

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

**Efeito da associação cafeína e etanol sobre a diferenciação osteogênica das  
células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas**

**Camila Lana Rosa da Silva**

**Belo Horizonte  
2019**

**Camila Lana Rosa da Silva**

**Efeito *in vitro* cafeína e etanol isolados ou em associação sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas**

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

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária-UFMG  
2019**

S586e Silva, Camila Lana Rosa da, 1988-  
Efeito *in vitro* cafeína e etanol isolados ou em associação sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas /Camila Lana Rosa da Silva – 2019.

53p.: il.

Orientadora: Natália de Melo Ocarino  
Coorientadora: Amanda Maria Sena Reis

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

1- Rato como animal de laboratório– Teses- 2 –Cafeína– Teses- 3 – Células-tronco – Teses  
4 – Veterinária – Teses - I – Ocarino, Natália de Melo – II – Reis, Amanda Maria Sena - III – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – V – Título.

**CDD – 636.089**

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

**CAMILA LANA ROSA DA SILVA**

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

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2019, pela banca constituída pelos membros:

*Natália de Melo Ocarino*

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

*Rogéria Serakides*

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

*Carla Maria Osório Silva*

Prof<sup>ª</sup>. Carla Maria Osório Silva  
Centro Universitário Newton Paiva



## **AGRADECIMENTOS**

A inteligência suprema, causa primária de todas as coisas que criou tudo o que existe, Deus.

Aos anjos guardiões que sempre estão presentes em todas as realizações da minha vida me dando força e amparo para minha evolução e aprimoramento pessoal através da intuição, da inspiração, dos conselhos e consolações diante de situações difíceis e de aflição.

Aos meus queridos avós, Maria Jaques, já falecida, pela simplicidade, fé e por me ensinar que “Se quiser conhecer uma pessoa não observe o que ela faz, mas o que ela ama”. José Lino pelo apoio incondicional e por estar sempre na torcida.

Aos meus pais Marilza Jaques e Luiz Rosa, por me criarem e por serem meus grandes professores doutores e filósofos referente a máxima "Conhece-te a ti mesmo" que preconiza a importância de se buscar aquilo que se é, não do lado de fora, mas do lado de dentro. Contudo, de forma especial a minha amada mãe, que sempre esteve ao meu lado me possibilitando a realização de tudo. Obrigada pelo amor incondicional, pelas orações e por abrir mão de muitas coisas em prol de mim.

Aos meus irmãos Rey, Leandro e Waleson, pelo carinho. E minha irmã Edilane, que sempre estava disposta a me ajudar. Por todo apoio e amizade.

À minha orientadora professora Natália de Melo Ocarino, pela orientação, pelo apoio e compreensão em todo o meu período como aluna de Iniciação Científica e Mestrado. Obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos.

À professora Rogéria Serakides, que me acompanhou e orientou durante a minha formação acadêmica e profissional. Pela excelente e prestativa coordenação no programa de monitoria da disciplina patologia veterinária do DCCV. Obrigada por todo apoio e pelos ensinamentos.

À minha co-orientadora professora Amanda Maria Sena Reis , que eu tive oportunidade de acompanhar como aluna de iniciação científica.Obrigado pelos ensinamentos.

Aos professores do setor de patologia Renato de Lima Santos, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Roselene Ecco, Rogéria Serakides, Natália de Melo Ocarino e Felipe Pierezan, agradeço imensamente pelos conhecimentos adquiridos durante a graduação, monitoria e mestrado.

Aos colegas/irmãos de laboratório Lorena, Fabrício, Débora, Kênia, Fabiana, Gabriela, Layla, Carla, Natália, Talita. Como é bom trabalhar com pessoas que tornam o nosso dia a dia mais leve e feliz. Obrigada pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às alunas de Iniciação Científica,Yasmim, Tanara, Débora e Flávia , obrigado pela ajuda constante e amizade.

Aos amigos, colegas e ex-colegas da Patologia, particularmente Juneo, karina, Matheus, Cláudia, Fabíola, Aysa, Alexandre, Mirtha, Thaynara, Diego, Willian, Philipe, Leticia, Douglas, Ágna, Carolina, Pâmela, Dayse, Ana, Matheus, obrigada pela amizade e por sempre estarem dispostos a ajudar.

Ao residentes e ex-residentes do Setor de Patologia, Sóstenes, Luís, Clarissa, Samantha, Daniel, Beatriz e Thaís, obrigada por toda a ajuda, amizade e pelo ótimo convívio.

Ao Joilson Reis, Mariana Mamedes, Raphael Mattoso, Andressa Laysse e Andresa Araujo meus companheiros irmãos de graduação e mestrado, mesmo em áreas diferentes, por dividirem ensinamentos, momentos de descontração com direito a muitas pausas para o cafezinho e pela amizade. À vocês só tenho a agradecer, pois tornaram os meus dias muito mais felizes.

Aos técnicos de laboratório Leimar, Natália, Valéria e Luís obrigada por toda a ajuda. Por serem sempre tão amáveis, pelas horas de conversa e aprendizado e pelas boas risadas.

Aos funcionários da limpeza, da esterilização, e aos porteiros, em especial ao João, Carlão, Dona Beth e Vitalina obrigada pela convivência agradável.

Aos componentes titulares da banca Rogéria Serakides, Natália de Melo Ocarino e Carla Maria Osório Silva, e aos suplentes Jankerle Neves Boeloni e Eliane Gonçalves de Melo pela prontidão em compor a banca para avaliação desta dissertação.

Aos animais utilizados no laboratório, pois foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Ao CNPq, FAPEMIG e PRPq, obrigado pelo apoio financeiro.

Muito obrigado a todos que contribuíram para minha formação como pessoa e profissional. Serei eternamente grata.

---

## *SUMÁRIO*

---

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	09
<b>RESUMO</b> .....	10
<b>ABSTRACT</b> .....	12
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>HIPÓTESES</b> .....	16
<b>OBJETIVO</b> .....	16
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
1. <i>Células tronco mesenquimais e diferenciação osteogênica</i> .....	17
2. <i>Cafeína e seus efeitos sobre as células ósseas e suas precursoras</i> .....	29
3. <i>Etanol e seus efeitos sobre as células ósseas e suas precursoras</i> .....	22
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	26
<b>RESULTADOS</b> .....	31
<b>DISCUSSÃO</b> .....	38
<b>CONCLUSÃO</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41

---



---

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Colheita das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas (A, B e C). Células tronco mesenquimais da medula óssea cultivadas em meio de indiferenciação (D).....	22
Figura 2	Fotomicroscopia da redução do MTT em cristais de formazan (A) e média $\pm$ desvio padrão em culturas de CTM-MO de ratas controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05 (B).....	27
Figura 3	Fotomicroscopia da atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT (A) e média $\pm$ desvio padrão em culturas de CTM-MO de ratas controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05 (B).....	28
Figura 4	Síntese de colágeno (média $\pm$ desvio padrão) pela coloração de Sircol red em culturas de CTM-MO de ratas controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05.....	29
Figura 5	Fotomicroscopia da porcentagem de células/campo pela coloração de HE (A) e média $\pm$ desvio padrão em culturas de CTM-MO de ratas controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05 (B).....	30
Figura 6	Fotomicroscopia do número de nódulos/campo pela coloração de Von Kossa (A grupo controle, B grupo cafeína, C) grupo etanol e D grupo cafeína + etanol). Média $\pm$ desvio padrão em culturas de CTM-MO de ratas controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 21 dias de diferenciação osteogênica. *p < 0,05 (E).....	31

---

## RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da associação cafeína e etanol sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea de ratas. Foram utilizadas CTM da medula óssea de 3 ratas Wistar com 30 dias de idade. Após o cultivo em meio de indiferenciação e realização de citometria de fluxo para caracterização fenotípica das CTM, as mesmas foram cultivadas em meio osteogênico acrescido ou não de cafeína ou etanol constituindo-se quatro grupos experimentais: 1) controle diferenciado, 2) diferenciado com adição de 0,3mM de cafeína, 3) diferenciado com adição de 50mM de etanol e 4) diferenciado com associação cafeína/etanol (0,3mM de cafeína + 50mM de etanol). Foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno e porcentagem de células por campo aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. O número de nódulos mineralizados por campo foi contabilizado aos 21 dias de diferenciação. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 119/2016). Os dados foram submetidos a ANOVA com comparação das médias pelo teste SNK. Diferenças foram consideradas significativas se  $p \leq 0,05$ . Os grupos tratados com cafeína, etanol e associação de cafeína/etanol apresentaram menor conversão de MTT aos 7 e 14 dias em relação ao grupo controle. A associação cafeína/etanol não apresentou diferença quando comparada ao grupo cafeína, porém, promoveu menor redução quando comparada ao grupo etanol aos 14 e 21 dias. A atividade da fosfatase alcalina foi menor no grupo cafeína em relação ao controle em todos os períodos, diferentemente do grupo etanol que não apresenta diferença. A associação cafeína/etanol promoveu maior atividade de fosfatase alcalina em relação ao grupo cafeína aos 7 dias e redução da atividade da fosfatase alcalina aos 14 e 21 dias, quando comparado ao grupo etanol. A síntese de colágeno no grupo cafeína foi menor em relação ao controle, aos 14 e 21 dias e o grupo etanol apresentou menor síntese de colágeno em relação ao controle aos 21 dias. A associação cafeína/etanol promoveu redução na síntese de colágeno quando comparada aos grupos cafeína e etanol aos 14 dias. A porcentagem de células do grupo cafeína foi menor em relação ao controle aos 14 e 21 dias e o grupo etanol demonstrou redução da porcentagem de células em relação ao controle, somente aos 7 dias. A associação cafeína/etanol promoveu redução da porcentagem de células aos 7, 14 e 21 dias quando comparado aos grupos controle, cafeína e etanol. Os grupos cafeína e etanol apresentaram menor número de nódulos em relação ao controle e em relação ao grupo associação

cafeína/etanol. Este, apresentou número de nódulos mineralizados semelhante ao controle. Conclui-se que a cafeína e o etanol nas doses de 0,3mM e 50mM respectivamente, promovem redução da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea o que não foi visto na associação cafeína/etanol que apresentou síntese de matriz mineralizada semelhante ao grupo controle apesar da menor celularidade.

Palavras chave: cafeína, células tronco, diferenciação osteogênica, etanol, rato

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of the caffeine and ethanol association on the osteogenic differentiation of bone marrow MSCs from rats. CTM from the bone marrow of 3 Wistar rats at 30 days of age were used. After cultivation in non-differentiation medium and flow cytometry for phenotypic characterization of the CTM, they were cultured in osteogenic medium with or without caffeine and ethanol, constituting four experimental groups: 1) differentiated control, 2) differentiated with addition of 0.3mM of caffeine, 3) differentiated with the addition of 50mM of ethanol and 4) differentiated with caffeine/ethanol association (0.3mM caffeine + 50mM ethanol). The conversion of MTT to formazan crystals, alkaline phosphatase activity by BCIP/NBT method, collagen production by the Sircol red method and number of cells per field at 7, 14 and 21 days of differentiation were performed. The number of mineralized nodules per field evaluated by the Von Kossa staining was counted at the 21 days of differentiation. The procedures were approved by the Comitê de Ética em Experimentação Animal of UFMG (protocol 119/2016). Data were submitted to ANOVA with means comparison by SNK test. Differences were considered significant if  $p \leq 0.05$ . The groups treated with caffeine, ethanol, and caffeine/ethanol showed higher MTT conversion at 7 and 14 days compared to the control group. The caffeine ethanol association did not show any difference when compared to the caffeine group, however, it promoted a lower reduction when compared to the ethanol group at 14 and 21 days. Alkaline phosphatase activity was lower in the caffeine group in relation to the control in all periods, differently the ethanol group where there was no difference. The caffeine/ethanol association promoted greater alkaline phosphatase activity in relation to the caffeine group at 7 days and a reduction in alkaline phosphatase activity at 14 and 21 days when compared to the ethanol group. The collagen synthesis in the caffeine group was lower in relation to the control at 14 and 21 days, and the ethanol group presented lower synthesis of collagen in relation to the control at 21 days. The caffeine/ethanol association promoted reduction in collagen synthesis when compared to caffeine and ethanol groups at 14 days. The percentage of cells in the caffeine group was lower in relation to the control at 14 and 21 days, and the ethanol group showed a reduction of the percentage of cells in relation to the control at 7 days. The caffeine/ethanol association promoted reduction of the percentage of cells at 7, 14 and 21 days when compared to the control,

caffeine and ethanol groups. The caffeine and ethanol groups presented lower numbers of nodules in relation to the control and in relation to the caffeine/ethanol association group. This presented a number of mineralized nodules similar to the control. It was concluded that caffeine and ethanol at doses of 0.3 mM and 50 mM respectively promoted a reduction in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, which was not seen in the caffeine/ethanol association that presented similar mineralized matrix synthesis to the group control despite the lower cellularity

.

