

**Jankerle Neves Boeloni**

**Efeitos *in vivo* e *in vitro* dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal.

Área: Patologia Animal

Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Co-orientadores: Prof. Dr. Alfredo Miranda Goes

Profa. Dra. Natália de Melo Ocarino

Dra. Rafaela Chitarra Rodrigues Hell

**Belo Horizonte  
UFMG – Escola de Veterinária  
2012**

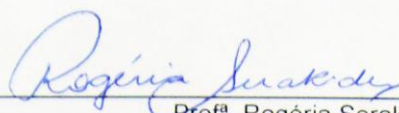
B671e Boeloni, Jankerle Neves, 1980-  
Efeitos *in vivo* e *in vitro* dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e no ovariectomizadas / Jankerle Neves Boeloni. – 2012.  
226 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides  
Co-orientadores: Alfredo Miranda Goes, Natália de Melo Ocarino, Rafaela Chitarra Rodrigues Hell  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

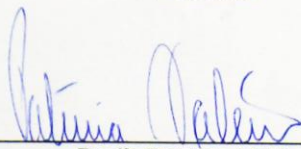
1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Hormônios tireoidianos – Teses.  
3. Células tronco – Teses. 4. Medula óssea – Teses. 5. Tecido adiposo – Teses.  
6. Ovariectomia – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Goes, Alfredo Miranda. III. Ocarino, Natália de Melo. IV. Hell, Rafaela Chitarra Rodrigues. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.088 5

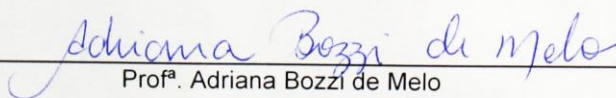
Tese defendida e aprovada em 02 de março de 2012, pela Comissão Examinadora constituída por:



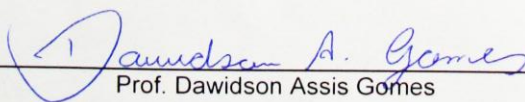
Profª. Rogéria Serakides  
Presidente



Profª. Patrícia Valério



Profª. Adriana Bozzi de Melo



Prof. Dawidson Assis Gomes



Profª. Eliane Gonçalves de Melo



Aos meus pais, Carlos e Ermínia, por todo amor, carinho, incentivo e pelo exemplo de vida.  
Amo vocês incondicionalmente.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em minha vida em todos os momentos, guiando-me, oferecendo-me um amor incondicional e me dando força para alcançar os meus objetivos.

À Nossa Senhora Aparecida por todas as graças alcançadas.

À profa. Rogéria pela orientação sempre presente, apoio e ensinamentos em todos esses anos e pelo exemplo de perseverança, seriedade e dedicação ao trabalho. À você a minha gratidão e o meu muito obrigada.

Ao prof. Alfredo, por ter me recebido de forma tão acolhedora em seu laboratório e por todo apoio incondicional, ensinamentos e lição de vida. Muito obrigada.

À profa. Natália, por todos os ensinamentos e contribuição tão importantes, além do exemplo de dedicação e perseverança. Muito obrigada.

À Dra. Rafaela, por todos os ensinamentos e apoio.

À profa. Eliane, por todo carinho, ensinamentos e prontidão em ajudar.

A todos os professores da patologia, prof. Ernane, profa. Rogéria, profa. Natália, prof. Roberto, profa. Rosilene e prof. Renato por todos os ensinamentos.

Aos amigos Júneo, Paula Vidigal, Endrigo, Flávia, Danielle, Guilherme, Renata e Sandro pela amizade, ajuda e convivência. E aos amigos Ana Patrícia, Auricélio, Fernanda, Érica, Tati, Kristel, Ana Flávia, Ana Luiza, Amanda, Adriana, Karen, Paula, Fernanda, Juliana Braga, Juliana Saes, Juliana Paniago, Lidiane, Rosy e Raquel pelo apoio e convivência.

À Cristiane Corrêa e à Caryne pelo carinho, apoio e pela ajuda na leitura no citômetro de fluxo.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do ICB: Natália Breyner, Alexandra, Luiza, Betinha, Ana Cláudia, Juliana Lott, Juliana Barbosa, Natássia e Vivi pelo apoio, ensinamentos e convivência.

Aos amigos Fátima, Hayala, Silvia França, Silvia Minharro, Perla, Natalie, Aliny, Paulo, João, Carla, Fabíola, Maurício, Débora, Fabiana, Janayna, Fernando Dório, Kelly Dório e Paula Dório por todo apoio, carinho e amizade.

Aos componentes da banca Adriana Bozzi de Melo, Dawidson Assis Gomes, Eliane Gonçalves de Melo e Patrícia Valério, pela prontidão em compor a banca para avaliação desta tese.

À profa. Marivalda e à técnica Denise pelo apoio na realização dos testes biomecânicos.

Às minhas amigas e orientadoras, Adriana e Krishna, por todos os ensinamentos e amizade.

À minha grande amiga Karen pelo exemplo de perseverança e vontade de viver. Descanse em paz.

Ao grande amor da minha vida, Tyrone, pelo apoio, compreensão e carinho incondicionais.

À toda a minha família, tia Cláuzia, tio Pedro, tio Vitim, Tia Sandra, vovô Hilário, vovó Mercedes, Marilza, Ana Luiza, meus irmãos Jancarlos e Jonerlei, tia Lurdes, tio Miguel, tia Maria, Mariana, tia Odete e a todos os meus familiares que eu não citei, mas que estavam à distância torcendo por mim.

Aos porteiros Fábio e Ney e às técnicas Marilene, Leimar e Mel, pelo apoio.

À minha grande amiga e “mãe” Dora pelo amor, carinho e palavras de conforto. Obrigada por tudo.

A todos os animais, inclusive a Penélope, a Flor, o Luquinhas, o Oto e a Mel, que com um simples olhar já demonstravam todo o carinho incondicional.

Às secretárias, Eliane, Lurdes e Rosângela pela convivência.

Ao prof. Ricardo por disponibilizar o citômetro de fluxo.

Ao CNPq e à Fapemig pela concessão da bolsa e pelo apoio financeiro.

A todos o meu muito obrigada, pois de maneira direta ou indireta contribuíram para a minha formação profissional e pessoal.

## LISTA DE ABREVIACÕES

AR: receptor para andrógeno  
BCIP: *5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*  
BMP: proteína morfogenética do osso  
BSP: sialoproteína óssea  
CATK: catepsina K  
COL I: colágeno I  
CTA: célula tronco adulta  
CTE: célula tronco embrionária  
CTM: célula tronco mesenquimal  
CTM-MO: célula tronco mesenquimal da medula óssea  
CTM-TA: célula tronco mesenquimal do tecido adiposo  
CSF-1: fator estimulante de colônia 1  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DMP-1: matriz dentinária 1  
DNA: ácido desoxirribonucléico  
EGF: fator de crescimento epidermal  
FACS: *Fluorescence-activated cell sorting*  
FGF: fator de crescimento fibroblástico  
FSC: *Forward scatter*  
GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GH: hormônio do crescimento  
HGF: fator de crescimento de hepatócitos  
HSD: hidroxisteróide desidrogenase  
IGF: fator de crescimento semelhante à insulina  
IL: interleucina  
JNK: jun N-terminal kinase  
MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno  
M-CSF: fator estimulador de colônia de macrófago  
MEPE: fosfoglicoproteína extracelular da matriz  
MTT: brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]  
NBT: *nitro-blue tetrazolium chloride*



OC: osteocalcina  
ON: osteonectina  
OPG: osteoprotegerina  
OP: osteopontina  
Osx: osterix  
OVX: ovariectomizado  
PBS: solução tampão de fosfato padrão  
PCR: reação em cadeia da polimerase  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PG: prostaglandina  
Pi: fósforo inorgânico  
PRP: plasma rico em plaquetas  
PTH: paratormônio  
PTU: propiltiouracil  
RANKL: receptor ativador NF-kapa beta ligante  
RNA: ácido ribonucléico  
SDS: dodecil sulfato de sódio  
SFB: soro fetal bovino  
Shh: *sinic hedgehog*  
SNK: *Student Newman Keuls*  
SSC: *Side scatter*  
T3: triiodotironina  
T4: tiroxina  
TERT: telomerase reverse transcriptase  
TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformante  $\beta$   
TNF: fator de necrose tumoral  
TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato  
TR: receptor do hormônio tireoidiano  
TRH: hormônio liberador de tireotropina  
TSH: hormônio tireotrófico  
VEGF: fator de crescimento endotelial vascular

---

## SUMÁRIO

---

|   |    |
|---|----|
| <b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....   | 8  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....   | 13 |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | 14 |
| <b>RESUMO</b> .....   | 22 |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | 23 |
| <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 24 |
| <b>CAPÍTULO 1. Revisão de Literatura</b> .....  | 27 |
| 1. Tecido ósseo .....   | 27 |
| 2. Os hormônios tireoidianos.....   | 28 |
| 3. O tecido ósseo e as disfunções tireoidianas.....   | 29 |
| 4. O tecido ósseo e a deficiência de hormônios sexuais.....   | 32 |
| 5. Células tronco.....  | 34 |
| 5.1 Caracterização e diferenciação osteogênica das CTM-MO.....  | 35 |
| 5.1.1 Ação dos hormônios na diferenciação osteogênica das CTM-MO.....   | 38 |
| 5.2 Células tronco mesenquimais do tecido adiposo e diferenciação osteogênica.....  | 40 |
| <b>CAPÍTULO 2. Participação das células tronco mesenquimais da medula óssea na gênese das alterações ósseas causadas pelas disfunções tireoidianas em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas</b> ..... | 43 |
| Resumo.....   | 43 |
| Introdução.....   | 44 |
| Material e Métodos.....   | 45 |
| Resultados.....   | 53 |
| Discussão.....  | 68 |
| Conclusões.....   | 71 |
| <b>CAPÍTULO 3. Efeito do tratamento <i>in vitro</i> com triiodotironina sob o potencial</b>   |    |

|   |            |
|---|------------|
| <b>osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas adultas com osteoporose.....</b>  | <b>73</b>  |
| Resumo.....   | 73         |
| Introdução.....   | 74         |
| Material e Métodos.....   | 75         |
| Resultados.....   | 81         |
| Discussão.....  | 96         |
| Conclusões.....   | 98         |
| <b>CAPÍTULO 4. Efeito <i>in vitro</i> da triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose.....</b> | <b>101</b> |
| Resumo.....   | 101        |
| Introdução.....   | 102        |
| Material e Métodos.....   | 103        |
| Resultados.....   | 109        |
| Discussão.....  | 121        |
| Conclusões.....   | 123        |
| <b>CAPÍTULO 5. Estudo comparativo do potencial osteogênico de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens, adultas e ovariectomizadas com osteoporose.....</b>  | <b>125</b> |
| Resumo.....   | 125        |
| Introdução.....   | 126        |
| Material e Métodos.....   | 127        |
| Resultados.....   | 133        |
| Discussão.....  | 147        |
| Conclusões.....   | 149        |
| <b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>  | <b>151</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b> | <b>153</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                     | <b>174</b> |

---

## LISTA DE TABELAS

---

### CAPÍTULO 2

|          |   |    |
|----------|---|----|
| Tabela 1 | Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.....  | 53 |
| Tabela 2 | Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais indiferenciadas de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%..... | 59 |

### CAPÍTULO 3

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.....  | 80 |
| Tabela 2 | Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e adultas com osteoporose, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%..... | 82 |

### CAPÍTULO 4

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.....  | 105 |
| Tabela 2 | Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e adultas com osteoporose, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%..... | 106 |

### CAPÍTULO 5

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Tabela 1 | Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.....  | 128 |
| Tabela 2 | Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%..... | 129 |

---

## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO 2

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 utilizada no ensaio de flexão em três pontos.....  | 48 |
| Figura 2 | Teste de flexão em três pontos em tíbias de ratas com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. A) Posicionamento da tíbia na máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 no momento do teste de flexão em três pontos. B) Desenho esquemático do posicionamento da tíbia durante o ensaio de flexão em três pontos. Célula de força de 500N (a), tíbia (b), barra com dois pontos de apoio com distância de 20 mm entre as mesmas (c).....  | 48 |
| Figura 3 | Concentração plasmática de T4 livre (ng/dl) em ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 1).....   | 53 |
| Figura 4 | Porcentagem de tecido ósseo trabecular (média ± desvio padrão) na tíbia de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. (A) Epífise proximal da tíbia. (B) Metáfise proximal da tíbia. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX) (Anexo 2).....   | 55 |
| Figura 5 | Porcentagem de tecido ósseo trabecular no fêmur de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. (A) Epífise distal do fêmur. (B) Metáfise distal do fêmur. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX) (Anexo 2).....   | 56 |
| Figura 6 | Metáfise distal do fêmur de ratas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. (A) Grupo normal com trabéculas espessas e confluentes, HE. Barra = 274 µm. (B) Grupo normal com osteoblastos volumosos (setas), HE. Barra = 68,6 µm. (C) Grupo OVX com trabéculas em número reduzido, fragmentadas e delgadas, HE. Barra = 274 µm. (D) Grupo OVX com cobertura osteoblástica reduzida e fusiforme (setas), HE. Barra = 68,6 µm. (E) Grupo Hipo não OVX com trabéculas em menor número e delgadas, HE. Barra = 274 µm. (F) Grupo Hipo não OVX com cobertura osteoblástica predominantemente fusiforme, HE. Barra = 68,6 µm. (G) Grupo |    |

|           |  |    |
|-----------|--|----|
|           | Hipo OVX com trabéculas fragmentadas e delgadas, HE. Barra = 274 µm. (H) Grupo Hipo OVX com número reduzido de osteoblastos (setas), HE. Barra = 68,6 µm. (I) Grupo Hiper não OVX com trabéculas espessas e confluentes, HE. Barra = 274 µm. (J) Grupo Hiper não OVX com osteoblastos volumosos (setas), HE. Barra = 68,6 µm. (K) Grupo Hiper OVX com trabéculas em número reduzido, HE. Barra = 274 µm. (L) Grupo Hiper não OVX com trabécula recoberta por mais de uma camada de osteoblastos volumosos de permeio ao osteóide (setas), HE. Barra = 68,6 µm..... | 57 |
| Figura 7  | Deflexão específica (média ± desvio padrão) em tíbias de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX) (Anexo 3).....  | 58 |
| Figura 8  | Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas aos sete (A) e 21 (B) dias de diferenciação osteogênica. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexos 5).....                | 60 |
| Figura 9  | Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas aos sete (A) e 21 (B) dias de diferenciação osteogênica. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 6).....                          | 63 |
| Figura 10 | Número de nódulos de mineralização/campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas aos sete (A) e 21 (B) dias de diferenciação osteogênica. *p<0,05. Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 7).....                 | 64 |
| Figura 11 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para colágeno I (COL I) e osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM nos grupos eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não  |    |

|           |   |    |
|-----------|---|----|
|           | ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX) aos sete (A,C) e 21 dias (B,D) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). A,B) Expressão relativa de colágeno I. C,D) Expressão relativa de osteocalcina. *p<0,05. (Anexos 8 e 9).....   | 65 |
| Figura 12 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM nos grupos eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX) aos sete (A,C) e 21 dias (B,D) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). A,B) Expressão relativa de sialoproteína óssea. C,D) Expressão relativa de osteopontina. *p<0,05. (Anexos 10 e 11)..... | 66 |

### CAPÍTULO 3

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Figura 1 | Porcentagem de tecido ósseo trabecular (média ± desvio padrão) no fêmur e tíbia de ratas adultas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. (A) Epífise proximal da tíbia. (B) Metáfise proximal da tíbia. (C) Epífise distal do fêmur. (D) Metáfise distal do fêmur. *p<0,05. Ovariectomizado (OVX) (Anexo 32).....   | 81 |
| Figura 2 | Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. *p<0,05. (Anexo 34).....  | 83 |
| Figura 3 | Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. *p<0,05. (Anexo 35).....   | 84 |
| Figura 4 | Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. *p<0,05. (Anexo 36).....   | 86 |
| Figura 5 | Nódulos de mineralização (setas) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. A) Jovem normal, B) Adulto normal, C) Adulto ovariectomizado (OVX), D) Adulto OVX 0,01nM, E) Adulto OVX 1nM, F) Adulto OVX 100nM, G) Adulto OVX 1000nM. Barra = 89,85 µm..... | 87 |
| Figura 6 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para   |    |



|           |   |    |
|-----------|---|----|
|           | colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 37).....  | 88 |
| Figura 7  | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada) (Anexo 38).....                               | 89 |
| Figura 8  | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para sialoproteína óssea (BSP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 39).....              | 90 |
| Figura 9  | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 40).....                      | 91 |
| Figura 10 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 41)..... | 92 |

#### **CAPÍTULO 4**

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Figura 1 | Porcentagem de tecido ósseo trabecular (média ± desvio padrão) no fêmur e tíbia de ratas adultas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. (A) Epífise proximal da tíbia. (B) Metáfise proximal da tíbia. (C) Epífise distal do fêmur. (D) Metáfise distal do fêmur. *p<0,05. Ovariectomizado (OVX) (Anexo 68)..... | 106 |
| Figura 2 | Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo.                         |     |

|          |   |     |
|----------|---|-----|
|          | *p<0,05. (Anexo 70).....  | 108 |
| Figura 3 | Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. *p<0,05. (Anexo 71).....  | 109 |
| Figura 4 | Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. *p<0,05 (Anexo 72).....   | 110 |
| Figura 5 | Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. *p<0,05. (Anexo 73).....   | 111 |
| Figura 6 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 74).....                     | 113 |
| Figura 7 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 75).....                      | 114 |
| Figura 8 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 76).....                      | 115 |
| Figura 9 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05 (Anexo 77)..... | 116 |

## CAPÍTULO 5

|          |  |     |
|----------|--|-----|
| Figura 1 | Conversão do MTT em cristais de formazan (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de cultivo. *p<0,05..... | 130 |
| Figura 2 | Comparação da conversão do MTT em cristais de formazan (média $\pm$ desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. *p<0,05.....  | 130 |
| Figura 3 | Atividade da fosfatase alcalina (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de cultivo. *p<0,05.....          | 131 |
| Figura 4 | Comparação da atividade da fosfatase alcalina (média $\pm$ desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. *p<0,05.....   | 132 |
| Figura 5 | Porcentagem de células/campo (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. *p<0,05.....  | 132 |
| Figura 6 | Comparação da porcentagem de células/campo (média $\pm$ desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. *p<0,05.....   | 133 |
| Figura 7 | Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. *p<0,05.....                               | 133 |
| Figura 8 | Comparação da porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média $\pm$ desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo.....   | 134 |

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| Figura 9  | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para caspase 3 pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de diferenciação. *p<0,05....   | 135 |
| Figura 10 | Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para caspase 3 pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de diferenciação.....  | 135 |
| Figura 11 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....         | 136 |
| Figura 12 | Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....  | 137 |
| Figura 13 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea (BSP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05..... | 138 |
| Figura 14 | Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea (BSP) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....  | 138 |
| Figura 15 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas  |     |

|           |   |     |
|-----------|---|-----|
|           | (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....  | 139 |
| Figura 16 | Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....   | 140 |
| Figura 17 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....                     | 141 |
| Figura 18 | Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....  | 141 |
| Figura 19 | Quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05..... | 142 |
| Figura 20 | Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). *p<0,05.....  | 143 |

## RESUMO

Foram realizados quatro experimentos distintos. O experimento 1 avaliou a participação das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) na gênese das alterações ósseas induzidas pelo hipo e hipertireoidismo em ratas ovariectomizadas (OVX) e não OVX. O experimento 2 avaliou o efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina (T3) sob o potencial osteogênico reduzido das CTM-MO de ratas OVX com osteoporose, comparando-o ao das CTM-MO de ratas adultas e jovens sem osteoporose. O experimento 3 avaliou o efeito da T3 na diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas adultas OVX com osteoporose e comparou-o ao de ratas adultas e jovens sem osteoporose. E o experimento 4 comparou o potencial osteogênico das CTM-MO e das CTM-TA dentro dos grupos de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas OVX com osteoporose. Concluiu-se no experimento 1 que a redução do potencial osteogênico das CTM-MO é um dos mecanismos envolvidos na gênese da osteopenia induzida pelo hipotireoidismo e que o aumento da diferenciação osteogênica das CTM de ratas OVX tratadas com tiroxina pode ser um dos mecanismos pelo qual esse hormônio aumenta a resistência óssea de ratas OVX. No experimento 2, concluiu-se que a T3 não somente melhora o potencial osteogênico reduzido das CTM-MO de ratas com osteoporose como aumenta esse potencial em relação ao das CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose, sendo esse efeito dose-dependente. Mas, o tratamento com T3 não é capaz de igualar o potencial osteogênico das CTM de ratas com osteoporose ao de ratas jovens saudáveis. No experimento 3, concluiu-se as CTM-TA de ratas ovariectomizadas com osteoporose apresentaram redução da diferenciação osteogênica e que o tratamento com T3 apresenta efeitos negativos sobre alguns dos fatores envolvidos nessa diferenciação. No experimento 4, concluiu-se que as CTM-TA de ratas jovens e de ratas OVX com osteoporose apresentam maior potencial osteogênico que as CTM-MO da mesma categoria de animais e que, no grupo de ratas adultas, o potencial osteogênico é semelhante entre as CTM-MO e as CTM-TA e que as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose têm potencial osteogênico semelhante ao das CTM-MO de ratas jovens.

Palavras chave: célula tronco mesenquimal, medula óssea, tecido adiposo, diferenciação osteogênica, disfunções tireoidianas, ovariectomia, triiodotironina, ratas.

## ABSTRACT

Four different experiments were performed. Experiment 1 evaluated the role of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) on the genesis of bone alterations caused by hypo and hyperthyroidism in ovariectomized (OVX'd) or non-ovariectomized female rats. Experiment 2 evaluated the effect of *in vitro* treatment with triiodothyronine (T3) on the reduced osteogenic potential of BMMSCs of the OVX'd rats with osteoporosis, compared to that of BMMSCs of young and adult rats without osteoporosis. Experiment 3 evaluated the effect of T3 on osteogenic differentiation of adipose derived stem cells (ASCs) from adult OVX'd rats with osteoporosis, compared to that of ASCs of young and adult rats without osteoporosis. Finally, experiment 4 compared the osteogenic potential of BMMSCs and ASCs within groups of young rats, adult rats and OVX'd rats with osteoporosis. It was concluded in experiment 1 that the reduction of osteogenic differentiation of BMMSCs is one of the mechanisms involved in osteopenia genesis induced by hypothyroidism and that the increase of MSCs osteogenic differentiation may be one of the mechanisms by which thyroxine increases bone resistance of OVX'd female rats. In experiment 2 it was concluded that T3 improves reduced osteogenic potential of BMMSCs on rats with osteoporosis and it also increases the osteogenic potential with respect to the BMMSCs of adult rats without osteoporosis, where the effect was dose dependent. However, treatment with T3 was not able to reach the osteogenic potential of MSCs in rats with osteoporosis when compared to that of healthy young rats. In experiment 3 it was concluded that ASCs of OVX'd rats with osteoporosis showed reduced osteogenic differentiation and that treatment with T3 has negative effects on some of the factors involved in this differentiation. In experiment 4 it was concluded that ASCs of young rats and OVX'd rats with osteoporosis have higher osteogenic potential than BMMSCs of the same category of animals and that, in the group of adult rats, the osteogenic potential is similar between BMMSCs and ASCs. Furthermore ASCs of OVX'd rats with osteoporosis have an osteogenic potential similar to that of BMMSCs of young rats.

Key-words: Mesenchymal stem cells, bone marrow, adipose tissue, osteogenic differentiation, thyroid dysfunctions, ovariectomy, triiodothyronine, female rats.

## INTRODUÇÃO

As disfunções tireoidianas são as anormalidades endócrinas mais comumente diagnosticadas em todo o mundo, afetando homens e mulheres de todas as idades (Boelaert e Franklyn, 2005). Nos animais domésticos, o hipotireoidismo é uma das endocrinopatias mais comuns no cão (Panciera, 1994; Scarlett, 1994; Dixon et al., 1999) enquanto o hipertireoidismo tem sido mais frequentemente diagnosticado no gato (Scarlett, 1994; Naan et al., 2006; Harvey et al., 2009). Essas disfunções podem afetar todo o organismo, uma vez que os hormônios tireoidianos controlam o metabolismo basal de todos os tecidos (Boelaert e Franklyn, 2005).

Os hormônios tireoidianos, representados pela tiroxina (T4) e pela triiodotironina (T3), são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de muitos órgãos e tecidos durante a embriogênese, incluindo o tecido ósseo. Além disso, os hormônios tireoidianos também são responsáveis pelo crescimento, pela diferenciação e pelo metabolismo celular na vida pós-natal (Yen, 2001). No tecido ósseo, esses hormônios estimulam tanto a formação (Serakides et al., 2004) quanto à reabsorção óssea (Mundy et al., 1976), por regularem a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos (Klaushofer et al., 1995). Além disso, os hormônios tireoidianos também estimulam *in vitro* a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas jovens (Boeloni et al., 2009).

As células tronco são células indiferenciadas representadas pelas células tronco embrionárias, obtidas do embrião na fase de blastocisto, e pelas células tronco adultas oriundas do feto ou de indivíduos adultos. Independente da sua origem, essas células não são especializadas, são capazes de se dividir por longos períodos e podem gerar tipos celulares especializados. Vários

tecidos são fontes de células tronco mesenquimais (CTM), em maior ou menor número. Mas, a medula óssea e o tecido adiposo são considerados sítios doadores importantes devido à maior quantidade e facilidade de obtenção dessas células (Bianco et al., 2001; Zuk et al., 2002).

As CTM podem se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos, tenócitos e miócitos, dentre outros tipos celulares (Payushina et al., 2006). Com relação especificamente à diferenciação osteogênica das CTM-MO, as mesmas podem se proliferar e se diferenciar em células osteoprogenitoras, em osteoblastos e osteócitos (Karaoz et al., 2009). Hoje, se sabe que as CTM de ratas ovariectomizadas apresentam menor diferenciação osteogênica e que esse pode ser um dos mecanismos pelo qual a deficiência dos esteróides sexuais causa osteoporose (Ocarino et al., 2008). A diferenciação osteogênica das CTM pode ser afetada por fatores como idade e doenças metabólicas, limitando assim a utilização terapêutica das CTM de indivíduos doadores mais velhos e portadores de doenças. Apesar de se saber que há redução significativa da diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea de ratas com osteoporose, não há estudos que tenham verificado o efeito da deficiência dos esteróides sexuais sob a diferenciação osteogênica das CTM do tecido adiposo. Também ainda não havia sido estudado o efeito das disfunções tireoidianas sob a diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea.

O hipotireoidismo e o hipertireoidismo são endocrinopatias frequentemente diagnosticadas em mulheres na menopausa (Schindler, 2003; Pearce, 2007). E, por isso, o efeito da associação dessas disfunções tireoidianas com a hipofunção gonadal sobre o tecido ósseo tem sido alvo de estudos. Desde 1999, nossa equipe tem pesquisado o efeito das disfunções tireoidianas sobre o metabolismo ósseo e



mineral em modelos animais com hipo e hipertireoidismo associados à ovariectomia (Serakides et al., 2000b; Serakides et al., 2004; Ribeiro et al., 2004; Serakides et al., 2008). Resultados dessas pesquisas demonstraram que o hipotireoidismo causa osteoporose em ratas não ovariectomizadas e potencializa a osteoporose de ratas ovariectomizadas. A gênese pela qual o hipotireoidismo causa osteoporose foi atribuída à redução do número e da atividade dos osteoblastos. Baseado nesses resultados, associado ao fato de que os osteoblastos se originam das CTM, foi aventada a hipótese de que as CTM-MO de ratas com hipotireoidismo ovariectomizadas ou não ovariectomizadas apresentam menor diferenciação osteogênica. Esse poderia ser um dos mecanismos pelo qual o hipotireoidismo causa osteoporose e potencializa a osteoporose decorrente da deficiência dos esteróides sexuais. Esse estudo também tem o propósito de verificar se essas disfunções endócrinas poderiam afetar as CTM e inviabilizar a doação de células por indivíduos portadores de distúrbios funcionais da tireóide.

Com relação ao hipertireoidismo, seus efeitos no osso variam de acordo com a dose de tiroxina administrada, com o perfil sérico dos hormônios sexuais e com o curso da doença. O hipertireoidismo pode aumentar, reduzir ou até não alterar a quantidade de tecido ósseo em ratas (Allain et al., 1995; Serakides et al., 2004) ou em mulheres com níveis normais de hormônios sexuais (Karga et al., 2004; Cipriani et al., 2009). Esses efeitos antagônicos são observados, pois o hipertireoidismo não somente aumenta a atividade osteoblástica como também aumenta a reabsorção óssea. Assim, a alteração óssea somente se instala quando há desequilíbrio entre os processos catabólico e anabólico (Allain e McGregor, 1993; Garnerio et al., 1994).

O efeito do hipertireoidismo sobre o esqueleto de ratas ovariectomizadas

também é variável, podendo reverter a osteoporose pós-ovariectomia dependendo da dose (Gouveia et al., 1997) e do curso da doença (Serakides et al., 2004) ou agravar a osteoporose da menopausa (Cipriani et al., 2009). Por esse último efeito, o hipertireoidismo é considerado um fator de risco importante para a osteoporose da menopausa, uma vez que a reversão da doença óssea somente é possível quando o hipertireoidismo aumenta a atividade osteoblástica reduzida pela deficiência dos esteróides sexuais sem aumentar demasiadamente a reabsorção óssea (Cipriani et al., 2009).

Várias pesquisas já demonstraram o efeito *in vitro* dos hormônios tireoidianos sobre o aumento da atividade de síntese dos osteoblastos (Ohishi et al., 1994; Fratzi-Zelman et al., 1997; Varga et al., 1997; Gouveia et al., 2001). As CTM-MO apresentam receptores para os hormônios tireoidianos TR $\alpha$  e TR $\beta$  (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002) e por isso respondem à adição desses hormônios *in vitro*, com aumento da diferenciação osteogênica (Boeloni et al., 2009; Hell et al., 2011). Mas, ainda não se sabe se esse mesmo efeito poderia ser observado *in vivo*, quando da indução do hipertireoidismo em ratas com ou sem osteoporose decorrente da ovariectomia.

A osteoporose causada pela deficiência dos esteróides sexuais caracteriza-se por redução da massa óssea por insuficiência osteoblástica (Nunes e Nunes, 1988) e por redução do potencial osteogênico das CTM-MO (Ocarino et al., 2008). Sendo assim, o uso de CTM-MO para tratamento da osteoporose não deve ser realizado com células tronco do próprio paciente a menos que seja realizado, antes da inoculação, algum tratamento *in vitro* que aumente o potencial osteogênico dessas células igualando-o ao de indivíduos saudáveis. Em CTM-MO de ratas jovens sem osteoporose e saudáveis, a adição de T3 em meio de

cultura aumenta significativamente a diferenciação osteogênica (Boeloni et al., 2009). Mas, não se sabe se o tratamento *in vitro* com T3 poderia aumentar também o potencial osteogênico das CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose, igualando-o ao de ratas sem osteoporose, sendo esse mais um objetivo do presente estudo. Melhorar a diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas com osteoporose pode ser uma etapa crucial quando se pretende utilizar as células do próprio paciente no tratamento da osteoporose ou de outras doenças metabólicas do osso que afetam o potencial osteogênico das CTM.

### **OBJETIVOS GERAIS**

- Estudar o potencial osteogênico das CTM-MO de ratas com hipotireoidismo e hipertireoidismo ovariectomizadas e não ovariectomizadas (capítulo 2).
- Estudar o efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina no potencial osteogênico reduzido de CTM-MO de ratas adultas com osteoporose e compará-lo ao das CTM-MO de ratas adultas e jovens sem osteoporose (capítulo 3).
- Estudar o efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina sobre a diferenciação osteogênica de CTM-TA de ratas adultas com osteoporose e compará-lo ao das CTM-TA de ratas adultas e jovens sem osteoporose (capítulo 4).
- Comparar o potencial osteogênico das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) dentro dos grupos de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas com osteoporose (capítulo 5).

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a resistência óssea de tíbias utilizando o teste biomecânico de flexão em três pontos (capítulo 2) e determinar a porcentagem de tecido ósseo trabecular do fêmur e tíbia de ratas por meio de histomorfometria (capítulos 2, 3 e 4).
- Realizar a caracterização fenotípica das CTM da medula óssea e do tecido adiposo por citometria de fluxo (capítulos 2, 3, 4 e 5).
- Avaliar a viabilidade celular pelo uso da técnica de coloração pelo azul de Tripán, avaliar o metabolismo celular pelo teste de conversão do MTT em cristais de formazan, avaliar a atividade da fosfatase alcalina usando o kit BCIP/NBT e quantificar os nódulos de mineralização pela técnica de Von Kossa em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo (capítulos 2, 3, 4 e 5).
- Quantificar a celularidade em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo por morfometria (capítulos 4 e 5).
- Quantificar relativamente os transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, osteopontina (capítulos 2, 3, 4 e 5), sialoproteína (capítulo 2, 3 e 5), BMP-2 (capítulos 3, 4 e 5) e caspase 3 (capítulo 5) em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo pela técnica de RT-PCR em tempo real.

