophysiology of Osteoarthritis. *Compendium Equine*, v. 4, n.1, p. 28-40, 2009.
- CARVALHO, A. M.; ALVES, A. L.; GOLIM, M. A. et al. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 132, p. 303-306, 2009.
- CASTRO, F.O.; TORRES, A.; CABEZAS, J.; RODRIGUEZ-ALVES, L. Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*, v. 96, n.1, p. 95-101, 2014.

CENTRELLA, M.; MCCARTHY, T. L.; CANALIS, E. Transforming growth factor beta is a bifunctional regulator of replication and collagen synthesis in osteoblast-enriched cell cultures from fetal rat bone. *J. Bio. Chem.*, v.25, n.262, p.2869-2874, 1987.

CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B.; MIDDLETON, J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v.25, n.11, p.2739-2749, 2007.

CHEIFETZ, S.; LI, I. W.; McCULLOCH, C. A.; et al. Influence of osteogenic protein-1 (OP-1;BMP-7) and transforming growth factor-beta 1 on bone formation in vitro. *Connect Tissue Res.*, v. 35, p.71-78, 1996.

CHEN, Q.; SHOU, P.; ZHENG, C.; et al. Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts? *Cell Death Differ.*, v.23, n.7, 2016.

DEL BUE, M.; RICCÒ, S.; RAMONI, R.; et al. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Vet Res Commun*, v. 32, p.51-55, 2008.

DIEKMAN, B. O.; GUILAK, F. Stem cell-based therapies for osteoarthritis: Challenges and opportunities. *Curr Opin Rheumatol.*, v. 25, n.1, p. 119-126, 2013.

DOMINICI, M.L.; Le BLANC, K.; MUELLER, I.; et al. Minimal criteria for defining multipotential mesenchymal stromal cells. *The international society for cellular therapy position statement. Cytotherapy.* v.8, p.315-317, 2006.

ELASHRY, M. I.; BAULIG, N.; HEIMANN, M.; et al. Osteogenic differentiation of equine adipose tissue derived mesenchymal stem cells using CaCl₂. *Res. Vet. Sci.*, v. 117, p. 45-53, 2018.

FAKHRY, M.; HAMADE, E.; BRADAN, B.; et al. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World J Stem Cells*, v. 25, n. 4, p.136-148, 2013.

FÉRNANDEZ-PERNAS, P.; LABORA, J. F.; RODRIGUEZ, I. L.; et al. 3, 3', 5'-triiodo-L-thyronine Increases In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells From Human Umbilical Cord Stroma Through SRC2. *J Cell Biochem.*, v. 117, n.9, p.2097-2108, 2016.

FRISBIE, D. D.; HAGUE, B. A.; KISIDAY, J. D. Stem cells as a treatment for osteoarthritis. *ACVS*, p. 39-42, 2007.

FRISBIE, D. D.; SMITH, R. K. W. Clinical update on the use of mesenchymal stem cells in equine orthopaedics. *Equine vet. J.*, v.42, n.1, p.86-89, 2010.

GARG, P.; MAZUR, M.M; BUCK, A. C.; et al. Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts. *Orthop Surg.*, v.9, n.1, p.13-19, 2017.

GIORDANO, V.; GIORDANO, M.; KNACKFUSS, I.G. Fatores de crescimento e diferenciação ósseos. Efeitos sobre o processo de consolidação óssea: presente e futuro. *Rev Bras Med.*, v. 57, p.1018-1029, 2000.