Key words: caffeine, stem cells, osteogenic differentiation, ethanol, mouse

## INTRODUÇÃO

O osso é um tecido metabolicamente dinâmico e sua higidez depende do equilíbrio entre os processos anabólico (aposição) e catabólico (reabsorção). Sabe-se que vários fatores e substâncias influenciam o metabolismo ósseo (Rubin e Lanyon, 1987; Raisz, 1999; Bland, 2000) podendo causar desequilíbrios entre os dois processos promovendo diminuição da massa óssea o que caracteriza as doenças osteopênicas (Serakides, 2016). O processo anabólico é dependente não só da atividade osteoblástica, mas também da diferenciação das células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea em células osteoprogenitoras (Serakides, 2016). Assim, qualquer substância que diminua o potencial de diferenciação osteogênica das CTM influencia diretamente a massa óssea devido a redução na síntese de osteóide.

Duas substâncias ingeridas frequentemente na dieta de grande parte da população humana vêm sendo associadas a doenças osteopênicas em indivíduos jovens e adultos são elas a cafeína e o etanol (Alghadir et al., 2015).

A cafeína compromete o tecido ósseo desde sua formação na vida pré-natal se consumida por mulheres gestantes até na vida adulta. Essa substância tem sido muito estudada por ser um alcalóide natural amplamente consumido por homens e mulheres, inclusive no período gestacional (Dews, 1982; Reissig et al., 2009). Esse composto passa para a prole através da placenta e do leite (Tyrala e Dodson, 1979) podendo causar alterações teratogênicas nos ossos de fetos (Scott, 1983) e alterações no crescimento ósseo endocondral, bem como redução da massa óssea em indivíduos jovens e adultos (Huang et al., 2002; Tan et al., 2012; Reis et al., 2014). Sabe-se que a cafeína reduz a viabilidade de osteoblastos e aumenta a apoptose dos mesmos (Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010), além de diminuir a síntese protéica e a expressão de transcritos gênicos importantes para a osteogênese como colágeno, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, dentre outros (Tassinari et al., 1991; Zhou et al., 2010). Além disso, os efeitos negativos da cafeína sobre o osso, parecem ser decorrentes também de seu efeito no aumento da osteoclastogênese, o que promove redução da massa óssea (Liu et al., 2011).

O etanol é outra substância amplamente consumida por homens e mulheres por meio do consumo de bebidas alcoólicas (Neto et al., 2002; Dörrie et al., 2014). Em indivíduos adultos, os efeitos do consumo de etanol sobre o metabolismo ósseo estão relacionados ao

desenvolvimento de osteopenias sendo considerada, no homem, a principal causa de osteoporose até mesmo comparada ao hipogonadismo masculino (Neto et al., 2002). Acredita-se que o etanol aja de forma direta e indireta sobre as células ósseas e cartilaginosas (Day et al. 2002; Snow e Keiver, 2007). Diretamente, sabe-se que ele induz a reabsorção óssea, através da ativação e proliferação de osteoclastos contribuindo para o desenvolvimento de osteopenias (Cheung et al., 1995). Além disso, promove osteopenia devido a redução da atividade osteoblástica, sendo considerado um fator de risco para fraturas decorrentes da osteoporose (Spencer et al., 1986; Cheung et al., 1995).

Os efeitos negativos do consumo dessas substâncias sobre o metabolismo ósseo são comprovados (Tassinari et al., 1991; Day et al. 2002; Simpson et al., 2005; Snow e Keiver, 2007; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010) porém, os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem são pouco conhecidos. Estudos *in vitro* já demonstraram que, tanto a cafeína quanto o etanol agem de forma dose dependente sobre os osteoblastos e sobre as células tronco mesenquimais (Friday e Howard, 1991; Klein, 1997; Chen et al., 2011; Reis et al., 2015; Reis et al., 2016).

As células tronco mesenquimais são células precursoras encontradas na medula óssea e em todos os tecidos adultos (Minguell et al., 2000). São células multipotentes capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares dentre elas, os osteoblastos (Friedenstein et al., 1974; Minguell et al., 2000). A adição de cafeína ou etanol em culturas de CTM inibe a diferenciação osteogênica reduzindo com isso a síntese de matriz (Grisso et al., 1991; Hernandez-Avila et al., 1991; Tassinari et al., 1991; Kreiger et al., 1992; Zhou et al., 2010). Em osteoblastos, a adição de etanol em culturas promove efeito tóxico para as células (Friday e Howard, 1991; Klein, 1997; Chen et al., 2011).

Os estudos têm avaliado o efeito isolado de ambas as substâncias sobre as células ósseas e sobre as células tronco tentando elucidar os mecanismos pelos quais a cafeína e o etanol agem no metabolismo ósseo. Não há estudos que avaliaram o efeito da associação cafeína e etanol sobre o potencial osteogênico das células tronco mesenquimais em células osteoprogenitoras. O estudo da associação de ambas as substâncias sobre a capacidade de diferenciação das CTM

em células osteoprogenitoras é pertinente uma vez que o consumo concomitante de cafeína e etanol é muito frequente tanto na população em geral quanto em mulheres gestantes.

### **HIPÓTESES**

- A adição isolada de cafeína e etanol nas concentrações de 0,3mM e 50mM, respectivamente em culturas de células tronco mesenquimais de ratas promove redução da capacidade de diferenciação osteogênica das mesmas.
- A associação etanol e cafeína potencializa a da diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de ratas quando comparado ao efeito isolado de cada substância.

### **OBJETIVO**

- Estudar o efeito *in vitro* do etanol e da cafeína de forma isolada e associada no potencial de diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais de ratas por meio dos ensaios de conversão de MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT, síntese de colágeno pela coloração de Sircol red, porcentagem de células por campo pela coloração de HE e síntese de matriz mineralizada pela coloração de Von Kossa.



## REVISÃO DE LITERATURA

### *Células tronco mesenquimais e diferenciação osteogênica*

As células tronco mesenquimais também conhecidas como células tronco esqueléticas, células estromais da medula óssea, e ainda células estromais mesenquimais multipotentes (Horwitz et al., 2005) são células indiferenciadas capazes de se auto renovarem (Shenfield et al., 2002), ou seja, são capazes de se multiplicar mantendo o seu estado indiferenciado. A CTM é um tipo de célula tronco adulta que pode ser facilmente isolada e expandida *in vitro* (Wolfgang e Ho, 2007). Elas podem ser isoladas, em quantidades variáveis, de diversas fontes como sangue periférico, fígado (Liu et al., 2016), pâncreas (Mayhall et al., 2004), vasos sanguíneos, coração (Beltrami et al., 2003), sistema nervoso central, pele (Gurevitch et al., 2003; Pombero et al., 2016), trato gastrointestinal (Presnell et al., 2002), sistema nervoso periférico, córnea, retina (Grove et al., 2004), músculo esquelético (Jiang et al., 2002), membrana sinovial (Luyten, 2004), sangue do cordão umbilical, placenta (Bobis et al., 2006), tecido adiposo e medula óssea (Murphy et al., 2003), dentre outros. A medula óssea é considerada um dos principais sítios de CTM devido à maior quantidade e facilidade de obtenção dessas células (Payushina et al., 2006).

As CTM são células formadoras de colônias uma vez que apresentam, em cultura, características morfológicas semelhantes a fibroblastos (Fridenstein et al., 1974). Elas possuem capacidade de emitir prolongamentos e secretar matriz extracelular que permitem a sua adesão à superfícies plásticas (Kraus e Kirker-Head, 2006; Bydlowski et al., 2009; Lin et al., 2013). De acordo com a *International Society for Cellular Therapy*, para ser considerada uma célula tronco mesenquimal, a mesma precisa apresentar características de aderência seletiva à superfície plástica, expressar um conjunto de marcadores de superfície como CD105, CD73 e CD90 e não expressar CD34, CD45, CD14, ou CD11b, CD79, ou CD19 e HLA-DR. Além disso, a célula precisa ter a capacidade de se diferenciar, quando estimuladas, em células das linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica (Horwitz et al., 2005; Abdallah et al., 2008).

As CTM fornecem células osteoprogenitoras em um processo conhecido como diferenciação osteogênica e os fatores que estimulam esta diferenciação tanto *in vivo* quanto *in vitro* vêm sendo estudados. Esses fatores são sinais celulares internos e externos representados por genes, substâncias secretadas por outras células, pelo contato físico com as células vizinhas e pelo microambiente (Iglézias, 2004). *In vitro*, a diferenciação da CTM em células osteoprogenitoras é dependente do meio de cultura e está relacionada a adição de substâncias importantes para a síntese e mineralização da matriz óssea (Pittenger et al., 1999; Kraus e Kirker-Head, 2006). Primeiramente, para o cultivo das células indiferenciadas, utiliza-se o meio de cultura básico *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) baixa glicose acrescido de antibióticos, antimicóticos e 10% de soro fetal bovino (SFB). Para promover a diferenciação osteogênica acrescenta-se a esse meio, dexametasona,  $\beta$ -glicerofosfato e ácido ascórbico. Estas substâncias são importantes para a síntese de colágeno I (principal componente da matriz representando 90% da mesma), para a expressão das proteínas não colagênicas como osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea e para a mineralização da matriz. Assim, o processo de diferenciação é dividido em três etapas: 1) proliferação, 2) maturação da matriz extracelular e 3) mineralização. A dexametasona atua na fase inicial da diferenciação (Panetta et al., 2009), enquanto o  $\beta$ -glicerofosfato e o ácido ascórbico em fases mais tardias onde ocorre a mineralização da matriz extracelular (Bellows et al., 1992; Bruder et al., 1998; Aubin, 2001; Payushina et al., 2006). O ácido ascórbico é um co-fator na hidroxilação dos resíduos de lisina e de prolina do colágeno I, aumentando a síntese de proteínas não colagênicas da matriz (Payushina et al., 2006, Tuan et al., 2008) e o  $\beta$ -glicerofosfato age na mineralização da mesma.

Durante o processo de diferenciação das células osteoprogenitoras, são identificados genes associados ao estágio proliferativo como *c-fos*, *c-myc* (Liu et al., 2003) e *c-jun* (Stein et al., 1993), caracterizando a primeira fase da diferenciação, enquanto na diferenciação propriamente dita há expressão de genes como colágeno I, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (Liu et al., 2003). Sabe-se que 10% da matriz óssea orgânica consiste de proteínas não colagênicas produzidas por osteoblastos; dentre elas tem-se a osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea (Roach, 1994). Por estarem presentes nas periferias das regiões de matriz óssea neoformada, acredita-se que a osteopontina e a sialoproteína óssea sejam importantes iniciadoras do processo de mineralização óssea sendo,

portanto, marcadores precocemente encontrados durante a diferenciação osteogênica (Roach, 1994). A sialoproteína óssea age como nucleadora dos cristais de hidroxiapatita e a osteopontina previne a precipitação prematura dos cristais de fosfato de cálcio na matriz colagênica (Doi et al., 1992). Já a osteocalcina e a osteonectina se encontram dispersas no osteóide sendo consideradas importantes no processo de progressão da mineralização sendo encontradas mais tardiamente no processo de diferenciação (Roach, 1994). *In vitro*, a presença de matriz mineralizada se dá pela formação dos nódulos de mineralização.

*In vivo*, uma vez diferenciadas em osteoblastos, esses sintetizam a matriz óssea em um processo anabólico conhecido como aposição. A matriz vai sendo gradativamente reabsorvida pelos osteócitos em um processo catabólico denominado reabsorção (Serakides, 2016). Este *turnover* faz com que o tecido ósseo seja metabolicamente dinâmico e o equilíbrio entre os dois processos, influencia diretamente na massa óssea do indivíduo (Serakides, 2016). Assim, fatores, condições ou substâncias ingeridas que interfiram direta ou indiretamente na diferenciação das CTM em células osteoprogenitoras ou na aposição e/ou reabsorção ósseas podem influenciar a massa óssea de um indivíduo e causar osteopenias caracterizadas por redução da massa óssea.