## Capítulo 1

### REVISÃO DE LITERATURA

#### 1. Tecido ósseo

O osso é um tecido metabolicamente ativo que está em constante renovação (Raisz, 1999; Robling et al., 2006; Datta et al., 2008) para manter sua integridade estrutural e a homeostasia sérica do cálcio e do fósforo (Raisz, 1999), ambas dependentes do equilíbrio entre os processos anabólico (aposição) e catabólico (reabsorção) (Bland, 2000). Participam desse processo três tipos celulares distintos e com funções específicas: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos (Robling et al., 2006; Datta et al., 2008).

Os osteoblastos derivam-se da diferenciação das CTM da medula óssea e do periósteo, sendo que inicialmente as CTM dão origem aos pré-osteoblastos que por sua vez se diferenciam em osteoblastos (Robling et al., 2006). Esse evento denominado diferenciação osteogênica é estimulado pela interação coordenada entre fatores de transcrição gênica, fatores de crescimento e hormônios (Compston, 2002; Datta et al., 2008). Dentre eles têm-se: Runx2 também denominado Cbfa1, Osx (osterix) (Katagiri e Takahashi, 2002; Robling et al., 2006; Franceschi et al., 2009), Wnt (Robling et al., 2006), *c-fos*, Msx2, Bapx-1 (Marie, 2001) e Dlx5 (Marie, 2001; Franceschi et al., 2009); além de proteínas morfogenéticas do osso 2 (BMP-2) e 4 (BMP-4) (Abe et al., 2000), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), paratormônio (PTH), 1,25-diidroxicalciferol (Datta et al., 2008), estrogênio (Marie, 2001) e triiodotironina (Boeloni et al., 2009).

Os osteoblastos se localizam na superfície das trabéculas, no canal de Havers, no periósteo e no endósteo, e têm a função primordial de sintetizar matriz óssea não mineralizada (osteóide) (Raisz, 1999; Mackie, 2003). O osteóide é constituído por colágeno I e por proteínas não colagênicas, como osteocalcina (OC) ou proteína Gla, osteopontina (OP), osteonectina (ON) ou SPARC, e sialoproteína óssea (BSP) (Nefussi et al., 1997; Bellows et al., 1999; Mackie, 2003), e por proteoglicanos, principalmente sulfato de condroitina, dentre outros (Mackie, 2003). Cerca de 70% da matriz óssea é mineralizada logo após sua síntese e o restante sofre posteriormente mineralização gradual (Nunes e Nunes, 1988), sendo a fração mineral constituída por cristais de hidroxiapatita [ $3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2(\text{OH})_2$ ] (Mackie, 2003; Hadjidakis e Androulakis, 2006).

Os osteoblastos também controlam a atividade osteoclástica, já que sintetizam a osteoprotegerina (OPG) e expressam o receptor ativador NF-kapa beta ligante (RANK). A expressão do RANKL pelos osteoblastos coordena a reabsorção óssea por osteoclasia e sua ativação é controlada por fatores que estimulam a formação e a atividade osteoclásticas (Mackie, 2003). A OPG bloqueia a ligação entre RANKL e seu receptor celular RANK (Boyle et al., 2003), reduzindo a osteoclastogênese, além de induzir apoptose nos osteoclastos (Robling et al., 2006). A síntese de OPG é estimulada por agentes anabólicos como estrogênio, TGF- $\beta$  e proteína morfogenética do osso (BMP) (Boyle et al., 2003).

À medida que os osteoblastos sintetizam matriz óssea, eles ficam envoltos por ela e passam a ser chamados de osteócitos. Essas células perdem a capacidade de sintetizar matriz (Tate et al., 2004; Datta et al., 2008) e passam a expressar moléculas como matriz dentinária 1 (DMP-1), esclerostina, fosfoglicoproteína extracelular da matriz (MEPE) (Bonewald, 2006; Robling et al.,

2006) e PheX (Bonewald, 2006). Os osteócitos ficam alojados em lacunas e se comunicam com outros osteócitos e com os osteoblastos através de projeções intercanaliculares, as junções *gap* (Mckie, 2003; Tate et al., 2004). Essas junções promovem a comunicação entre o citoplasma de duas células vizinhas e permitem a difusão de íons, metabólitos e moléculas sinalizadoras intracelulares como o cálcio e o AMPc (Civitelli, 2008). Os osteócitos reabsorvem a matriz óssea e os minerais do osso por um mecanismo de reabsorção profunda, conhecido como osteólise osteocítica, que é essencial para manter constantes os níveis de cálcio extracelulares (Bonewald, 2006).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da diferenciação e fusão de precursores de monócitos/macrófagos (Boyle et al., 2003; Datta et al., 2008) que estão localizados na superfície das trabéculas, no canal de Havers, no perióstio e no endóstio (Datta et al., 2008). Esses precursores sintetizam interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que são potentes estimuladores tanto da osteoclastogênese quanto da atividade osteoclástica (Compston, 2002). Além disso, citocinas e hormônios também têm sido implicados em aumentar a atividade osteoclástica como o PTH, a IL-6, as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e a 1,25-diidroxicolecalciferol (Kim et al., 1999). O PTH e a 1,25-diidroxicolecalciferol se ligam a receptores nos osteoblastos e estimulam a produção de citocinas como interleucina 6 (IL-6) e interleucina 11 (IL-11), aumentando a atividade osteoclástica (Compston, 2002). Outros fatores como RANKL, fator estimulante de colônia 1 (CSF-1) (Boyle et al., 2003) e fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) também são necessários para a osteoclastogênese (Robling et al., 2006). Esses fatores são importantes para induzir a expressão de genes que caracterizam a linhagem osteoclástica como fosfatase ácida

resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K (CATK), receptor para calcitonina e integrina  $\beta$ 3 (Boyle et al., 2003). Em resposta à ativação do RANK pelo seu ligante, o osteoclasto inicia sua função de reabsorção óssea alojado na lacuna de Howship (Boyle et al., 2003).

O controle dos processos anabólico e catabólico do tecido ósseo são influenciados por fatores locais representados pelas citocinas tais como as interleucinas IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11; TNF, OPG; fatores de crescimento como o TGF- $\beta$ , FGF e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); óxido nítrico; comunicações intercelulares (Raisz, 1999; Bland, 2000) e estímulo mecânico (Ocarino et al., 2007; Datta et al., 2008). Adicionalmente, o controle sistêmico dos processos anabólico e catabólico é exercido pela ação de fatores de crescimento como o IGF (Raisz, 1999; Bland, 2000; Marie, 2001) e de hormônios como o PTH, hormônio do crescimento (GH) (Hadjidakis e Androulakis, 2006; Datta et al., 2008), 1,25-diidroxicolecalciferol (Raisz, 1999; Bland, 2000), calcitonina, estrógeno, glicocorticóides, andrógenos e de hormônios tireoidianos (Raisz, 1999; Bland, 2000; Hadjidakis e Androulakis, 2006). Sendo que o PTH, a 1,25-diidroxicolecalciferol e a calcitonina são os principais reguladores da homeostasia mineral (Raisz, 1999). Já o estrógeno, a tiroxina (T4) e a triiodotironina (T3) influenciam o metabolismo ósseo, controlando, de forma diferenciada, a reabsorção e a aposição ósseas (Serakides et al., 2004).

## 2. Os hormônios tireoidianos

Os hormônios, representados pela triiodotironina e pela tiroxina, são secretados pela tireóide (Yen, 2001; Nunes, 2003; Demers, 2004) e são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos durante a embriogênese.

Além disso, na vida adulta são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e pelo controle do metabolismo de vários órgãos, razões pelas quais são considerados essenciais para a manutenção da vida (Yen, 2001; Nunes, 2003).

A tireóide secreta predominantemente a tiroxina da qual deriva, por desidratação, a triiodotironina em diversos tecidos, principalmente no fígado e nos rins (Demers, 2004). A síntese desses hormônios é regulada pelo hormônio hipotalâmico liberador de tireotrofina (TRH) que, por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário liga-se a receptores específicos da adeno-hipófise, determinando a síntese e a secreção de hormônio tireotrófico (TSH). O TSH interage com receptores na membrana da célula folicular tireoidiana induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos hormônios tireoidianos (Nunes, 2003; Bassett e Williams, 2008).

### **3. O tecido ósseo e as disfunções tireoidianas**

O efeito dos hormônios tireoidianos (T3 e T4), no tecido ósseo se deve principalmente a ligação da T3 nos receptores nucleares TR $\alpha$  e TR $\beta$  nos osteoblastos (Allain et al., 1996; Gruber et al., 1999), osteoclastos (Allain et al., 1996; Abu et al., 1997), osteócitos (Abu et al., 1997) e nas CTM (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002). Os hormônios tireoidianos exercem importantes funções para o desenvolvimento, crescimento (Yen, 2001) e para o *turnover* ósseos por influenciarem tanto a formação quanto a reabsorção ósseas (Raisz, 1999). Assim, esses hormônios apresentam papel importante no desenvolvimento ósseo normal (Bland, 2000).

As disfunções tireoidianas podem ser causadas por diversos fatores. O hipotireoidismo, tanto em humanos quanto

em animais, pode ser causado pela deficiência de iodo, pois a tireóide precisa desse elemento para a síntese de T3 e T4 (Roberts e Ladenson, 2004). Outra causa de hipotireoidismo adquirido em humanos é uma condição autoimune conhecida como tireoidite de Hashimoto (Roberts e Ladenson, 2004). Além dessas causas, o hipotireoidismo pode ser causado por tratamento da glândula com iodo radioativo, radioterapia de cabeça ou pescoço, agenesia da tireóide que é rara (Segers et al., 1993; Goldsmith et al., 1999; Roberts e Ladenson, 2004), remoção cirúrgica da tireóide e disfunção hipofisária ou hipotalâmica (Roberts e Ladenson, 2004). Com relação ao hipertireoidismo, a causa mais comum em humanos é a doença de Graves (Franklyn e Boelaert, 2012). Neoplasias benignas ou malignas da tireóide também são causas de hipertireoidismo (Franklyn e Boelaert, 2012). No estágio inicial de destruição da tireóide pela tireoidite (Ladenson et al., 2000; Franklyn e Boelaert, 2012) e na administração exógena de hormônios tireoidianos (Ladenson et al., 2000) também pode haver hipertireoidismo. A relação entre disfunção tireoidiana e perda óssea foi descrita pela primeira vez por Von Recklinghausen em 1891 (Stern, 1996). Posteriormente, outros estudos demonstraram que mudanças nas funções tireoidianas conduziam a alterações no tecido ósseo, tanto no hipotireoidismo (Auwerx e Bouillon, 1986; Allain et al., 1995; Ribeiro et al., 2004) quanto no hipertireoidismo (Mundy et al., 1976; Auwerx e Bouillon, 1986; Allain et al., 1995; Serakides et al., 2004; Serakides et al., 2008).

As alterações no tecido ósseo decorrentes das disfunções tireoidianas podem ser explicadas por diversas ações dos hormônios tireoidianos no tecido ósseo, pois os mesmos podem agir de forma direta, através da presença de receptores nucleares nas células do tecido ósseo (Allain et al., 1996; Abu et al., 1997;

Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002), ou indireta, estimulando a síntese de fatores de crescimento, citocinas e outros hormônios (Williams et al., 1998; Kim et al., 1999; Huang et al., 2000; Pepene et al., 2001).

Nesse contexto, T3 e T4, podem aumentar a aposição óssea, pois estimulam a expressão de genes nos osteoblastos para a produção de colágeno (Bland, 2000; Pepene et al., 2003), osteocalcina (Varga et al., 1997; Bland, 2000; Gouveia et al., 2001; Asai et al., 2009) e IGF, importantes para a aposição óssea (Milne et al., 1998; Huang et al., 2000). T3 e T4 também estimulam a síntese e a atividade da fosfatase alcalina, mediadora da aposição e da mineralização ósseas (Banovac e Koren, 2000; Pepene et al., 2003). Além disso, os hormônios tireoidianos estimulam, *in vitro*, de forma dose-dependente a diferenciação osteogênica das CTM-MO de ratas (Boeloni et al., 2009). Estudos comprovam que os sítios ósseos respondem de forma diferente aos hormônios tireoidianos (Suwanwalaikorn et al., 1996; Boeloni et al., 2010), visto que a regulação de alguns genes pela T3 e T4 é diferenciada dependendo do local estudado, pois ratos tratados com tiroxina apresentam aumento da expressão mRNA para OC, OP e fosfatase alcalina em osteoblastos do fêmur, mas não em vértebras (Suwanwalaikorn et al., 1996). Outro estudo observou ainda que, em cultura de células do estroma da medula óssea do fêmur, T3 aumentou os níveis de mRNA para OC e colágeno I, mas em cultura obtida de vértebras, T3 não teve efeito na expressão destes genes, no entanto aumentou a expressão de IGF-1 (Milne et al., 1998).

Além de aumentar a aposição óssea, os hormônios tireoidianos podem estimular a reabsorção óssea osteoclástica de forma direta (Mundy et al., 1976) ou indireta mediada por osteoblastos (Allain et al., 1992; Britto et al., 1994). A triiodotironina também regula a produção de IL-6 pelos

osteoblastos (Siddiqi et al., 1998) e pelas células do estroma da medula óssea (Kim et al., 1999) e de IL-8 pelos osteoblastos (Siddiqi et al., 1998) que são fatores importantes na osteoclastogênese, o que poderia estimular a reabsorção óssea por osteoclasia (Siddiqi et al., 1998; Kim et al., 1999). Mas os efeitos de T3 e T4 na osteoclastogênese são contraditórios, uma vez que há estudos que demonstraram que esses hormônios estimulam a expressão de OPG (Varga et al., 2004), que bloqueia a ligação entre RANKL e seu receptor celular RANK (Boyle et al., 2003), promovendo assim a redução da osteoclastogênese (Robling et al., 2006).

A OPG, por sua vez, é uma glicoproteína solúvel membro da família do receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) que pode ser detectada em uma variedade de locais incluindo os tecidos ósseo, nervoso, tímico, pulmonar, cardíaco, renal, hepático, gástrico, intestinal e tireóideo (Simonet et al., 1997; Theoleyre et al., 2004; Heymann et al., 2008). A OPG tem como alvo os sistemas osteoarticular, imune e vascular (Theoleyre et al., 2004). No tecido ósseo especificamente, a OPG desempenha papel importante na homeostasia regulando a massa óssea juntamente com o RANKL e o RANK (Simonet et al., 1997; Theoleyre et al., 2004). Nas disfunções tireoidianas, as concentrações séricas de OPG podem estar alteradas, sendo que tanto no hipo quanto no hipertireoidismo ocorre um aumento da OPG sérica (Amato et al., 2004; Guang-Da et al., 2005), mas esses níveis de OPG podem retornar ao normal quando a função tireoidiana é restaurada (Amato et al., 2004; Guang-Da et al., 2005; Nagasaki et al., 2005).

Outros fatores como as prostaglandinas têm sido implicados como mediadores dos efeitos reabsortivos dos hormônios tireoidianos no osso (Klaushofer et al., 1989). Postula-se ainda que esses hormônios estimulem a diferenciação dos

osteoclastos mediada pela interação com os osteoblastos, já que induz a expressão de RANKL *in vitro*, mas esse efeito somente é amplificado quando se adiciona 1,25-diidroxicalciferol em culturas de osteoblastos, sugerindo interação dos hormônios tireoidianos com a vitamina D no mecanismo de reabsorção óssea (Miura et al., 2002).

Com relação ao hipertireoidismo, a maioria dos pesquisadores associa essa hiperfunção tireoidiana com a redução da massa óssea em animais (Gouveia et al., 1997; Serakides et al., 2004) e em humanos (Allain e McGregor, 1993; Akalin et al., 2002; Van de Ven e Erdtseck, 2008). As pesquisas demonstram ainda que tanto a aposição quanto a reabsorção ósseas estão aumentadas no hipertireoidismo (Coindre et al., 1986; Allain e McGregor, 1993; Garnero et al., 1994) e que a osteopenia se instala quando há supremacia da reabsorção frente a aposição óssea (Coindre et al., 1986; Mosekilde et al., 1990; Allain e McGregor, 1993; Garnero et al., 1994; Serakides et al., 2004). O efeito da administração de T4 em ratas ovariectomizadas é dose-dependente sendo que altas doses de T4 agravam a osteopenia após trinta dias de tratamento, enquanto doses próximas à fisiológica, administradas pelo mesmo período, previnem a osteopenia pós-ovariectomia (Gouveia et al., 1997). No entanto, há outros estudos que demonstram que o efeito de elevadas doses de tiroxina em ratas ovariectomizadas é dependente do período de administração da tiroxina, prevenindo a osteoporose da deficiência dos esteróides sexuais em um primeiro momento, por estimular a atividade osteoblástica, e agravando a osteoporose após três meses de administração (Serakides et al., 2004). Em ratos não castrados, o hipertireoidismo também pode aumentar a massa óssea por estimular a atividade osteoblástica (Allain et al., 1995).

Alguns pesquisadores afirmam que no hipertireoidismo há hiperfosfatemia e que a mesma se dá pelo aumento da reabsorção óssea que causa hipercalcemia, hipoparatiroidismo e consequente aumento da reabsorção tubular de fósforo (Auwerx e Bouillon, 1986; Mosekilde et al., 1990). No entanto, pelo que se sabe sobre a regulação do cálcio e do fósforo, é improvável que essa seja a razão da hiperfosfatemia, já que ratas hipertireóideas apresentam hiperfosfatemia sem a coexistência de hipercalcemia. Além disso, os valores de tiroxina livre apresentam correlação positiva com os níveis de fósforo, mas não com os do cálcio (Serakides et al., 2000a). Assim, a hiperfosfatemia advém da ação de T3 e T4 na absorção intestinal do fósforo (Cross e Peterlik, 1991) e, nos rins, os hormônios tireoidianos estimulam o co-transporte Na<sup>+</sup>/Pi (fósforo inorgânico), proporcionando aumento da reabsorção tubular de fósforo (Espinosa et al., 1984; Alcade et al., 1999; Cano et al., 1999).

No hipotireoidismo, por sua vez, ocorre menor *turnover* ósseo e o crescimento, o desenvolvimento e a massa óssea estão diminuídos (Mosekilde e Melsen, 1978; Fadaei et al., 2005). Além disso, o hipotireoidismo causa osteoporose em ratas não ovariectomizadas decorrente do menor crescimento, da inibição da aposição e do aumento da reabsorção ósseas; potencializando ainda a osteoporose em ratas ovariectomizadas (Ribeiro et al., 2004).

Assim, no hipotireoidismo ocorre redução do metabolismo ósseo e da aposição óssea (Mosekilde e Melsen, 1978; Fadaei et al., 2005), visto que ocorre um decréscimo no recrutamento, maturação e na atividade das células ósseas (Eriksen et al., 1986). E essa redução pode ocorrer por interferência direta ou indireta dos hormônios tireoidianos. A interferência direta pode ocorrer, pois T3 e T4 estimulam a diferenciação de pré-osteoblastos (Ernst e

Froesch, 1987) e a diferenciação osteogênica de CTM-MO de ratos *in vitro* (Boeloni et al., 2009). Além disso, T3 e T4 estimulam a atividade da fosfatase alcalina (Banovac e Koren, 2000), a expressão de genes nos osteoblastos para a produção de colágeno (Bland, 2000; Pepene et al., 2003) e osteocalcina (Varga et al., 1997; Gouveia et al., 2001; Bland, 2000; Asai et al., 2009) importantes para a aposição óssea (Huang et al., 2000). No entanto, a ação dos hormônios tireoidianos sobre a matriz óssea pode ser também indireta, pois T3 estimula a expressão de genes para OPG em células MC3T3-E1 *osteoblastic-like* (Varga et al., 2004), e como a OPG inibe a reabsorção óssea, esse mecanismo pode contribuir para aumentar a massa óssea (Boyle et al., 2003).

Os hormônios tireoidianos estimulam a síntese de GH (Wilkins et al., 1974) e de IGF-1 pelos osteoblastos (Varga et al., 1994; Pepene et al., 2001; Huang et al., 2000) e pelas células do estroma da medula óssea (Milne et al., 1998). Dessa forma, outra ação indireta dos hormônios tireoidianos sobre a síntese de matriz óssea se deve a ação dos mesmos sobre o GH e o IGF-1 (Huang et al., 2000). No hipotireoidismo, há redução da concentração plasmática de GH e de IGF-1, o que indiretamente pode contribuir para a gênese da osteoporose decorrente da deficiência dos hormônios tireoidianos (Wilkins et al., 1974; Burstein et al., 1979; Wolf et al., 1989).

Os hormônios tireoidianos são necessários para o transporte intestinal de cálcio e fósforo mediado pela 1,25-diidroxicolecalciferol (Cross et al., 1986). Além disso, nos rins, os hormônios tireoidianos estimulam o co-transporte Na<sup>+</sup>/Pi, proporcionando aumento da reabsorção tubular de fósforo (Alcade et al., 1999; Cano et al., 1999). T3 e T4 também aumentam a absorção intestinal do fósforo mediada por gradiente de concentração

dependente do sódio (Cross e Peterlik, 1991). Assim, a diminuição da mineralização óssea na deficiência dos hormônios tireoidianos parece ser decorrente da redução dos valores plasmáticos de cálcio e fósforo (Bijlsma et al., 1983; Cross et al., 1986).

#### **4. O tecido ósseo e a deficiência de hormônios sexuais**

Os efeitos adversos da deficiência dos hormônios sexuais sobre o tecido ósseo foram descritos primeiramente por Albright e colaboradores em 1940 e por Albright e Reifenstein em 1947 (Balasch, 2003). Atualmente, o que se sabe é que os hormônios sexuais desempenham papel fundamental na manutenção da homeostase e no crescimento ósseo (Weitzmann e Pacifici, 2006). Assim, a deficiência de hormônios sexuais causa perda de massa óssea podendo ocasionar osteoporose (Manolagas et al., 2002; Syed e Khosla, 2005) tanto em mulheres na menopausa (Nelson, 2008) quanto em animais com deficiência de hormônios sexuais (Wronski et al., 1985; Imai et al., 2009).

Estudos confirmam que na mulher, após cessar a produção de hormônios sexuais, a massa óssea diminui rapidamente nos primeiros 10 anos e lentamente nos anos subsequentes (Ishida et al., 1996; Compston, 2001; Riggs et al., 2002), havendo, a cada ciclo de remodelação óssea, menor quantidade de osso formado e maior quantidade de osso reabsorvido (Bland, 2000; Ishida et al., 1996). No homem, ao contrário, a diminuição da massa óssea se dá de forma lenta e progressiva (Compston, 2001; Riggs et al., 2002).

Adicionalmente, os mecanismos de ação pelos quais os esteróides sexuais atuam sobre o osso não estão totalmente esclarecidos (Balasch, 2003; Imai et al., 2009). Mas, é sabido que os esteróides



sexuais podem ter um efeito direto mediado pela presença de receptores nas células ósseas ou efeito indireto na expressão gênica, liberação de citocinas e outros fatores de crescimento importantes para controlar o *turnover* ósseo (Balasch, 2003). O efeito direto dos esteróides sexuais sobre o tecido ósseo se dá pela presença de receptores para estrógeno ER $\alpha$  e ER $\beta$  nos osteoblastos (Eriksen et al., 1988), osteócitos (Tomkinson et al., 1998), osteoclastos (Oursler et al., 1991) e nas CTM (Gruber et al., 1999; Zhou et al., 2001).

O estrógeno pode atuar tanto *in vivo* quanto *in vitro* sobre os osteoblastos. *In vivo*, o E2 tem efeito estimulatório sobre a formação óssea (Chow et al., 1992), e *in vitro*, estimula a proliferação e a expressão de fosfatase alcalina em osteoblastos (Qu et al., 1998). Além disso, o estrógeno estimula a expressão de mRNA para genes marcadores da atividade osteoblástica como colágeno I, osteocalcina, osteopontina, osteonectina e fosfatase alcalina (Gray et al., 1987; Ernst et al., 1988; Robinson et al., 1997; Qu et al., 1998) e exerce efeito estimulatório sobre a síntese e a mineralização da matriz óssea (Bland, 2000).

O estrógeno também diminui a responsividade dos osteoclastos ao RANKL (Srivastava et al., 2001). Além disso, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, suprime a expressão de RANKL pelos osteoblastos, células B e células T (Guggenbuhl, 2009) e aumenta a produção de OPG, diminuindo assim a osteoclastogênese (Hofbauer et al., 1999). O estrógeno também regula a síntese de fatores e citocinas envolvidas na remodelação óssea como TNF $\alpha$ , M-CSF, IL-6 (Syed e Khosla, 2005; Weitzmann e Pacifici, 2006), IL-1 e prostaglandinas (Riggs et al., 2002) e estimula a produção de TGF- $\beta$ , que aumenta a apoptose de osteoclastos (Hughes et al., 1996; Syed e Khosla, 2005). O TNF- $\alpha$  especificamente

estimula a atividade osteoclástica (Fuller et al., 2002) e inibe a formação de osteoblastos, conduzindo a um desequilíbrio entre a formação e a reabsorção ósseas (Nunes, 2003). A IL-1, por sua vez, promove a expressão de RANKL pelas células do estroma da medula óssea e osteoblastos e estimula a atividade dos osteoclastos, além de mediar em parte a ação do TNF sobre os osteoclastos (Wei et al., 2005). Tanto em mulheres na menopausa quanto em animais ovariectomizados ocorre um aumento nos níveis de TNF na medula óssea e no sangue periférico (Pacifici et al., 1991). A IL-6 é uma citocina produzida pelos osteoblastos e pelas células da medula óssea, importante no processo catabólico do osso e que tem sua expressão inibida pelo estrógeno. Além disso, essa citocina é um dos fatores responsáveis pelo aumento da reabsorção óssea quando da deficiência de estrógeno (Girasole et al., 1992).

O efeito direto dos esteróides sexuais masculinos no metabolismo do tecido ósseo também pode ser sugerido pela presença de receptores para andrógenos (AR) em osteoblastos, osteócitos (Compston, 2001; Chiang et al., 2009), osteoclastos (Bellido et al., 1995) e em células do estroma da medula óssea (Gruber et al., 1999), além da comprovada conversão da testosterona em diidrotestosterona no osso (Vanderschueren et al., 1998; Gaumet-Meunier et al., 2000). No entanto, parece que o principal mecanismo pelo qual a testosterona atua no osso é mediado por sua transformação em estrógeno, pela ação de uma aromatase (Vanderschueren et al., 1998; Notelovitz, 2002). Os osteoblastos possuem uma série de enzimas, tais como a 20-alfa-hidroxiesteróide desidrogenase (HSD), a 7-alfa-hidroxilase e a 17-beta-HSD, que metabolizam os andrógenos e regulam a responsividade do osso à ação deles (Ishida et al., 2002). Os andrógenos inibem a diferenciação dos osteoclastos, estimulam a aposição e a mineralização da matriz óssea

(Vanderscheren e Vandenput, 2000), por promoverem a proliferação e a diferenciação dos pré-osteoblastos (Notelovitz, 2002), suprimem a expressão de RANKL e diminuem a produção de OPG (Syed e Khosla, 2005; Weitzmann e Pacifici, 2006).

Os hormônios sexuais regulam o número de osteoclastos e de osteoblastos, pois controlam a transcrição de genes responsáveis tanto pela osteoclastogênese quanto pela replicação e diferenciação das CTM (Manolagas et al., 2002). Os hormônios sexuais também atuam sobre a média de vida das células ósseas, visto que apresentam efeitos pró-apoptóticos em osteoclastos (Kameda et al., 1997) e anti-apoptóticos em osteoblastos e osteócitos (Kousteni et al., 2001). Em animais ovariectomizados e orquiectomizados há aumento da apoptose de osteoblastos e osteócitos, confirmando a ação da deficiência dos hormônios sexuais sobre o ciclo de vida dessas células (Kousteni et al., 2001). O mecanismo pelo qual os hormônios sexuais induzem apoptose em osteoblastos e osteócitos é devido à ação tanto do estrógeno quanto dos andrógenos em aumentar a fosforilação de quinase regulada por sinais extracelulares (ERK), também chamadas de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Kousteni et al., 2001), sendo que essas ERK são uma das três subfamílias da MAPK e as outras duas subfamílias são jun N-terminal kinases (JNK) e a p38 kinases. As MAPK são quinases serina/treonina que transduzem sinais químicos e físicos da superfície celular para o núcleo, controlando assim a proliferação, a diferenciação e a sobrevivência celulares (Chang e Karin, 2001). A transdução do sinal da superfície celular pelas MAPK inicia com a fosforilação e o recrutamento de proteínas acessórias como Ras, Src ou She. Este evento é seguido por uma cascata de outros eventos que conduz a ativação de ERK que tem sido associada com sobrevivência

celular em uma variedade de tipos celulares que podem resultar em fosforilação e posterior ativação de proteínas pró-apoptóticas como Bad, que é membro da família Bcl2 (Chao e Korsmeyer, 1998). Portanto, na deficiência dos hormônios sexuais pode ocorrer aumento da osteoclastogênese e menor formação de osteoblastos e osteócitos, ocorrendo assim desequilíbrio entre a formação e reabsorção ósseas com progressiva redução da massa óssea (Manolagas et al., 2002).

## 5. Células tronco

As células tronco são células indiferenciadas representadas pelas células tronco embrionárias (CTE), obtidas do embrião na fase de blastocisto, e pelas células tronco adultas (CTA) oriundas do feto ou de indivíduos adultos (Grove et al., 2004). Independente da sua origem, elas não são especializadas, são capazes de se dividir por longos períodos e podem gerar tipos celulares especializados (Lerou e Daley, 2005).

As células tronco são classificadas em: i) totipotentes ou embrionárias capazes de se diferenciar em todas as células do indivíduo completamente formado; ii) pluripotentes, capazes de se diferenciar em quase todos os tecidos, com exceção da placenta e dos anexos embrionários, iii) multipotentes, que originam menor número de linhagens celulares; e iv) unipotentes, que se diferenciam em um único tecido (Wagers e Weisman, 2004).

As células tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e podem se diferenciar em qualquer tipo celular originário de uma das três camadas germinativas: ectoderma, mesoderma e endoderma (Thomson et al., 1998). Além disso, essas células podem ser expandidas indefinidamente *in vitro*, sem a perda de seu

potencial de diferenciação, ao contrário das células tronco adultas (McLaren, 2001).

As células tronco adultas são células multipotentes, encontradas entre as células diferenciadas de um tecido (Presnell et al., 2002) com função de se auto-renovar e manter ou reparar os tecidos nos quais residem (Shenfield et al., 2002). Mas, algumas pesquisas têm sugerido que as CTA são pluripotentes e apresentam potencial de diferenciação próximo ao das CTE, podendo originar tipos celulares diferentes daqueles que compõem o tecido no qual residem (Bianco et al., 2001; Presnell et al., 2002), processo conhecido como plasticidade ou transdiferenciação (Minguell et al., 2001; Wagers e Weissman, 2004). Exemplos dessa plasticidade são representados pela diferenciação das CTM da medula óssea em hepatócitos (Sato et al., 2005) e pela diferenciação das células do sistema nervoso e musculares em células hematopoiéticas (Wagers e Weissman, 2004).

Tanto as CTE quanto as CTA apresentam vantagens e desvantagens na medicina regenerativa. A utilização das CTE pode acarretar em alguns riscos, tais como, a proliferação celular descontrolada resultando na formação de teratomas e de outros tumores (Shenfield et al., 2002; Rao, 2004). Além disso, as questões éticas e religiosas que envolvem o uso destas células não se aplicam ao uso das CTA (McLaren, 2001). Outra vantagem das CTA é que as mesmas podem ser expandidas em cultura e depois reintroduzidas no próprio paciente, não induzindo rejeição pelo sistema imunológico (Ricardo e Deane, 2005) ao contrário das CTE (Bobis et al., 2006). Mas a capacidade proliferativa e de diferenciação das CTA diminui com a idade, o que limita o transplante autólogo dessas células para tratamento de doenças osteoarticulares degenerativas decorrentes da idade (Heng et al., 2004). No entanto, uma das principais vantagens do seu uso é

que as CTA são embriologicamente mais evoluídas e, por isso, percorrem um caminho menor até a diferenciação, diminuindo o risco de desvios ontogênicos e de outros efeitos indesejados (Araújo et al., 2005).

### **5.1 Caracterização e diferenciação osteogênica das CTM-MO**

As CTM-MO foram primariamente descritas por Fridenstein e colaboradores em 1966 (Tae et al., 2006; Liu et al., 2009a) e com o passar dos anos, muitas pesquisas têm sido realizadas com enfoque na identificação, isolamento e na caracterização das CTM, bem como em seu uso no tratamento de doenças como do miocárdio, sistema nervoso e tecido ósseo, dentre inúmeras outras. Apesar de todos os avanços gerados com essas pesquisas, existem controvérsias quanto à terminologia das CTM-MO, podendo ser chamadas de células do estroma da medula, células tronco estromais da medula óssea, células precursoras do estroma, células tronco esqueléticas e células progenitoras adultas. No entanto, o termo células tronco mesenquimais tem sido a terminologia mais aceita e utilizada (Chen et al., 2008).

Além da medula óssea (Jiang et al., 2002), as CTM podem ser encontradas em vários tecidos, em maior ou menor número. Dentre eles tem-se: tecido adiposo (Zuk et al., 2001; Zhu et al., 2008), derme (Toma et al., 2001), músculo esquelético, membrana sinovial, pulmão (Tae et al., 2006), fígado, sangue periférico, intestino (Presnell et al., 2002), sistema nervoso periférico (Kruger et al., 2002), sistema nervoso central (Gage, 2000), miocárdio (Beltrami et al., 2003), polpa dentária (Meirelles et al., 2006), líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, placenta (Bobis et al., 2006), vasos sanguíneos, córnea e retina (Grove et al., 2004).