- GIROLAMO, L.; SARTORI, M. F.; ALBISETTI, W.; BRINI, A. T. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med*, v. 1, n. 2, p.154-157, 2007.
- GOLDRING, M. B.; TSUCHIMOCCHI, K.; IJIRI, K. The Control of Chondrogenesis. *J Cell Biochem.*, v. 1, n.97, p.33-44, 2006.
- GOVONI, K. E. Horse species symposium: Use of mesenchymal stem cells in fracture repair in horses. *J Anim Sci.*, v. 93, n. 3, p.871-878, 2015.
- GRASSEL, S.; LORENZS, J. Tissue-engineering strategies to repair chondral and osteochondral tissue in osteoarthritis: use of mesenchymal stem cells. *Curr Rheumatol Rep.*, v. 16, n. 10, p.452-468, 2014.
- GRUBER, R.; CZERWENKA, K.; WOLF, F.; et al. Expression of the vitamin D receptor, of estrogen and thyroid hormone receptor alpha- and beta-isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone*, v. 24, n.5, p. 465-473, 1999.
- GUEST, D. J.; OUSEY, J. C.; SMITH, M. R. W. Defining the expression of marker genes in equine mesenchymal stromal cells. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, v. 1, p. 1-9, 2008.
- HARVEY, C. B.; O'SHEA, P. J.; SCOTT, A. J. Molecular Mechanisms of Thyroid Hormone Effects on Bone Growth and Function. *Mol Genet Metab.*, v. 75, n.1, p. 17-30, 2002.
- HELL, R. C. R.; BOELONI, J. N.; OCARINO, N. M.; et al. Efeito da triiodotironina na expressão das proteínas ósseas durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v. 55, n.4. p. 339-344, 2009.
- HENG, B.C.; CAO, T.; LEE, E.H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage *in vitro*. *Stem Cells*, v.22, p.1152-1167, 2004.
- HILLMANN, A.; AHRNERG, A. B.; BREHM, W. et al. Comparative Characterization of Human and Equine Mesenchymal Stromal Cells: A Basis for Translational Studies in the Equine Model. *Cell Transplant.*, v. 25, p. 109-124, 2016.
- HONG, L.; COLPAN, A., PEPTAN, I. A.; et al. 17-Beta estradiol enhances osteogenic and adipogenic differentiation of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng.*, v. 13, n. 6, p. 1197-1203, 2007.
- HWANG, N.S.; VARGHESE, S.; PULEO, C.; et al. Morphogenetic Signals from Chondrocytes Promote Chondrogenic and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Physiol.*, v. 212, n.2, p.281-284, 2007.
- IACONO, E.; BRUNORI, L.; PIRRONE, A. et al. Isolation, characterization and differentiation of mesenchymal stem cells from amniotic fluid, umbilical cord blood and Wharton's jelly in the horse. *Reproduction*, v.143, p. 455-468, 2012.

- JAMES, A. W. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Cientifica (Cairo)*, v.2013, p.1-17, 2013.
- JOHNSON, B. J.; STOVER, S. M.; DAFT, B. M.; et al. Causes of death in racehorses over a 2 year period. *Equine Vet J.*, v. 26, n.4, p.327-330, 1994.
- ISHIKAWA, S.; HORINOUCI, C.; MURATA, D.; et al. Isolation and Characterization of equine dental pulp stem cells derived from Thoroughbred wolf teeth. *J. Vet. Med. Sci.*, v,79, n.1, p. 47-51, 2017.
- JENEI-LANZL, Z., STRAUB, R. H.; DIENSTKNECHT, T.; et al. Estradiol inhibits chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells via nonclassic signaling. *Arthritis Rheum.*, v. 62, n. 4, p. 1088-1096, 2010.
- KANG, J. G.; PARK, S. B.; SEO, M. S.; et al. Characterization and clinical application of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *J Vet Sci.*, v. 14, n. 3, p. 367-371, 2013.
- KARL, A.; OLBRICH, N.; PFEIFER, C.; et al. Thyroid Hormone-Induced Hypertrophy in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis Is Mediated by Bone Morphogenetic Protein-4. *Tissue Eng*, v. 20, n.1-2, p. 178-188, 2014.
- KASASHIMA Y.; TAKAHASHI, T.; SMITH, R.K.; et al. Prevalence of superficial digital flexor tendonitis and suspensory desmitis in Japanese Thoroughbred flat racehorses in 1999. *Equine Vet. J.*, v.36, v.4, p.346-350, 1999.
- KELLY, D. J.; JACOBS, C. R. The Role of Mechanical Signals in Regulating Chondrogenesis and Osteogenesis of Mesenchymal Stem Cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*, v. 90, n.1, p.75-85, 2010.
- KERN, S.; EICHLER, H.; STOEVE, J.; et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, v. 24, n.5, p.1294-1301, 2006.
- KIM, H.; KIM, Y.; IM, G. Is Continuous Treatment with Transforming Growth Factor-Beta Necessary to Induce Chondrogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells? *Cells Tissues Organs*, v.190, n.1, p.1-10, 2009.
- KIM, H. Y.; MOHAN, S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. *Bone Res.*, v.1, n. 2, p. 146-161, 2013.
- KOCH, T. G.; BERG, L. C.; BETTS, D. H. Current and future regenerative medicine: Principles, concepts, and therapeutic use of stem cell therapy and tissue engineering in equine medicine. *Can. Vet. J.*, v.50, p.155-165, 2009.
- KOERNER, J.; NESIC, D.; ROMERO, J. D.; et al. Equine Peripheral Blood-Derived Progenitors in Comparison to Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, v.24, p. 1613-1619, 2006.