Duas substâncias ingeridas frequentemente na dieta de grande parte da população humana vem sendo associadas a doenças ósseas em indivíduos jovens e adultos, são elas a cafeína e o etanol e, estudos *in vivo* e *in vitro* tem tentado elucidar os mecanismos pelos quais estas substâncias interferem com o metabolismo ósseo (Tassinari et al., 1991; Day et al. 2002; Simpson et al., 2005; Snow e Keiver, 2007; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010; Reis et al., 2015; Reis et al., 2016).

### ***Cafeína e seus efeitos sobre as células ósseas e suas precursoras***

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcalóide natural, farmacologicamente ativo que está presente em café, chás, refrigerantes, energéticos, chocolates, plantas e medicamentos, dentre outros (Putnam et al., 2007; Heckman et al., 2010; Su et al., 2013) sendo um composto muito consumido pela população humana de diversas faixas etárias (Putnam et al., 2007; Su et al., 2013).

Após a ingestão, a cafeína sofre desmetilação, no fígado, por meio da citocromo P-450 (CYP) (Arnaud et al., 2011) dando origem aos principais metabólitos como a teobromina, a paraxantina e a teofilina e quantidades vestigiais de ácido 1,3,7-trimetilúrico (Soares e Fonseca, 2004; Souza e Sichieri, 2005). Em ratos, origina-se predominantemente a teobromina através da 8-hidroxilação, enquanto que em humanos origina-se a paraxantina por meio da 3-N-desmetilação (Eteng et al., 1997, Klebanoff et al., 1999). Em ambas as espécies, a desmetilação é catalisada pela enzima CYP1A2 (Kot e Daniel, 2007; Kot e Daniel, 2008). Devido ao seu caráter lipossolúvel, a cafeína atravessa todas as membranas biológicas incluindo as barreiras hematoencefálica e a placentária (Maickel e Snodgrass, 1973), distribuindo-se em todos os fluidos corporais até mesmo no líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, plasma e na urina dos neonatos (Fernandes et al., 1988).

Resumidamente, a ação da cafeína se deve ao antagonismo dos receptores de adenosina e rianodina. Os receptores para adenosina são expressos em células tronco mesenquimais (Gharibi et al., 2011) e em células osteoprogenitoras (Evans et al., 2006) e exercem sua ação via sinalização por AMP cíclico (Carroll et al., 2013). Além disso, a cafeína também promove a liberação de cálcio e regula a atividade transcricional do Runx-2 e Sox-9 (Zhou et al., 2009; Ribeiro e Sebastião, 2010). Já os receptores de rianodina, pouco se sabe sobre o seu envolvimento nas alterações provocadas pela cafeína sobre a osteogênese, mas sabe-se que esses receptores mediam canais de cálcio e esses são importantes na remodelação óssea (Fill e Copello, 2002). A ação da cafeína sobre as células pode ser também, por mecanismos indiretos uma vez que ela modula receptores para vitamina D, glicocorticóides, insulina, estrógeno e andrógeno, glutamato e os receptores adrenérgicos (Shi et al., 1993; Ogata et al., 2000; Rauch et al., 2010; Egawa et al., 2011; Xu et al., 2012; Melville et al., 2014; Wang et al., 2014). Entretanto, o real papel desses receptores em modular o efeito da cafeína sobre as células ósseas é pouco conhecido.

*In vivo*, os efeitos da cafeína sobre as células podem ser desencadeados por via direta e/ou indireta envolvendo o próprio alcalóide ou os produtos de seu metabolismo (Bergman et al., 1990; Rapuri et al., 2007); diferentemente do *in vitro* onde os efeitos da cafeína sobre as células são decorrentes do alcalóide. Estudos têm demonstrado os efeitos adversos do consumo de cafeína sobre vários órgãos e sistemas incluindo o sistema esquelético (Cummings et al., 1995;

Meyer et al., 1997; Polikeit et al., 2004; Putnam et al., 2007; Su et al., 2013). No osso, a cafeína é considerada um fator de risco para a osteoporose (Kamagata-Kiyoura et al., 1999) devido ao seu efeito direto sobre a viabilidade e a atividade de síntese dos osteoblastos (Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010; Choi et al., 2016) e sobre a diferenciação das células precursoras (Liu et al., 2011; Reis et al., 2015). Além disso, este alcalóide é um agente causador de malformações fetais (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991), uma vez que compromete a síntese de matriz condrogênica e a atividade dos condrócitos na placa de crescimento comprometendo tanto a formação quanto o crescimento ósseo endocondrais (Reis et al., 2014; Choi et al., 2016). Entretanto, os mecanismos envolvidos nestas alterações ainda são pouco compreendidos.

Os efeitos da exposição à cafeína na formação óssea em cultura de osteoblastos expostas a doses de cafeína 0,1 mM, 0,2 mM ou 0,4 mM apresentou uma diminuição, dose dependente, dos níveis de osteocalcina, a atividade da fosfatase alcalina e os níveis totais de cálcio (Su et al., 2013). Fisiologicamente, alcançar um nível de cafeína no sangue de 2 mM exigiria o consumo simultâneo de mais de 100 xícaras de café (Bode e Dong, 2006).

Com o objetivo de elucidar o efeito direto da cafeína sobre as células ósseas, estudos *in vitro* com cultura de osteoblastos demonstraram que a adição de cafeína promove efeitos dose-dependentes. Concentrações de cafeína menores que 0,4 mM em culturas de osteoblastos não promoveram alterações relevantes na atividade das células (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). Em contrapartida, concentrações que variaram de 0,4 mM a 10mM promoveram morte de osteoblastos por apoptose e necrose, além de promover menor expressão de Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina e osteopontina (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). Observou-se também, redução na expressão de receptores para vitamina D podendo ser este, um dos mecanismos *in vivo* pelos quais a cafeína afeta o metabolismo ósseo, uma vez que a vitamina D participa do metabolismo do cálcio (Rapuri et al., 2007). Os efeitos da cafeína sobre o metabolismo ósseo podem ser decorrente também do fato dessa substância modular outros receptores, expressos tanto em osteoblastos quanto em células tronco, como para glicocorticóides, insulina, estrógeno e andrógeno (Costa et al., 2011 ; Sarobo et al., 2012). *In vivo*, altas doses de cafeína sobre o osso aumentou os níveis plasmáticos de cortisol (Tan et al.,

2012 ; Reis et al., 2014) e elevou a sensibilidade dos osteoblastos aos glicocorticoides ocasionando apoptose dos mesmos (Ogawa et al., 2002) uma vez que, culturas de osteoblastos tratadas com cafeína demonstraram aumento da atividade transcricional dos receptores para glicocorticóides (Föcking et al., 2005).

Sabe-se que outras substâncias quando consumidas concomitantemente à cafeína, influenciam as taxas de depuração e de eliminação da mesma aumentando ou diminuindo a sua meia ação cafeína e etanol atuação vida e um deste fatores é o etanol (George et al., 1986).

Comparando os efeitos farmacológicos da cafeína e do álcool torna-se evidente que a mistura álcool e cafeína podem ser uma combinação de medicamentosa com efeitos desejados, pois eles podem compensar mutuamente seus efeitos indesejados. Dessa forma, as propriedades de excitação da cafeína podem neutralizar os efeitos sonogênicos do álcool, enquanto os efeitos ansiolíticos do álcool podem ser neutralizados pelos efeitos ansiogênicos da cafeína. Vale ressaltar a cafeína promove o consumo voluntário de etanol em ratos machos ( Barré e Brien, 2011)

### ***Etanol e seus efeitos sobre as células ósseas e suas precursoras***

O etanol é uma substância química constituída por dois carbonos e um grupo hidroxila cuja fórmula química é  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$  (Maurel et al., 2011). É uma substância amplamente consumida por homens e mulheres por meio da ingestão de bebidas alcoólicas. De forma resumida, após a ingestão, o etanol é rapidamente e totalmente absorvido pela corrente sanguínea do tubo digestivo, principalmente do estômago e intestino delgado (Barre, 1982; Li e Bosron, 1987). Sua velocidade de absorção será dependente do tipo de bebida consumida, da concentração de etanol, do pH do meio e da presença ou não de alimento. Já no intestino, a velocidade de absorção independe desses fatores sendo geralmente uma absorção rápida e, por ser uma molécula pequena e solúvel tanto em meio aquoso quanto lipídico, atinge os tecidos sendo capaz de atravessar as membranas biológicas (Jones, 2011; Zelner e Koren, 2013).

De todo o etanol consumido, 90% será metabolizado no fígado e os 10% restantes serão eliminados na urina ou no suor (Jones, 2011). No fígado, sua metabolização ocorre por reações oxidativas catalisadas por enzimas podendo ocorrer por três vias (Li e Bosron, 1987). A

primeira via e a mais importante é a catalisada pela enzima citossólica álcool desidrogenase (ADH) (DiPadova et al., 1987). Ela converte o etanol a acetaldeído que por sua vez, será catalisado pela enzima mitocondrial aldeído desidrogenase (ALDH), resultando em acetato e NADH. Grande parte do acetato deixa o fígado e circula para os tecidos periféricos, onde será oxidado em Acetil CoA, que entrará no ciclo de Krebs originando dióxido de carbono e água (Lee et al., 2006). Sabe-se que existem diferentes isoformas de ADH e ALDH, codificadas por genes, isso poderia explicar a susceptibilidade individual quanto ao grau de degradação do etanol (Zelner e Koren, 2013). A segunda via de metabolização é a do sistema microssomal hepático de oxidação do etanol (MEOS) por meio da enzima CYP2E1 que envolve proteínas do complexo do citocromo P-450. Nessa via, há consumo de NADPH e  $O_2$ , produzindo  $H_2O$  e radicais livres. Ela oxida cerca de 10 a 20% do etanol ingerido (Deng et al., 2008). A terceira via é a da catalase encontrada na fração peroxisomal utilizada em menor escala quando há necessidade de reduzir peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e, diferentemente das outras, não produz NADH (Deng et al., 2008).

Nas três vias, ocorre formação de acetaldeído que por ser tóxico pode estar envolvido em desnaturação de proteínas, peroxidação lipídica e aumento dos radicais livres. Além disso, interfere na cadeia transportadora de elétrons causando alterações mitocondriais e inibindo processos de reparação do DNA (Addolorato et al., 1997).

Em indivíduos adultos, os efeitos do consumo de etanol sobre o metabolismo ósseo estão relacionados ao desenvolvimento de osteopenias sendo considerada, no homem, a principal causa de osteoporose até mesmo comparada ao hipogonadismo masculino (Neto et al., 2002). Gong et al., 2004 demonstraram que a massa óssea de indivíduos jovens alcoólatras era comparável à de mulheres idosas na menopausa. Sabe-se que o consumo de álcool, promove osteopenia devido à redução da atividade osteoblástica, sendo considerado um fator de risco para fraturas decorrentes da osteoporose (Spencer et al., 1986; Cheung et al., 1995). Apesar dos efeitos negativos do etanol sobre o metabolismo ósseo serem comprovados, os mecanismos pelos quais esses efeitos ocorrem são pouco conhecidos. Acredita-se que o etanol aja de forma direta e indireta sobre as células ósseas e cartilaginosas, além de agir sobre as células osteoprogenitoras derivadas das células tronco mesenquimais. Diretamente, sabe-se que o etanol induz a reabsorção óssea, através da ativação e proliferação de osteoclastos contribuindo

para o desenvolvimento de osteopenias (Cheung et al., 1995). Dai et al., 2000 demonstraram que o etanol induz a expressão do gene da IL-6 em linhagem de células estromais da medula óssea. Sabe-se que IL-6 tem a capacidade de induzir osteoclastogênese e conseqüentemente perda óssea (Keller et al., 1997). Assim, o aumento da osteoclastogênese induzido pelo etanol pode ser mediado por citocinas devido ao aumento da expressão de IL-6, que por sua vez induz a expressão RANKL (Dai et al., 2000).

Além disso, estudos demonstram que o álcool suprime a osteogênese por comprometer o recrutamento das células da linhagem osteoblástica da medula óssea reduzindo com isso a síntese de matriz (Grisso et al., 1991; Hernandez-Avila et al., 1991; Kreiger et al., 1992). Estudos *in vitro*, demonstram também que a adição de etanol (Friday e Howard, 1991; Klein, 1997; Chen et al., 2011) e acetaldeído em culturas de osteoblastos e em cultura de células da medula óssea promove efeito tóxico para as células, diminuindo a síntese de osteóide e a diferenciação em células osteoprogenitoras, respectivamente (Giuliani et al., 1999; Gong e Wezeman et al., 2004; Chen et al., 2017).