As CTM-MO são mais estudadas em comparação às de outros sítios do organismo pelo fato de serem facilmente isoladas, possuem grande capacidade de expansão *in vitro* e amplo potencial de diferenciação (Minguell et al., 2001; Payushina et al., 2006; Tae et al., 2006). Essas células já foram isoladas da medula óssea de diversas espécies como camundongo, ratos, gatos, cães, coelhos, suínos e seres humanos (Chamberlain et al., 2007). Além disso, essas células podem se diferenciar em osteoblastos, condroblastos, adipócitos (Chen et al., 2008) e miócitos (Payushina et al., 2006). Sendo que, cada tipo de diferenciação é regulada por diferentes fatores de transcrição. A diferenciação das CTM-MO em osteoblastos, condroblastos, adipócitos e miócitos, é controlada pelo Runx2/Osterix, SOX5/6/7, PPAR $\gamma$  e MyoD *family*, respectivamente (Katagiri e Takahashi, 2002). As CTM-MO também são capazes de se diferenciar em células não mesenquimais representadas pelas células neurais e epiteliais sob condições *in vitro* específicas (Jiang et al., 2002; Tae et al., 2006).

As culturas de CTM podem ser caracterizadas pela expressão ou ausência de marcadores fenotípicos (Payushina et al., 2006). Essas células expressam CD105, CD73, CD44, CD71, CD106, CD124 (Jackson et al., 2007), CD54 (Tocci e Forte, 2003), CD90 (Thy-1) (Bobis et al., 2006; Panetta et al., 2009), CD144, CD166 (ALCAM), CD115, CD29, HLA-ABC, Sca-1 (Bobis et al., 2006; Chen et al., 2008) e Stro-1 (Bobis et al., 2006; Chen et al., 2008; Panetta et al., 2009). Mas não expressam marcadores de células tronco hematopoiéticas como: CD45, CD34 (Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006; Jackson et al., 2007; Panetta et al., 2009), CD14 (Bobis et al., 2006; Jackson et al., 2007; Panetta et al., 2009), CD11b, CD31, CD33 e CD133 (Bobis et al., 2006). Além disso, existem marcadores das CTM que

também podem ser expressos em fibroblastos (Ishii et al., 2005a), o que dificulta a obtenção de uma cultura totalmente pura e a identificação destas células *in vivo* (Bobis et al., 2006). No entanto, o “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*” propôs que as CTM expressam CD73 e CD90, e não expressam CD45 sendo este painel de marcação mundialmente utilizado e aceito para caracterizar fenotipicamente as CTM (Schäffler e Büchler, 2007). As CTM também expressam integrinas como  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha v$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  e  $\beta 4$ , além de moléculas de adesão que incluem VCAM-1, ICAM-1, ICAM-3 e ALCAM (Minguell et al., 2001).

Para o crescimento e expansão *in vitro* das CTM é utilizado um meio básico representado por *Dulbecco's modified Eagles's medium* (DMEM) enriquecido com antibióticos, antifúngicos e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Pittenger et al., 1999; Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). Na ausência de SFB, as células apresentam baixo índice mitótico, pouca adesão e elevada taxa de apoptose (Heng et al., 2004). Durante a proliferação, as CTM aderem às placas ou garrafas de cultivo e podem ser expandidas *in vitro* por longo período (Tae et al., 2006). No entanto, com o passar do tempo e com o aumento do número de passagens, o potencial proliferativo diminui, sendo descrito que até a 30<sup>a</sup> passagem as células crescem regularmente e diminuem a partir de então (Kim et al., 2008). Isso provavelmente ocorre devido à senescência replicativa, quando as células morrem por apoptose (Stenderup et al., 2003). Adicionalmente, a idade e doenças metabólicas podem influenciar na proliferação e no potencial de diferenciação das CTM (Liu et al., 2009a). As CTM podem se diferenciar em osteoblastos tanto *in vivo*, como parte de um processo reparativo de uma determinada doença ou sob condições fisiológicas

(Marie, 2001), quanto *in vitro*, dependendo das condições do meio de cultura (Payushina et al., 2006). Fisiologicamente, a formação óssea envolve um complexo processo de desenvolvimento de células osteoprogenitoras e sua progressiva diferenciação em osteoblastos, que se originam de CTM sob a influência de fatores sistêmicos e locais (Marie, 2001). Assim, durante a diferenciação osteogênica, as células tronco passam por diversos estágios sucessivos do desenvolvimento, tais como: i) CTM, ii) células osteoprogenitoras, iii) pré-osteoblastos, iv) osteoblastos e vi) osteócitos (Heng et al., 2004).

Para a diferenciação osteogênica das CTM *in vitro*, a dexametasona, o ácido ascórbico e o  $\beta$ -glicerofosfato são fatores indispensáveis no meio de cultura (Jackson et al., 2007; Panetta et al., 2009). A dexametasona induz o estágio inicial de diferenciação que é acompanhada pelo aumento da expressão de fosfatase alcalina (Payushina et al., 2006). Já o ácido ascórbico e o  $\beta$ -glicerofosfato são essenciais para as células atingirem os estágios tardios da diferenciação onde ocorrem a formação e a mineralização da matriz extracelular (Payushina et al., 2006).

Durante a diferenciação osteogênica, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, ocorre a expressão de fosfatase alcalina (Marie, 2001; Payushina et al., 2006; Tae et al., 2006), a síntese de colágeno I, de glicosaminoglicanos e de proteínas como osteopontina, osteonectina, osteocalcina e sialoproteína óssea e a mineralização da matriz (Marie, 2001), sendo que *in vitro*, a mineralização da matriz é observada pela formação de nódulos mineralizados (Tae et al., 2006) que podem ser visualizados pelas técnicas de coloração Alizarin red ou Von kossa (Chamberlain et al., 2007). Durante a diferenciação osteogênica, essas células também expressam genes como osteocalcina, osteopontina, colágeno I,

Runx2, BMP-2, BMP-4 (Karaoz et al., 2009), osterix, sialoproteína óssea (Jackson et al., 2007) e osteonectina (Payushina et al., 2006).

Dentre as proteínas não colagênicas, a osteocalcina é uma glicoproteína específica do tecido ósseo que promove a mineralização da matriz e é considerada um marcador inicial da diferenciação osteogênica (Nakamura et al., 2009). A osteopontina, por sua vez, é uma fosfoproteína que possui domínios ligantes de cálcio e está relacionada com a proliferação celular e com a mineralização da matriz óssea (Donzelli et al., 2007). A osteonectina também está relacionada com a mineralização da matriz no estágio inicial da formação óssea (Karaoz et al., 2009).

A diferenciação osteogênica das CTM, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, está sob o comando de fatores que vêm sendo pouco a pouco elucidados. Esses fatores induzem estímulos celulares e moleculares durante o processo de diferenciação (Hughes et al., 2006) e são representados por fatores de transcrição gênica, fatores de crescimento, citocinas, densidade celular, contato físico com as células vizinhas, estímulos físico (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006) e mecânico (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006; Ocarino et al., 2007) e por hormônios (Ebert et al., 2007). Os fatores de transcrição gênica são representados por Runx2 (também chamado de Cbfa1) (Marie, 2001; Datta et al., 2008; Franceschi et al., 2009), Osx (Katagiri e Takahashi, 2002; Robling et al., 2006; Datta et al., 2008; Franceschi et al., 2009), Wnt (Robling et al., 2006; Datta et al., 2008; Liu et al., 2009b; Panetta et al., 2009),  $\beta$ -catenina (Datta et al., 2008), Smad (Katagiri e Takahashi, 2002), Sinic hedgehog (Shh) (Panetta et al., 2009), TAZ (Hong et al., 2005), família AP-1 (c-Fos), Msx2, Bapx-1 (Marie, 2001) e Dlx5 (Marie, 2001; Franceschi et al., 2009). O Runx2, por sua vez, regula a expressão de genes

para colágeno I, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína óssea e para TGF- $\beta$  (Ducy et al., 1997; Ducy e Karsenty, 1998; Datta et al., 2008), enquanto o Smad induz a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de osteocalcina em células *osteoblastic-like* (C2C12 e 10T1/2) (Katagiri e Takahashi, 2002). O Wnt promove a osteogênese por ativar o Runx2 em CTM (Panetta et al., 2009), mas inibe a diferenciação condrogênica (Day et al., 2005).

Outros fatores como as BMP, também são importantes durante a diferenciação osteogênica (Abe et al., 2000; Katagiri e Takahashi, 2002; Datta et al., 2008; Panetta et al., 2009) sendo capazes de induzir a diferenciação, estimulando principalmente a formação de nódulos de mineralização e a expressão de marcadores da diferenciação osteoblástica (Chen et al., 1991). As BMP 2, 4, 6, 7 e 9 são consideradas as mais importantes durante o processo de diferenciação osteogênica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Luu et al., 2007; Panetta et al., 2009). As BMP promovem a expressão de Runx2 (Marie, 2001), sendo que a BMP-2 juntamente com o Wnt e a BMP-7 também promovem a expressão de Runx2 (Datta et al., 2008). As BMP também estimulam a expressão de genes para fosfatase alcalina, colágeno I e osteocalcina em osteoblastos e também estimulam a formação de nódulos de mineralização (Katagiri e Takahashi, 2002).

Além das BMP, outros fatores são importantes para a diferenciação osteogênica como: IGF-1 (Marie, 2001; Datta et al., 2008), PDGF (Chaudhary et al., 2004; Liu et al., 2009a), FGF-1 (Hughes et al., 2006), FGF-2, VEGF (Marie, 2001; Datta et al., 2008; Panetta et al., 2009), fator de crescimento epidermal (EGF) (Bianco et al., 2001; Datta et al., 2008), PGE2 (Keila et al., 2001), IGF-1 (Jia e Heersche, 2002) e TGF- $\beta$  (Datta et al., 2008; Panetta et al., 2009). Mas, existem fatores inibidores dessa diferenciação como

o fator inibitório leucêmico, a oncostatina M, o calcitriol (Payushina et al., 2006) e o TNF- $\alpha$  (Hughes et al., 2006).

O TGF- $\beta$  juntamente com as BMP, regulam a proliferação e a diferenciação celulares e a síntese de matriz óssea, sendo o TGF- $\beta$  um potente indutor da síntese de colágeno pelos osteoblastos (Panetta et al., 2009). Com relação ao FGF, geralmente o FGF-1, é mais potente do que o FGF-2 (Canalis et al., 1988) e esses fatores estimulam a proliferação dos pré-osteoblastos *in vitro*, mas não aumentam a produção de colágeno ou a atividade da fosfatase alcalina (Canalis e Raisz, 1980; Rodan et al., 1989; Hurley et al., 1993). Já o FGF-2 é um fator de crescimento que suprime a expressão de marcadores da diferenciação osteogênica *in vitro*. No entanto, *in vivo*, o FGF-2 estimula a formação óssea (Hughes et al., 2006). O PDGF é sintetizado pelas CTM e pelos osteoblastos e estimula o recrutamento das CTM durante a formação e remodelação ósseas (Hughes et al., 2006). O IGF-1 estimula a proliferação das CTM e a expressão de fatores de transcrição como o osterix (Hughes et al., 2006), sendo este efeito potencializado pela BMP-2 (Celil e Campbell, 2005).

### 5.1.1 Ação dos hormônios na diferenciação osteogênica das CTM-MO

Comprovadamente, as CTM-MO apresentam receptores para estrógeno (Gruber et al., 1999; Wang et al., 2006a), andrógeno, 1,25-diidroxicolecalciferol (Gruber et al., 1999), hormônios tireoidianos (Gruber et al., 1999; Milne et al., 1999; Siddiqi et al., 2002), hormônio do crescimento (Cool et al., 2005), glicocorticóides (Derfoul et al., 2006) e leptina (Hess et al., 2005). Sendo assim, vários hormônios, tais como o estrógeno, a progesterona, o andrógeno, a vitamina D, o paratormônio, o hormônio do crescimento, os glicocorticóides, a leptina e os hormônios tireoidianos podem ser

importantes moduladores da proliferação celular, da diferenciação osteogênica das CTM e da síntese de matriz óssea (Thomas et al., 1999; Ebert et al., 2007).

O estrógeno estimula *in vitro* a diferenciação das CTM-MO em osteoblastos (Pan et al., 2005), ativando a expressão de BMP-2 (Zhou et al., 2003), controlando a expressão de fosfatase alcalina (Zhou et al., 2001; Holzer et al., 2002; Hong et al., 2009), colágeno I, TGF- $\beta$ , Cbfa1 (Zhou et al., 2001) e de osteocalcina e a mineralização da matriz extracelular (Hong et al., 2006; Hong et al., 2009). Além disso, as CTM-MO de ratas ovariectomizadas apresentam menor diferenciação osteogênica, comprovando a ação *in vivo* dos hormônios sexuais sob essas células (Ocarino et al., 2008).

Com relação à progesterona, estudos em ratos comprovaram a existência de receptores em células osteoprogenitoras (Namara e Loughrey, 1998) e seu efeito direto na proliferação e na diferenciação das células osteoprogenitoras em osteoblastos (Ishida e Heersche, 1997). No entanto, o efeito da progesterona na proliferação e na diferenciação osteogênica das CTM-MO é dose e sexo dependentes, estimulando mais a diferenciação das CTM de ratas fêmeas do que de machos (Ishida e Heersche, 1997).

Os andrógenos promovem a proliferação e a diferenciação das CTM-MO e estimulam a síntese e a mineralização da matriz óssea (Ishida e Heersche, 1997). Além disso, os andrógenos também controlam a síntese de várias citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IGF, PGE2 e de TGF- $\beta$  que podem ser responsáveis pelo efeito indireto desses hormônios na diferenciação osteogênica das CTM-MO e das células osteoprogenitoras (Chiu et al., 2000).

A vitamina D estimula a diferenciação osteogênica das CTM-MO por inibir a

proliferação e estimular a expressão de fosfatase alcalina (Rickard et al., 1995; Fromigué et al., 1997; D'Ippolito et al., 2002). Além disso, a vitamina D, juntamente com a dexametasona, apresenta efeitos aditivos na expressão de fosfatase alcalina em culturas de CTM-MO durante a diferenciação osteogênica (Fromigué et al., 1997). A vitamina D associada ao plasma rico em plaquetas (PRP) também demonstra efeito aditivo na expressão de fosfatase alcalina em cultura de CTM-MO (Feng et al., 2010). Adicionalmente, durante a diferenciação osteogênica das CTM-MO, o tratamento com vitamina D e PTH aumenta a expressão de osteocalcina e de fosfatase alcalina e quando este tratamento é acrescido de BMP-6 e BMP-4 ocorre maior expressão de osteocalcina e aumento da formação de nódulos de mineralização (Sammons et al., 2004).

O hormônio do crescimento tem papel importante na manutenção da massa óssea em indivíduos adultos por regular a remodelação óssea pela interação com IGF-1 (Ueland, 2005) que é um importante estimulador da aposição óssea (Huang et al., 2000). Além disso, o GH estimula a diferenciação osteogênica das CTM-MO e induz a expressão de Cbfa1, colágeno I, osteopontina e osteocalcina e a formação de nódulos de mineralização (Cool et al., 2005). O IGF-1 também contribui para a expressão de genes para colágeno I, Cbfa1, fosfatase alcalina e osterix nas culturas de CTM-MO (Celil et al., 2005; Koch et al., 2005).

Os glicocorticóides são requeridos *in vivo* para a formação óssea e para estimular a diferenciação osteogênica das CTM-MO (Eijken et al., 2006; Phillips et al., 2006). No entanto, o tratamento prolongado *in vivo* pode causar redução da massa óssea (Pierotti et al., 2008). *In vitro*, os glicocorticóides também estimulam a diferenciação das células osteoprogenitoras e, ao contrário da progesterona, não têm

efeito sexo dependente (Ishida e Heersche, 1997). O aumento na diferenciação osteogênica promovido pelos glicocorticóides está associado com a indução da expressão de marcadores dessa diferenciação tais como: fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea (Kasugai et al., 1991). O efeito dos glicocorticóides é dose-dependente. Em concentrações fisiológicas esse hormônio promove o recrutamento e a diferenciação osteogênica das células do estroma da medula óssea e em concentrações elevadas (100nM) inibe a proliferação celular, sem afetar a diferenciação (Walsh et al., 2001).

A leptina estimula a diferenciação osteogênica das CTM-MO, aumentando a mineralização da matriz, a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de colágeno I, além de aumentar a expressão de fosfatase alcalina, de colágeno I e de osteocalcina (Thomas et al., 1999).

O efeito *in vitro* da triiodotironina (T3) na diferenciação osteogênica das CTM-MO também é dose dependente, sendo que algumas doses podem aumentar a síntese e a maturação do colágeno, o número e o tamanho dos nódulos de mineralização (Boeloni et al., 2009) e a expressão de osteocalcina para níveis semelhantes aqueles expressos em culturas de osteoblastos (Hell, et al., 2011).

## **5.2 Células tronco mesenquimais do tecido adiposo e diferenciação osteogênica**

As células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) foram primariamente descritas por Zuk e colaboradores em 2001 e, desde então, inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o intuito de caracterizar fenotipicamente e estudar o potencial de diferenciação dessas células. As CTM-TA podem ser extraídas do tecido adiposo intra-abdominal ou subcutâneo (Locke et al., 2009; Rada et al., 2009) e já

foram isoladas de diversas espécies como ratos (Zaminy et al., 2008; Arrigoni et al., 2009), camundongos (Malladi et al., 2006), coelhos (Peptan et al., 2006; Arrigoni et al., 2009), cães (Li et al., 2007; Vieira et al., 2010), suínos (Qu et al., 2007; Arrigoni et al., 2009) e humanos (Zuk et al., 2002; Toyoda et al., 2009).

Uma grande variedade de termos é utilizada para denominar as células multipotentes derivadas do tecido adiposo, podendo ser chamadas de pré-adipócitos, células mesenquimais derivadas do tecido adiposo, células tronco adultas derivadas do tecido adiposo, células estromais aderentes derivadas do tecido adiposo, células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo e células estromais derivadas do tecido adiposo. No entanto, durante a “*Second Annual International Fat Applied Technology Society Meeting*” propôs-se que a terminologia mais aceitável seria a de células estromais derivadas do tecido adiposo (Levi e Longaker, 2011).

O método de isolamento das CTM-TA mais empregado é o enzimático, sendo a colagenase tipo I a enzima mais utilizada (Zuk et al., 2001). Esse método consiste em uma lavagem inicial do tecido adiposo em solução salina para remover as células sanguíneas com posterior incubação com colagenase a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> para separar a fração celular. Após esse processo, as CTM-TA podem ser cultivadas nas mesmas condições que são cultivadas as CTM-MO (Locke et al., 2009; Mizuno, 2009). Durante o cultivo, as CTM-TA, assim como as CTM-MO, também apresentam a capacidade de se aderir às placas ou garrafas de cultivo (Levi e Longaker, 2011).

Para estimular a proliferação *in vitro* das CTM-TA podem ser utilizados fatores como FGF-2 (Lee et al., 2009), PDGF e oncostatina M (Song et al., 2005). Durante a proliferação, as CTM-TA aderem às placas ou garrafas de cultivo e podem ser



expandidas *in vitro* por longo período (Zhu et al., 2008), além disso, secretam potentes fatores de crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), FGF-2 e IGF-1 (Mizuno, 2009).

As culturas de CTM-TA podem ser caracterizadas pela expressão ou ausência de marcadores fenotípicos (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2002; Katz et al., 2005). Essas células expressam CD29, CD44, CD71 (Zuk et al., 2002; Katz et al., 2005), CD49e, CD51, CD90 (Katz et al., 2005), CD49d, CD9, CD105, CD166, CD73 e CD44 (Gronthos et al., 2001). Mas não expressam CD45, CD31, CD34 (Zuk et al., 2002; Katz et al., 2005), CD56, CD50, CD11a, CD11b e CD11c (Katz et al., 2005).

As CTM-TA apresentam capacidade de diferenciações osteogênica, condrogênica, miogênica e adipogênica (Zuk et al., 2001; Zhu et al., 2008). Além disso, essas células podem se diferenciar em neurônios (Zuk et al., 2001), células endoteliais, hepatócitos e cardiomiócitos sob condições *in vitro* específicas (Rada et al., 2009).

Para a diferenciação osteogênica, as CTM-TA requerem condições de cultura semelhantes às CTM-MO como meio básico representado por DMEM enriquecido com antibióticos, antifúngicos e 10% de SFB e acrescido de dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato (Rada et al., 2009; Levi e Longaker, 2011). O ácido ascórbico funciona como um co-fator na hidroxilação dos resíduos de prolina e lisina do colágeno e aumenta a síntese de proteínas não colagênicas da matriz, enquanto o  $\beta$ -glicerofosfato é essencial para a mineralização da matriz extracelular (Locke et al., 2009).

A diferenciação osteogênica das CTM-TA também pode ser influenciada por diversos

fatores como estrógeno (Hong et al., 2007), vitamina D (Malladi et al., 2006), ácido retinóico (Skillington et al., 2002; Malladi et al., 2006; Wan et al., 2006), BMP-2 (Skillington et al., 2002; Knippenberg et al., 2006; Wan et al., 2006), BMP-4, BMP-7 (Levi e Longaker, 2011), IGF-1 (Levi et al., 2010a), TGF- $\beta$  (Levi et al., 2010b), fator de crescimento e diferenciação 5 (GDF-5) (Rada et al., 2009), FGF-2 (Kakudo et al., 2007), oncostatina M (Song et al., 2007) e estímulo mecânico (Diederichs et al., 2010; Huang et al., 2010).

Semelhante as CTM-MO, durante a diferenciação osteogênica, as CTM-TA também expressam genes como Runx2, BMP-2, BMP-4 (Shafiee et al., 2011), colágeno I, osteonectina (Egusa et al., 2007), osteocalcina (Egusa et al., 2007; Zaminy et al., 2008; Shafiee et al., 2011), sialoproteína óssea, Cbfa1, osteopontina (Egusa et al., 2007) fosfatase alcalina (Egusa et al., 2007; Wall et al., 2007; Zaminy et al., 2008), receptores para BMP e PTH (Zuk et al., 2002), além de formarem matriz mineralizada (Wall et al., 2007; Zaminy et al., 2008). Durante a diferenciação osteogênica das CTM-TA, também são identificadas diferentes fases, onde na fase inicial há expressão de Runx-2 e fosfatase alcalina; na fase intermediária tem-se a expressão de osteopontina e na fase final ocorre expressão de osteocalcina (Levi e Longaker, 2011).



## Capítulo 2

### **Participação das células tronco mesenquimais da medula óssea na gênese das alterações ósseas causadas pelas disfunções tireoidianas em ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas**

#### **RESUMO**

As disfunções tireoidianas podem causar osteopenia ou agravar a osteoporose pós-menopausa por aumentar a reabsorção óssea e/ou por reduzir a atividade osteoblástica. Apesar dos osteoblastos derivarem das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO), a participação dessas células na gênese das alterações ósseas causadas pelas disfunções tireoidianas não tem sido estudada, sendo este o principal objetivo deste estudo. Sessenta ratas Wistar com dois meses de idade foram separadas inicialmente em dois grupos: ovariectomizado (OVX) e não OVX. Uma semana após a ovariectomia, um grupo OVX e um grupo não OVX receberam diariamente propiltiouracil (1 mg/animal) ou L-tiroxina (50 µg/animal) ou água destilada por sonda oro-gástrica para indução dos estados hipotireóideo, hipertireóideo e eutireóideo, respectivamente. Assim, foram constituídos seis grupos de dez animais: 1) normal, 2) OVX, 3) hipo, 4) hipo OVX, 5) hiper e 6) hiper OVX. Após 135 dias de tratamento, as ratas foram eutanasiadas. Foram colhidos o plasma sanguíneo para dosagem de T4 livre, os fêmures e as tíbias esquerdas para avaliação histomorfométrica, as tíbias direitas para avaliação da resistência óssea e os fêmures direitos para extração das CTM. Foram realizados, *in vitro*, os ensaios de MTT, BCIP/NBT, Von kossa para quantificação dos nódulos de mineralização e RT-PCR tempo real para expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste SNK. As concentrações de T4 livre confirmaram a indução dos estados hipo e hipertireóideo. As células, independente do grupo, apresentaram características fenotípicas compatíveis com as de células tronco. A ovariectomia induziu osteopenia e reduziu significativamente a diferenciação osteogênica das CTM. O hipotireoidismo, independentemente do estado funcional das gônadas, causou osteopenia e em ratas não OVX reduziu significativamente a diferenciação osteogênica das CTM. O hipertireoidismo em ratas não OVX não alterou o osso e, apesar de ter reduzido a expressão de osteopontina aos sete e 21 dias, não alterou a síntese de nódulos de mineralização pelas CTM aos 21 dias de diferenciação. Mas, em ratas OVX, o hipertireoidismo aumentou a resistência óssea e o potencial osteogênico das CTM caracterizado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, do número de nódulos de mineralização e da expressão de osteocalcina, sialoproteína e osteopontina. Conclui-se que a redução do potencial osteogênico das CTM-MO é um dos mecanismos envolvidos na gênese da osteopenia induzida pelo hipotireoidismo e que o aumento da diferenciação osteogênica das CTM de ratas OVX tratadas com tiroxina pode ser um dos mecanismos pelo qual esse hormônio aumenta a resistência óssea de ratas OVX.

Palavras chave: células tronco mesenquimais, diferenciação osteogênica, ovariectomia, disfunções tireoidianas, ratas.

## INTRODUÇÃO

As disfunções tireoidianas são as anormalidades endócrinas mais comumente diagnosticadas em todo o mundo, afetando homens e mulheres de todas as idades (Boelaert e Franklyn, 2005). Nos animais domésticos, o hipotireoidismo é uma das endocrinopatias mais comuns no cão (Panciera, 1994; Scarlett, 1994; Dixon et al., 1999) enquanto o hipertireoidismo tem sido mais frequentemente diagnosticado no gato (Scarlett, 1994; Naan et al., 2006; Harvey et al., 2009). Essas disfunções podem afetar todo o organismo, uma vez que os hormônios tireoidianos controlam o metabolismo basal de todos os tecidos (Boelaert e Franklyn, 2005).

Os hormônios tireoidianos, representados pela tiroxina (T4) e pela triiodotironina (T3), são essenciais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos durante a embriogênese, incluindo o tecido ósseo. Além disso, esses hormônios também são responsáveis pelo crescimento, pela diferenciação e pelo metabolismo celular na vida pós-natal (Yen, 2001). No tecido ósseo, T3 e T4 estimulam a formação (Serakides et al., 2004) e a reabsorção óssea (Mundy et al., 1976) por regularem tanto a atividade dos osteoblastos quanto dos osteoclastos (Klaushofer et al., 1995). Além disso, os hormônios tireoidianos também estimulam *in vitro* a diferenciação osteogênica das CTM-MO de ratas (Boeloni et al., 2009).

O hipotireoidismo e o hipertireoidismo são endocrinopatias frequentemente diagnosticadas em mulheres na menopausa (Schindler, 2003; Pearce, 2007). E por isso o efeito da associação dessas disfunções tireoidianas com a hipofunção gonadal sobre o tecido ósseo tem sido alvo de estudos. O efeito das disfunções tireoidianas sobre o metabolismo ósseo e mineral vem sendo estudado em modelos animais com hipo e hipertireoidismo

associado à ovariectomia (Serakides et al., 2000b; Serakides et al., 2004; Ribeiro et al., 2004; Serakides et al., 2008). Resultados dessas pesquisas demonstraram que o hipotireoidismo causa osteoporose em ratas não ovariectomizadas e potencializa a osteoporose induzida pela ovariectomia. A gênese pela qual o hipotireoidismo causa osteoporose foi atribuída à redução do número e da atividade dos osteoblastos (Ribeiro et al., 2004). Como os osteoblastos derivam das CTM-MO, a partir desses resultados, foi aventada a hipótese de que as CTM-MO de ratas com hipotireoidismo ovariectomizadas ou não ovariectomizadas apresentam menor diferenciação osteogênica e que esse poderia ser um dos mecanismos pelo qual o hipotireoidismo causa osteoporose e potencializa a osteoporose decorrente da deficiência dos esteróides sexuais.

Com relação ao hipertireoidismo, seus efeitos no osso variam de acordo com a dose de tiroxina administrada, com o perfil sérico dos hormônios sexuais e com o curso da doença. Dependendo do curso da doença, o hipertireoidismo pode aumentar, ou reduzir ou até não alterar a quantidade de tecido ósseo em ratas (Allain et al., 1995; Serakides et al., 2004) ou em mulheres (Karga et al., 2004; Cipriani et al., 2009) com níveis normais de hormônios sexuais. Esses efeitos antagônicos são observados, pois o hipertireoidismo não somente aumenta a atividade osteoblástica como também aumenta a reabsorção óssea e a alteração óssea somente se instala quando há desequilíbrio entre os processos catabólico e anabólico (Allain e McGregor, 1993; Garnero et al., 1994).

O efeito do hipertireoidismo sobre o esqueleto de ratas ovariectomizadas também é variável, podendo reverter a osteoporose pós-ovariectomia dependendo da dose (Gouveia et al., 1997) e do curso da doença (Serakides et al., 2004) ou agravar a osteoporose da menopausa (Cipriani et al.,

2009). Por esse último efeito, o hipertireoidismo é considerado um fator de risco importante para a osteoporose da menopausa, uma vez que a reversão dessa doença somente é possível quando o hipertireoidismo aumenta a atividade osteoblástica reduzida pela deficiência dos esteróides sexuais sem aumentar demasiadamente a reabsorção óssea (Cipriani et al., 2009).

Várias pesquisas já demonstraram o efeito *in vitro* dos hormônios tireoidianos sobre a atividade de síntese dos osteoblastos (Ohishi et al., 1994; Fratzi-Zelman et al., 1997; Varga et al., 1997; Gouveia et al., 2001). Além disso, foi comprovado que as CTM-MO apresentam receptores TR $\alpha$  e TR $\beta$  para os hormônios tireoidianos (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002) e que, por isso, respondem à adição desses hormônios *in vitro*, com aumento da diferenciação osteogênica (Boeloni et al., 2009; Hell et al., 2011). Mas, ainda não se sabe se esse mesmo efeito poderia ser observado *in vivo*, quando da indução do hipertireoidismo em ratas com ou sem osteoporose decorrente da ovariectomia, sendo esse mais um dos objetivos deste estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos laboratórios de Experimentação Animal, de Cultivo de Células Tronco e Terapia Celular, de Biologia Molecular e de Histopatologia do Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular (LICM) do Depto. de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e do Laboratório de Bioengenharia do Depto. de Engenharia Mecânica da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto

de Ciências Biológicas da UFMG. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo nº 134/2008).

### *Ovariectomia e indução das disfunções tireoidianas*

Foram utilizadas 60 ratas Wistar (209,71  $\pm$  23,35g) com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas, numa densidade de cinco ratas/caixa, que receberam ração comercial<sup>1</sup> (22% de proteína bruta, 1,4% de cálcio, 0,6% de fósforo, além de micronutrientes) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em um regime de 12 horas com luz e 12 horas no escuro. Após um período de trinta dias de adaptação, as ratas foram pesadas e separadas inicialmente em dois grupos, sendo um grupo não ovariectomizado (n=30) e um grupo ovariectomizado (OVX) (n=30). As ratas do grupo ovariectomizado foram submetidas à ovariectomia bilateral sob anestesia geral (associação de 40mg/Kg de quetamina<sup>2</sup> com 10g/Kg de xilazina<sup>3</sup>). A remoção dos ovários foi feita por duas incisões laterodorsais de aproximadamente 1cm de extensão na região abdominal com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e pele com fio catagute e sutura padrão em ponto simples separado.

Uma semana após a ovariectomia, dois grupos, um OVX (n=10) e outro não OVX (n=10), foram induzidos ao hipotireoidismo, pela administração diária de propiltiouracil (PTU)<sup>4</sup>, por sonda orogástrica, na dose de 1 mg/animal, diluído em 5mL de água destilada por todo período experimental de acordo com Ribeiro et al. (2004). Dois grupos, um OVX (n=10) e

---

<sup>1</sup> Nuvilab, Nuvital, Brasil

<sup>2</sup> Quetamina, Vetnil Ind. e Com., Brasil

<sup>3</sup> Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil

<sup>4</sup> 100mg, Pharmacia Brasil Ltda

outro não OVX (n=10) também foram induzidos ao hipertireoidismo, pela administração diária de L-tiroxina<sup>5</sup>, por sonda oro-gástrica, na dose de 50 µg/animal, diluída em 5mL de água destilada por todo período experimental segundo Serakides et al. (2004). Os dois grupos restantes [OVX (n=10) e não OVX (n=10)] foram mantidos em estado eutireóideo, pela administração de 5mL de água destilada, como placebo, no mesmo esquema posológico. Foram constituídos então seis grupos experimentais: 1) Eutireóideo não OVX (normal) (n=10), 2) Eutireóideo ovariectomizado (OVX) (n=10), 3) hipotireóideo não ovariectomizado (hipo) (n=10), 4) hipotireóideo ovariectomizado (hipo OVX) (n=10), 5) hipertireóideo não ovariectomizado (hiper) (n=10) e 6) hipertireóideo ovariectomizado (hiper OVX) (n=10).