- KOLF, C. M.; CHO, E.; TUAN, R. S. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.*, v. 9, n.1, p.1-10, 2007.
- LAKATOS, P.; CAPLICE, M. D.; KHANNA, V.; STERN, P. H. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor I content in the medium of rat bone tissue. *J Bone Miner Res.*, v. 8, n. 12, p. 1475-1481, 1993.
- LEE, E.H.; HUI, J.H.P. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J. Bone Joint Surg*, v.88, p.841-851, 2006.
- LEEB, C.; JURGA, M.; MCGUCHIN.; et al. Promising New Sources for Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. and Rep.*, v. 6, n. 1, p. 15-26, 2010.
- LEVI, B.; JAMES, A. W.; XU, Y.; et al. Divergent Modulation of Adipose-Derived Stromal Cell Differentiation by TGF-1 Based on Species of Derivation. *Plast Reconstr Surg*, v. 126, n.2, p. 412-425, 2010.
- MAEHATA, Y.; TAKAMIZAWA, S.; OSAWA, S.; et al. Both direct and collagen-mediated signals are required for active vitamin D3-elicited differentiation of human osteoblastic cells: roles of osterix, an osteoblast-related transcription factor. *Matrix Biol.*, v.25, n.1, p.47-58, 2006.
- McLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, v.414, p.129-131, 2001.
- MELLO, M. A.; TUAN, R. S. Effects of TGF- β 1 and Triiodothyronine on Cartilage Maturation: In Vitro Analysis Using Long-Term High-Density Micromass Cultures of Chick Embryonic Limb Mesenchymal Cells. *J Orthop Res.*, v. 24, n. 11, p.2095-2105, 2002.
- MENSING, N.; GASSE, H.; HAMBRUCH, N.; et al. Isolation and characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from the gingiva and the periodontal ligament of the horse. *MBC Veterinary Research*, v. 7, n. 42, p.1-13, 2011.
- MIAZONO, K. Positive and negative regulation of TGF- β signaling. *J. Cell Sci.*, v. 113, p.1101-1109, 2000.
- MILNE, M.; KANG, M. I.; QUAIL, J. M.; BARAN, D. T. Thyroid Hormone Excess Increases Insulin-Like Growth Factor I Transcripts in Bone Marrow Cell Cultures: Divergent Effects on Vertebral and Femoral Cell Cultures. *Endocrinology*, v. 5, p. 2527-2534, 1998.
- MILJKOVIC N. D.; COOPER, G. M.; MARRA, K.G. Chondrogenesis, bone morphogenetic protein-4 and mesenchymal stem cells. *Osteoarthritis Cartilage*, v.16, n. 10, p. 1121-1130, 2008.
- MONTEIRO, B. S.; NETO, N.M.A.; DEL CARLO, R. J. Mesenchymal stem Cell. *Ciência Rural*, v.40, n.1, p.238-245, 2010.
- MOSNA, F., SENSEBE, L., KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev*, v. 19, n. 10, p.1449-1470, 2010.