Acredita-se que o etanol possa influenciar indiretamente o metabolismo ósseo também por vias que envolvam ações hormonais como leptina (Maurel et al., 2011; Ronis et al., 2011), hormônio de crescimento (Turner et al., 2010; Maurel et al., 2011), vitamina D (Griffiths et al., 1993; Maurel et al., 2011) e os esteróides sexuais (Emanuele e Emanuele, 1997).

A leptina, secretada pelos adipócitos, é mediadora da relação entre o tecido adiposo e o osso. Está envolvida na regulação da ingestão de alimentos e do peso corporal por agir no sistema nervoso central. Também apresenta efeito anabólico sobre o osso, estimulando a diferenciação de células tronco em osteoblastos. Pesquisas apontam que o consumo de etanol diminui as concentrações de leptina em homens e ratos (Maurel et al., 2011; Ronis et al., 2011), diminuindo a osteoblastogênese e aumentando a adipogênese. Cui et al., 2006 utilizando tratamento com etanol nas concentrações de 0,09, 0,15 e 0,21 mol/L observou diminuição da osteogênese e aumento da adipogênese na medula óssea.

Já o hormônio do crescimento (GH) é um importante regulador fisiológico do crescimento ósseo e desempenha importante papel na regulação da remodelação óssea em adultos (Serakides, 2016). *In vitro*, osteoblastos e condrócitos tratados com GH aumentam sua



proliferação (Menagh et al., 2010). Muitas das ações do GH nas células são mediadas pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), que apresenta sua concentração diminuída após o consumo crônico de etanol (Turner et al., 2010; Maurel et al., 2011).

O consumo crônico de etanol pode levar à diminuição nos níveis séricos de vitamina D resultando em má absorção de cálcio no intestino e levando a baixos níveis de cálcio sérico (Griffiths et al., 1993; Maurel et al., 2011). Como a reabsorção óssea é fonte de aquisição de cálcio, os níveis de vitamina D baixos no alcoolismo podem estar relacionados ao aumento da reabsorção óssea comprometendo ainda mais a massa óssea (Serakides, 2016).

O consumo elevado de etanol apresenta efeitos supressores no eixo hipotalâmico-gonadal em homens e mulheres (Emanuele e Emanuele, 1997). Mulheres alcoólatras e ratas tratadas com álcool apresentam níveis de estradiol plasmático reduzido o que interfere negativamente na diferenciação das células tronco mesenquimais em células osteoprogenitoras, bem como no aumento da osteoclastogênese e consequentemente perda óssea (Martin et al., 2007; Maurel et al., 2011).

Embora os efeitos negativos da cafeína e do etanol sobre o metabolismo ósseo sejam comprovados, os mecanismos pelos quais esses efeitos são promovidos, são pouco compreendidos. Sabe-se que os efeitos são dose e período dependentes e que muitos são decorrentes de efeitos diretos e indiretos das substâncias e/ou de seus metabólitos. O consumo da associação de cafeína e do etanol é uma constante na população humana incluindo mulheres gestantes e lactantes, seja pelo consumo de drogas e/ou bebidas que contenham ambas as substâncias. Estudar o efeito isolado e da associação é pertinente uma vez que os efeitos adversos podem acompanhar o indivíduo por toda a vida além de ser transferido para a descendência por meio da epigenética.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto utilizou as bases físicas e a infraestrutura dos seguintes laboratórios: 1) Núcleo de Cultivo de Células Tronco e Terapia Celular do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (DCCV) da Escola de Veterinária da UFMG e 2) Laboratório de Experimentação Animal do DCCV. As ratas foram provenientes do Biotério Central da UFMG.

### Extração, cultivo e caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais

Foram utilizadas células tronco mesenquimais da medula óssea de 3 ratas Wistar com 30 dias de idade provenientes do grupo controle do projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 119/2016). Em resumo, os fêmures e as tíbias de todos os animais foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica. Fragmentos de cartilagem foram imediatamente colhidas das extremidades distal e proximal destes ossos com auxílio de um estereomicroscópio. Para obtenção da medula óssea da diáfise, os fragmentos ósseos foram lavados no fluxo laminar. A medula óssea foi lavada com DMEM (Gibco, USA) enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L) (Sigma, USA). Após centrifugação por 10 minutos a 1400g do lavabo, as células foram cultivadas em garrafas T75 contendo DMEM baixa glicose enriquecido com antibiótico e antimicótico e 10% de soro fetal bovino (Soral, Brasil) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24h as células foram lavadas com PBS (solução tampão de fosfato padrão) para remoção das células não aderidas. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

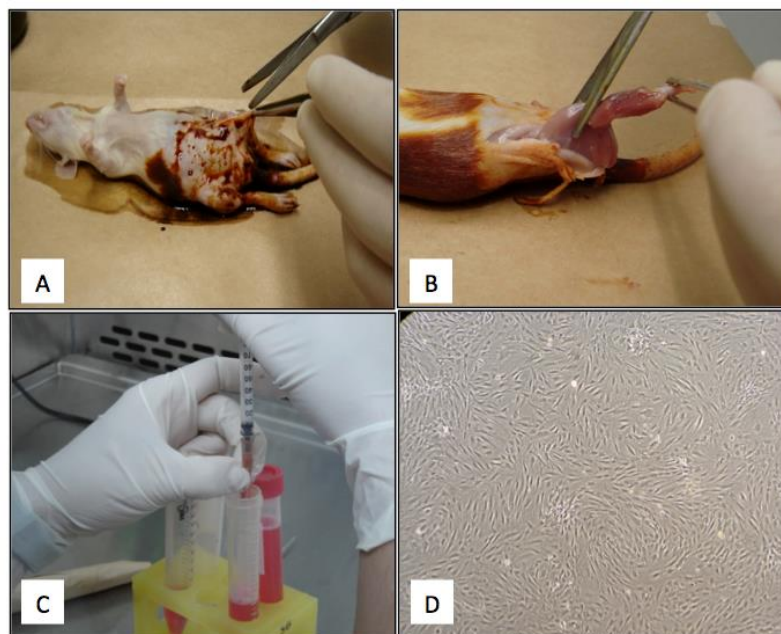


Figura 1. Colheita das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas: Tricotomia e antissepsia na capela com fluxo laminar (A). Isolamento e dissecação dos tecidos musculares e conectivos adjacentes dos membros posteriores (B). Camadas de cartilagem da articulação fêmuro-tíbio-patelar e da cabeça do fêmur colocadas em tubo Falcon contendo meio de cultivo DMEM (C). Células tronco mesenquimais da medula óssea cultivadas em meio de indiferenciação (D).

#### Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas

Células cultivadas até a terceira passagem em DMEM foram tripsinizadas e centrifugadas a 1400g por 10 minutos. As células foram ressuspensas em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células em PBS 0,15M e transferidas para placas de 96 poços com anticorpo primário por 30 minutos a 4°C. As células foram lavadas com PBS 0,15M e incubadas com anticorpo secundário com conjugado fluorescente (AlexaFluor 488, Molecular Probes, OR, USA) por 30 minutos a 4°C. As amostras foram analisadas utilizando-se citômetro FACScan (Becton Dickinson, NY, USA) e os dados analisados utilizando Cellquest software Becton Dickinson. Os seguintes anticorpos primários foram utilizados: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD54 (clone 1A29 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

#### Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em meio osteogênico acrescido ou não de etanol e/ou cafeína

Após o cultivo em DMEM e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, o meio foi substituído por meio osteogênico que é enriquecido com vitamina C (50 µg/mL), β glicerofosfato (10 mM), dexametasona (0,1 µM) e 10% de soro fetal bovino, sendo que as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Dependendo do tipo de associação, 1x10<sup>4</sup> células foram cultivadas, em sextuplicata, em placas de 24 poços e 3x10<sup>4</sup> células em placas de 6 poços com meio osteogênico acrescido ou não de etanol e/ou cafeína durante 7, 14 e 21 dias. Os meios foram trocados a cada 2 dias. Foram constituídos quatro grupos experimentais: 1) controle diferenciado, 2) diferenciado com adição de 0,3mM de cafeína, 3) diferenciado com adição de 50mM de etanol e 4) diferenciado com associação cafeína/etanol (0,3mM de cafeína +50mM de etanol). Foram realizados os testes de conversão do MTT em cristais de formazan, atividade de fosfatase alcalina pelo método BCIP/NBT, produção de colágeno pelo método do Sircol red e porcentagem de células por campo aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação. O número de nódulos mineralizados por campo avaliados pela coloração de Von Kossa foi contabilizado aos 21 dias de diferenciação.

#### Teste da conversão do MTT em cristais de formazan

O ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) é um método colorimétrico quantitativo e qualitativo que mensura o estado oxidativo da mitocôndria. As células viáveis convertem o dimetiltiazol (MTT) em cristais de formazan (insolúveis em água), através de enzimas presentes nas mitocôndrias. Portanto, a quantidade de formazan é diretamente proporcional ao metabolismo celular (Mosmann, 1983).

Ao término de 7, 14 e 21 dias de diferenciação, as células foram submetidas ao teste de conversão do MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]*} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com ou sem cafeína e etanol e 170µL de MTT (5mg/mL) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS-10% HCl que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na

leitora de placas com comprimento de onda de 595nm. O teste foi realizado em sextuplicata e foram calculados a média e desvio padrão para cada grupo.

#### Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (BCIP/NBT)

A atividade da fosfatase alcalina (FA) pelas células pode ser medida através do ensaio BCIP-NBT (*5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate - nitroblue tetrazolium*). BCIP-NBT é usado como substrato para a enzima fosfatase alcalina. A FA cliva o grupo fosfato do BCIP produzindo uma coloração azulada e um próton, que por sua vez reduz o NBT. A redução do NBT produz um precipitado insolúvel de cor púrpura.

Ao término de 7, 14 e 21 dias de diferenciação, as células foram lavadas com PBS 0,15M. Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIP/NBT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foram adicionados 210µL de solução detergente SDS 10% HCl para incubação *overnight*. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm. O teste foi realizado em sextuplicata e foram calculados média e desvio padrão para cada grupo.

#### Síntese de colágeno (Sircol Red)

A dosagem do colágeno foi realizada através de marcação com *SIRCOL Collagen Assay* (Biocolor). O corante (*Sirius Red*), é aniônico, com grupos de cadeias laterais de ácido sulfônico, que reagem com grupos de cadeias laterais dos aminoácidos presentes no colágeno. Esse corante tem a propriedade de se ligar seletivamente à sequência terminal do colágeno de mamíferos, composta por tripeptídeos [Gli-X-Y]. Esse ensaio não diferencia os tipos de colágeno entre si.

Em cada tempo experimental, as células foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas em 2mL de solução de Bouin por 2 horas em estufa 37°C. Em seguida as células foram lavadas em água corrente por 15 minutos e incubadas com 2mL/poço da solução de Sircol Red (0,6 mg de Sircol Red em 1 mL de ácido pícrico) a 37°C sob agitação. Após a incubação, as células foram lavadas com solução de HCl 0,01N para a remoção do corante não ligado e a marcação para colágeno foi visualizada em microscópio óptico. Em seguida, o colágeno foi dissolvido com 300µL de

solução de NaOH 0,5N por 30 minutos sob agitação e a dosagem do colágeno foi realizada em espectrofotômetro a 540nm. O teste foi realizado em sextuplicata e foram calculadas média e o desvio padrão para cada grupo.

#### Determinação da porcentagem de células/campo

Ao término de 7, 14 e 21 dias de diferenciação, as células foram fixadas em paraformoldeído 4% e submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (Prophet et al., 1992). A porcentagem de células/campo foi determinada em 8 campos/lamínula com objetiva de 10x utilizando uma grátícula, sobreposta à lamínula, com 121 pontos. A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

#### Síntese dos nódulos de mineralização pela coloração de Von Kossa

Aos 21 dias de cultivo, as células cultivadas em lamínulas foram fixadas em paraformoldeído 4% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (Prophet et al., 1992) para avaliação do número de nódulos mineralizados/campo. Somente os nódulos de coloração marrom ou negro foram quantificados. Foi determinado o número de nódulos em 8 campos em objetiva de 10x. A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

#### Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foi realizada a análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinadas a média e o desvio-padrão. As médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) utilizando o programa *GraphpadInstat 3.05* (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas

A caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea indicou que 96,94% das células não apresentaram expressão para CD45. Entretanto houve expressão para CD73, CD54, e CD90 em 93,99%, 95,10%, e 86,77% das células, respectivamente.