Após 135 dias do início dos tratamentos, dez ratas de cada grupo foram submetidas à punção cardíaca, após anestesia geral (associação de 40mg/kg de quetamina<sup>6</sup> com 10g/kg de xilazina<sup>7</sup>) e o plasma sanguíneo foi colhido para dosagem de T4 livre. As ratas foram eutanasiadas por hipovolemia e em seguida, os fêmures direitos foram colhidos assepticamente e imediatamente submetidos à extração da medula óssea para obtenção de um *pool* de células de cinco ratas de cada grupo.

Células da medula óssea dos fêmures direitos das ratas dos seis grupos listados anteriormente foram cultivadas separadamente em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)<sup>8</sup> para realização da caracterização fenotípica. Posteriormente, foi determinado o potencial osteogênico das CTM-MO de cada grupo

cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por dois períodos (sete e 21 dias). Após esses períodos, foram realizados: teste do MTT, atividade da fosfatase alcalina, quantificação dos nódulos de mineralização e avaliação da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina, por RT-PCR em tempo real descritos detalhadamente a seguir.

A fim de verificar as alterações ósseas induzidas pelas disfunções tireoidianas associadas ou não à ovariectomia foi realizada histomorfometria óssea dos fêmures e tíbias esquerdos e teste biomecânico das tíbias direitas de todos os animais dos seis grupos como descrito detalhadamente a seguir.

#### ***Dosagem de T4 livre***

Para comprovação dos estados de hipo e hipertireoidismo, a concentração plasmática de T4 livre foi determinada pela técnica da quimioluminescência<sup>9</sup> seguindo o protocolo do fabricante. Além disso, os animais foram avaliados diariamente com relação ao comportamento e as características da pelagem.

#### ***Histomorfometria óssea***

Dez ratas de cada grupo foram eutanasiadas aos 135 dias após o início do tratamento, momento em que os ossos longos (fêmur e tíbia) esquerdos foram colhidos. Os mesmos foram fixados em formalina a 10%, neutra e tamponada e descalcificados em solução de ácido fórmico a 10% por 45 dias. Após completa descalcificação controlada por exame radiográfico, os ossos foram lavados em água corrente por 24 horas e seccionados em duas metades, pelo seu eixo longitudinal. Em seguida, foram processados pela técnica de inclusão em

<sup>5</sup> Armesham International, Buckinghamshire, England

<sup>6</sup> Quetamina, Vetnil Ind. e Com., Brasil

<sup>7</sup> Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil

<sup>8</sup> Gibco, USA

<sup>9</sup> Access Immunoassay System, Sanofi Diagnostics Pasteur Inc., Chaska, MN, USA

parafina e as secções histológicas de 4µm foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica de acordo com Ocarino et al. (2007).

Para a determinação da porcentagem de osso trabecular, realizou-se a morfometria em secções histológicas de ossos longos (epífise e metáfise distais do fêmur e epífise e metáfise proximais da tíbia). Nesses ossos, numa área tecidual média de 8mm<sup>2</sup>, iniciada a 1mm abaixo da placa epifisária e da cartilagem articular, foram determinados, com objetiva de 20×, as porcentagens de tecido ósseo trabecular com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma graticula com 121 pontos. As variáveis foram determinadas em um total de cinco campos na região da epífise e dez campos na metáfise totalizando 605 pontos na epífise e 1210 pontos na metáfise.

#### ***Teste biomecânico da resistência óssea***

As propriedades biomecânicas das tíbias dos seis grupos experimentais foram medidas pelo teste de flexão em três pontos de acordo com Huang et al. (2008). Os ensaios de biomecânica têm sido utilizados para verificar a resistência de tecidos ósseos não descalcificados, sendo este um ensaio complementar à histomorfometria realizada em tecido ósseo descalcificado. O teste foi realizado nas tíbias direitas de todos os animais dos seis grupos experimentais. Para padronização do tempo e da forma de armazenamento das tíbias, da célula de força, da velocidade de deslocamento e do posicionamento das tíbias no momento do teste, foi realizado um teste piloto. Após a eutanásia dos animais, as tíbias direitas foram colhidas, dissecadas, imersas em solução salina (NaCl 0,9%) e estocadas a -20°C durante sete dias. No dia do teste, as tíbias foram mantidas em temperatura ambiente para mensuração dos diâmetros das epífises proximal e distal e da diáfise das tíbias com auxílio de um paquímetro digital. Para o teste de flexão em três pontos

utilizou-se uma máquina universal de ensaios EMIC DL 3000<sup>10</sup> (Fig.1) acoplada ao computador, com célula de carga de 500N e velocidade de deslocamento de 2mm/s. Cada tíbia foi posicionada sobre a superfície de uma barra com dois pontos de apoio distantes 20 mm entre si, e a célula de força foi posicionada sobre o osso no centro da diáfise com distância igual entre as duas barras inferiores (Fig. 2). O teste foi realizado até a fratura completa das tíbias. O parâmetro avaliado foi a deflexão específica.

---

<sup>10</sup> EMIC DL 3000 (EMIC equipamentos e sistemas de ensaio Ltda), São José dos Pinhais, Paraná, Brasil

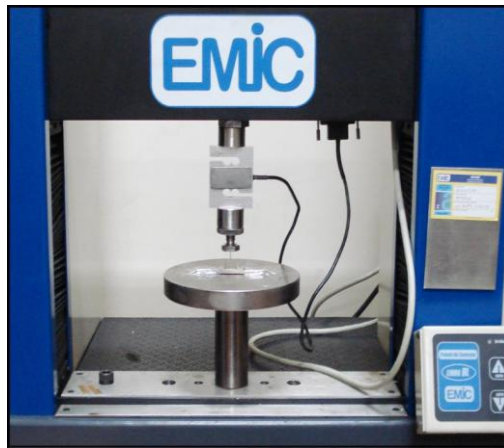


Figura 1. Máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 utilizada no ensaio de flexão em três pontos.

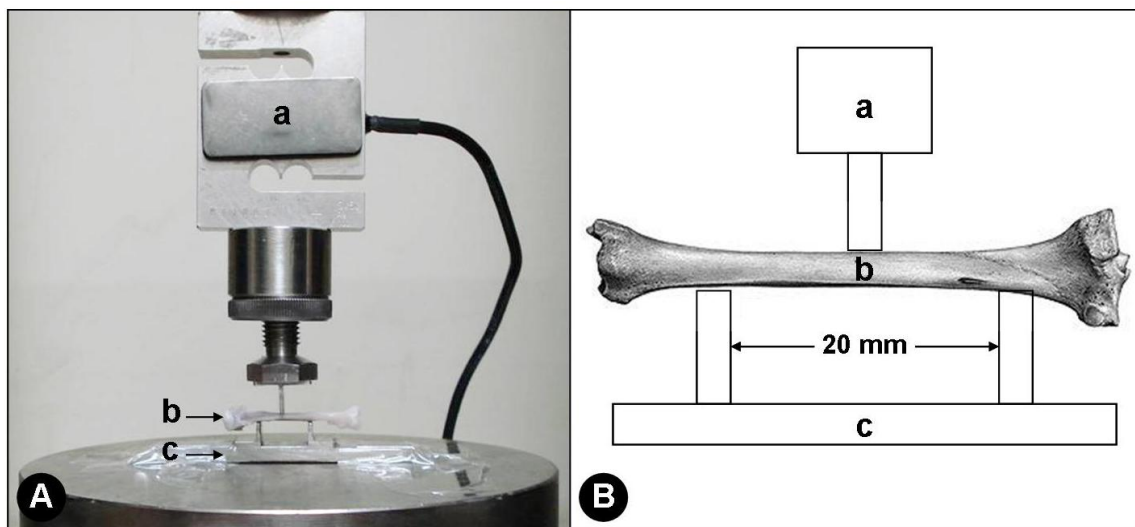


Figura 2. Teste de flexão em três pontos em tíbias de ratas com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. A) Posicionamento da tibia na máquina universal de ensaios EMIC DL 3000 no momento do teste de flexão em três pontos. B) Desenho esquemático do posicionamento da tibia durante o ensaio de flexão em três pontos. Célula de força de 500N (a), tibia (b), barra com dois pontos de apoio com distância de 20 mm entre as mesmas (c).



### ***Extração e cultivo de células tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea***

A extração das CTM-MO foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Lee et al., 2003; Tropel et al., 2004; Nadri et al., 2007; Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). No fluxo laminar, inicialmente, realizou-se a remoção dos pelos e a antisepsia na pele da região do membro posterior direito. Em seguida, os fêmures direitos foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção da medula óssea da diáfise. No fluxo laminar, a medula óssea foi lavada com DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L).<sup>11</sup> Após centrifugação por 10 minutos a 1400g, as células foram cultivadas em garrafas T75<sup>12</sup> contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de soro fetal bovino<sup>13</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Após quatro repiques e confluência de 80 a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microorganismos.

### ***Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea***

Após o cultivo em garrafas T75 das CTM-MO em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90%, as células de cada grupo experimental foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96

poços<sup>14</sup> (fundo redondo) com concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço, sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação, para cada grupo experimental. Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição do anticorpo primário com diluição de 1:50. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionou-se 150µL de PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário<sup>15</sup> com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionou-se então 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL/poço de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)<sup>16</sup> empregando o *software Cell Quest*<sup>17</sup>, com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento de onda de 530nm, que corresponde à fluorescência verde, para

<sup>14</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>15</sup> Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Oregon, USA

<sup>16</sup> FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA

<sup>17</sup> The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

<sup>11</sup> Sigma, USA

<sup>12</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>13</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

análises pelo programa WinMDI 3.0<sup>18</sup> por gráficos de *dot plot* e histogramas (Tropel et al., 2004; Ishii et al., 2005a). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 *mouse*), anti-CD54 (clone 1A29 *mouse*), anti-CD73 (clone 5 F/B9 *mouse*) e anti-CD90 (clone Ox-7 *mouse*)<sup>19</sup>.

### ***Extração e cultivo de osteoblastos***

A extração de osteoblastos da calvaria foi realizada conforme protocolo já estabelecido (Valério et al., 2004). A calvaria de ratos Wistar neonatos com dois dias de idade foi colhida assepticamente em fluxo laminar, para obtenção dos osteoblastos. Inicialmente, realizou-se antisepsia da pele que recobre a cabeça, seguido do corte e colheita dos ossos frontais e parietais. Os fragmentos foram lavados em PBS, recortados em fragmentos pequenos e incubados em tripsina 1% por 15 minutos e posteriormente em colagenase 0,25%<sup>20</sup> diluídas em PBS 0,15M por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com PBS e após centrifugação por 10 minutos a 1400g, foram cultivadas em garrafas T75<sup>21</sup> contendo DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>22</sup> e 10% de soro fetal bovino<sup>23</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, as mesmas foram utilizadas para extração do RNA total e posterior análise da expressão

de proteínas colagênicas e não colagênicas pela técnica de RT-PCR em tempo real e assim usadas como controle positivo de células diferenciadas.

### ***Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán***

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM de todos os grupos foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripán. Inicialmente, as CTM de todos os grupos foram cultivadas em garrafas T75 (1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) com DMEM e no momento do teste foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400g por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul de Tripán. As células de cada grupo inviáveis (em azul) e viáveis (transparentes) foram quantificadas em câmara de Neubauer.

### ***Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em meio de diferenciação osteogênico***

Após o cultivo em DMEM, quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, o meio foi substituído por meio de diferenciação osteogênico que é enriquecido com ácido ascórbico (50µg/mL), β-glicerofosfato (10mM)<sup>24</sup> e dexametasona (0,1µM)<sup>25</sup>, acrescido de 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim, dependendo do tipo de ensaio, as CTM, de cada um dos seis grupos experimentais, foram cultivadas em uma densidade previamente padronizada (1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>), em seis repetições, em garrafas T25 e em placas de seis ou 24 poços<sup>26</sup> por dois períodos (sete e 21 dias). Foram realizados teste do MTT, atividade da fosfatase alcalina, quantificação dos nódulos

<sup>18</sup> Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry 3.0

<sup>19</sup> BD Biosciences, San Jose, CA, USA

<sup>20</sup> Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Type I, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>21</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>22</sup> Sigma, USA

<sup>23</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

<sup>24</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>25</sup> Aché, Guarulhos, SP, Brasil

<sup>26</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

de mineralização e avaliação da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina por RT-PCR em tempo real.

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

Ao término de cada período (sete e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de 24 poços, foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com soro fetal bovino em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL)<sup>27</sup>. A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-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 de acordo com Valério et al. (2004).

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

Ao término de cada período (sete e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS 0,15M. Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIP/NBT<sup>28</sup> (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3µL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras permaneceram duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, adicionou-se 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 de acordo com Ocarino et al., (2008) e Boeloni et al. (2009).

#### ***Quantificação dos nódulos de mineralização***

Ao término de cada período (sete e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas (22x22mm) estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (adaptado de Prophet et al., 1992) para avaliação do número de nódulos/campo. Somente os nódulos de coloração marrom ou negro foram quantificados e foi determinado o número de nódulos/campo em 50 campos em objetiva de 20× de acordo com Ocarino et al. (2010).

#### ***Quantificação relativa dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina***

Realizou-se, em todos os grupos e nos dois períodos avaliados, a quantificação relativa da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina pela técnica de RT-PCR em tempo real. A extração do RNA total das células foi feita em três garrafas T25 por grupo pelo uso do Trizol<sup>29</sup>. O método de extração consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL e foram adicionados 0,2mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, três minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, para separação em três fases

<sup>27</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

<sup>28</sup> Zymed Laboratories, CA, USA

<sup>29</sup> Invitrogen, USA

onde a fase incolor superficial continha o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi então lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500g por 5 minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água DEPC<sup>30</sup> livre de RNase e imediatamente armazenado a -80°C. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial<sup>31</sup>, sendo que se utilizou 1 µg de RNA total para a síntese de cDNA com um volume final de 20µL. Realizaram-se ainda as reações de PCR em tempo real utilizando-se 2 µg de cDNA, 5 pM de cada iniciador e 12,5µL do reagente syber Green<sup>32</sup> em um volume final de 25 µL de reação em um tubo<sup>33</sup>, no aparelho *SmartCycler System*<sup>34</sup>. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tab. 1). A expressão gênica foi calculada usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*.

### *Análise Estatística*

O delineamento foi inteiramente ao acaso com fatorial 6x2 (seis grupos e dois períodos). Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste Student Newman Keuls (SNK) utilizando o programa *Graphpad Instat 3*<sup>35</sup>. As alterações na expressão medidas pelo RT-PCR em tempo real foram comparadas pelo teste SNK após transformação logarítmica dos dados. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

---

<sup>30</sup> Água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC), Invitrogen, USA

<sup>31</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>32</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>33</sup> SmartCycler® Tube-25µL, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA

<sup>34</sup> SmartCycler® System, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA

---

<sup>35</sup> GraphPad Software Inc., San Diego, USA

Tabela 1. Genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para RT-PCR em tempo real.

| Gene                | Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')                                   | Nº acesso   |
|---------------------|--|-------------|
| GAPDH               | <i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA<br><i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA  | NM_002046   |
| Colágeno I          | <i>foward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG<br><i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG    | NM_000088   |
| Osteocalcina        | <i>foward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT<br><i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG      | NM_013414.1 |
| Sialoproteína óssea | <i>foward</i> : TGTCTTCTGAACGGGTTTC<br><i>reverse</i> : CTTCCCCATACTCAACCGTG       | NM_012587.2 |
| Osteopontina        | <i>foward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT<br><i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA | AB001382    |

## RESULTADOS

### Indução do hipo e do hipertireoidismo

A comprovação das disfunções tireoidianas foi feita com base na concentração plasmática de T4 livre e nos sinais clínicos das ratas. A concentração plasmática de T4 livre nos animais tratados com PTU foi significativamente inferior ao grupo normal (Fig. 3; Anexo 1). Além disso, as ratas

tratadas com PTU apresentavam-se letárgicas e com alopecia parcial multifocal, confirmando a indução do hipotireoidismo pelo uso de PTU. Nos grupos tratados com tiroxina, a concentração plasmática de T4 livre foi significativamente superior ao grupo normal (Fig. 3; Anexo 1) e as ratas eram agressivas e agitadas, o que confirma o estado hipertireóide das ratas tratadas com hormônio tireoidiano.

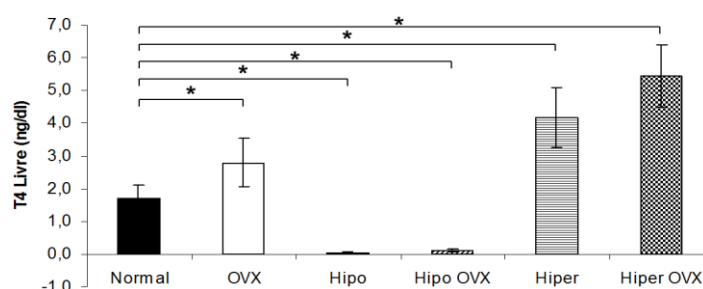


Figura 3. Concentração plasmática de T4 livre (ng/dl) em ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. \* $p < 0,05$ . Eutireóide não ovariectomizado (Normal), eutireóide ovariectomizado (OVX), hipotireóide não ovariectomizado (Hipo), hipotireóide ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóide não ovariectomizado (Hiper), hipertireóide ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 1).

## **Histomorfometria óssea**

### ***Grupo normal***

Os animais do grupo normal não apresentaram alterações ósseas. As trabéculas epifisárias e metafisárias do fêmur e da tíbia eram numerosas, espessas e confluentes. Os osteoblastos recobriam toda a superfície das trabéculas e apresentavam-se ora ativos, cuboidais, com núcleo volumoso e oval, ora inativos, achatados com núcleo fusiforme e intensamente basofílico. Os osteócitos apresentavam-se ora inativos com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas e pouco basofílicas, ora ativos com núcleos volumosos alojados em lacunas largas com bordas basofílicas.

### ***Grupo ovariectomizado***

A tíbia e o fêmur das ratas OVX apresentavam osteoporose intensa caracterizada pela presença de trabéculas epifisárias e metafisárias delgadas, fragmentadas e em número significativamente reduzido quando comparadas ao grupo normal (Fig. 4, 5 e 6; Anexo 2). A cobertura osteoblástica era reduzida, descontínua e formada por células fusiformes (inativas). Havia predomínio de osteócitos com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas e com bordas basofílicas.

### ***Grupo hipotireóideo não ovariectomizado***

Os animais do grupo hipotireóideo não ovariectomizado apresentaram osteoporose caracterizada por redução significativa da porcentagem de tecido ósseo trabecular no fêmur e na tíbia em comparação ao grupo normal (Fig. 4, 5 e 6; Anexo 2). A placa epifisária estava selada pela placa óssea terminal distal, com interrupção do crescimento ósseo. As trabéculas epifisárias e metafisárias apresentavam-se delgadas, fragmentadas e em número reduzido. A cobertura osteoblástica era reduzida, descontínua e formada por células

fusiformes (inativas). Havia predomínio de osteócitos inativos, com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas e pouco basofílicas. Observaram-se ainda, áreas com retenção de coração condróide nas trabéculas, porém em menor quantidade quando comparado ao grupo normal.

### ***Grupo hipotireóideo ovariectomizado***

As ratas do grupo hipo OVX apresentaram osteopenia intensa no fêmur e na tíbia caracterizada por redução significativa da porcentagem de tecido ósseo trabecular em comparação aos grupos normal e semelhante ao grupo OVX. A porcentagem de tecido ósseo trabecular da tíbia e do fêmur das ratas hipo OVX não diferiu significativamente da dos animais hipotireóideos não ovariectomizados (Fig. 4, 5 e 6; Anexo 2), ou seja, o hipotireoidismo não potencializou a osteoporose induzida pela ovariectomia nos sítios ósseos analisados. As trabéculas epifisárias e metafisárias apresentavam-se fragmentadas e em número reduzido. Os osteoblastos eram praticamente inexistentes e com características semelhantes ao dos animais OVX, ou seja, apresentavam-se achatados e com núcleos fusiformes. Havia predomínio de osteócitos ativos, com núcleo oval volumoso e alojados em lacunas largas de bordas basofílicas.

### ***Grupo hipertireóideo não ovariectomizado***

Os animais do grupo hipertireóideo não ovariectomizado apresentavam morfologia dentro da normalidade. As trabéculas epifisárias e metafisárias da tíbia e do fêmur eram numerosas, confluentes e semelhantes as do grupo normal (Fig. 4, 5 e 6; Anexo 2). A cobertura osteoblástica era contínua e constituída por células ativas com núcleos volumosos e ovais. Os osteócitos eram predominantemente ativos, com núcleos volumosos alojados em lacunas largas e basofílicas. Observaram-se ainda áreas com

retenção de coração condróide nas trabéculas metafisárias.

### Grupo hipertireóideo ovariectomizado

Os ossos longos das ratas do grupo hiper OVX apresentaram trabéculas metafisárias menos numerosas em comparação ao grupo normal e semelhante ao grupo OVX. Mas, nas epífises, não houve alteração significativa da porcentagem de tecido ósseo trabecular no fêmur e na tibia em comparação ao grupo normal (Fig. 4, 5 e 6; Anexo 2). No entanto, ao contrário do

grupo OVX, os osteoblastos das ratas hiper OVX apresentavam núcleos volumosos e se aglomeravam formando mais de uma camada de revestimento da trabécula de permeio ao osteóide (áreas de hiperplasia osteoblástica). Os osteócitos profundos eram na maioria das vezes ativos, com núcleo volumosos, alojados em lacunas alargadas e com bordas basofílicas. Observaram-se ainda áreas com retenção de coração condróide nas trabéculas, porém aparentemente em menor quantidade quando comparado ao grupo normal.

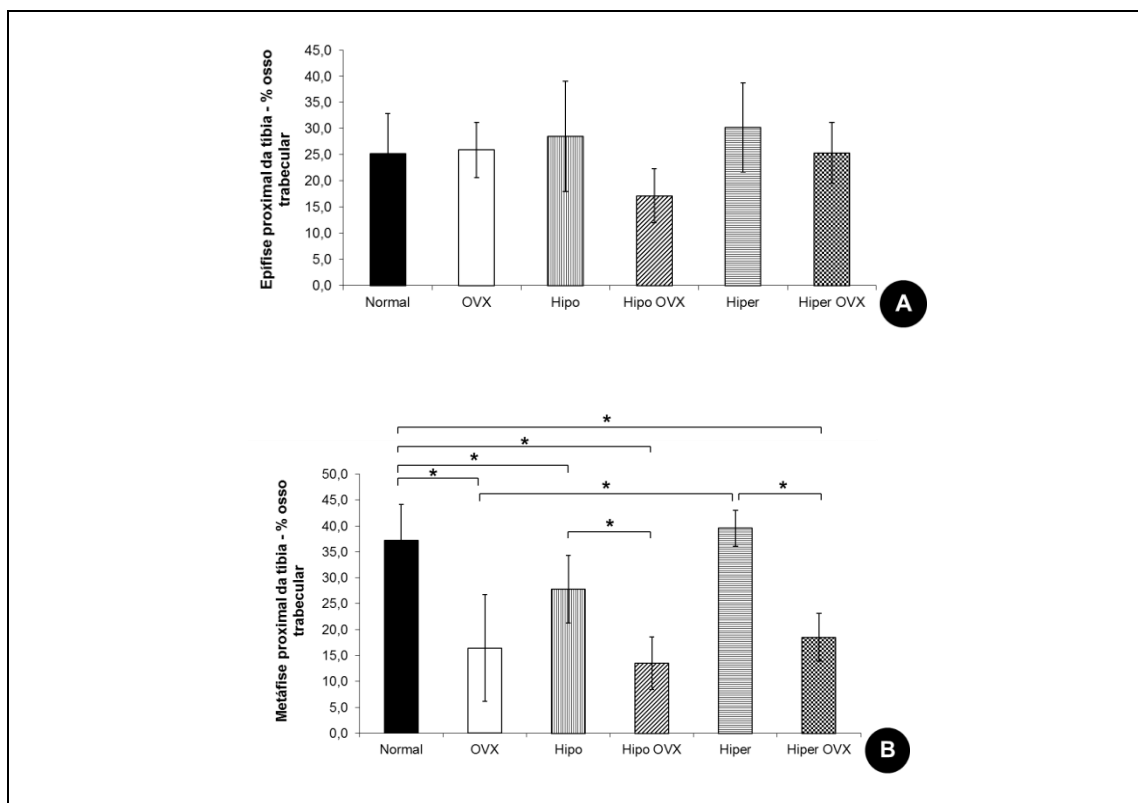


Figura 4. Porcentagem de tecido ósseo trabecular (média  $\pm$  desvio padrão) na tibia de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. (A) Epífise proximal da tibia. (B) Metáfise proximal da tibia. \* $p < 0,05$ . Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 2).

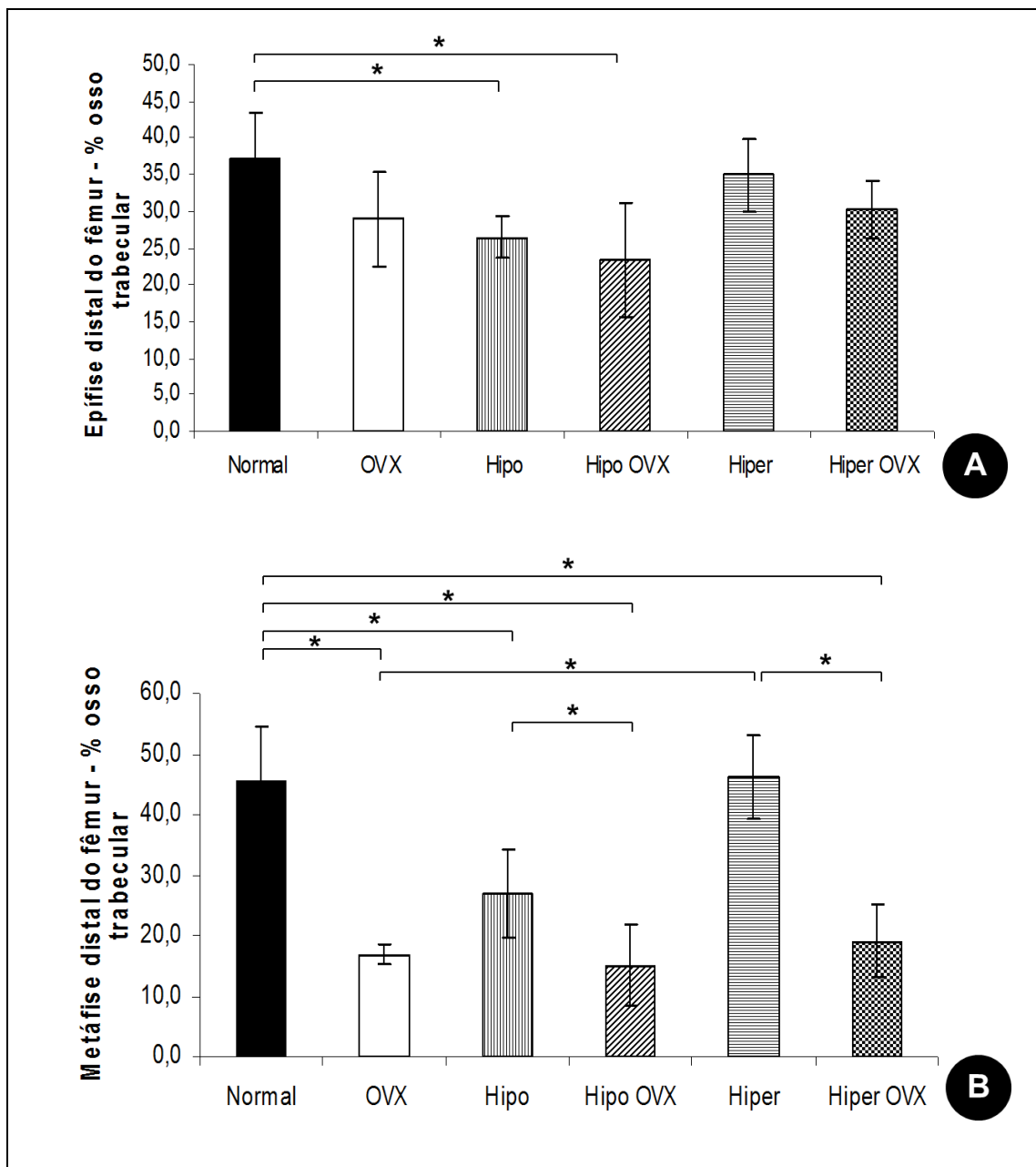


Figura 5. Porcentagem de tecido ósseo trabecular no fêmur de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. (A) Epífise distal do fêmur. (B) Metáfise distal do fêmur. \* $p < 0,05$ . Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 2).



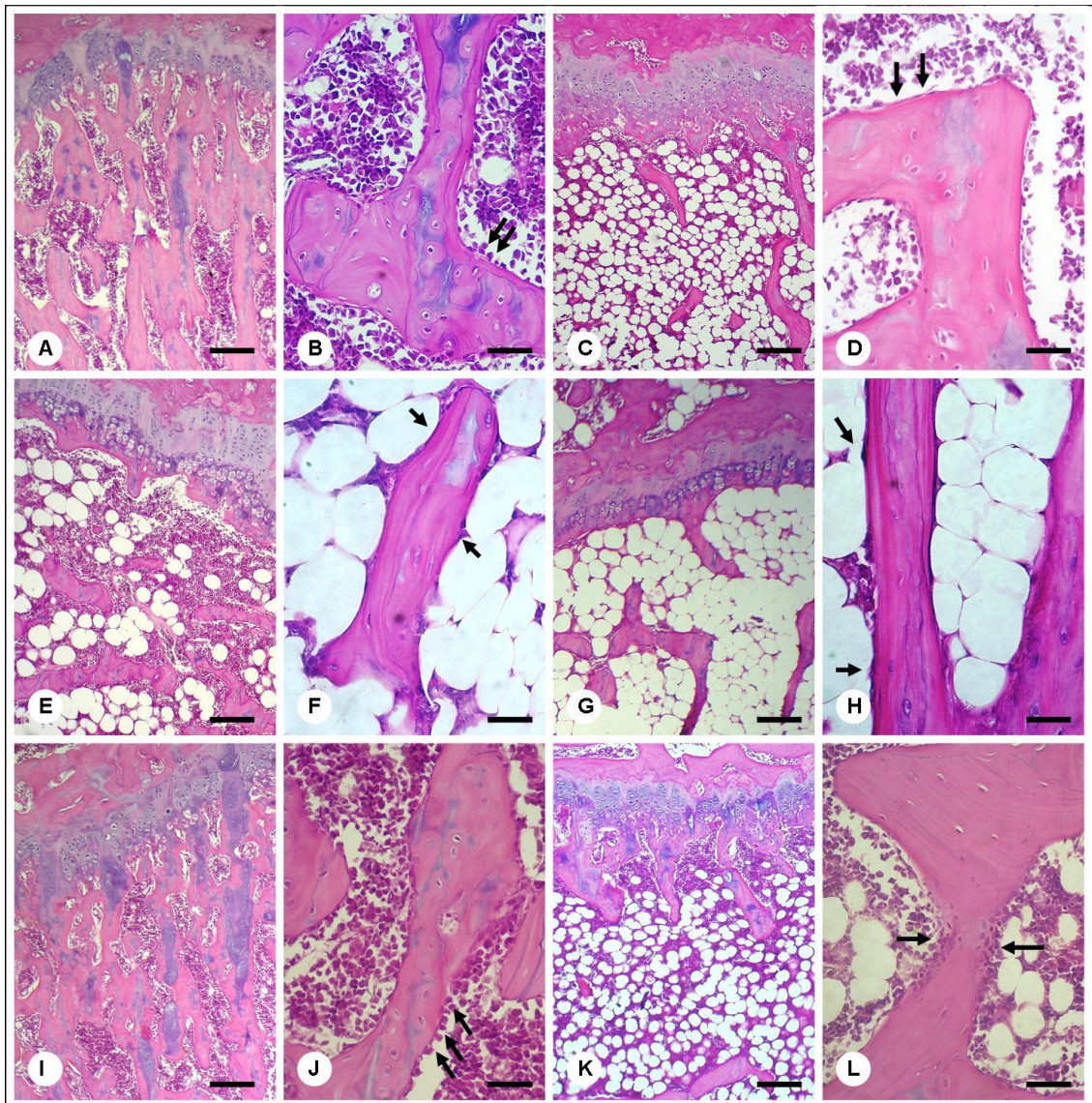


Figura 6. Metáfise distal do fêmur de ratas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. (A) Grupo normal com trabéculas espessas e confluentes, HE. Barra = 274  $\mu$ m. (B) Grupo normal com osteoblastos volumosos (setas), HE. Barra = 68,6  $\mu$ m. (C) Grupo OVX com trabéculas em número reduzido, fragmentadas e delgadas, HE. Barra = 274  $\mu$ m. (D) Grupo OVX com cobertura osteoblástica reduzida e fusiforme (setas), HE. Barra = 68,6  $\mu$ m. (E) Grupo Hipo não OVX com trabéculas em menor número e delgadas, HE. Barra = 274  $\mu$ m. (F) Grupo Hipo não OVX com cobertura osteoblástica predominantemente fusiforme, HE. Barra = 68,6  $\mu$ m. (G) Grupo Hipo OVX com trabéculas fragmentadas e delgadas, HE. Barra = 274  $\mu$ m. (H) Grupo Hipo OVX com número reduzido de osteoblastos (setas), HE. Barra = 68,6  $\mu$ m. (I) Grupo Hiper não OVX com trabéculas espessas e confluentes, HE. Barra = 274  $\mu$ m. (J) Grupo Hiper não OVX com osteoblastos volumosos (setas), HE. Barra = 68,6  $\mu$ m. (K) Grupo Hiper OVX com trabéculas em número reduzido, HE. Barra = 274  $\mu$ m. (L) Grupo Hiper não OVX com trabécula recoberta por mais de uma camada de osteoblastos volumosos de permeio ao osteóide (setas), HE. Barra = 68,6  $\mu$ m.