MURATA, D.; MIYAKOSHI, D.; HATAZOE, T.; et al. Multipotency of equine mesenchymal stem cells derived from synovial fluid. *The Vet. Journal*, v. 202, p.53-61, 2014.

MURPHY, E.; WILLIAMS, G. R. The thyroid and the skeleton. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 61, n.3, p. 285-298, 2004.

MUTTINI, A.; SALINI, V.; VALBONETTI, L.; ABATE, M. Stem cell therapy of tendinopathies: suggestions from veterinary medicine. *Muscles, Ligaments and Tendons Journal*, v.2, n.3, p. 187-192, 2012.

NAUTA, A. J., FIBBE, W. E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stroma cells. *Blood*, v. 10, n.10, p. 3499-3506, 2007.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F. P.; Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. *Cell Tissue Res*, v. 343, n. 2, p.289-302, 2011.

NOTH, U.; STENERT, A. F.; TUAN, R. S.; Technology Insight: adult mesenchymal stem cells for osteoarthritis therapy. *Nat Clin Pract Rheumatol.*, v.4, n. 7, p. 371-380, 2008.

NUNES, M. T. Hormônios tiroideanos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v. 47, n. 6, p. 639-643, 2003.

NUTI, N.; CORALLO, C.; CHAN, B. M. F. et al. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev.*, v. 12, n. 5, p. 511-523, 2016.

OHISHI, K.; ISHIDA, H.; NAGATA, T.; et al. Thyroid hormone suppresses the differentiation of osteoprogenitor cells to osteoblasts, but enhances functional activities of mature osteoblasts in cultured rat calvaria cells. *Journal Of Cellular Physiology*, v. 161, n. 3, p. 544-552, 1994.

PAEBST, F.; PIEHLER, D.; BREHM, W.; et al. Comparative Immunophenotyping of Equine Multipotent Mesenchymal Stromal Cells: An Approach Toward a Standardized Definition. *Cytometry A*, v.85, n.8, p.678-687, 2014.

PELTARI, K.; STECK, E.; RICHTER, W. The use of mesenchymal stem cells for chondrogenesis. *Injury*, v.39, n. 1., p. 58-65, 2008.

PRADO, A. A. F.; FAVARON, P. O.; SILVA, L. C. L. C.; et al. Characterization of mesenchymal stem cells derived from the equine synovial fluid and membrane. *MBC Veterinary Research*, v. 11, n.281, p.1-13, 2015.

QU, Q.; PERÄLÄ-HEAPE, M.; KAPANEN, A.; et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, v.22, n.3, p.201-209, 1998.

RADTKE, C. L.; NINO-FONG, R.; GONZALEZ, B. P. E.; et al. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue– and periosteal tissue– derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow– and adipose tissue–derived mesenchymal stem cells. *AJVR*, v. 74, n. 5, p.790-800, 2013.