A diferenciação osteogênica foi confirmada pela mensuração da atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno e síntese e mineralização da matriz extracelular.

### Conversão do MTT em cristais de formazan

Os grupos tratados com cafeína, etanol e associação de etanol/cafeína apresentaram menor conversão de MTT em formazan aos 7 e 14 dias de diferenciação quando comparados ao grupo controle. Aos 21 dias, somente os grupos cafeína e associação cafeína/etanol tiveram menor conversão de MTT em relação ao controle. Em todos os períodos estudados, a associação etanol/cafeína não apresentou diferença significativa na conversão do MTT quando comparado ao grupo cafeína porém, a associação promoveu menor conversão quando comparado ao grupo que recebeu etanol tanto aos 14 dias quanto aos 21 dias de diferenciação (Fig. 2).

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

O grupo tratado com cafeína apresentou menor atividade de fosfatase alcalina quando comparado ao grupo controle em todos os períodos estudados, diferentemente do grupo que recebeu etanol onde não houve diferença significativa em relação ao grupo controle em nenhum tempo. Já a associação cafeína/etanol promoveu maior atividade de fosfatase alcalina em relação ao grupo cafeína aos 7 e 14 dias. Entretanto, quando comparado ao grupo etanol, a associação cafeína/etanol apresentou redução da atividade de fosfatase alcalina aos 14 e 21 dias e aos 21 dias quando comparado ao controle (Fig. 3).

### Síntese de colágeno (Sircol Red)

A síntese de colágeno observada nos grupo cafeína foi menor em relação ao controle aos 14 e 21 dias de diferenciação. Já as células que receberam etanol apresentaram menor síntese de

colágeno em relação ao controle somente aos 21 dias. A associação cafeína/etanol promoveu redução na síntese de colágeno quando comparada aos grupos cafeína ou etanol somente aos 14 dias (Fig. 4), sendo também menor aos 14 e 21 dias quando comparado ao grupo controle.

#### Porcentagem de células/campo

O grupo que recebeu cafeína apresentou redução da porcentagem de células quando comparado ao grupo controle aos 14 e 21 dias de diferenciação. O grupo etanol demonstrou redução da porcentagem de células em relação ao controle, somente aos 7 dias. A associação cafeína + etanol promoveu redução da porcentagem de células aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação quando comparado ao grupo controle e aos grupos cafeína e etanol isoladamente (Fig. 5).

#### Síntese dos nódulos de mineralização

Os grupos cafeína e etanol apresentaram menor número de nódulos em relação ao controle e em relação ao grupo associação cafeína/etanol. Este, apresentou número de nódulos mineralizados semelhante ao grupo controle (Fig. 6).



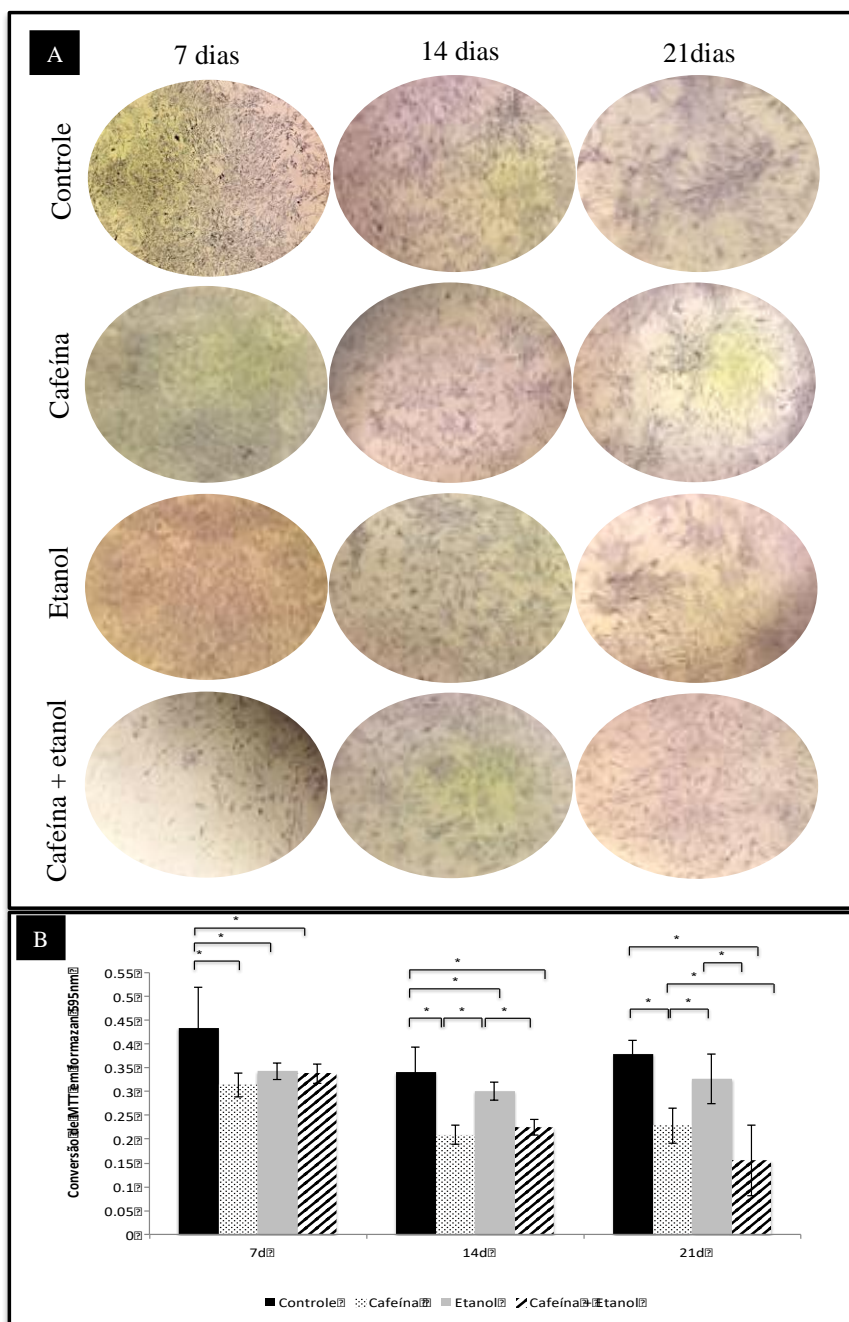


Figura 2. Redução do MTT em cristais de formazan (A) e média  $\pm$  desvio padrão em culturas de CTM-MO culturas tratadas e não tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$  (B).

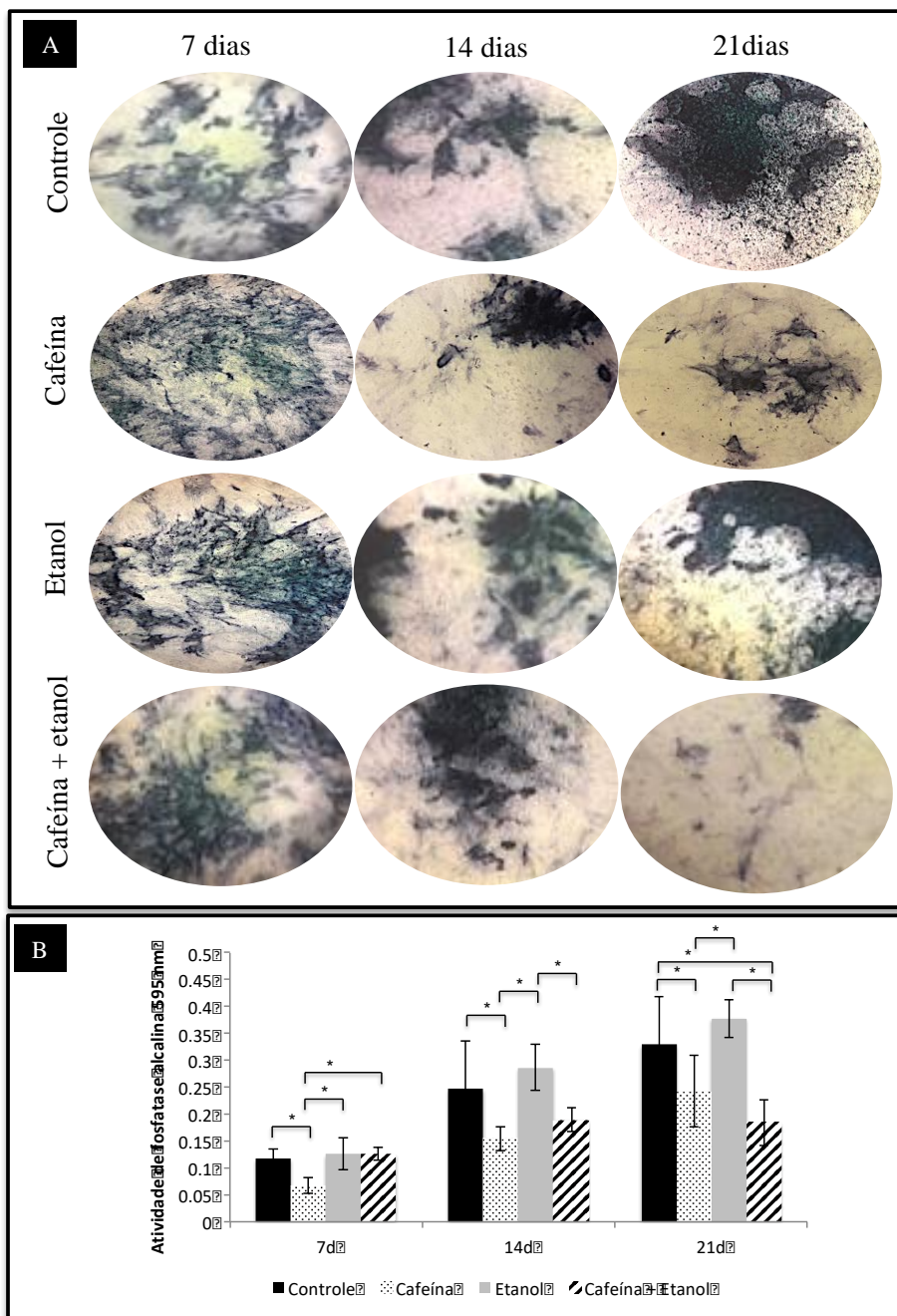


Figura 3. Atividade de fosfatase alcalina pelo método de BCIP/NBT (A) média  $\pm$  desvio padrão em culturas de CTM-MO culturas tratadas e não tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$  (B).

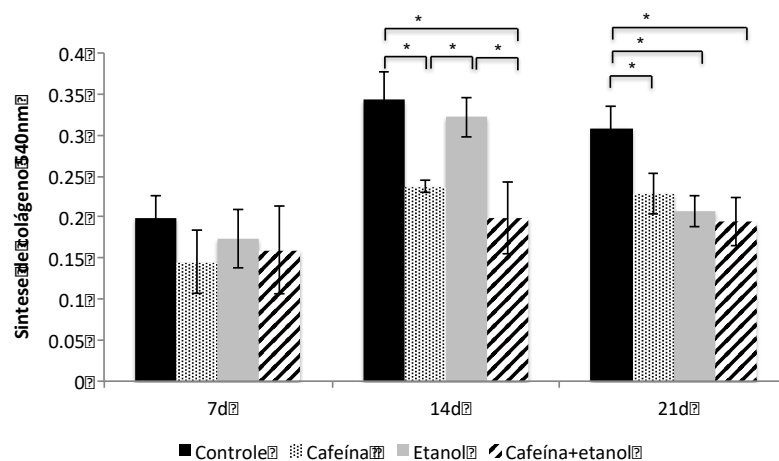


Figura 4. Síntese de colágeno (média  $\pm$  desvio padrão) pela coloração de Sircol red em culturas de CTM-MO culturas tratadas e não tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$ .