### Teste biomecânico da resistência óssea

Com o objetivo de avaliar a resistência óssea das tíbias das ratas com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas e compará-las a de ratas normais, realizou-se o teste de flexão em três pontos avaliando a deflexão específica. As tíbias das ratas OVX, hipo, hipo OVX e hiper OVX apresentaram deflexão significativamente menor em comparação ao grupo normal, semelhante aos resultados da histomorfometria óssea que demonstrou que

esses grupos apresentavam menor porcentagem de trabéculas ósseas principalmente metafisárias. No entanto, as tíbias das ratas não ovariectomizadas tratadas com tiroxina apresentaram resistência semelhante a do grupo normal. Interessante, é que neste teste as ratas OVX tratadas com tiroxina apresentaram resistência óssea significativamente maior quando comparada a das ratas OVX (Fig. 7; Anexo 3) apesar da porcentagem de tecido ósseo trabecular não ter diferido significativamente entre esses dois grupos.

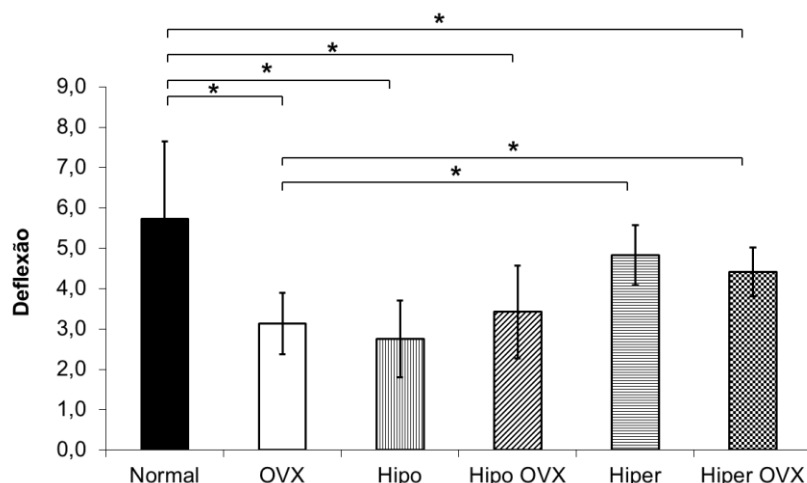


Figura 7. Deflexão específica (média  $\pm$  desvio padrão) em tíbias de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. \* $p < 0,05$ . Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 3).

### Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea

As células tronco mesenquimais da medula óssea de todos os grupos experimentais apresentaram caracterização fenotípica semelhante, demonstrando expressão de CD45 em no máximo 2,18% das células e expressão de CD54, CD73 e CD90 acima

de 65,39% das células conforme demonstrado na Tabela 2 e Anexo 4. Estes resultados são compatíveis com as características de células tronco propostas pelo “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*” (Schäffler e Büchler, 2007). No entanto, as CTM do grupo hipertireóideo apresentaram expressão de CD73 bem inferior a dos demais grupos.

Tabela 2. Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais indiferenciadas de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%.

| Grupos                             | Expressão de moléculas de superfície (%) |       |       |       |
|------------------------------------|--|-------|-------|-------|
|                                    | CD45                                     | CD54  | CD73  | CD90  |
| Normal                             | 1,09                                     | 96,94 | 84,27 | 95,93 |
| Ovariectomizado                    | 1,01                                     | 97,94 | 92,20 | 95,99 |
| Hipotireóideo não ovariectomizado  | 0,48                                     | 98,29 | 79,67 | 94,13 |
| Hipotireóideo ovariectomizado      | 1,26                                     | 82,49 | 91,79 | 97,48 |
| Hipertireóideo não ovariectomizado | 2,18                                     | 86,19 | 96,34 | 97,26 |
| Hipertireóideo ovariectomizado     | 1,22                                     | 80,61 | 65,39 | 96,89 |

#### Viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação osteogênico, as CTM de todos os grupos apresentavam 100% de viabilidade.

#### Conversão do MTT em cristais de formazan

Este teste baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul escura. Esta capacidade, que somente as células viáveis

possuem, indica a atividade mitocondrial (Mossman, 1983; Hansen et al., 1989).

Aos sete dias de diferenciação, as CTM das ratas OVX apresentaram menor capacidade de conversão do MTT em cristais de formazan em relação às CTM de ratas normais (Fig. 8A; Anexo 5). No entanto, ainda aos sete dias de diferenciação, as CTM das ratas hiper OVX demonstraram maior capacidade de conversão do MTT em relação às CTM dos grupos normal, OVX e hiper (Fig. 8A; Anexo 5). Interessante, é que os resultados deste ensaio no grupo hiper OVX foram significativamente superiores ao grupo normal aos sete dias. Resultados semelhantes entre os grupos também foram observados aos 21 dias (Fig. 8B; Anexo 5).

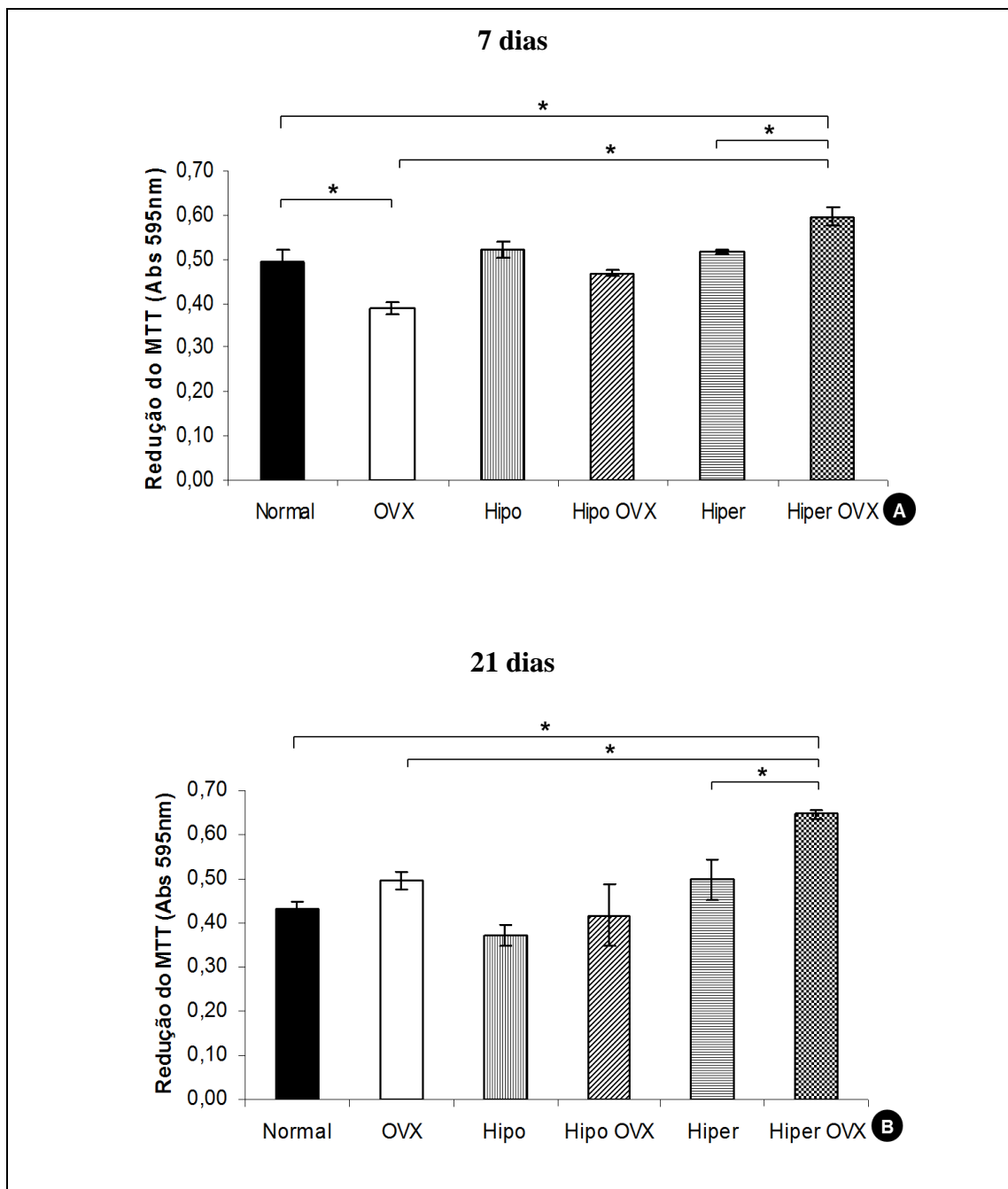


Figura 8. Conversão do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas aos sete (A) e 21 (B) dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$ . Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexos 5).

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

Este teste é um modo indireto de detecção da atividade da fosfatase alcalina, visto que se baseia no princípio de que os cromógenos BCIP e NBT reagem com a fosfatase alcalina. Inicialmente, a fosfatase alcalina cliva o grupo fosfato do BCIP produzindo uma coloração azulada e um próton, que por sua vez reduz o NBT e essa redução produz um precipitado insolúvel de cor púrpura (Smejkal e Kaul, 2001).

Aos sete dias de diferenciação, somente as CTM das ratas OVX apresentaram menor atividade da fosfatase alcalina em comparação as CTM das ratas normais. As CTM dos demais grupos demonstraram maior atividade da fosfatase em relação às CTM do grupo normal (Fig. 9A; Anexo 6). No entanto, aos 21 dias de diferenciação, somente as células dos animais hiper OVX apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente superior a do grupo normal (Fig. 9B; Anexo 6).

### **Número de nódulos de mineralização/campo**

Aos sete dias de diferenciação, as CTM dos animais dos grupos OVX e hipotireóides e hipertireóides OVX e não OVX produziram número de nódulos de mineralização significativamente menor em comparação ao grupo normal. Mas, semelhante aos resultados dos ensaios de MTT e fosfatase alcalina, o tratamento com tiroxina aumentou significativamente o número de nódulos na cultura das CTM de ratas OVX em comparação aos grupos OVX e hiper (Fig. 10A; Anexo 7). Aos 21 dias de diferenciação, os grupos tratados com tiroxina (hiper OVX e hiper) apresentaram número de nódulos de mineralização semelhantes ao grupo normal. Semelhante aos resultados dos sete dias, os demais grupos OVX, hipo OVX e hipo apresentaram número de nódulos de

mineralização significativamente menor em comparação ao normal (Fig. 10B; Anexo 7).

### **Expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina**

A expressão dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina nas culturas de CTM dos seis grupos foram comparados entre si durante a diferenciação osteogênica e com a expressão em osteoblastos (controle positivo da diferenciação osteogênica).

Em todos os grupos, a expressão de colágeno I, aos sete e 21 dias de diferenciação, foi inferior a do osteoblasto (Fig. 11A e B). Em comparação ao grupo normal, somente os grupos hipo, hipo OVX e hiper OVX apresentaram expressão de colágeno I significativamente menor aos sete dias (Fig. 11A; Anexo 8). Entretanto, aos 21 dias de diferenciação, a expressão de colágeno I foi significativamente maior nos grupos OVX e hipo em relação ao grupo normal (Fig. 11B; Anexo 8).

A expressão de osteocalcina, tanto aos sete quanto aos 21 dias de diferenciação, foi inferior a do osteoblasto em todos os grupos (Fig. 11C e D). Aos sete dias de diferenciação, somente o grupo hiper OVX apresentou expressão de osteocalcina superior ao grupo normal (Fig. 11C; Anexo 9). Mas, aos 21 dias a expressão de osteocalcina foi semelhante ao grupo normal em todos os grupos (Fig. 11D; Anexo 9).

Com relação à expressão de sialoproteína, aos sete dias de diferenciação, a expressão foi inferior a do osteoblasto em todos os grupos (Fig. 12A). E como observado também na expressão de osteocalcina, somente o grupo hiper OVX apresentou expressão de sialoproteína superior ao grupo normal, aos sete dias de diferenciação (Fig. 12A; Anexo 10). Surpreendentemente, aos 21 dias de diferenciação, o grupo hiper OVX apresentou expressão de sialoproteína

superior à do osteoblasto (Fig. 12B; Anexo 10).

Outro resultado interessante foi com relação à expressão de osteopontina. Aos sete dias de diferenciação, somente o grupo hiper OVX apresentou expressão superior a do grupo normal, enquanto os demais grupos OVX, hipo, hipo OVX e hiper apresentaram expressão significativamente menor a do grupo normal (Fig. 12C; Anexo 11). Aos 21 dias de diferenciação, apesar de todos os grupos apresentarem expressão de osteopontina superior a do osteoblasto, essa expressão nos grupos OVX, hipo e hiper foi significativamente menor em comparação ao grupo normal. Os grupos hipo OVX e hiper OVX não diferiram do grupo normal (Fig. 12D; Anexo 11).

#### **Expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina**

A expressão dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea e osteopontina nas culturas de CTM dos seis grupos foram comparados entre si durante a diferenciação osteogênica e com a expressão em osteoblastos (controle positivo da diferenciação osteogênica).

Em todos os grupos, a expressão de colágeno I, aos sete e 21 dias de diferenciação, foi inferior a do osteoblasto (Fig. 11A e B). Em comparação ao grupo normal, somente os grupos hipo, hipo OVX e hiper OVX apresentaram expressão de colágeno I significativamente menor aos sete dias (Fig. 11A; Anexo 8). Entretanto, aos 21 dias de diferenciação, a expressão de colágeno I foi significativamente maior nos grupos OVX e hipo em relação ao grupo normal (Fig. 11B; Anexo 8).

A expressão de osteocalcina, tanto aos sete quanto aos 21 dias de diferenciação, foi inferior a do osteoblasto em todos os grupos (Fig. 11C e D). Aos sete dias de diferenciação, somente o grupo hiper OVX apresentou expressão de osteocalcina superior ao grupo normal (Fig. 11C; Anexo 9). Mas, aos 21 dias a expressão de osteocalcina foi semelhante ao grupo normal em todos os grupos (Fig. 11D; Anexo 9).

Com relação à expressão de sialoproteína, aos sete dias de diferenciação, a expressão foi inferior a do osteoblasto em todos os grupos (Fig. 12A). E como observado também na expressão de osteocalcina, somente o grupo hiper OVX apresentou expressão de sialoproteína superior ao grupo normal, aos sete dias de diferenciação (Fig. 12A; Anexo 10). Surpreendentemente, aos 21 dias de diferenciação, o grupo hiper OVX apresentou expressão de sialoproteína superior à do osteoblasto (Fig. 12B; Anexo 10).

Outro resultado interessante foi com relação à expressão de osteopontina. Aos sete dias de diferenciação, somente o grupo hiper OVX apresentou expressão superior a do grupo normal, enquanto os demais grupos OVX, hipo, hipo OVX e hiper apresentaram expressão significativamente menor a do grupo normal (Fig. 12C; Anexo 11). Aos 21 dias de diferenciação, apesar de todos os grupos apresentarem expressão de osteopontina superior a do osteoblasto, essa expressão nos grupos OVX, hipo e hiper foi significativamente menor em comparação ao grupo normal. Os grupos hipo OVX e hiper OVX não diferiram do grupo normal (Fig. 12D; Anexo 11).

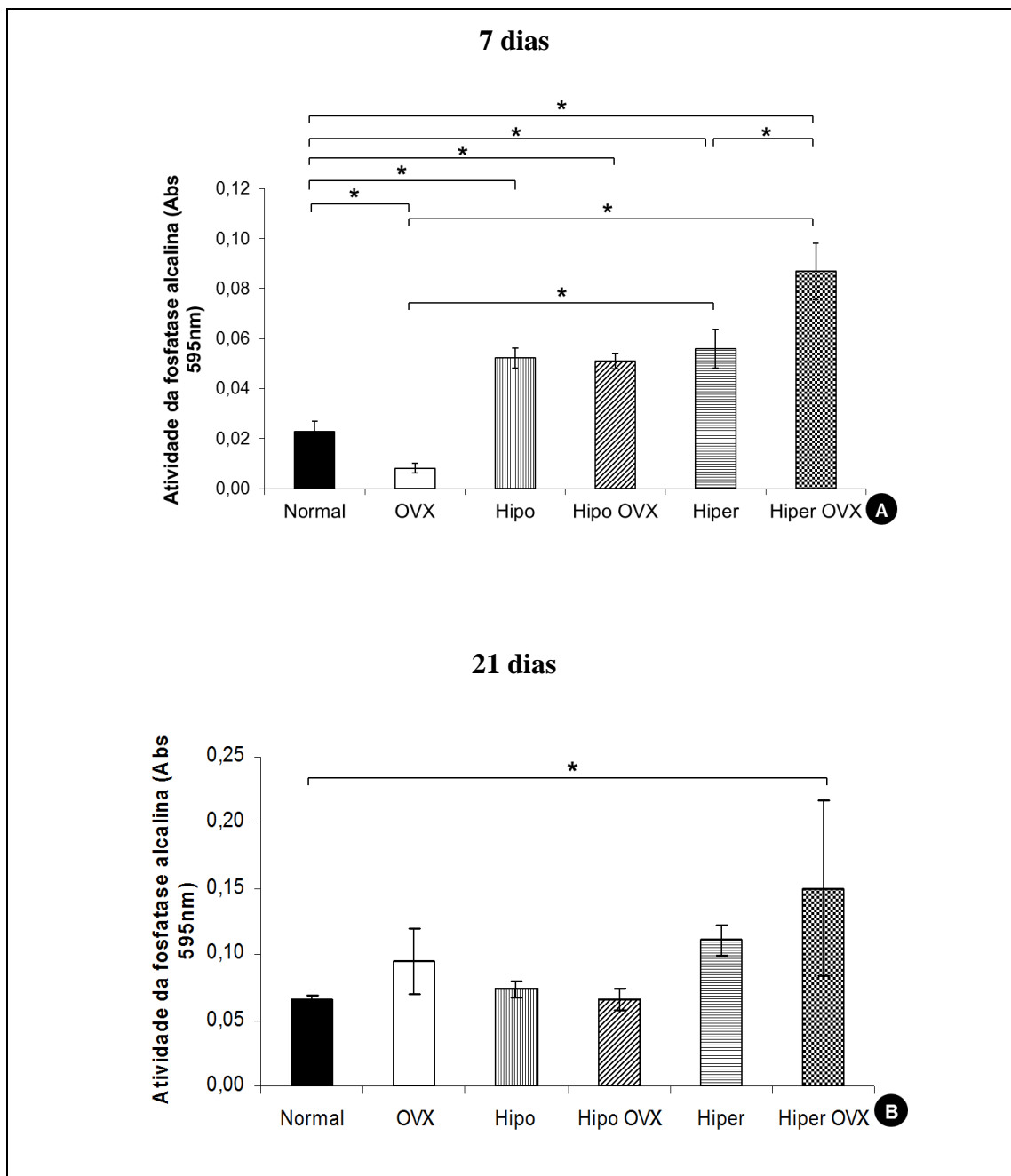


Figura 9. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas aos sete (A) e 21 (B) dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$ . Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 6).



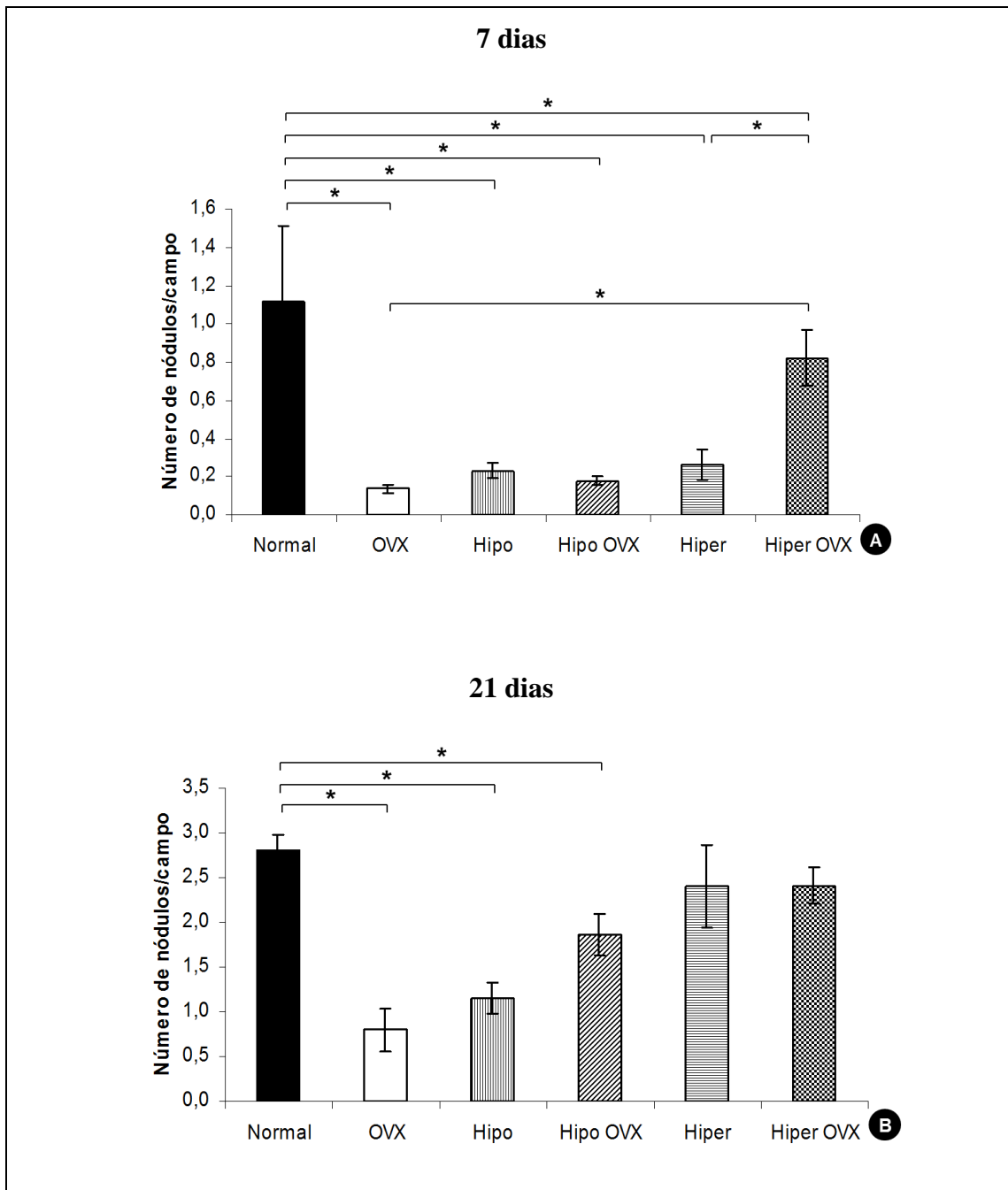


Figura 10. Número de nódulos de mineralização/campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas aos sete (A) e 21 (B) dias de diferenciação osteogênica. \* $p < 0,05$ . Eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX). (Anexo 7).

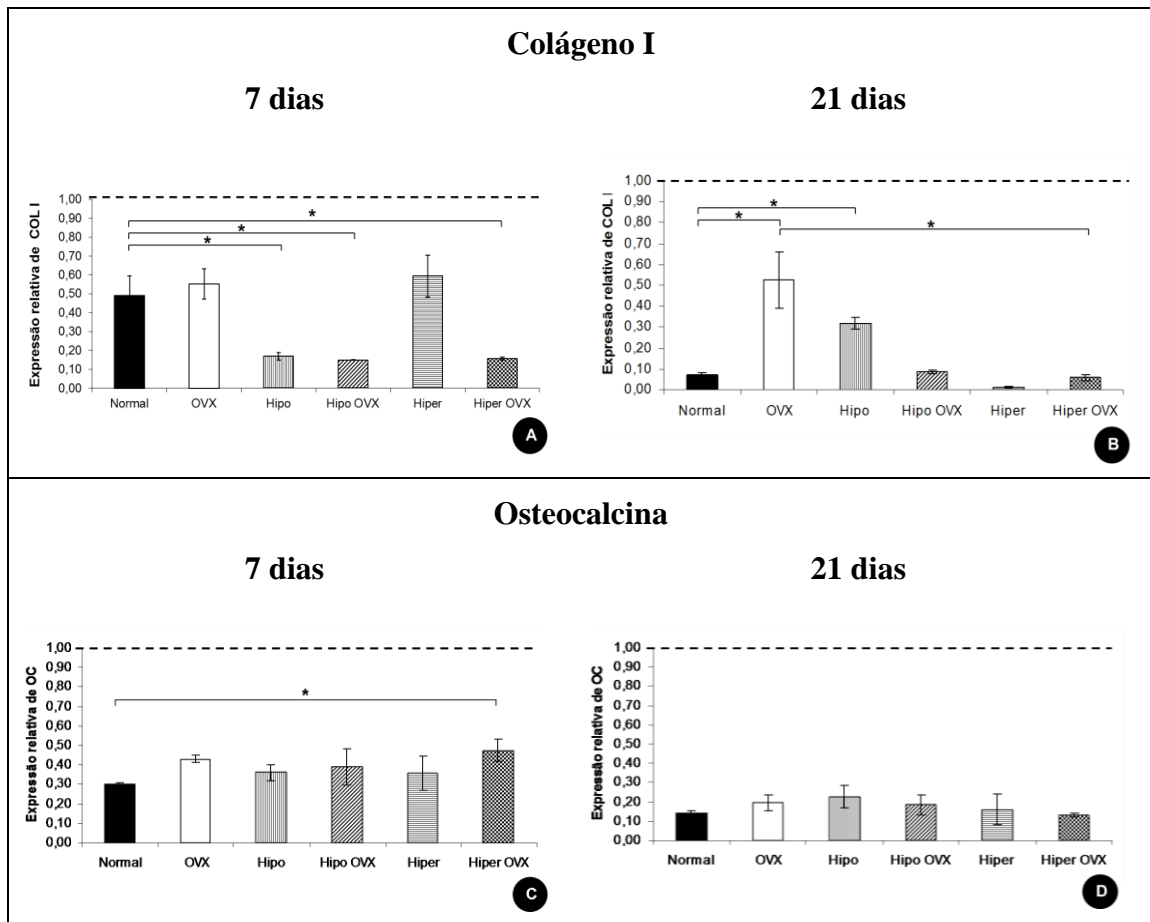


Figura 11. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para colágeno I (COL I) e osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM nos grupos eutireóideo não ovariectomizado (Normal), eutireóideo ovariectomizado (OVX), hipotireóideo não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideo ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideo não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideo ovariectomizado (Hiper OVX) aos sete (A,C) e 21 dias (B,D) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). A,B) Expressão relativa de colágeno I. C,D) Expressão relativa de osteocalcina. \* $p < 0,05$ . (Anexos 8 e 9).

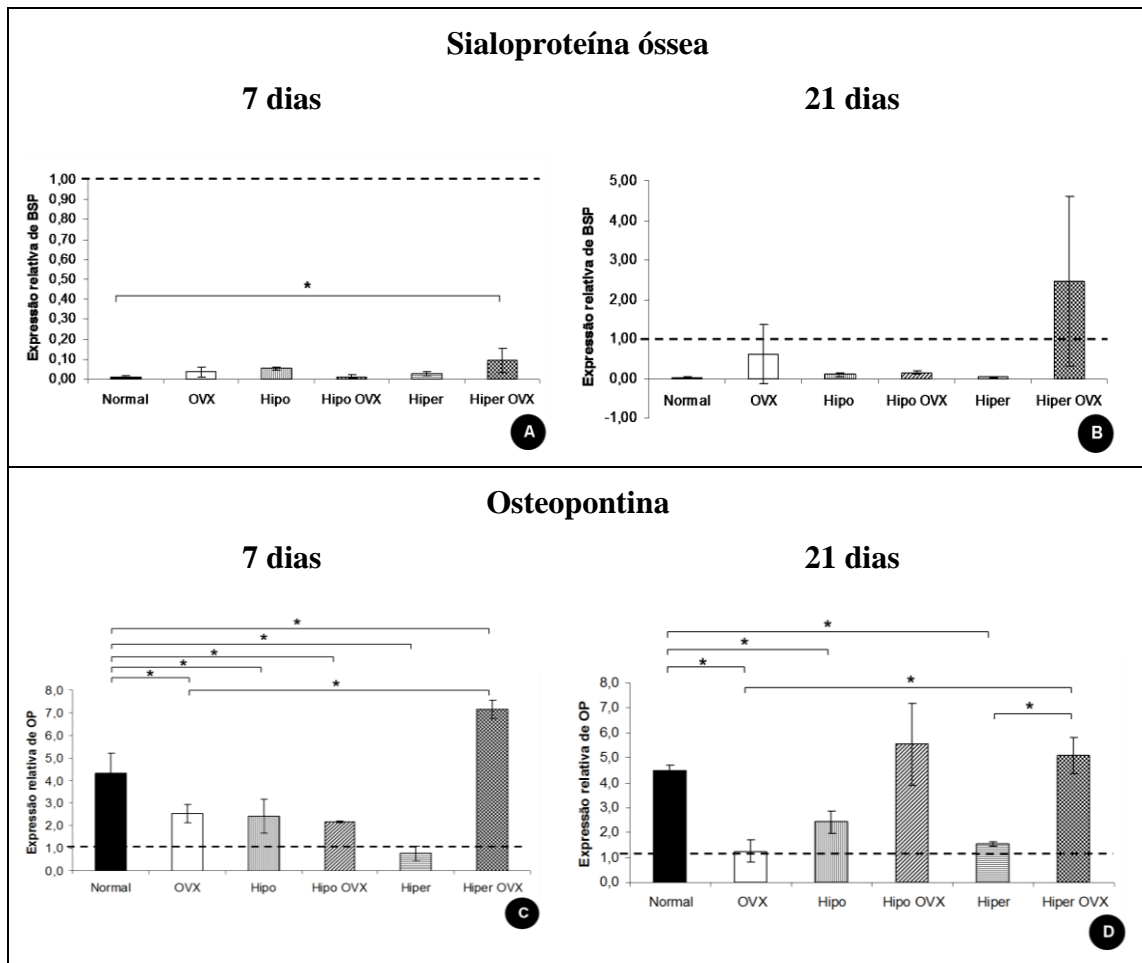


Figura 12. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM nos grupos eutireóideio não ovariectomizado (Normal), eutireóideio ovariectomizado (OVX), hipotireóideio não ovariectomizado (Hipo), hipotireóideio ovariectomizado (Hipo OVX), hipertireóideio não ovariectomizado (Hiper), hipertireóideio ovariectomizado (Hiper OVX) aos sete (A,C) e 21 dias (B,D) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). A,B) Expressão relativa de sialoproteína óssea. C,D) Expressão relativa de osteopontina. \* $p < 0,05$ . (Anexos 10 e 11).

## DISCUSSÃO

Independentemente do grupo, as CTM apresentaram características semelhantes com relação aos marcadores de superfície. No entanto, a baixa expressão de CD73 evidenciada nas CTM do grupo hipertireóideo OVX é importante de ser analisada. A função da CD73 depende do tipo de célula, ou seja, hematopoiética ou não hematopoiética. Essa molécula está envolvida com resposta imunológica e com carcinogênese (Resta e Thompson, 1997; Wang et al., 2008), embora seu papel nas CTM ainda necessite ser elucidado. Os hormônios tireoidianos podem alterar a atividade e a expressão de CD73 em outros tipos celulares (Wink et al., 2003; Carneiro-Ramos et al., 2004; Bruno et al., 2005). Ratos com disfunções tireoidianas induzidas demonstraram alteração na atividade da CD73, ocorrendo no hipotireoidismo redução e aumento da atividade de CD73 em plaquetas de ratos com hipertireoidismo (Bruno et al., 2005). Em culturas primárias de cardiomiócitos e de *C6 glioma cells* tratadas com T3 também houve aumento da atividade e da expressão de CD73 de forma dose-dependente nessas células (Wink et al., 2003; Carneiro-Ramos et al., 2004). No entanto, esses resultados diferem do presente estudo, onde o hipertireoidismo diminuiu a expressão de CD73 em CTM da medula óssea. Assim, células de origens diferentes também podem ter respostas diferentes ao tratamento com T3.