- REIS, A. M. S. *Efeitos In Vivo E In Vitro Da Cafeína Sobre A Diferenciação Osteogênica Das Células Tronco Mesenquimais E Atividade De Síntese De Osteoblastos E Condrócitos De Ratos*. 2017. 178f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- RIBITSCH, I.; BURK, J.; DELLING, U.; Basic science and clinical application of stem cells in veterinary medicine. *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, v. 123, p. 219-263, 2010.
- RODRIGUEZ, P. GONZALÉZ, M.; RÍOS, S.; CAMBIAZO, V. Cytoskeletal Organization of Human Mesenchymal Stem Cells (MSC) Changes During Their Osteogenic Differentiation. *J Cell Biochem.*, v. 93, n.4,p.721-731, 2004.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 4ª edição. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2015. 265p.
- SCHAUWER, C.; MEYER, E.; VAN DE WALLE, G. R.; et al. Markers of stemness in equine mesenchymal stem cells: a plea for uniformity. *Theriogenology*, v.75, p. 1431-1443, 2011.
- SEO, J. P.; TSUZUKI, N.; HANEDA, S.; et al. Osteoinductivity of gelatin/ β -tricalcium phosphate sponges loaded with different concentrations of mesenchymal stem cells and bone morphogenetic protein-2 in an equine bone defect model. *Vet Res Commun.*, v. 38, n.1, p. 73-80, 2014.
- SEO, M.; PARK, S.; KIM, H.; et al. Isolation and characterization of equine amniotic membrane-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.*, v. 14, n. 2, p. 151-159, 2013.
- SHENFIELD, F.; PENNING, G.; SUREAU, C. et al. Stem cells. *Hum. Reprod.*, v.17, p.1409-1410, 2002.
- SONG, I.; KIM, B. S.; KIM, C. S.; IM, G. I. Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 408, n.1, p. 126-131, 2011.
- SOUZA, M. V. Osteoarthritis in horses – Part 1: relationship between clinical and radiographic examination for the diagnosis. *Braz. arch. biol. Technol*, v. 59, p.1-9, 2016.
- STEWART, M. C; STEWART, A. A. Mesenchymal Stem Cells: Characteristics, Sources and Mechanisms of Action. *Vet Clin North Am Equine Pract*, v. 27, n. 2, p.243-261, 2011.
- VARGAS, F.; RUMPER M.; LUEGMAYR, E.; et al. Triiodothyronine, a Regulator of Osteoblastic Differentiation: Depression of Histone H4, Attenuation of c-fos/c-jun, and Induction of Osteocalcin Expression. *Calcif Tissue Int.*, v. 61, n. 5, p. 404-411, 1997.
- VATER, C.; KASTEN, P.; STIEHLER, M. Culture media for the differentiation of mesenchymal stromal cells. *Acta Biomater.*, v.7, n.2, p.463-477, 2011.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; JOHNSON, J. R. et al. Cell Growth Characteristics and Differentiation Frequency of Adherent Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity. *Vet. Surg.*, v. 35, p.601-610, 2006.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J. et al. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Vet. Surg.*, v. 36, p. 613-622, 2007.

ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. *Células-Tronco: A nova Fronteira da Medicina*. São Paulo: Atheneu, 2006. 245p.

WATTS, A. E. Use of stem cells in equine musculoskeletal disorders. *Equine vet. Educ*, v. 26, n.9, p.492-498, 2014.

WEISS, S.; HENNIG, T.; BOCK, R.; et al. Impact of growth factors and PTHrP on early and late chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J. Cell Physiol.*, v.2013, n.1, p. 84-93, 2010.

WILKE, M. M.; NYDAM, D. V.; NIXON, A. J. Enhanced Early Chondrogenesis in Articular Defects following Arthroscopic Mesenchymal Stem Cell Implantation in an Equine Model. *J Orthop Res.*, v. 25, n. 7, p. 913-925, 2007.

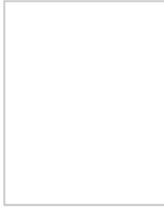
WILLIAMS, G. R. Thyroid Hormone Actions in Cartilage and Bone. *Eur Thyroid J.*, v. 2, n.1, p.3-13, 2013.

YEN, P. M. Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol Rev.*, v. 81, n. 3, p. 1097-1142, 2001.

YOUSSEF, A.; ABOALOLA, D.; HAN, V. K. M.; The Roles of Insulin-Like Growth Factors in Mesenchymal Stem Cell Niche. *Stem Cells Int.*, v.2017, p.1-12, 2017.

6. ANEXOS

6.1 Aprovação Do Comitê De Ética



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Prezado(a):

Esta é uma mensagem automática do sistema Solicite CEUA que indica mudança na situação de uma solicitação.

Protocolo CEUA: 362/2017

Título do projeto: Comparação do potencial osteogênico e condrogênico das células tronco mesenquimais da polpa dentária e do tecido adiposo de equinos

Finalidade: Pesquisa

Pesquisador responsável: Rogeria Serakides

Unidade: Escola de Veterinária

Departamento: Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária

Situação atual: [Decisão Final - Aprovado](#)

Aprovado na reunião do dia 26/02/2018. Validade: 26/02/2018 à 25/02/2023

Belo Horizonte, 27/02/2018.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br