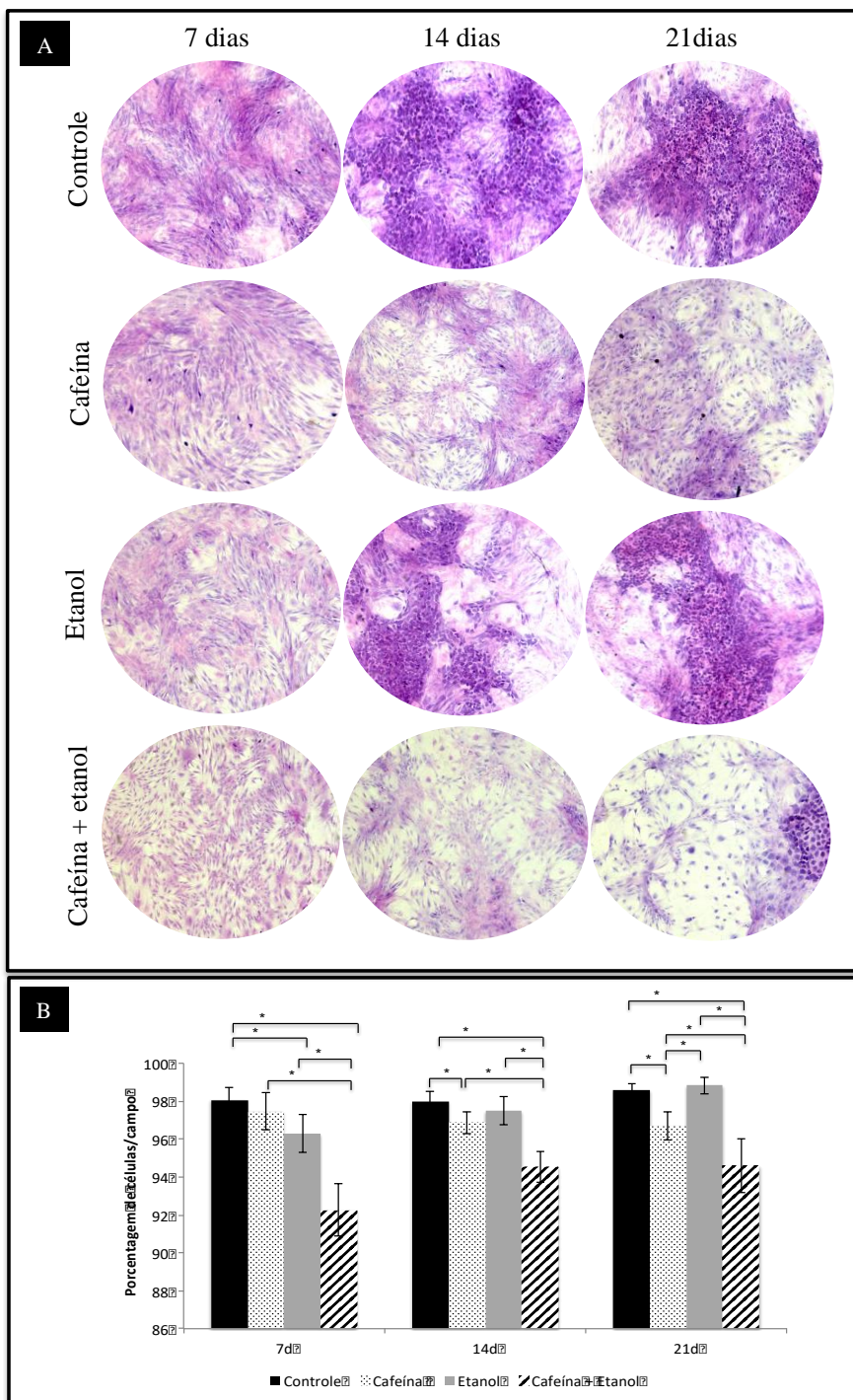


Figura 5. Porcentagem de células/campo pela coloração de HE (A) e média  $\pm$  desvio padrão em culturas de CTM-MO de ratos controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 7, 14 e 21 dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$  (B).

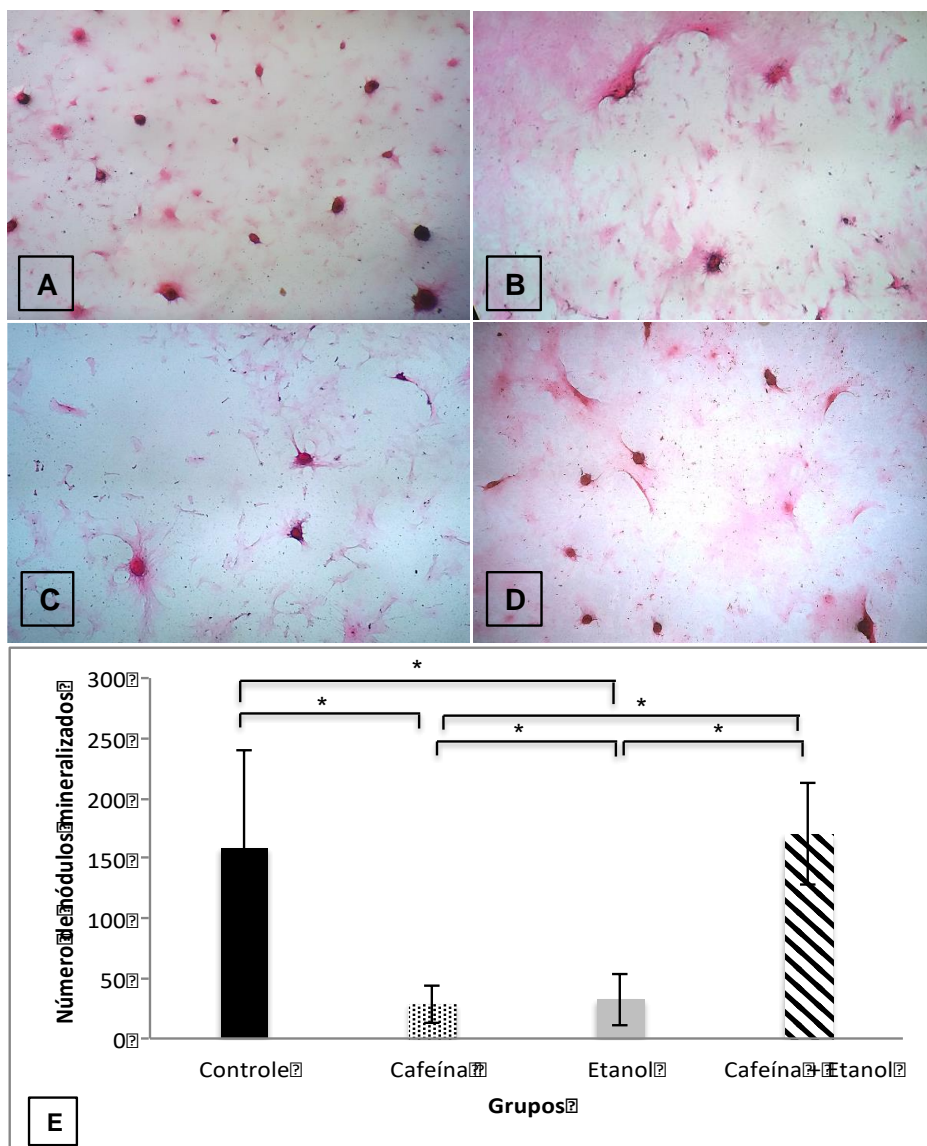


Figura 6. Fotomicroscopia do número de nódulos/campo pela coloração de Von Kossa (A grupo controle, B grupo cafeína, C) grupo etanol e D grupo cafeína + etanol) e média  $\pm$  desvio padrão em culturas de CTM-MO de ratas controle e tratadas com cafeína (0,3mM), etanol (50mM) e associação cafeína (0,3mM) + etanol (50mM) aos 21 dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$  (E).

## DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das células antes da diferenciação é fundamental para demonstrar o grau de pureza da cultura, pois a medula óssea pode apresentar CTM, células hematopoéticas (Bianco et al., 2001; Bobis et al., 2006) e fibroblastos (Ishii et al., 2005). As células hematopoéticas expressam, dentre outras moléculas, CD45 (Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006) que também pode ser expressa em fibroblastos (Ishii et al., 2005b). A molécula CD73 (Bobis et al., 2006) pode ser expressa tanto em fibroblastos quanto em CTM (Ishii et al., 2005a). Mas as moléculas CD90 (Bobis et al., 2006) e CD54 (Covas et al., 2003; Tocci e Forte, 2003) expressas em mais de 90% das células deste estudo não são expressas em fibroblastos e células hematopoéticas. Além disso, somente as CTM apresentam capacidade de diferenciação osteogênica (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006) que foi comprovada pela síntese de matriz mineralizada.

O ensaio de conversão de MTT em cristais de formazan é um método colorimétrico, quantitativo que envolve a habilidade de enzimas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis em converter o MTT em cristais de formazan (Mossmann, 1983). Considerando que o ensaio de MTT é dependente do metabolismo mitocondrial (Mossmann, 1983), esse ensaio reflete o estado funcional da cadeia respiratória. O grupo tratado com cafeína apresentou menor conversão de MTT em formazan em todos os períodos estudados. Três hipóteses podem ser apontadas para explicar esse resultado: a primeira é que as CTM dos animais tratados com cafeína têm sua viabilidade diminuída quando cultivadas em meio de diferenciação osteogênico, a segunda seria a diminuição da atividade enzimática mitocondrial e a terceira, maior diferenciação das CTM em osteoblastos. A primeira hipótese ganha força uma vez que a porcentagem de células por campo foi significativamente menor nesse grupo quando comparado ao controle aos 14 e 21 dias de diferenciação. Essa redução da porcentagem de células pode ter sido decorrente do efeito da cafeína em promover apoptose e/ou necrose. Estudos demonstraram que a adição de cafeína em culturas de osteoblastos promoveu ativação irreversível da cascata de morte celular dependente de mitocôndrias por necrose e/ou apoptose (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Lu et al., 2008). A segunda e terceira hipóteses podem ser refutadas, pois embora espera-se que com o avançar da diferenciação ocorra maturação celular e com isso haja diminuição da atividade mitocondrial, os outros parâmetros

de diferenciação osteogênica como atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno e produção de matriz mineralizada foram significativamente menores o que demonstra que a cafeína promoveu redução do número de células e menor diferenciação osteogênica das CTM. Sabe-se que o efeito da cafeína sobre a cultura de osteoblastos (Reis et al., 2015) e de células tronco mesenquimais é dose e período dependentes (Reis et al., 2016) assim como os efeitos são variados em se tratando de estudos *in vivo* e *in vitro*. *In vitro*, efeitos benéficos da cafeína sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais foram descritos com a utilização de baixas concentrações da substância (0,1mM) que promoveu aumento da atividade de fosfatase alcalina e da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, RUNX-2 além de aumentar a síntese de matriz mineralizada. Enquanto, doses iguais ou superiores de 0,3mM suprimiram a diferenciação (Su et al., 2013), semelhante ao que foi observado no presente estudo. Os estudos *in vitro*, por promoverem um microambiente, se limitam a avaliação do efeito direto da substância sobre a célula não permitindo avaliar os efeitos de seus metabólitos e da relação intrínseca e extrínseca com outros fatores presentes *in vivo*. A menor atividade de fosfatase alcalina observada no grupo cafeína já aos 7 dias de cultivo em meio osteogênico, indica que a cafeína age precocemente no processo de diferenciação osteogênica uma vez que essa enzima, é um marcador precoce da diferenciação (Bruder et al., 1998). A menor síntese de nódulos mineralizados neste grupo quando comparado ao controle, foi decorrente não só da menor porcentagem de células por campo, mas da menor síntese de colágeno. O colágeno constitui 90% da matriz osteóide sendo a restante construída pelas proteínas não colagênicas como osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea que são essências para a mineralização da matriz (Tsuang et al., 2006; Moiola et al., 2007). Embora a expressão das proteínas não colagênicas não tenham sido avaliadas no presente estudo, outros pesquisadores já demonstraram o efeito negativo da cafeína sobre a expressão das mesmas (Su et al., 2013) o que pode ter contribuído para a menor síntese de nódulos mineralizados observada no presente estudo.

Já os efeitos da adição de etanol na dose de 50mM na cultura promoveu efeitos interessantes. O etanol promoveu menor conversão de MTT em formazan em relação ao controle, somente no início da diferenciação, ou seja, aos 7 e 14 dias. Interessantemente, o etanol não apresentou efeito citotóxico quando se avalia a porcentagem de células por campo uma vez que esta foi

semelhante ao grupo controle aos 14 e 21 dias de diferenciação. Sendo assim, a menor síntese de colágeno, menor conversão de MTT e menor número de nódulos mineralizados, não foram decorrentes da diminuição do número de células o que nos permite inferir que a adição de etanol na concentração deste estudo promoveu redução do potencial de diferenciação osteogênico das células tronco mesenquimais sendo estes, um dos possíveis mecanismos envolvidos na ocorrência de osteopenias e indivíduos adultos que consomem estas substâncias em doses e períodos prolongados da vida.