A indução das alterações ósseas evidenciadas pela histomorfometria e pelo teste de deflexão variou entre os grupos estudados. Como já era esperado, o grupo OVX apresentou osteoporose caracterizada por redução da porcentagem de tecido ósseo trabecular, hipotrofia e hipoplasia osteoblásticas e redução da resistência óssea. Além disso, semelhante aos resultados de Ocarino et al. (2008) também foi observada redução da diferenciação osteogênica das CTM das ratas OVX. Os hormônios sexuais

desempenham papel fundamental na manutenção da homeostase entre os processos catabólicos e anabólicos do tecido ósseo (Weitzmann e Pacifici, 2006). Sabe-se que a deficiência desses hormônios, decorrente da menopausa, causa osteoporose (Manolagas et al., 2002; Syed e Khosla, 2005), que tem a redução da diferenciação osteogênica das CTM como um dos mecanismos envolvidos na sua gênese (Ocarino et al., 2008). Mas, os hormônios tireoidianos também são importantes para o crescimento ósseo e para manter a homeostase desse tecido (Mosekilde et al., 1990; Williams et al., 1998). Dessa forma, são vários os relatos de alterações ósseas em pacientes ou modelos animais com disfunções tireoidianas (Mosekilde e Melsen, 1978; Coindre et al., 1986; Allain et al., 1995; Karga et al., 2004; Ribeiro et al., 2004; Serakides et al., 2004; Serakides et al., 2008).

Apesar da associação entre a menopausa e as disfunções tireoidianas ser comum (Schoutens et al., 1991; Campos-Pastor et al., 1993; Affinito et al., 1996; Ben-Shlomo et al., 2001; Pearce, 2007), até o presente momento não se tinha conhecimento do efeito da associação entre o hipo ou o hipertireoidismo com a deficiência dos hormônios sexuais sobre a diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea. Também não se conhecia o efeito isolado de cada uma dessas disfunções tireoidianas sobre a diferenciação osteogênica dessas células. A diferenciação das CTM em osteoblastos é controlada por fatores de crescimento, estímulo mecânico, citocinas produzidas pela medula óssea e pelas moléculas de adesão que atuam como intermediárias das interações celulares (Bobis et al., 2006; Hughes et al., 2006; Payushina et al., 2006; Ocarino et al., 2007). Mas, vários hormônios, dentre eles os sexuais (Hong et al., 2006; Hong et al., 2009) e tireoidianos (Boeloni et al., 2009), também são importantes para a diferenciação osteogênica das CTM.

Semelhante aos efeitos da deficiência dos esteróides sexuais sobre o osso, o hipotireoidismo também causou osteoporose na tíbia e no fêmur, caracterizada por menor porcentagem de tecido ósseo trabecular, hipotrofia e hipoplasia osteoblásticas e redução da resistência óssea. Pela primeira vez, foi observada redução do potencial osteogênico das CTM de ratas com hipotireoidismo caracterizada por redução do número de nódulos de mineralização e da expressão de osteopontina. Desta forma, foi confirmada uma das hipóteses deste estudo de que a redução da diferenciação osteogênica das CTM é mais um dos mecanismos pelo qual o hipotireoidismo causa osteoporose.

Sabe-se que o hipotireoidismo reduz a mineralização da matriz óssea (Mosekilde e Melsen, 1978; Allain et al., 1995), o que poderia ter contribuído para a redução da resistência óssea. Mas, esse não é o único mecanismo pelo qual o hipotireoidismo causa fragilidade óssea. A hipofunção tireoidiana reduz também o número e a atividade osteoblástica (Ribeiro et al., 2004) com redução significativa da síntese de matriz óssea (Mosekilde e Melsen, 1978; Fadaei et al., 2005) e consequente osteoporose (Ribeiro et al., 2004). Por ser o osteoblasto uma célula que deriva da diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea, pode-se afirmar que a redução do número dessa célula esteja relacionada à redução da diferenciação das células tronco em osteoblastos. *In vitro*, já havia sido demonstrado que a T3 aumenta a capacidade de síntese dos osteoblastos (Ernst e Froesch, 1987; Varga et al., 1997; Gouveia et al., 2001; Asai et al., 2009) e a diferenciação osteogênica das CTM de ratas por aumentar a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de colágeno e a mineralização da matriz colagênica (Boeloni et al., 2009), além de aumentar também a expressão de osteocalcina (Hell et al., 2011). A CTM é responsiva aos hormônios tireoidianos por apresentar receptores para eles (Gruber et

al., 1999; Siddiqi et al., 2002). Dessa forma, os efeitos de T3 e T4 sobre a diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM pode explicar porque ratas com hipotireoidismo apresentam redução da diferenciação osteogênica. Mas, embora os ensaios demonstrem aumento da expressão de osteocalcina com a adição de T3 em culturas de CTM (Hell et al., 2011), somente a expressão de osteopontina pelas CTM reduziu significativamente em ratas com hipotireoidismo.

No entanto, apesar do hipotireoidismo ser considerado fator de risco para a osteoporose da menopausa (Barrett-Connor et al., 2009), neste estudo, a associação hipotireoidismo-ovariectomia não potencializou os efeitos negativos isolados do hipotireoidismo ou da ovariectomia sobre a porcentagem de tecido ósseo trabecular e sobre a resistência óssea. Mas, Ribeiro et al (2004) demonstraram que o hipotireoidismo pode potencializar a osteoporose em ratas ovariectomizadas. Essa diferença de resultado pode ser explicada pelo tempo de indução do hipotireoidismo ter sido superior ao tempo utilizado no presente estudo e também pelo fato de Ribeiro et al (2004) ter analisado todo o esqueleto, uma vez que os efeitos das disfunções tireoidianas podem variar dependendo do curso da doença e do sítio ósseo.

Entretanto, de forma intrigante a associação hipotireoidismo-ovariectomia aumentou significativamente *in vitro* a síntese de nódulos de mineralização e a expressão de osteopontina pelas CTM aos 21 dias de cultivo, em comparação ao efeito isolado do hipotireoidismo ou da ovariectomia. É provável que o aumento do número de nódulos de mineralização tenha sido subsequente ao aumento da osteopontina. Mas porque o hipotireoidismo ou a ovariectomia isolados causam redução da expressão de osteopontina pelas CTM e quando associados, elevam a expressão dessa proteína para um nível superior a

expressão no osteoblasto? Essa questão não pode ser respondida com base nos resultados do presente estudo e necessita ser mais investigada.

Ainda no grupo de ratas hipo OVX, se há aumento da diferenciação osteogênica das CTM, porque os ossos dessas ratas apresentavam redução da massa óssea e de sua resistência? O aumento da reabsorção óssea observado nos ossos dessas ratas poderia explicar a perda óssea. Além disso, havia hipotrofia e hipoplasia intensa dos osteoblastos que caracteriza uma redução da atividade de síntese dessa célula. Mas, a diferença de resultados *in vivo* e *in vitro* pode ser explicada, em parte, pelo fato de *in vivo* o controle dos processos anabólico e catabólico do tecido ósseo ser controlado pela interação coordenada entre fatores de transcrição gênica, citocinas, fatores de crescimento, hormônios (Raisz, 1999; Bland, 2000; Compston, 2002; Datta et al., 2008) e estímulo mecânico (Ocarino et al., 2007) diferente do que ocorre *in vitro*, onde a avaliação é restrita ao processo anabólico.

Outra questão suscitada é que se a diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM na associação hipotireoidismo-ovariectomia foi maior que o efeito isolado de cada um desses distúrbios hormonais, porque o osteoblasto, que deriva dessas células, estava presente em número reduzido na superfície das trabéculas ósseas? Uma das explicações pode ser que algum fator que esteja estimulando a diferenciação celular, não está sendo suficiente para manter a sobrevivência dos osteoblastos. Sabe-se que o tempo de vida do osteoblasto é pequeno e que, por isso, essa célula sofre renovação continuamente. O número de osteoblastos depende da taxa de multiplicação e de diferenciação das células tronco, bem como da velocidade com que ocorre apoptose. Nem todos os osteoblastos diferenciados a partir das células tronco vão revestir o tecido ósseo e sintetizar matriz óssea. Cerca de 65% dos osteoblastos morrem por apoptose

antes de compor as superfícies ósseas ou de se transformarem em osteócitos, de modo que alterações da taxa de apoptose pode ter um impacto importante sobre o número dessas células (Manolagas, 2000). Por isso, mais estudos são necessários a fim de verificar se na associação hipotireoidismo-ovariectomia há menor sobrevivência de osteoblastos por aumento da taxa de apoptose.

Com relação ao hipertireoidismo, há estudos que demonstram que a hiperfunção tireoidiana isolada pode aumentar a quantidade de tecido ósseo quando há supremacia da aposição em relação à reabsorção óssea. No entanto, seu efeito sobre o osso é variável dependendo da dose de tiroxina administrada, do perfil sérico dos hormônios sexuais e do curso da doença (Serakides et al., 2004), além de variar com o sítio ósseo (Suwanwalaikorn et al., 1996; Milne et al., 1998). Sendo assim, há estudos que demonstram que no hipertireoidismo a massa óssea pode estar normal, aumentada ou diminuída (Eriksen et al., 1986; Allain et al., 1995; Karga et al., 2004; Serakides et al., 2004). Neste estudo, semelhante ao descrito por Serakides et al (2004) também foram observados focos de hiperplasia osteoblástica. No entanto, a despeito disso, o hipertireoidismo isolado não alterou significativamente a porcentagem de tecido ósseo trabecular, a resistência óssea e a diferenciação osteogênica das células tronco. Apesar do número de nódulos de mineralização nas ratas hiper ter sido inferior ao grupo normal aos sete dias de diferenciação e da expressão de osteopontina ter sido inferior nos dois períodos estudados, o número de nódulos de mineralização produzidos pelas CTM desse grupo foi semelhante ao grupo normal aos 21 dias de diferenciação. Mas, resultado contrário e surpreendente foi observado nas ratas OVX tratadas com tiroxina.

Baseando-se somente no ensaio da histomorfometria óssea, a administração de

tiroxina em ratas OVX não aumentou a porcentagem de tecido ósseo trabecular, mas aumentou significativamente a resistência óssea pelo ensaio de deflexão em relação ao grupo OVX. É provável que o aumento da resistência óssea tenha sido decorrente do aumento da mineralização óssea ou do aumento do tecido ósseo cortical que não foram analisados neste estudo. Apesar de vários pesquisadores considerarem o hipertireoidismo um fator de risco para a osteoporose da menopausa (Földes et al., 1993; Belaya et al., 2007), Gouveia et al. (1997) também já haviam demonstrado que ratas OVX tratadas com pequenas doses de tiroxina podem apresentar reversão da osteoporose. Serakides et al (2004) também demonstrou que o efeito do hipertireoidismo associado à ovariectomia pode variar, revertendo a osteoporose pós castração num primeiro momento ou potencializando a perda óssea da deficiência dos esteróides sexuais após um período prolongado de indução do hipertireoidismo.

É provável também que o aumento da resistência dos ossos das ratas hiper OVX esteja relacionado ao aumento da diferenciação osteogênica das CTM. Apesar das CTM de ratas OVX apresentarem redução do potencial osteogênico, a administração de tiroxina nas ratas OVX aumentou significativamente o potencial osteogênico dessas células, caracterizado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, do número de nódulos de mineralização e da expressão de osteocalcina, sialoproteína e osteopontina. O aumento da diferenciação osteogênica das CTM explica porque as ratas hiper OVX apresentam focos de hiperplasia osteoblástica. Mas, a hipertrofia apresentada pelos osteoblastos nos ossos das ratas hiper OVX é provavelmente o reflexo da ação deste hormônio sobre a atividade de síntese dessa célula, já demonstrado em culturas de osteoblastos tratadas com hormônio tireoidiano (Ernst & Froesch, 1987; Varga et al., 1997; Gouveia et al., 2001; Asai et al.,

2009). O aumento da diferenciação osteogênica das CTM e da atividade osteoblástica podem ser alguns dos mecanismos responsáveis pelo aumento da resistência dos ossos das ratas hiper OVX. Com base nos resultados enunciados e na ampla literatura consultada, esse estudo parece ser o primeiro a demonstrar a participação das CTM da medula óssea na gênese das alterações ósseas induzidas pelas disfunções tireoidianas em ratas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas. E a partir desse estudo, foi demonstrado que a redução do potencial osteogênico das CTM da medula óssea é um dos mecanismos envolvidos na gênese da osteopenia induzida pelo hipotireoidismo e que o hipertireoidismo aumenta a diferenciação osteogênica das CTM de ratas ovariectomizadas e que esse pode ser um dos mecanismos pelo qual a administração de tiroxina pode reverter a osteoporose pós-ovariectomia (Gouveia et al., 1997; Serakides et al., 2004). Também foi demonstrado que na associação hipotireoidismo-ovariectomia há perda óssea e hipoplasia osteoblástica apesar do aumento da diferenciação osteogênica das CTM. Por isso, há necessidade de mais pesquisas sobre os efeitos dessa associação na sobrevivência de osteoblastos.

## CONCLUSÕES

- 1) O hipotireoidismo e a ovariectomia causam osteopenia decorrente da menor aposição óssea e da redução da diferenciação osteogênica das CTM-MO, caracterizada por redução da síntese de nódulos de mineralização e da expressão de osteopontina;
- 2) A associação hipotireoidismo-ovariectomia não potencializa ou reduz a osteopenia e a hipoplasia osteoblástica, mas aumenta a diferenciação osteogênica das CTM quando comparada ao potencial das

CTM de ratas OVX ou com hipotireoidismo não OVX.

3) O tratamento com tiroxina de ratas não OVX não altera a porcentagem de tecido ósseo trabecular e a resistência óssea dos sítios estudados e a síntese de nódulos de mineralização pelas CTM aos 21 dias, apesar de reduzir a expressão de osteopontina aos sete e 21 dias de diferenciação.

4) A administração de tiroxina em ratas OVX aumenta a resistência óssea e a diferenciação osteogênica das CTM, caracterizada pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, do número de nódulos de mineralização e da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, sialoproteína e osteopontina.



## Capítulo 3

### **Efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas adultas com osteoporose**

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina (T3) sob o potencial osteogênico reduzido das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas com osteoporose e compará-lo ao de ratas adultas e jovens sem osteoporose. Foram utilizadas 12 ratas Wistar com dois meses de idade, distribuídas em dois grupos, um com osteoporose induzida por ovariectomia e o outro sem osteoporose (saudável) e seis ratas Wistar jovens sem osteoporose com um mês de idade. Após a indução da osteoporose, as ratas foram eutanasiadas e o fêmur e a tíbia direitos foram colhidos para extração das CTM-MO e avaliação do seu potencial osteogênico. As células da medula óssea foram cultivadas em DMEM enriquecido a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após quatro repiques foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-MO de ratas adultas com osteoporose e de ratas adultas e jovens sem osteoporose pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90. Foram constituídos sete grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico: 1) CTM-MO de ratas jovens sem osteoporose; 2) CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose; 3) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose sem T3; 4) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (0,01nM); 5) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1nM); 6) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (100nM) e 7) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1000nM). Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina, a conversão do substrato dimetiltiliazol (MTT) em cristais de formazan, avaliação da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2, por RT-PCR em tempo real aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação e o número de nódulos de mineralização aos 21 dias de diferenciação. Os dados foram submetidos à análise de variância com comparação das médias pelo teste SNK. As células, independente do grupo, apresentaram características fenotípicas compatíveis com a de células tronco. O aumento da idade reduziu significativamente a conversão do MTT em formazan, a atividade da fosfatase alcalina, a formação dos nódulos de mineralização e a expressão de colágeno I, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados. A osteoporose também alterou a diferenciação osteogênica das células tronco, aumentando a atividade da fosfatase alcalina e reduzindo a formação dos nódulos de mineralização e a expressão de colágeno I e osteopontina em pelo menos um dos períodos. No entanto, o tratamento hormonal das CTM-MO de ratas com osteoporose alterou significativamente esses parâmetros, em pelo menos uma das doses e em um dos períodos estudados. Conclui-se que a T3 não somente melhora o potencial osteogênico reduzido das CTM-MO de ratas com osteoporose como aumenta esse potencial em relação ao das CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose, sendo esse efeito dose-dependente. Mas, o tratamento com T3 não é capaz de igualar o potencial osteogênico das CTM de ratas com osteoporose ao de ratas jovens saudáveis.

Palavras chave: células tronco mesenquimais, medula óssea, diferenciação osteogênica, triiodotironina, ovariectomia, ratas.

## INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos são fundamentais para o crescimento e desenvolvimento de vários órgãos e tecidos (Nunes, 2003), incluindo o tecido ósseo (Britto et al., 1994; Pepene et al., 2001). A ação desses hormônios é de suma importância durante a embriogênese. Além disso, os hormônios tireoidianos são responsáveis pelo crescimento, diferenciação e pelo controle do metabolismo de vários órgãos na vida adulta, razões pelas quais são considerados essenciais para a manutenção da vida (Nunes, 2003).

A tireóide secreta predominantemente tiroxina da qual deriva, por desiodação, a triiodotironina. A síntese desses hormônios é regulada pelo hormônio hipotalâmico liberador de tireotrofina (TRH) que, por meio do sistema porta hipotalâmico-hipofisário liga-se a receptores específicos da adeno-hipófise, determinando a síntese e a secreção de hormônio tireotrófico (TSH). O TSH interage com receptores na membrana da célula folicular tireoidiana induzindo a expressão de proteínas envolvidas na biossíntese dos hormônios tireoidianos (Nunes, 2003).

O efeito dos hormônios tireoidianos se deve principalmente a ação direta da T<sub>3</sub> nos receptores TR $\alpha$  e TR $\beta$  presentes em células diferenciadas de diversos tecidos (Moeller et al., 2005) como condrócitos (Carrascosa et al., 1992; Robson et al., 2000), osteoblastos (Allain et al., 1996; Gruber et al., 1999) e osteoclastos (Allain et al., 1996). A T<sub>3</sub> é o hormônio ativo, capaz de estimular, em concentrações de 0,01 a 0,1nM, a proliferação e a atividade da fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos, apresentando efeitos opostos em concentrações mais elevadas (Ernst e Froesch, 1987). Além disso, foi comprovado que a T<sub>3</sub> também estimula de forma dose-dependente a diferenciação osteogênica *in vitro* das células tronco mesenquimais da

medula óssea de ratas jovens saudáveis, aumentando significativamente a diferenciação osteogênica (Boeloni et al., 2009; Hell et al., 2011).

As células tronco derivadas de animais e humanos podem ser classificadas como embrionárias (Lerou e Daley, 2005; Weissman, 2006) e adultas (Presnell et al., 2002) com funções e características distintas. As células tronco adultas são multipotentes, sendo encontradas na razão de 1:10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> de todas as células (Matikainen e Laine, 2005). São encontradas no cérebro (Gage, 2000), sistema nervoso periférico (Kruger et al., 2002), coração (Beltrami et al., 2003), medula óssea (Jiang et al., 2002; Gronthos et al., 2003), músculo esquelético (Jiang et al., 2002), pele (Toma et al., 2001), tecido adiposo (Zuk et al., 2001; Zhu et al., 2008), fígado, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal, córnea, retina, polpa dentária e dente (Fuchs e Segre, 2000). A capacidade de diferenciação das células tronco adultas é mais limitada do que as embrionárias (Donovan e Gearhart, 2001). A principal vantagem do seu uso recai sobre o fato de que células do próprio indivíduo podem ser expandidas em cultura e introduzidas novamente no paciente, sem o risco de rejeição pelo sistema imune (Ricardo e Deane, 2005). Consequentemente, a possibilidade de utilização das células tronco adultas para terapias celulares transformou-se em uma área de ampla investigação (McKay, 2000).

A osteoporose é uma doença caracterizada pela redução da síntese de matriz óssea causada por insuficiência osteoblástica. Sendo assim, todo fator que reduz a atividade de síntese do osteoblasto pode causar osteoporose. Dessa forma, deficiência de hormônio sexual, de crescimento e tireoidiano, deficiência protéica e até perda dos movimentos locomotores pode resultar em osteoporose. Mas, por ser o osteoblasto uma célula que tem sua origem na diferenciação da célula tronco mesenquimal

da medula óssea, fatores que reduzem a diferenciação osteogênica dessa célula também podem causar osteoporose. CTM-MO de pacientes com osteoporose apresentam deficiência na produção de colágeno I (Rodríguez et al., 2000). Adicionalmente, Ocarino et al. (2008) verificou que ratas castradas desprovidas dos esteróides sexuais apresentam redução do potencial osteogênico das CTM-MO, caracterizado por redução da síntese de nódulos mineralizados (Ocarino et al., 2008). Além disso, também foi comprovado que a injeção intra-óssea de células tronco de ratas isogênicas saudáveis no fêmur de ratas com osteoporose reverte a osteoporose local (Ocarino et al., 2010). Sabe-se que a inoculação de células tronco do próprio paciente com osteoporose poderia surtir melhor efeito por não haver risco de rejeição pelo sistema imune. Mas como o paciente com osteoporose apresenta redução significativa do potencial osteogênico das CTM-MO, postula-se que a adição de T3 *in vitro* poderia aumentar a diferenciação osteogênica das CTM-MO antes de seu uso no tratamento da osteoporose. Por isso, o presente estudo teve como objetivo principal estudar o efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido das células tronco mesenquimais de ratas adultas com osteoporose e compará-lo ao potencial osteogênico de CTM-MO de ratas adultas e de ratas jovens sem osteoporose.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos laboratórios de Experimentação Animal, de Cultivo de Células Tronco e Terapia Celular, de Biologia Molecular e de Histopatologia do Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### **Indução de osteoporose**

Foram utilizadas 12 ratas Wistar (236,58 ± 20,42g) com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (seis ratas/caixa) que receberam ração comercial<sup>36</sup> (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em um regime de 12 horas de luz e 12 horas no escuro e foram separadas inicialmente em dois grupos, sendo um grupo não ovariectomizado (normal, n=6) e um grupo ovariectomizado (OVX, n=6). As ratas do grupo OVX foram submetidas à ovariectomia bilateral sob anestesia geral (associação de 40mg/Kg de quetamina<sup>37</sup> com 10g/Kg de xilazina<sup>38</sup>). A remoção dos ovários foi feita por duas incisões laterodorsais de aproximadamente 1cm de extensão na região abdominal com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e da pele com fio categute e sutura padrão em ponto simples separado.

Três meses após a ovariectomia, tempo suficiente para a indução da osteoporose (Serakides et al., 2004), as ratas, já com cinco meses de idade, foram submetidas à eutanásia com sobredose de anestesia<sup>39</sup> e seus ossos longos (fêmur e tíbia) direitos foram colhidos para a determinação do potencial osteogênico das células tronco mesenquimais, avaliado por meio de cultivo celular. Também foi realizada a histomorfometria óssea dos ossos do lado contralateral, a fim de se confirmar o quadro de osteoporose.

### **Histomorfometria óssea**

À necropsia, os fêmures e as tíbias do lado esquerdo foram colhidos, pré-fixados em

---

<sup>36</sup> Nuvilab, Nuvital, Brasil

<sup>37</sup> Quetamina, Vetnil Ind. e Com., Brasil

<sup>38</sup> Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil

<sup>39</sup> Associação de 40mg/Kg de quetamina (Vetnil Ind. e Com., Brasil) com 10g/Kg de xilazina (Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil)

formalina a 10%, neutra e tamponada, por 96 horas, e em seguida dissecados para posterior descalcificação. A descalcificação foi realizada em ácido fórmico a 10% por 45 dias. Após completa descalcificação, controlada por exame radiográfico, os ossos foram lavados em água corrente por 24 horas, seccionados em duas metades, pelo seu eixo longitudinal, processados pela técnica de inclusão em parafina e as secções histológicas foram cortadas a 4µm e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica de acordo com Ocarino et al. (2007).

Para a determinação da porcentagem de tecido ósseo trabecular, realizou-se a morfometria nas secções histológicas do fêmur e tíbia, numa área tecidual média de 8mm<sup>2</sup>, iniciada a 1mm abaixo da placa epifisária e da cartilagem articular, onde foram determinados, com objetiva de 20x, as porcentagens de osso trabecular com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma gráticula com 121 pontos. As variáveis foram determinadas em um total de cinco campos na região da epífise e 10 campos na metáfise totalizando 605 pontos na epífise e 1210 pontos na metáfise (Ocarino et al, 2007).

#### ***Extração e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea***

A extração das CTM-MO foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Lee et al., 2003; Tropel et al., 2004; Nadri et al., 2007; Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). No fluxo laminar, inicialmente, realizou-se a remoção dos pelos e a antissepsia na pele da região do membro posterior direito. Em seguida, os fêmures e tíbias direitos das ratas adultas (5 meses de idade) com e sem osteoporose e de ratas jovens (1 mês de idade) saudáveis foram dissecados de tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção

da medula óssea da diáfise. No fluxo laminar, a medula óssea foi lavada com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>40</sup>. Após centrifugação por 10 minutos a 1400g, as células foram cultivadas em garrafas T75<sup>41</sup> contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de soro fetal bovino<sup>42</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-MO por citometria de fluxo. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos.

As CTM-MO das ratas adultas (5 meses de idade) com e sem osteoporose e das ratas jovens (1 mês de idade) foram cultivadas em meio de indiferenciação (DMEM) e de diferenciação osteogênico, acrescido ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3)<sup>43</sup> dependendo do grupo. Foram constituídos sete grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico: 1) CTM-MO de ratas jovens com um mês de idade sem osteoporose; 2) CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose; 3) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose sem T3; 4) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (0,01nM); 5) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1nM); 6) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (100nM) e 7) CTM-MO de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1000nM). Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina e a conversão do substrato dimetiliazol (MTT) em cristais de formazan, avaliação da

---

<sup>40</sup> Sigma, USA

<sup>41</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>42</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

<sup>43</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e de BMP-2, por RT-PCR em tempo real aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação e o número de nódulos de mineralização aos 21 dias de diferenciação. Todos os ensaios *in vitro*, foram realizados com seis repetições em cada grupo e em cada período, como descrito detalhadamente a seguir.

### **Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea**

Após o cultivo em garrafas T75 das CTM-MO em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90%, as células das ratas jovens e das ratas adultas com e sem osteoporose foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços<sup>44</sup> (fundo redondo) com concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço, sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação. A caracterização fenotípica foi realizada nas células de ratas adultas sem osteoporose, adultas com osteoporose e jovens sem osteoporose. Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição de 2µL do anticorpo primário e 20µL de PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M/poço. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário<sup>45</sup> com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30

minutos a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)<sup>46</sup> empregando o *software Cell Quest*,<sup>47</sup> com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento de onda de 530nm, que corresponde a fluorescência verde, para análises pelo programa WinMDI<sup>48</sup> por gráficos de *dot plot* e histogramas (Tropel et al., 2004; Ishii et al., 2005a). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 *mouse*), anti-CD54 (clone 1A29 *mouse*), anti-CD73 (clone 5 F/B9 *mouse*) e anti-CD90 (clone Ox-7 *mouse*)<sup>49</sup>.

### **Extração e cultivo de osteoblastos**

A extração de osteoblastos da calvaria foi realizada conforme protocolo já estabelecido (Valério et al., 2004). A calvaria de ratos Wistar neonatos com dois dias de idade foi colhida assepticamente em fluxo laminar, para obtenção dos osteoblastos. Inicialmente, realizou-se antissepsia da pele que recobre a cabeça, seguido do corte e colheita dos ossos frontais e parietais. Os fragmentos foram lavados em PBS, recortados em fragmentos pequenos e incubados em tripsina 1% por 15 minutos e

<sup>44</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>45</sup> Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Oregon, USA

<sup>46</sup> FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA

<sup>47</sup> The Cell Quest™ Software, Becton Dickinson Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

<sup>48</sup> Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry 3.0

<sup>49</sup> BD Biosciences, San Jose, CA, USA

posteriormente em colagenase 0,25%<sup>50</sup> diluídas em PBS 0,15M por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com PBS e após centrifugação por 10 minutos a 1400g, foram cultivadas em garrafas T75<sup>51</sup> contendo DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>52</sup> e 10% de soro fetal bovino<sup>53</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, as mesmas foram utilizadas para extração do RNA total e posterior análise da expressão de proteínas colagênicas e não colagênicas pela técnica de RT-PCR em tempo real e assim usadas como controle positivo de células diferenciadas.

#### ***Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán***

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM-MO de cada grupo experimental foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripán. Inicialmente, as CTM-MO foram cultivadas em garrafas T75 (1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>) com DMEM e no momento do teste foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400g por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul de Tripán. As células de cada grupo inviáveis (em azul) e viáveis (transparentes) foram quantificadas em câmara de Neubauer.

---

<sup>50</sup> Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Type I, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>51</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>52</sup> Sigma, USA

<sup>53</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

#### ***Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em meio de diferenciação osteogênico***

Após o cultivo em DMEM e obtenção de confluência das células de 80 a 90%, o meio foi substituído por meio osteogênico que é enriquecido com ácido ascórbico (50 µg/mL), β-glicerofosfato (10 mM)<sup>54</sup> e dexametasona (0,1 µM)<sup>55</sup>, acrescido de 10% de soro fetal bovino, sendo que as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim, as CTM-MO das ratas adultas com e sem osteoporose e jovens foram cultivadas em uma densidade previamente padronizada (1x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>), em seis repetições, em garrafas T25 e em placas de 6 e 24 poços<sup>56</sup> durante 7, 14 e 21 dias de acordo com cada ensaio realizado e descrito a seguir. As CTM-MO de ratas adultas com osteoporose foram cultivadas ainda com diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM). As doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina foram estabelecidas conforme estudos realizados por Ishida et al. (1995) e por Boeloni et al. (2009), sendo a dose de 0,01nM semelhante à dose fisiológica. Após sete, 14 e 21 dias, foram realizados: teste do MTT, atividade da fosfatase alcalina e avaliação da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 por RT-PCR em tempo real e do número de nódulos de mineralização aos 21 dias de cultivo.

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

Foram cultivadas 1x10<sup>4</sup> CTM-MO/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante

---

<sup>54</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>55</sup> Aché, Guarulhos, SP, Brasil

<sup>56</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

sete, 14 e 21 dias. Ao término de cada período, as culturas foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com soro fetal bovino em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL)<sup>57</sup>. A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-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 de acordo com Valério et al. (2004).

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

Foram cultivadas 1x10<sup>4</sup> CTM-MO/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante sete, 14 e 21 dias. Ao término de cada período, as culturas foram lavadas com PBS (0,15 molar). Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIT/NBT<sup>58</sup> (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3µL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras ficaram duas horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e foram posteriormente fotografadas. Em seguida, foi adicionado 210µL de solução detergente SDS 10% para incubação *overnight*. Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de

onda de 595nm de acordo com Ocarino et al. (2008) e Boeloni et al. (2009).

#### ***Avaliação da porcentagem de nódulos de mineralização/campo***

Foram cultivadas 1x10<sup>4</sup> CTM-MO/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 6 poços com lamínulas (22x22mm) estéreis, em meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante 21 dias. Após esse período, as CTM-MO foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas com álcool 70% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (adaptada de Prophet et al., 1992) para avaliação da porcentagem de nódulos/campo. Somente os nódulos de coloração marrom ou negro foram avaliados. Foi determinada a porcentagem de nódulos/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma graticula com 121 pontos em 50 campos em objetiva de 20x de acordo com Ocarino et al. (2010).

#### ***Quantificação relativa dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 por RT-PCR em tempo real***

Realizou-se, em todos os grupos e nos três períodos estudados, a avaliação da quantificação relativa da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 pela técnica de RT-PCR em tempo real. A extração do RNA total das células foi feita em três garrafas T25 por grupo pelo uso do Trizol<sup>59</sup>. O método de extração consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL e foram adicionados 0,2mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de

<sup>57</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

<sup>58</sup> Zymed Laboratories, CA, USA

<sup>59</sup> Invitrogen, USA

homogeneização, três minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, para separação em três fases onde a fase incolor superficial continha o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi então lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500g por cinco minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água DEPC<sup>60</sup> livre de RNase e imediatamente armazenado a -80°C. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial<sup>61</sup>, sendo que se utilizou 1 µg de RNA total para a síntese de cDNA com um volume final de 20µL. Realizaram-se ainda as reações de PCR em tempo real utilizando-se 2 µg de cDNA, 5 pM de cada iniciador e 12,5µL do reagente syber Green<sup>62</sup> em um volume final de 25 µL de reação, no aparelho ABI 7500<sup>63</sup>. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. O iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tab. 1). A expressão gênica foi calculada usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*.

---

<sup>60</sup> Água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC), Invitrogen, USA

<sup>61</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>62</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>63</sup> Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA

## Análise estatística

O delineamento foi multifatorial (7x3), ou seja, sete grupos e três períodos. Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste de SNK (Student Newman Keuls) utilizando o programa *Graphpad Instat 3*<sup>64</sup>. As alterações na expressão medidas pelo RT-PCR em tempo real foram comparadas pelo teste de SNK após transformação logarítmica dos dados. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

---

<sup>64</sup> GraphPad Software Inc., San Diego, USA



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

| <b>Gene</b>         | <b>Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')</b>                             | <b>Nº acesso</b> |
|---------------------|---|------------------|
| GAPDH               | <i>forward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA<br><i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA  | NM_002046        |
| Colágeno I          | <i>forward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG<br><i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG    | NM_000088        |
| Osteocalcina        | <i>forward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT<br><i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG      | NM_013414.1      |
| Sialoproteína óssea | <i>forward</i> : TGTCCTTCTGAACGGGTTTC<br><i>reverse</i> : CTCCCCATACTCAACCGTG       | NM_012587.2      |
| Osteopontina        | <i>forward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT<br><i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA | AB001382         |
| BMP-2               | <i>forward</i> : TAGTGACTTTTGGCC ACGACG<br><i>reverse</i> : GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG    | NM_017178        |

## RESULTADOS

### Histomorfometria dos ossos longos (fêmur e tíbia)

Com o objetivo de confirmar a indução da osteoporose, foi realizada análise morfológica e quantificação da porcentagem de tecido ósseo trabecular do fêmur e tíbia dos grupos OVX e não OVX três meses após a cirurgia.

#### *Grupo adulto não ovariectomizado (normal)*

Os animais do grupo normal apresentaram morfologia óssea compatível com a normalidade. As trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos apresentavam-se em grande quantidade, espessas, confluentes e com grande retenção de matriz

cartilaginosa (coração condróide). A cobertura osteoblástica era formada por células ora cuboidais com núcleos grandes e ora achatadas com núcleos fusiformes. Os osteócitos mostravam-se ora ativos, com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas e ora inativos com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas.

#### *Grupo adulto ovariectomizado (osteoporose)*

As ratas do grupo ovariectomizado apresentavam redução da quantidade de osso, principalmente nas regiões com tecido ósseo trabecular. O número de trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos era menor quando comparado ao do grupo normal, o que foi confirmado pela análise da porcentagem de tecido ósseo trabecular, significativamente menor neste grupo (Fig.

1; Anexo. 32). As trabéculas eram delgadas e fragmentadas e a cobertura osteoblástica

era rarefeita e constituída por células fusiformes, caracterizando a osteoporose.

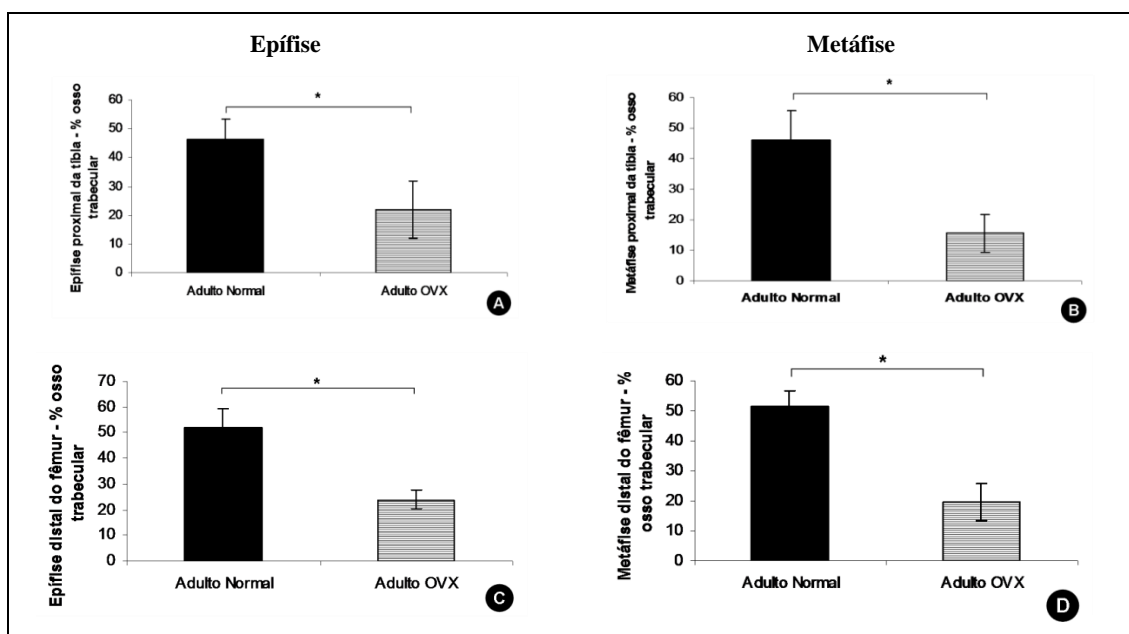


Figura 1. Porcentagem de tecido ósseo trabecular (média  $\pm$  desvio padrão) no fêmur e tíbia de ratas adultas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. (A) Epífise proximal da tíbia. (B) Metáfise proximal da tíbia. (C) Epífise distal do fêmur. (D) Metáfise distal do fêmur. \* $p < 0,05$ . Ovariectomizado (OVX). (Anexo 32).

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

As características fenotípicas das células extraídas da medula óssea de ratas adultas com e sem osteoporose e de ratas jovens foram compatíveis com a de células tronco.

Houve expressão de CD45 em no máximo 3,06% das células e expressão para CD54, CD73 e CD90 acima de 95,10%, 84,27% e 86,77% das células, respectivamente (Tabela 2; Anexo 33).

Tabela 2. Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e adultas com osteoporose, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%.

| Grupos                                    | Expressão de moléculas de superfície (%) |       |       |       |
|---|--|-------|-------|-------|
|   | CD45                                     | CD54  | CD73  | CD90  |
| Jovem sem osteoporose (1 mês de idade)    | 3,06                                     | 95,10 | 93,99 | 86,77 |
| Adulto sem osteoporose (5 meses de idade) | 1,09                                     | 96,94 | 84,27 | 95,93 |
| Adulto com osteoporose (5 meses de idade) | 1,01                                     | 97,94 | 92,20 | 95,99 |

### Viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação osteogênico, as CTM de todos os grupos apresentavam 100% de viabilidade.

### Conversão do MTT em cristais de formazan

Em comparação às CTM-MO das ratas jovens, as células das ratas adultas sem osteoporose apresentaram maior conversão do MTT em formazan aos sete dias. Mas esse resultado foi diferente aos 21 dias, quando as CTM-MO das ratas adultas sem osteoporose apresentaram menor conversão do MTT em formazan quando comparadas às CTM-MO das ratas jovens. As CTM-MO das ratas com osteoporose sem T3 apresentaram menor conversão do MTT em comparação às CTM-MO de ratas sem osteoporose somente aos sete dias. Em comparação às células das ratas com osteoporose, o tratamento hormonal com T3 somente aumentou a conversão do MTT em formazan na dose de 1nM aos sete e 21 dias, com resultado superior ao encontrado nas culturas de CTM-MO de ratas jovens aos sete dias e com resultado semelhante ao

dessas células aos 21 dias. As demais doses de T3 (0,01, 100 e 1000nM) reduziram a atividade do MTT somente aos sete dias de cultivo (Fig. 2A,2B,2C; Anexo 34).

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

O efeito da idade sob a atividade da fosfatase alcalina pode ser observado em todos os períodos estudados, uma vez que as CTM-MO das ratas adultas sem osteoporose apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao das CTM-MO de ratas jovens aos sete, 14 e 21 dias. Aos sete dias, as células das ratas adultas com osteoporose apresentaram aumento da atividade da fosfatase alcalina quando comparada ao das CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose. O tratamento com T3 das CTM-MO não alterou muito a atividade da fosfatase alcalina, exceto aos sete e 14 dias, no qual as células das ratas adultas com osteoporose tratadas com 1nM de T3 apresentaram menor atividade dessa enzima, comparadas as do grupo com osteoporose sem tratamento (Fig. 3A,3B,3C; Anexo 35).

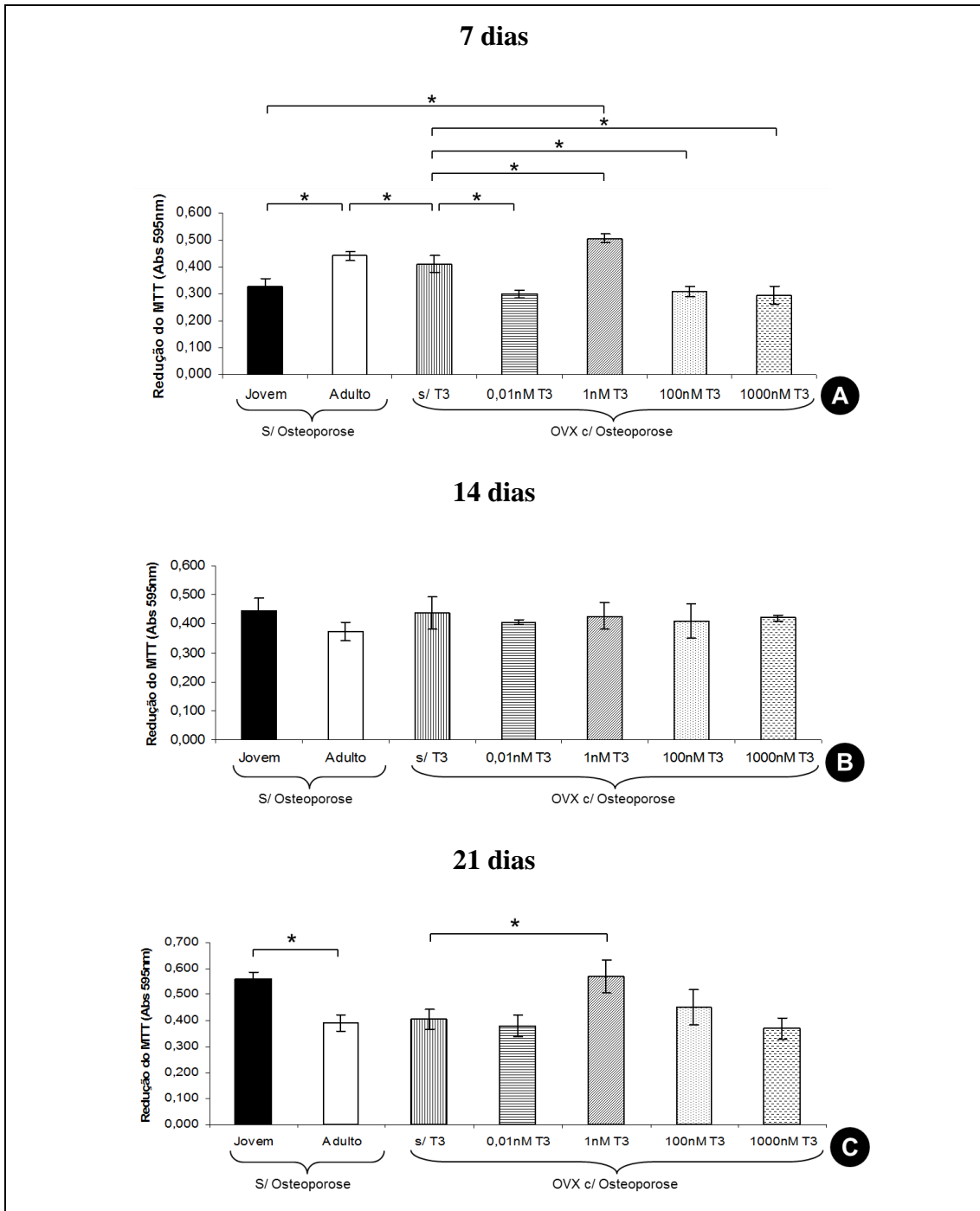


Figura 2. Conversão do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 34).

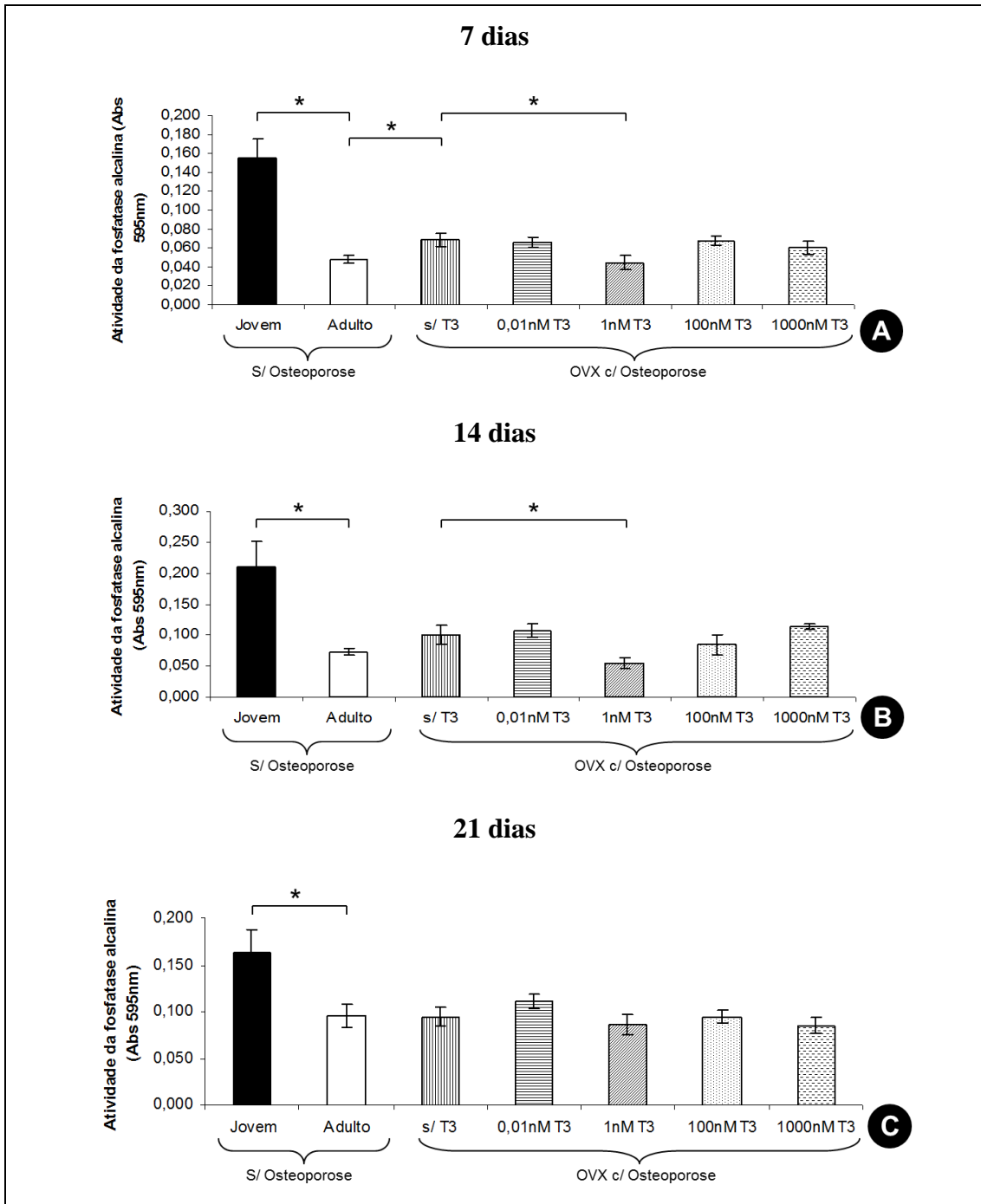


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 35).

## **Porcentagem de nódulos de mineralização/campo**

Como esperado, o efeito da idade também foi marcante sob a síntese de nódulos de mineralização, já que a cultura de CTM-MO de ratas adultas apresentou porcentagem de nódulos de mineralização significativamente menor aos 21 dias em comparação às culturas de células de ratas jovens. O efeito da osteoporose sob a síntese desses nódulos também foi observado com redução significativa dos mesmos em comparação às culturas de CTM-MO de ratas sem osteoporose. No entanto, o tratamento com T3 alterou positivamente esse resultado, aumentando significativamente a porcentagem de nódulos de mineralização/campo nas doses de 0,01 e 1000nM, atingindo valores semelhantes ao das culturas de CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose, mas sem se igualar a cultura de CTM-MO de ratas jovens (Fig. 4 e 5, Anexo 36).

## **Expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2**

A expressão dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 em cultura de CTM-MO dos sete grupos foram comparados entre si e com a expressão em osteoblastos (controle positivo da diferenciação osteogênica).

A expressão de colágeno I, aos sete dias de diferenciação, foi superior a do osteoblasto na maioria dos grupos estudados, com exceção das células do grupo com osteoporose tratado com 100 nM de T3 (Fig. 6A, Anexo 37). Aos 14 dias, somente as CTM-MO das ratas jovens e das ratas adultas com osteoporose tratadas com 1000 nM de T3 apresentaram expressão de colágeno I superior a do osteoblasto (Fig. 6B, Anexo 37). Entretanto, aos 21 dias de diferenciação, essa expressão foi inferior a do osteoblasto na maioria dos grupos

estudados, com exceção das CTM-MO das ratas jovens (Fig. 6C, Anexo 37).

Assim como em outros testes avaliados, o efeito da idade também foi marcante sob a expressão de colágeno I, já que a cultura de CTM-MO de ratas adultas apresentou expressão significativamente menor em comparação às culturas de células de ratas jovens nos três períodos avaliados. No entanto, o efeito da osteoporose sob a redução da expressão de colágeno I, somente foi observado aos 14 dias de diferenciação (Fig. 6B; Anexo 37). De forma interessante, em comparação às CTM-MO das ratas com osteoporose, o tratamento hormonal com T3 aumentou a expressão de colágeno I nas doses de 0,01nM, 1nM e 1000nM aos 14 dias de diferenciação (Fig. 6B; Anexo 37).

A expressão de osteocalcina, em todos os períodos de diferenciação e em todos os grupos, foi inferior a do osteoblasto (Fig. 7A,B,C; Anexo 38). Além disso, a idade, a osteoporose e o tratamento com T3 não alteraram a expressão de osteocalcina nos períodos avaliados (Fig. 7A,B,C; Anexo 38).

Ao contrário da expressão de osteocalcina, houve efeito da idade sob a expressão de sialoproteína óssea, já que a cultura de CTM-MO de ratas adultas apresentou expressão significativamente menor em comparação à das culturas de células de ratas jovens nos três períodos de diferenciação (Fig. 8A, B, C; Anexo 39). Entretanto, não houve efeito da osteoporose nem do tratamento com T3 sob a expressão de sialoproteína nos três períodos estudados (Fig. 8A,B,C; Anexo 39).

O efeito da idade também foi observado sob a expressão de osteopontina aos sete dias de diferenciação, já que a cultura de CTM-MO de ratas adultas apresentou expressão significativamente menor em comparação à das culturas de células de ratas jovens (Fig. 9A, Anexo 40). Mas, esse mesmo efeito não ocorreu aos 14 e 21 dias de diferenciação

(Fig. 9B,C; Anexo 40). Além disso, foi observado o efeito da osteoporose sob a expressão de osteopontina nos três períodos de diferenciação, uma vez que as CTM-MO de ratas adultas com osteoporose apresentaram expressão de osteopontina significativamente menor quando comparada ao das células de ratas adultas sem osteoporose (Fig. 9A,B,C; Anexo 40). Interessantemente, em comparação às CTM-MO das ratas com osteoporose, o tratamento hormonal com T3 somente aumentou a expressão de osteopontina nas doses de 1nM e 100nM e aos 21 dias de diferenciação (Fig. 9C, Anexo 40).

A expressão de BMP-2, aos sete e 14 dias de diferenciação, foi inferior a do osteoblasto em todos os grupos estudados (Fig. 10A, Anexo 41). Entretanto, aos 21 dias de diferenciação, essa expressão foi inferior ao osteoblasto na maioria dos grupos estudados, com exceção das células do

grupo jovem e do grupo com osteoporose (Fig. 10C, Anexo 41).

O efeito da idade também foi observado sob a expressão de BMP-2 aos 21 dias de diferenciação, já que a cultura de CTM-MO de ratas adultas apresentou expressão significativamente menor em comparação às culturas de células de ratas jovens (Fig. 10A, Anexo 41). Mas, esse mesmo efeito não ocorreu aos sete e 14 dias de diferenciação (Fig. 14B,C; Anexo 41). Além disso, não houve efeito da osteoporose sob a expressão de BMP-2 nos períodos avaliados (Fig. 10A,B,C; Anexo 41). No entanto, em comparação às células das ratas com osteoporose, o tratamento hormonal com T3 aumentou a expressão de BMP-2 nas doses de 0,01nM, 1nM e 100nM aos 14 dias de diferenciação (Fig. 10C, Anexo 41).

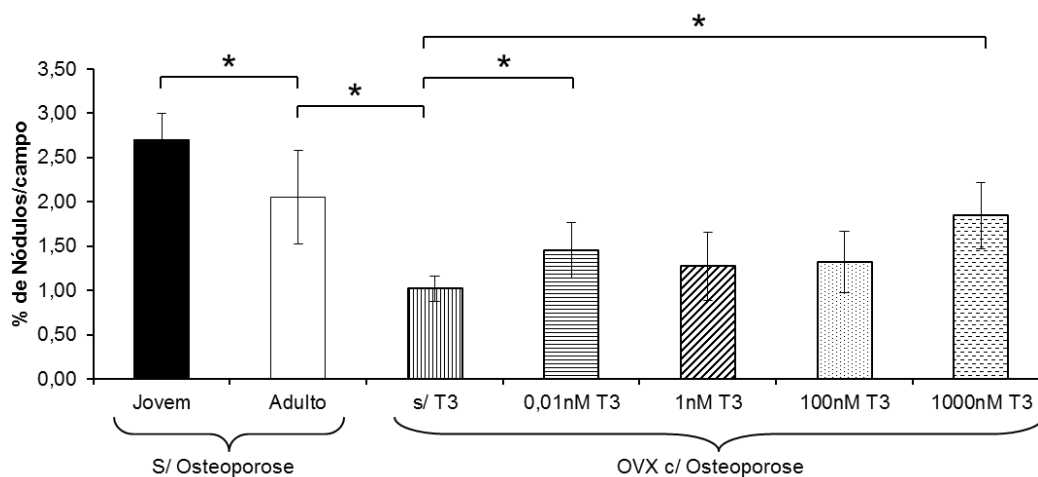


Figura 4. Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 36).





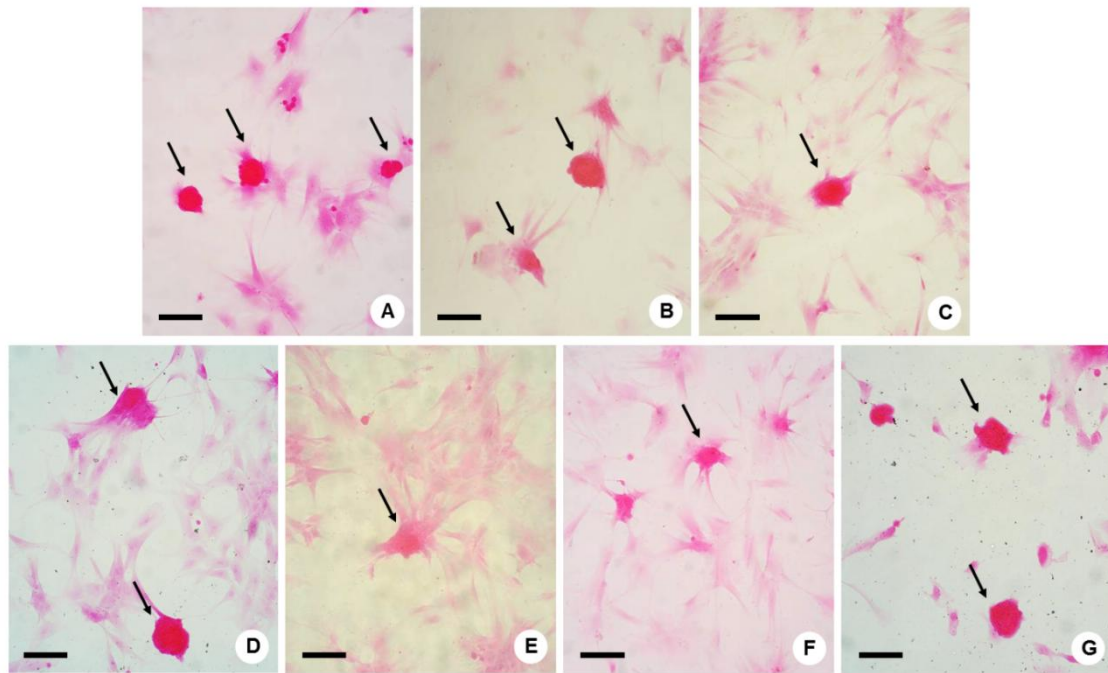


Figura 5. Nódulos de mineralização (setas) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. A) Jovem normal, B) Adulto normal, C) Adulto ovariectomizado (OVX), D) Adulto OVX 0,01nM, E) Adulto OVX 1nM, F) Adulto OVX 100nM, G) Adulto OVX 1000nM. Barra = 89,85  $\mu$ m.



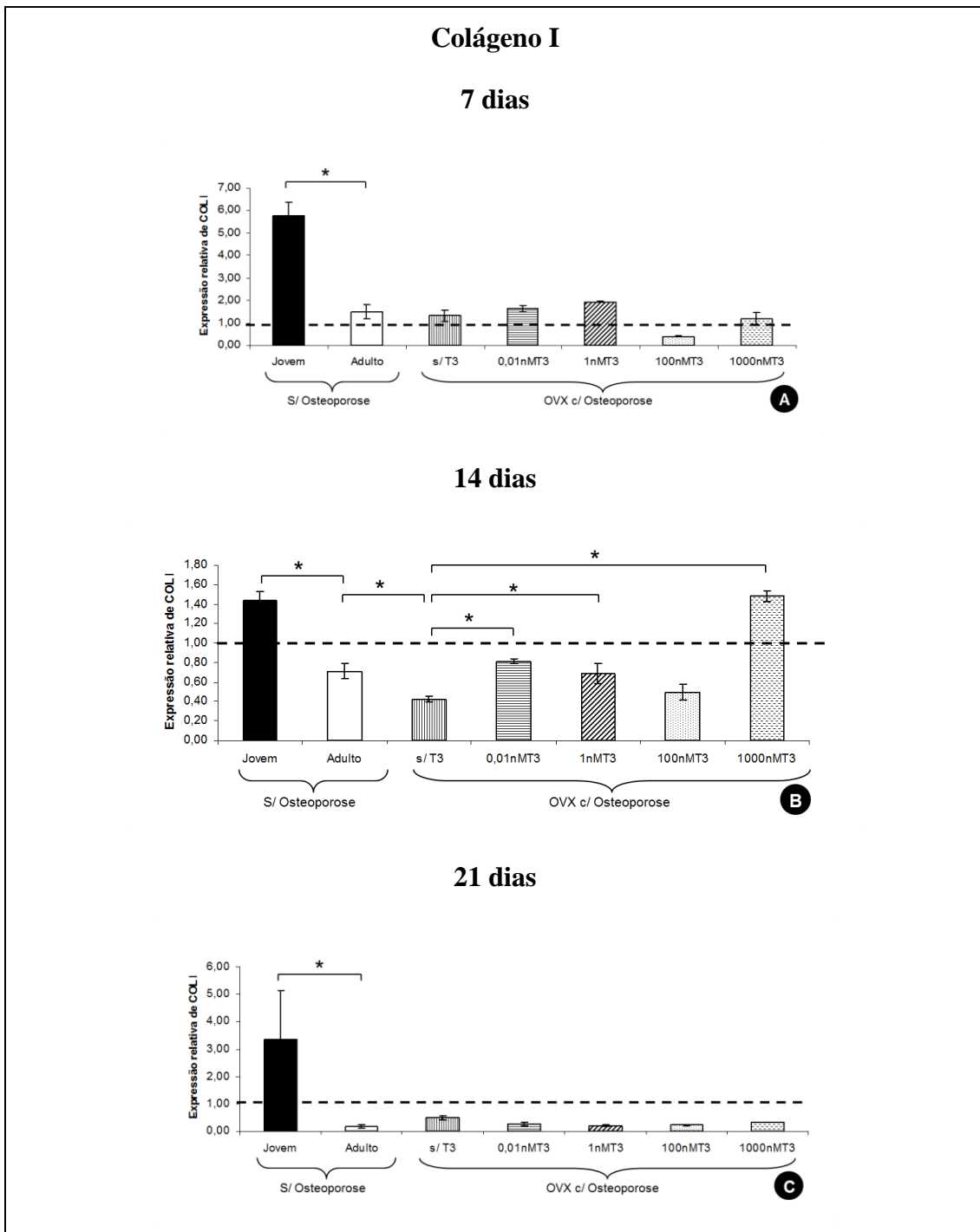


Figura 6. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 37).

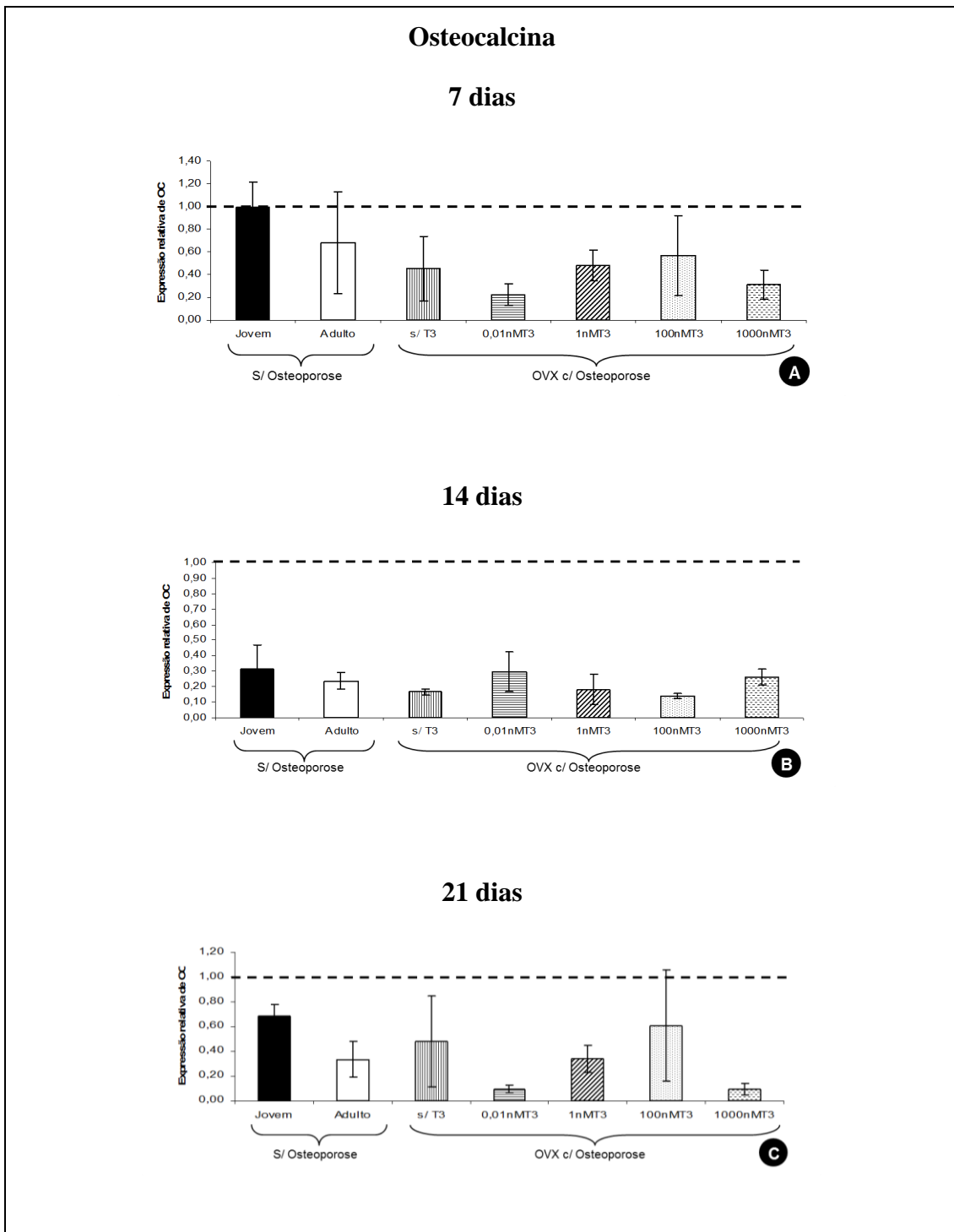


Figura 7. Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). (Anexo 38).