Interessantemente, os efeitos negativos observados nos grupos que receberam cafeína e etanol separadamente, não foram observados no grupo com associação de ambas as substâncias. Neste grupo, a porcentagem de células em todos os períodos foi menor em relação não somente ao controle mas também em relação aos grupos cafeína e etanol. Este resultado pode explicar porque os resultados dos testes colorimétricos que são dependentes do número de células da cultura como conversão do MTT, atividade de fosfatase alcalina e síntese de colágeno também foram menores em relação ao controle e aos grupos cafeína e etanol. A menor porcentagem de células observada no grupo associação cafeína e etanol provavelmente não foi decorrente de efeito citotóxico como postulamos nos grupos cafeína e etanol. Isso porque a associação cafeína e etanol, apesar de ter ocasionado menor porcentagem de células, promoveu maior número de nódulos mineralizados por campo quando comparado aos grupos cafeína e etanol sendo este número semelhante ao grupo controle. Estes resultados sugerem que a associação cafeína e etanol promoveu a diminuição da porcentagem de células devido não a um efeito citotóxico e sim da diminuição da proliferação celular. Sabe-se que com o avançar do processo de diferenciação das células, a taxa de proliferação diminui e ocorre aumento da expressão de fatores ligados a célula diferenciada (Owen et al., 1990; Ruijtenberg e Sander, 2016) que no presente estudo fica evidente pelo maior número de nódulos mineralizados mesmo com menor porcentagem de células na cultura.

In vivo no processo de envelhecimento, a perda óssea é causada não apenas pelo aumento da atividade de reabsorção óssea, mas também por um desbalanço da população celular devido a alterações na proliferação das CTM e diferenciação em osteoblastos em detrimento a população de células das linhagens adpogênica. Isso, leva a uma diminuição da capacidade de auto-



renovação e conseqüentemente leva a um desequilíbrio no tecido ósseo entre a massa óssea e o tecido adiposo. Já *in vitro*, a diminuição da síntese de osteóide e a diferenciação em células osteoprogenitoras (Chen et al., 2017) é evidente apenas pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina e a mineralização (Su et al., 2013).

Com base na metodologia aplicada neste estudo, não foi possível esclarecer os mecanismos pelos quais a associação cafeína e etanol promoveu efeito contrário ao observado nos grupos que receberam cafeína e etanol separadamente. Sendo assim, mais estudos são necessários para desvendar esses resultados.

### CONCLUSÃO

A adição de cafeína na concentração de 0,3mM ou de etanol na concentração de 50 mM em culturas de CTM da medula óssea de ratas diminui o potencial de diferenciação osteogênico das mesmas e que a associação cafeína (0,3mM) e etanol (50 mM) reduz a porcentagem de células por campo, a conversão de MTT, atividade da fosfatase alcalina em pelo menos um dos períodos, sem alterar a síntese de matriz mineralizada em comparação ao controle. Não há na associação cafeína/etanol potencialização da redução da diferenciação osteogênica evidenciada pela cafeína ou pelo etanol.

promove aumento do potencial osteogênico das CTM resultado caracterizado pela maior síntese de matriz mineralizada (nódulos de mineralização) mesmo com menor porcentagem de células na cultura.

### REFERENCIAS

ABDALLAH, B.M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.*, v.15(2), p. 109-16, 2008.

ADDOLORATO, G.; CAPRISTO, E.; GRECO, A.L.; et al. Energy expenditure, substrate oxidation and body composition in subjects with chronic alcoholism: new findings from metabolic assessment. *Alcoholism: Clin. Exp. Res.*, v.21, p. 962–967, 1997.

ALGHADIR, A.H.; GABR, S.A., A.L-EISA, E.; et al. Physical activity and lifestyle effects on bone mineral density among young adults: sociodemographic and biochemical analysis. *J. Phys. Ther. Sci.*, v 27, p.2261-70, 2015.

- ARNAUD, M.J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb. Exp. Pharmacol.*, v.200, p.33-91, 2011.
- AUBIN, J.E. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v. 2, p. 81-94, 2001.
- BARRE, M.G. Interrelationships between vitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> during ethanol administration in the rat. *Metabolism.*, v.31, p67-72, 1982.
- BELLOWS, C.G.; HEERSCHE, J.N. e AUBIN, J.E. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.*, v. 17, p. 15-29, 1992.
- BELTRAMI, A.P.; BARLUCCHI, L.; TORELLA, D., et al. Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, v.114, p.763-776, 2003.
- BERGMAN, E.A.; MASSEY, L.K.; WISE, K.J. et al. Effects of dietary caffeine on renal handling of minerals in adult women. *Life Sci.*,v.47, p.557-564, 1990.
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, v.19, p.180-92, 2001.
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin. Sci.*, v.98, p.217-240, 2000.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.*,v.44, p.215-30, 2006.
- BODE A.M.; DONG, Z.; The enigmatic effects of caffeine in cell cycle and cancer. *Cancer Lett.* V.247, p.26-39, 2006.
- BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N.S. et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop.*,. v.355S, p.S247-S256, 1998.
- BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASSELI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Rev. Bras. Hematol. Hemot.*, v.31, p.25-35, 2009.
- CARROLL, S.H.; RAVID, K. Differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and chondrocytes: a focus on adenosine receptors. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v.15, p.e1, 2013.

- CHEN, H.; GILBERT, L.C.; LU, X. et al. A new regulator of osteoclastogenesis: estrogen response element-binding protein in bone. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, p. 37-47, 2011.
- CHEN, X.; MAO, L.I.; JINKU, Y.; et al. Alcohol Induces Cellular Senescence and Impairs Osteogenic Potential in Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Alcohol Alcoholism*, v. 52, p.289–297, 2017.
- CHEUNG, R.C.; GRAY, C.; BOYDE, A. et al.. Effects of ethanol on bone cells in vitro resulting in increased resorption. Department of Anatomy and Developmental Biology, University College London, UK. *Bone*, v.16, n.1, p.143-147, 1995.
- CHOI, H.; CHOI, Y.; KIM, J.; BAE, J.; ROH, J. Longitudinal bone growth is impaired by direct involvement of caffeine with chondrocyte differentiation in the growth plate. *J. Anat.*, 2016.
- COSTA, M.A.; BARBOSA, A.; NETO, E. et al. On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, v.226, p.1353-1366, 2011.
- COVAS, D.T.; SIUFI, J.L.C.; SILVA, A.R.L. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, p.1179-1183, 2003
- CUI, Q.; WANG, Y.; SALEH, K.J., et al. Alcohol induced adipogenesis in a cloned bone-marrow stem cell. *J. Bone Joint. Surg. Am.*, v.88, p.148–154, 2006.
- CUMMINGS, S.R.; NEVITT, M.C.; BROWNER, W.S.; et al. Risk factors for hip fracture in white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *N. Engl. J. Med.*, 332:767–773, 1995.
- DAI, J.; LIN, D.; ZHANG, J.; et al. Chronic alcohol ingestion induces osteoclastogenesis and bone loss through IL-6 in mice. *J. Clin. Invest.*, v. 106, p.887–895, 2000.
- DENG, X.H. & RICHARD A.D.; Putative role of brain acetaldehyde in ethanol addiction. *Current. Drug. Abuse. Reviews.*, v.1, p.3-8, 2008.

- DIPADOVA, C.; WORNER, T.M.; JULKUNEN, R.J.K.; et al. Effects of fasting and chronic alcohol consumption on the first pass metabolism of ethanol. *Gastroent.*, v. 92, p. 1169–1173, 1987.
- DOI, Y.; HORIGUSHI, T.; KIM, S.H.; et al. Effects of non-collagenous proteins of the formation of apatite in Ca- $\beta$ -glycerophosphate solution. *Arch.Oral. Biol.*, v.37, p.15-21, 1992.
- DÖRRIE, N.; FÖCKER, M., FREUNSCHT, I. et al. Fetal alcohol spectrum disorders. *Eur. Child. Adolesc. Psychiatry*, v.23, p.863-875, 2014.
- EGAWA, T.; TSUDA, S.; MA, X. et al. Caffeine modulates phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs insulin signal transduction in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v,116, p.1629-36, 2011.
- EMANUELE, N. & EMANUELE, M. Alcohol Alters Critical Hormonal Balance. NIAAA VOL. 21, N.1, 1997 Disponível em: < [ps://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh21-1/53.pdf](https://pubs.niaaa.nih.gov/publications/arh21-1/53.pdf) >. Acessado em: 8 janeiro 2019
- ETENG, M. U.; EYONG, E. U.; AKPANYUNG E.O. et al. Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant. Foods Human Nutr.*, v.51, p.231-243, 1997.
- EVANS, B.A.; ELFORD, C.; PEXA, A. et al. Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modulates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. *J. Bone Miner. Res.*, v.21, p.228-236, 2006.
- FERNANDES, O.; SABHARWA, M.; SMILEY, T.; et al. Moderate to heavy caffeine consumption during pregnancy and relationship to spontaneous abortion and abnormal fetal growth: a meta-analysis. *Reprod. Toxicol.*, v. 12, p. 435-44, 1988.
- FERRÉ, S.; BRIEN, M.C. Alcohol and Caffeine: The Perfect Storm. *J Caffeine Res.*, v.3, p.153-162, 2011.
- FILL, M.; COPELLO, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.*, v.82, p.893-922, 2002.
- FÖCKING, M.; SCHMIEGELT, D.; TRAPP, T. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 337, p.435-9, 2005.

FRIEDENSTEIN, A.J.; DERIGLAZOVA, U.F.; KULAGINA, N.N. et al. Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp. Hematol*, v.2, p.83-92, 1974.

FRIDAY, K.E.; HOWARD, G.A. Ethanol inhibits human bone cell proliferation and function in vitro. *Metabolism*. v.40, p.562–565, 1991.

GEORGE, J.; MURPHY, T.; ROBERTS, R., et al. Influence of alcohol and caffeine consumption on caffeine elimination. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.13, p.731-6, 1986.

GHARIBI, B.; ABRAHAM, A.A.; HAM, J.; et al. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J. Bone Miner. Res.*, v.26, p.2112-2124, 2011.

GIULIANI, N.; GIRASOLE, G.; VESCOVI, P.P.; et al. Ethanol and acetaldehyde inhibit the formation of early osteoblast progenitors in murine and human bone marrow cultures. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, v.23, p.381–385, 1999.

GONG, Z. & WAZEMAN, F.H. Inhibitory effect of alcohol on osteogenic differentiation in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v.28, n.3, p.468-479, 2004.

GRIFFITHS HJ, PARANTAINEN H, OLSON P. Alcohol and bone disorders. *Alcohol Health Res. World*, v.17, p. 299–304, 1993.

GRISSE, J.A.; CHIU, G.Y.; MAISLIN, G. et al. Risk factors for hip fractures in men: A preliminary study. *J. Bone Miner. Res.*, v.6, p.865-868, 1991.

GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* v.22, p.487-500, 2004.

GUREVITCH, O.; KURKALLI, B.G.S.; PRIGOZHINA, T.; et al. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells* v. 21, p.588-97, 2003.

HECKMAN, M.A.; WEIL, J.; MEJIA, G.J. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *R: Con. Rev. Hyp. In Food Sci.*, v.75, p.77-87, 2010.

- HERNANDEZ-AVILA, M.; COLDITZ, G.A.; STAMPFER, M.J. et al. Caffeine, moderate alcohol intake, and risk of fractures of the hip and forearm in middle-aged women. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.54, p.157- 163, 1991.
- HORWITZ EM, LE BLANC K, DOMINICI M, MUELLER I, , et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* v.7(5):p.393-5, 2005.
- HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S., et al. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone*, v. 30, p. 293-299, 2002.
- IGLÉZIAS, J.C.R. Célula-tronco. *Rev. Fac. Cien. Med. Sorocaba*, v.6, p.39, 2004.
- ISHII, M.; KOIKE, C.; IGARASHI, A. et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.332, p.297-303, 2005a.
- ISHII, G.; SANGAI, T.; SUGIYAMA, K. et al. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells*, v.23, p.699-706, 2005b.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* v.418, p.41-9, 2002.
- JONES, A.W. Pharmacokinetics of ethanol - Issues of forensic importance. *Forensic. Sci. Ver.*, v.23, p.92-136, 2011.
- KAMAGATA-KIYOURA, Y.; OHTA, M.; CHEUK, G. et al. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells. *J. Periodontol.*, v.70, p.283-288, 1999.
- KELLER, E.T.; ZHANG, J.; ERSHLER, W.B. Ethanol activates the interleukin-6 promoter in a human bone marrow stromal cell line. *J. Gerontol. Biol. Sci. Med.*, v. 52, p.311–317, 1997.
- KLEBANOFF, M.A.; LEVINE, R.J.; DERSIMONIAN, R., et al. Maternal serum paraxanthine, a caffeine metabolite, and the risk of spontaneous abortion. *N. Engl. J. Med.*, v. 341, p. 1639-1644, 1999.

- KLEIN, R.F.; Alcohol-induced bone disease: impact of ethanol on osteoblast proliferation. *Alcohol. Clin. Exp. Res.*, v. 21, p.392–399, 1997.
- KOT, M. & DANIEL, W.A. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol Rep.*, v. 59, p. 296-305, 2007.
- KOT, M. & DANIEL, W.A. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an in vitro comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochem. Pharmacol.*, v. 76, p. 543-551, 2008.
- KRAUS, K. H. AND C. KIRKER-HEAD. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.* 35(3): 232-242, 2006.
- KREIGER, N.; GROSS, A.; HUNTER, G. Dietary factors and fracture in postmenopausal women- A case-control study. *Int. J. Epidemiol.*, v.21, p.953- 958, 1992
- LEE, S.L.; CHAU, G.Y.; YAO, C.T.; et al. Functional assessment of human alcohol dehydrogenase family in ethanol metabolism: Significance of first-pass metabolism. *Alcoholism. Clin. Exp. Res.*, v.30, p.1132–1142, 2006.
- LI, T.K.; BOSRON, W.F. Distribution and Properties of Human Alcohol Dehydrogenase Isoenzymes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.492, p. 1-10, 1987.
- LIN, S.; SHEN, H.; JIN, B., et al. Brief report: Blockade of Notch signaling in muscle stem cells causes muscular dystrophic phenotype and impaired muscle regeneration. *Stem Cells*, v. 31, p. 823-828, 2013.
- LIU, F.; MALAVAL, L.; AUBIN, E.J. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J. Cell Sci.*, v.116, n.9, p.1787-1796, 2003.
- LIU, S.H.; CHEN, C.; YANG, R.S. et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J. Orth. Res.*, v.29, p.954-960, 2011.
- LIU, W.H.; REN, L.N.; NAVARRO-ALVAREZ, N.; et al. The involving roles of intrahepatic and extrahepatic stem/progenitor cells (SPCs) to liver regeneration. *Int. J. Biol. Sci.*, v.12, p.954-963, 2016.

- LU, P.Z.; LAI, C.Y.; CHAN, W.H. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.*, v.9, p.698-718, 2008.
- LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.16, p.599-603, 2004.
- MAICKEL, R.P.; SNODGRASS, W.R. Physicochemical factors in maternal-fetal distribution of drugs. *Toxicol. App. Pharmacol.*, v.26, p.218-230, 1973.
- MARTIN, J.J.; RONIS, J.; WANDS, R.; et al. Alcohol-Induced Disruption of Endocrine Signaling. *Alcohol.*, v. 31, n. 8, 2007.
- MAUREL DB, BOISSEAU N, BENHAMOU CL, et al. Alcohol and bone: review of dose effects and mechanisms. *Osteoporos Int.*, v. 23, p.1–16, 2012.
- MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v. 16, p.713-20, 2004.
- MELVILLE, K.M.; KELLY, N.H.; KHAN, S.A. et al., Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength. *J. Bone Miner. Res.*, v.29, p.370-9, 2014.
- MENAGH, P.J.; TURNER, R.T.; JUMP, D.B.; et al. Growth hormone regulates the balance between bone formation and bone marrow adiposity. *J. Bone Miner. Res.*, v. 25, p.757–768, 2010.
- MEYER, H.E.; PEDERSEN, J.I.; LOKEN, E.B.; et al. Dietary factors and the incidence of hip fracture in middle-aged Norwegians. A prospective study. *Am. J. Epidemiol.*, v.145, p.117–123, 1997.
- MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. Biology and clinical use of mesenchymal progenitors. *BJMBR*, v.33, p.881-887, 2000.
- MOIOLI, E.K.; HONG, L.; MAO, J.J. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound. Repair. Regen.* v.15, p.413-421, 2007.



- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55-63, 1983.
- MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B. et al. Stem cell therapy a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.48, p.3464-74, 2003.
- NAROD, S.A.; SANTOSE, S.; VICTORA, C. Coffee during pregnancy: a reproductive hazard? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.164, p.1109-1114, 1991.
- NETO, P.M.A.; SOARES, S.; ALMIR, A.U. et al., Consenso brasileiro de osteoporose 2002. *Rev. Bras. Reumatol.*, v.422, n. 6, 2002.
- OGATA, N.; CHIKAZU, D.; KUBOTA, N. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J. Clin. Invest.*, v.105, p.935-43, 2000.
- OGAWA, R.; STREIFF, M.B.; BUGAYENKO, A.; KATO, G.J. Inhibition of PDE4 phosphodiesterase activity induces growth suppression, apoptosis, glucocorticoid sensitivity, p53, and p21 WAF1/CIP1 proteins in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, v.99, p.3390-3397, 2002.
- OWEN, T.A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V., et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.*, v.43, p.420-30, 1990.
- PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; QUARTO, N.; LONGAKER, M.T. Mesenchymal stem cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.*, v.51, p.25-41, 2009.
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell. Biol.*, v.33, p.6-25, 2006.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.
- POLIKEIT, A.; NOLTE, L.P.; FERGUSON, S.J.; et al. Simulated influence of osteoporosis and disc degeneration on the load transfer in a lumbar functional spinal unit. *J. Biomech.*, v.37, p.1061–1069, 2004.

- POMBERO, A; GARCIA-LOPEZ, R; MARTINEZ, S. Brain mesenchymal stem cells: physiology and pathological implications. *Development Growth Differentiation*. v.58, p.469-480, 2016.
- PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell Dev. Biol.*, v. 13, p.369-76, 2002.
- PUTNAM, S.E.; SCUTT, A.M.; BICKNELL, K.; et al. Natural products as alternative treatments for metabolic bone disorders and for maintenance of bone health. *Phytother. Res.*, v.21, p.99-112, 2007.
- RAISZ, L.G. The role of prostaglandins in the local regulation of bone metabolism. *Prog. Clin. Biol. Res.*, v. 332, p.195-203, 1990.
- RAPURI, P.B.; GALLAGHER, J.C.; NAWAZ, Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.103, p.368-371, 2007.
- RAUCH, A.; SEITZ, S.; BASCHANT, U. et al. Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.*, v.11, p.517-31, 2010.
- REIS, A.M.S.; BATISTA, A.C.M.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Effects of caffeine intake in mothers on maternal cortisol levels and offspring endochondral ossification. *Actualizaciones en Osteología*, v.10, p.20-36, 2014.
- REIS, A.M.; RIBEIRO, L.G.; OCARINO, N.M., et al. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskeletal Disord.*, v. 16, p. 10, 2015.
- REIS, A.M.; OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N., et al. Inhibition of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from the offspring of rats treated with caffeine during pregnancy and lactation. *Connective. Tissue. Res.*, v. 57, p. 131-142, 2016.
- REISSIG, C.J.; STRAIN, E.G.; GRIFFITHS, R.R. Caffeinated energy drinks: a growing problem. *Drug Alcohol Depend.*, v.99, p.1-10, 2009.

- RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers Dis.*, v.20, p.S3-15, 2010.
- ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous protein? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and reabsorption. *Cell. Biol. Int.*, v.18, n.6, p.617-628, 1994.
- RONIS, M.J.; MERCER, K.; CHEN, J.R. Effects of nutrition and alcohol consumption on bone loss. *Curr. Osteoporos. Rep.*, v. 9, p.53–59, 2011.
- RUBIN, C.T., LANYON, L.E. Osteoregulation nature of mechanical stimuli: junction as a determinant for adaptive remodeling in bone. *J. Orthop. Res.*, v.5, p.300-310, 1987.
- RUIJTENBERG, S. & SANDER, S.V.D. Coordinating cell proliferation and differentiation: Antagonism between cell cycle regulators and cell type-specific gene expression. *Cell. Cycle.*, v.15, p.196 – 212, 2016.
- SAROBO, C.; LACORTE, L.M.; MARTINS, M. et al. Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.93, p.429-37, 2012.
- SCOTT Jr., W.J. Caffeine-induced limb malformations: description of malformations and quantitation of placental transfer. *Teratology*, v.28, p.427-435, 1983.
- SERAKIDES, R. Ossos e articulações. In: Patologia Veterinária, Santos & Alessi, 2 ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016, p.619-662.
- SHI, D.; NIKODIJEVIĆ, O.; JACOBSON, K.A.; DALY, J.W. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell. Mol. Neur.*, v. 13, p.247-261, 1993.
- SHENFIELD, F.; PENNINGGS, G.; SUREAU, C. et al. Stem cells. *Hum. Reprod.*, v.17, p.1409-1410, 2002.
- SIMPSON, M.E.; DUGGAL, S.; KEIVER, K. Prenatal ethanol exposure has differential effects on fetal growth and skeletal ossification. *Bone*, v.36, p.521-532, 2005.

SNOW, M.E.; KEIVER, K. Prenatal ethanol exposure disrupts the histological stages of fetal bone development. *Bone*, v.41, p.181-187, 2007.

SOARES, A.I.S.M.; FONSECA, B.M.R. Cafeína. Trabalho realizado no âmbito da disciplina Toxicologia e Análises toxicológicas I. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal. 2004.

SOUZA, R.A.G.; SICHIERI, R. Consumo de cafeína e prematuridade. *Rev. Nutr.*, v.18, p.643-650, 2005.

SPENCER, H.; KRAMER, L.; OSIS, D.; et al. The effect of phosphorus on endogenous fecal calcium excretion in man. *J. Nutr.*, 108, 447-5, 1986.

STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.*, v.14, n.4, p.424-442, 1993.

SU, S.J.; CHANG, K.L.; SU, S.H. et al. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int. J. Food Sci. Nut.*, v.64, p.429-36, 2013.

TAN, Y.; LIU, J.; DENG, Y. et al. Caffeine-induced fetal rat over-exposure to maternal glucocorticoid and histone methylation of liver IGF-1 might cause skeletal growth retardation. *Toxicol. Letters*, v.214, p.279-287, 2012.

TASSINARI, M.S.; GERSTENFELD, L.C.; STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, v.6, p.1029-36, 1991.

TOCCI, A.; FORTE, L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. *Hematol. J.*, v.4, p.92-96, 2003.

TSUANG, Y.H.; SUN, J.S.; CHEN, L.T. et al. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J. Orth. Surg. Res.*, v.1, p.1-10, 2006.

TUAN, R.S.; BOLAND, G.; TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis. Res. Ther.*, v. 5, p. 32-45, 2003.

TURNER, R.T.; ROSEN, C.J.; IWANIEC, U.T. Effects of alcohol on skeletal response to growth hormone in hypophysectomized rats. *Bone*, v. 46, p.806–812, 2010.

TYRALA, E.E.; DODSON, W.E. Caffeine secretion into breast milk. *Arch. Dis. Child.*, v.54, p.787-9, 1979.

XU, D.; ZHANG, B.; LIANG, G. et al. Caffeine-induced activated glucocorticoid metabolism in the hippocampus causes hypothalamic-pituitary-adrenal axis inhibition in fetal rats. *Plos one*, v.7, p.e44497, 2012.

ZELNER, I. & KOREN, G. Pharmacokinetics of ethanol in the maternal-fetal unit. *J. Popul. Ther. Clin. Pharmacol.*, v.20, e259-e265, 2013.

ZHOU, Y.; ZHU, Z.L.; GUAN, X.X. et al. Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: the possible mechanism for caffeine induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Med. Hypotheses.*, v.73, p.83-85, 2009.

ZHOU, Y.; GUAN, X.X.; ZHU, Z.L. et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pharmacol.*, v.161, p.1542-1552, 2010.

WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H.F. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone. *J. Bone Miner. Res.*, v.29, p.685-92, 2014.

WOLFGANG, W. & HO, A.D. Mesenchymal stem cell preparations – Comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.*, v.3, p.239-24, 2007.