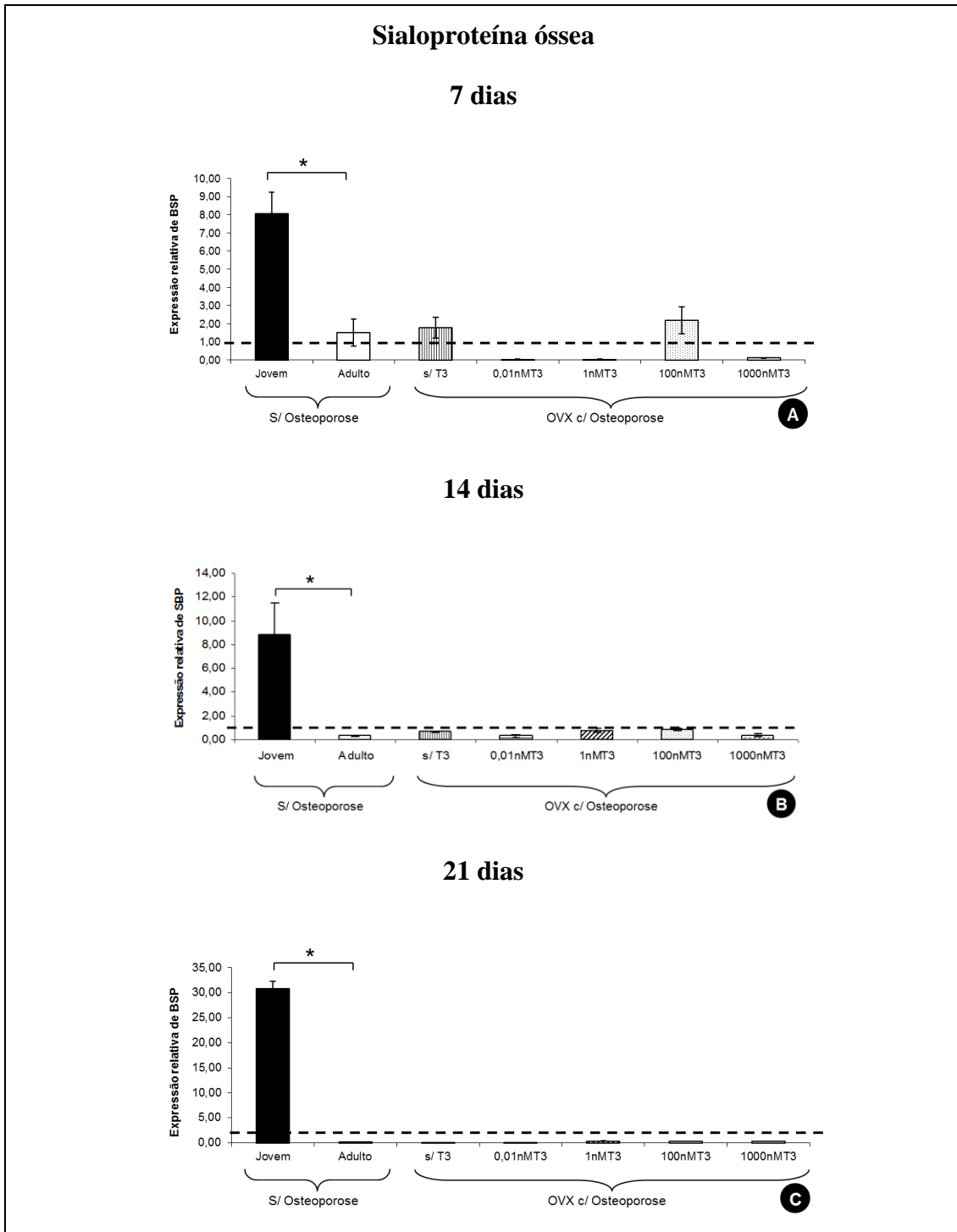


Figura 8. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para sialoproteína óssea (BSP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 39).

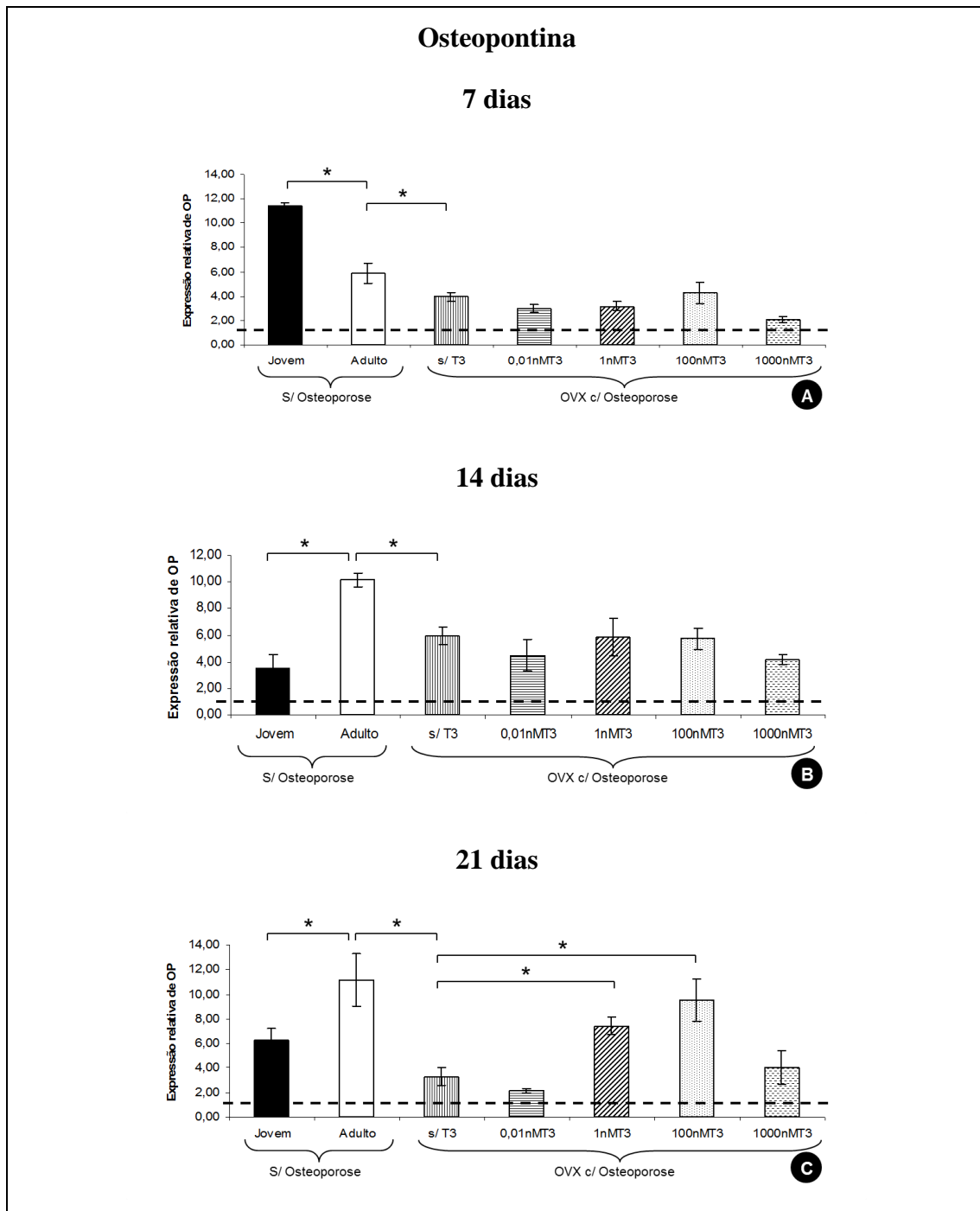


Figura 9. Quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 40).

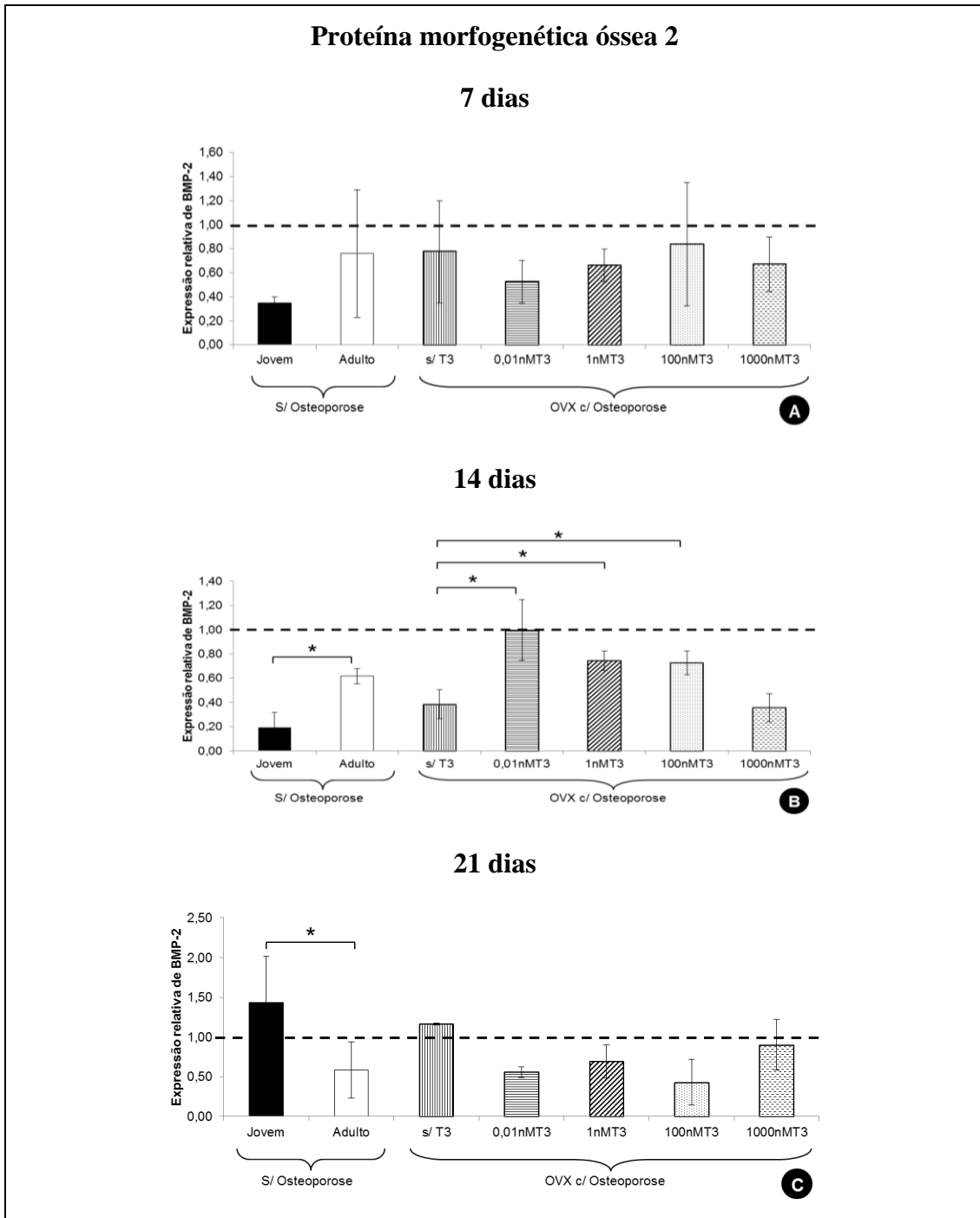


Figura 10. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 41).

## DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das células demonstrou que, independente do grupo, as células apresentaram características compatíveis com a de células tronco, ou seja, expressaram CD54, CD73 e CD90 e expressaram pouco CD45. Essa caracterização é importante, pois a medula óssea contém CTM, células hematopoiéticas (Bobis et al., 2006) e fibroblastos (Ishii et al., 2005a). O “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*” propôs que CTM expressam CD73 e CD90, e não expressam CD45 (Schäffler e Büchler, 2007). As células hematopoiéticas expressam, dentre outras moléculas, CD45 (Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006) que também pode ser expressa em fibroblastos (Ishii et al., 2005b). CD54 (ICAM-1) não é exclusivo de CTM e pode ser expressa em baixas concentrações em leucócitos e células endoteliais (Roebuck e Finnegan, 1999). Apesar disso, leucócitos e outras células hematopoiéticas não são aderentes em superfícies plásticas (Payushina et al., 2006). Adicionalmente, na medula óssea, somente as CTM apresentam a capacidade de diferenciação osteogênica (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006).

Como esperado, tanto a idade quanto a osteoporose alteraram o potencial osteogênico das CTM-MO. O interessante é que o resultado do tratamento com T3, apesar de ter variado com a dose e com o período, conseguiu melhorar o potencial osteogênico da CTM-MO de ratas com osteoporose, mas sem, no entanto, igualá-lo ao das CTM-MO de ratas jovens. Como esperado, o aumento da idade reduziu significativamente a diferenciação osteogênica das células tronco, caracterizada pela redução da atividade da fosfatase alcalina, da formação dos nódulos de mineralização e da expressão de colágeno I, sialoproteína óssea e de osteopontina em pelo menos um dos períodos estudados.

Vários estudos já haviam demonstrado que as CTM-MO de animais ou pacientes adultos apresentam menor potencial de diferenciação osteogênica em comparação ao de animais ou pacientes jovens (Mueller e Glowacki, 2001; Kretlow et al., 2008; Roobrouck et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zhou et al., 2008; Hell et al., 2012). Segundo Hell et al. (2012) as CTM-MO de ratas com cinco meses de idade, semelhantes às ratas deste estudo, apresentam redução significativa na expressão de telomerase reverse transcriptase (TERT), o que reduz a proliferação das CTM-MO. Mas apesar disso, a redução da síntese de matriz mineralizada é decorrente da redução em sua capacidade de sintetizar colágeno e outras proteínas não colagênicas representadas pela osteopontina e pela sialoproteína, importantes para a mineralização da matriz. Também não surpreendeu o fato de que as CTM-MO das ratas com osteoporose tenham apresentado menor diferenciação osteogênica, caracterizada por redução da formação dos nódulos de mineralização e da expressão de colágeno I e de osteopontina, em pelo menos um dos períodos estudados, quando comparadas as CTM-MO de ratas adultas sem osteoporose. Ocarino et al. (2008) também verificaram que as CTM-MO de ratas com osteoporose apresentam menor capacidade para sintetizar matriz mineralizada e sugeriu inclusive que a redução da diferenciação osteogênica das CTM-MO pode ser um dos mecanismos envolvidos na gênese da osteoporose decorrente da deficiência dos esteróides sexuais. É provável que os efeitos da idade se somem aos efeitos da deficiência dos esteróides sexuais para potencializar a redução do potencial osteogênico das CTM-MO, pelo menos na expressão de colágeno I e de osteopontina. Semelhante ao aumento da idade, a deficiência dos hormônios sexuais também reduziu a síntese de matriz mineralizada por reduzir a expressão de colágeno I e de osteopontina. A importância dos hormônios sexuais sobre a diferenciação osteogênica das CTM-MO também já havia



sido demonstrada anteriormente com a adição de esteróides sexuais em culturas de CTM-MO de ratas saudáveis que apresentaram aumento da síntese de matriz mineralizada (Hong et al., 2009).

A injeção intra-óssea local de CTM-MO doadas por ratas saudáveis e jovens pode aumentar a massa óssea de ratas com osteoporose. Esse tratamento não exclui o uso de drogas sistêmicas anabólicas ou antirreabsortivas, mas pode ser uma alternativa de tratamento viável naqueles sítios ósseos mais vulneráveis a fraturas (Ocarino et al., 2010) que causam alta taxa de morbidade e mortalidade (Chan et al., 2003). A possibilidade de rejeição existe (Wood e Goto, 2012) e por isso utilizar as células do próprio paciente seria o ideal. Mas, o uso de CTM-MO do paciente com osteoporose somente seria uma alternativa viável, se o potencial osteogênico dessa célula fosse resgatado ainda *in vitro* antes da sua inoculação. Há poucos estudos sobre a biologia das CTM-MO de ratas com osteoporose. Já foi demonstrado que a BMP-2, a BMP-7, o paratormônio (PTH) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) aumentam a atividade da fosfatase alcalina e a concentração de cálcio em culturas de CTM-MO de ratas com osteoporose (Pountos et al., 2010) e que, CTM-MO de camundongos ovariectomizadas respondem positivamente ao tratamento com estrógeno com aumento da síntese protéica, da atividade da fosfatase alcalina e da expressão de colágeno I (Zhou et al., 2001). No entanto, esse parece ser o primeiro estudo sobre o efeito da adição de T3 sobre a diferenciação osteogênica *in vitro* de CTM-MO de ratas com osteoporose. Somente *in vivo* já havia sido demonstrado que o tratamento com tiroxina sobre o esqueleto de ratas ovariectomizadas pode reverter a osteoporose pós-ovariectomia, dependendo da dose (Gouveia et al., 1997) e do curso da doença (Serakides et al., 2004) ou agravar a osteoporose da menopausa (Cipriani et al., 2009) por aumentar a

atividade osteoblástica (Serakides et al., 2004).

Os resultados da adição de T3 no meio osteogênico padrão foram surpreendentes e de forma inédita demonstraram que a capacidade de síntese da CTM-MO pode ser resgatada antes da sua inoculação no paciente. A adição de 1nM de T3 promoveu os melhores resultados uma vez que se comparando com as CTM-MO de ratas com osteoporose sem tratamento, as células tratadas com essa dose de T3 apresentaram maior expressão de colágeno I, de osteopontina e de BMP-2.

Estudos anteriores já haviam demonstrado o efeito benéfico de T3 sobre a diferenciação osteogênica das CTM-MO, mas de animais jovens e não portadores de nenhuma doença metabólica (Boeloni et al., 2009). Nesse mesmo estudo ficou também comprovado que as doses de T3 (0,01 a 0,1nM) capaz de aumentar o potencial osteogênico das CTM-MO são menores que a dose capaz de promover efeitos semelhantes em culturas de osteoblastos (1nM) e que doses maiores tem efeito contrário sob a cultura de CTM-MO (Ernst e Froesch, 1987; Boeloni et al., 2009). Dessa forma, Boeloni et al. (2009) demonstraram que a dose de T3 capaz de aumentar, *in vitro*, a síntese de matriz mineralizada pelas CTM-MO de ratas jovens e saudáveis pode variar de acordo com o grau de diferenciação da célula. No caso de perda do potencial osteogênico causado pela osteoporose, apesar da dose de 1nM aumentar um maior número das variáveis estudadas, a dose de 0,01nM de T3 que estimula a síntese de matriz mineralizada por CTM-MO de ratas jovens e saudáveis também foi capaz de melhorar algumas das variáveis estudadas. Ao contrário do observado por Boeloni et al. (2009), nenhuma das doses de T3 estudadas causou algum efeito adverso sobre a expressão de colágeno I ou sobre a síntese de matriz mineralizada pelas CTM-MO de ratas com osteoporose, o que reafirma a importância da

adição desse hormônio em culturas de CTM-MO de ratas com osteoporose. Esse resultado é interessante e difere de resultados *in vivo* que demonstram que o tratamento com tiroxina de ratas ovariectomizadas (Serakides et al., 2004) ou o hipertireoidismo em mulheres na menopausa (Cipriani et al., 2009) pode agravar a osteoporose causada pela deficiência dos esteróides sexuais. Mas, é interessante salientar que o agravamento da osteoporose nesses casos é decorrente de aumento da reabsorção óssea, apesar da aposição óssea também estar aumentada (Serakides et al., 2004). Pelo fato do osso ser um tecido complexo, onde o equilíbrio entre a aposição e reabsorção são fundamentais para a manutenção da massa óssea, os resultados *in vitro* nem sempre reproduzem fielmente os resultados *in vivo*. Mas, no entanto, esse resultado foi semelhante ao das CTM-MO de ratas ovariectomizadas e tratadas com tiroxina descritos no capítulo anterior onde o tratamento das ratas com tiroxina aumentou o potencial osteogênico das CTM-MO caracterizado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina, do número de nódulos de mineralização e da expressão de osteocalcina, sialoproteína e osteopontina quando comparado as CTM-MO de ratas ovariectomizadas sem tratamento.

Mas, estudos complementares com a adição de T3 em culturas de CTM-MO de pacientes humanos com osteoporose necessitam ser realizados para validar o uso desse hormônio nas culturas de CTM-MO. Também é importante verificar se o tratamento local da osteoporose com a CTM-MO tratada *in vitro* com T3 teria o mesmo sucesso se comparado ao tratamento com a CTM-MO de ratas jovens (Ocarino et al., 2010). Buscar outras fontes de CTM que não sofrem redução do potencial osteogênico em pacientes com osteoporose, também é importante porque poderiam ser alternativas mais viáveis para o tratamento da osteoporose, causada pela menopausa ou pela ovariectomia bilateral. Por isso, um dos

objetivos dos capítulos subsequentes foi estudar a CTM do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose.

É interessante salientar ainda que o efeito *in vitro* da adição de T3 sobre a redução do potencial osteogênico das CTM-MO depende da causa. Na osteoporose, causada por deficiência dos hormônios sexuais, a adição de T3 surtiu resultados positivos. Mas, em estudo recente, a adição de T3 não conseguiu aumentar a diferenciação osteogênica das CTM-MO reduzida pela idade (dados não publicados). Nesse estudo, T3 teve efeito negativo sobre a diferenciação osteogênica semelhante ao efeito *in vivo* observado no capítulo anterior onde as CTM-MO de ratas adultas tratadas com tiroxina não apresentaram aumento da diferenciação osteogênica, chegando a apresentar redução do número de nódulos de mineralização e da expressão de osteopontina em pelo menos um dos períodos estudados.

## CONCLUSÕES

- 1) O aumento da idade reduziu significativamente a conversão do MTT em formazan, a atividade da fosfatase alcalina, a formação dos nódulos de mineralização e a expressão de colágeno I, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados;
- 2) A osteoporose alterou a diferenciação osteogênica das células tronco, aumentando a atividade da fosfatase alcalina e reduzindo a formação dos nódulos de mineralização e a expressão de osteopontina em pelo menos um dos períodos estudados;
- 3) Todas as doses de T3 utilizadas neste estudo tiveram algum efeito positivo sobre alguns dos parâmetros avaliados e em pelo menos um dos períodos estudados, em comparação aos resultados do grupo de

CTM-MO de ratas com osteoporose sem tratamento, sem, no entanto igualar o potencial osteogênico ao de uma CTM-MO de rata jovem. No entanto, a adição de 1nM de T3 promoveu os melhores resultados, aumentando a expressão de colágeno I, de

osteopontina e de BMP-2. Nenhuma dose de T3 causou algum efeito adverso sobre a expressão de colágeno I ou sobre a síntese de matriz mineralizada pelas CTM-MO de ratas com osteoporose.



## Capítulo 4

### **Efeito *in vitro* da triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido de células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e com osteoporose**

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da triiodotironina (T3) na diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) de ratas adultas ovariectomizadas e com osteoporose e compará-lo ao de ratas adultas e jovens sem osteoporose. Foram utilizadas 12 ratas Wistar com dois meses de idade, distribuídas em dois grupos, um com osteoporose induzida por ovariectomia e o outro sem osteoporose (saudável) e seis ratas Wistar jovens sem osteoporose com um mês de idade. Após a indução da osteoporose, as ratas foram eutanasiadas e tecido adiposo visceral (omento) foi colhido para extração das CTM-TA e avaliação do seu potencial osteogênico. As células foram cultivadas em DMEM enriquecido a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-TA pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90. Foram constituídos sete grupos de CTM-TA cultivadas em meio osteogênico: 1) CTM-TA de ratas jovens sem osteoporose; 2) CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose; 3) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose sem T3; 4) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (0,01nM); 5) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1nM); 6) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (100nM) e 7) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1000nM). Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina, a conversão do MTT em formazan, a expressão de colágeno I, osteocalcina, osteopontina e BMP-2, por RT-PCR em tempo real e a porcentagem de nódulos de mineralização aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação e a celularidade aos 21 dias de diferenciação. Os dados foram submetidos à análise de variância com comparação das médias pelo teste SNK. As células, independente do grupo, apresentaram características fenotípicas compatíveis com a de células tronco. O aumento da idade reduziu significativamente a conversão do MTT em formazan, a atividade da fosfatase alcalina, a formação dos nódulos de mineralização e a expressão de osteopontina em pelo menos um dos períodos estudados. Ratas ovariectomizadas e com osteoporose apresentaram redução significativa da diferenciação osteogênica das CTM-TA, caracterizada pela redução da atividade da fosfatase alcalina, da porcentagem de nódulos de mineralização e da expressão de BMP-2 em pelo menos um dos períodos avaliados. No entanto, o tratamento com T3 não aumentou a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas com osteoporose. Independente da dose de T3, o tratamento não alterou o número de nódulos de mineralização e a expressão de osteopontina, sialoproteína e BMP-2 e reduziu em pelo menos uma das doses e dos períodos, a conversão do MTT, a atividade da fosfatase, a porcentagem de células e a expressão de colágeno I. Conclui-se que as CTM-TA de ratas ovariectomizadas e com osteoporose apresentam redução da diferenciação osteogênica e que o tratamento com T3 apresenta efeitos negativos sobre alguns dos fatores envolvidos nessa diferenciação, sem, no entanto, reduzir a formação de nódulos de mineralização.

Palavras chave: células tronco mesenquimais, tecido adiposo visceral, diferenciação osteogênica, triiodotironina, ovariectomia, ratas.

## INTRODUÇÃO

O tecido adiposo fornece uma fonte rica e acessível de células tronco mesenquimais (CTM-TA) e por isso pode apresentar enorme potencial para terapia autóloga de várias doenças degenerativas. A perda ou não do potencial osteogênico das CTM-TA, em decorrência de alguns fatores inerentes ao doador, ainda é muito controversa e precisa ser mais bem elucidada. As CTM-TA, tanto do tecido subcutâneo quanto da cavidade abdominal (visceral), tem sido alvo de diversas pesquisas, inclusive no que concerne ao implante das mesmas em defeitos ósseos (Li et al., 2007; Arthur et al., 2009; Rada et al., 2009; Levi e Longaker, 2011). Essas células, à semelhança das CTM-MO, também podem se diferenciar em vários tipos celulares (Zuk et al., 2002; Rydén et al., 2003; Planat-Benard et al., 2004) como em células da linhagem adipogênica, miogênica, condrogênica e osteogênica, desde que as condições de cultivo sejam apropriadas (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002).

As CTM-TA, assim como as CTM-MO, são facilmente colhidas e cultivadas (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002), porém o número de células obtidas do tecido adiposo é bem superior quando comparado ao da medula óssea (Zuk et al., 2001; Zuk et al., 2002; Zhu et al., 2008; Levi e Longaker, 2011). Essas células também têm sido classificadas como células tronco mesenquimais, por apresentarem marcadores de superfície e capacidade de diferenciação semelhantes aos das CTM-MO (Gronthos et al., 2001; Zuk et al., 2002; Lee et al., 2004; Katz et al., 2005; Romanov et al., 2005).

A diferenciação osteogênica das CTM-TA também é influenciada por diversos fatores como estrógeno (Hong et al., 2007; Taskiran e Evren, 2011), vitamina D (Malladi et al., 2006), ácido retinóico (Skillington et al., 2002; Malladi et al., 2006; Wan et al., 2006), BMP-2 (Skillington et al., 2002;

Knippenberg et al., 2006; Wan et al., 2006), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (Levi et al., 2010a), fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Levi et al., 2010b), oncostatina M (Song et al., 2007) e pelo estímulo mecânico (Diederichs et al., 2010; Huang et al., 2010). O efeito da adição de T3 na diferenciação osteogênica tem sido pesquisado nas CTM-MO de ratas jovens e saudáveis e também na redução do potencial osteogênico advindos da osteoporose, como descrito no capítulo anterior, e da idade (dados não demonstrados). Em CTM do tecido adiposo, tanto subcutâneo quanto visceral, foi comprovada a presença de receptores para os hormônios tireoidianos (Ortega et al., 2009). Por isso, é provável que essas células, à semelhança das CTM-MO, também respondam à adição de T3 com aumento da diferenciação osteogênica. O que se sabe é que a tiroxina (T4) aumenta a síntese de IGF em culturas de CTM-TA de suínos, favorecendo a adipogênese (Chen et al., 1996). Mas o efeito da T3 na diferenciação osteogênica das CTM-TA ainda não é conhecido.

Pelo fato, da diferenciação osteogênica das CTM-TA ser também influenciada pelo estrógeno (Hong et al., 2007), postulou-se, no presente estudo, que as CTM-TA de ratas ovariectomizadas apresentam redução da diferenciação osteogênica, o que limitaria o uso dessa fonte de célula no tratamento da osteoporose. Como a T3 aumenta, *in vitro*, o potencial osteogênico das CTM-MO de ratas ovariectomizadas e com osteoporose, uma segunda hipótese é que esse tratamento também poderia aumentar o potencial osteogênico das CTM-TA de ratas ovariectomizadas e com osteoporose. Por isso, o objetivo inicial deste estudo foi verificar se as CTM-TA de ratas ovariectomizadas e com osteoporose apresentam redução do potencial osteogênico e estudar o efeito de diferentes doses da T3 na diferenciação osteogênica dessas células.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos laboratórios de Experimentação Animal, de Cultivo de Células Tronco e Terapia Celular, de Biologia Molecular e de Histopatologia do Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### *Ovariectomia e indução da osteoporose*

Foram utilizadas 12 ratas Wistar com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (seis ratas/caixa) que receberam ração comercial<sup>65</sup> (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em um regime de 12 horas de luz e 12 horas no escuro e foram separadas inicialmente em dois grupos sendo um grupo não ovariectomizado (normal, n=6) e um grupo ovariectomizado (OVX, n=6). As ratas do grupo ovariectomizado foram submetidas à ovariectomia bilateral sob anestesia geral (associação de 40mg/Kg de quetamina<sup>66</sup> com 10g/Kg de xilazina<sup>67</sup>). A remoção dos ovários foi feita por duas incisões laterodorsais de aproximadamente 1cm de extensão na região abdominal com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e da pele com fio catagute e sutura padrão em ponto simples separado.

Três meses após a ovariectomia, tempo suficiente para a indução da osteoporose (Serakides et al., 2004), os animais foram submetidas à eutanásia com sobredose de anestesia<sup>68</sup> e o tecido adiposo visceral

(omento) foi colhido para a determinação do potencial osteogênico das células tronco mesenquimais, avaliado por meio de cultivo celular. Também foi realizada a histomorfometria óssea dos ossos longos (fêmur e tíbia) esquerdos, a fim de se confirmar o quadro de osteoporose.

### *Histomorfometria óssea*

À necropsia, os fêmures e as tíbias do lado esquerdo foram colhidos, pré-fixados em formalina a 10%, neutra e tamponada, por 96 horas, e em seguida dissecados para posterior descalcificação. A descalcificação foi realizada em ácido fórmico a 10% por 45 dias. Após completa descalcificação, controlada por exame radiográfico, os ossos foram lavados em água corrente por 24 horas, seccionados em duas metades, pelo seu eixo longitudinal, processados pela técnica de inclusão em parafina e as secções histológicas foram cortadas a 4µm e coradas pela técnica de hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica de acordo com Ocarino et al. (2007).

Para a determinação da porcentagem de osso trabecular, realizou-se a morfometria nas secções histológicas do fêmur e tíbia, numa área tecidual média de 8mm<sup>2</sup>, iniciada a 1mm abaixo da placa epifisária e da cartilagem articular, onde foram determinados, com objetiva de 20x, as porcentagens de osso trabecular com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma gráticula com 121 pontos. As variáveis foram determinadas em um total de 5 campos na região da epífise e 10 campos na metáfise totalizando 605 pontos na epífise e 1210 pontos na metáfise (Ocarino et al., 2007).

### *Extração e cultivo de células tronco mesenquimais do tecido adiposo visceral*

A extração das CTM-TA foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Zuk et al., 2001; Baglioni et al., 2009, Gomide et

<sup>65</sup> Nuvilab, Nuvital, Brasil

<sup>66</sup> Vetnil Ind. e Com., Brasil

<sup>67</sup> Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil

<sup>68</sup> Associação de 40mg/Kg de quetamina (Vetnil Ind. e Com., Brasil) com 10g/Kg de xilazina (Rompum, Bayer, São Paulo, SP, Brasil)

al., 2011). Apesar da nomenclatura internacional mais amplamente utilizada ser a de células estromais derivadas do tecido adiposo, neste estudo será utilizada a denominação células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) para facilitar a comparação entre grupos. Foi colhido, assepticamente, o tecido adiposo visceral de ratas adultas com e sem osteoporose e de ratas jovens saudáveis, para obtenção das CTM. No fluxo laminar, inicialmente, realizou-se a remoção dos pelos e a antisepsia na pele da região abdominal ventral com posterior laparotomia para colheita do tecido adiposo abdominal. O tecido adiposo foi colhido em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>69</sup>. Em seguida, o tecido, cortado em pequenos fragmentos, foi transferido para um tubo com colagenase 0,15%<sup>70</sup> diluída em PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M e incubado por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, agitando-o de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a colagenase foi inativada pela adição de DMEM com 10% SFB (soro fetal bovino)<sup>71</sup>. Posteriormente, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 1400g, obtendo-se três fases: gordura, hemáceas e outras células sanguíneas e precipitado (fase estromal). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos mais 10% SFB e cultivado em garrafas T75 em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-TA por citometria de fluxo. Todas as soluções e meios de cultivo foram

preparados com água pura livre de íons e de microrganismos.

As CTM-TA das ratas adultas (5 meses de idade) com e sem osteoporose e das ratas jovens (1 mês de idade) foram cultivadas em meio de indiferenciação (DMEM) e de diferenciação osteogênico, acrescido ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3)<sup>72</sup>, dependendo do grupo. Foram constituídos sete grupos experimentais de CTM-TA cultivadas em meio osteogênico: 1) CTM-TA de ratas jovens sem osteoporose; 2) CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose; 3) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose sem T3; 4) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (0,01nM); 5) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1nM); 6) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (100nM) e 7) CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com T3 (1000nM). Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina, a conversão do substrato dimetiliazol (MTT) em cristais de formazan, a expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e de BMP-2, por RT-PCR em tempo real e o número de nódulos de mineralização aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação e a celularidade aos 21 dias de diferenciação. Todos os ensaios *in vitro*, foram realizados com seis repetições em cada grupo e em cada período como descrito detalhadamente a seguir.

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

Após o cultivo em garrafas T75 das CTM-TA em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90%, as células das ratas jovens e adultas com e sem osteoporose foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em

---

<sup>69</sup> Sigma, USA

<sup>70</sup> *Collagenase from Clostridium histolyticum*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>71</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

---

<sup>72</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA



placas de 96 poços<sup>73</sup> (fundo redondo) com concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço, sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação para cada grupo experimental. Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição de 2µL do anticorpo primário e 20µL de PBS 0,15M/poço. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário<sup>74</sup> com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)<sup>75</sup> empregando o *software Cell Quest*,<sup>76</sup> com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento de onda de 530nm, que

corresponde a fluorescência verde, para análises pelo programa WinMDI por gráficos de *dot plot* e histogramas (Tropel et al., 2004; Ishii et al., 2005a). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 *mouse*), anti-CD54 (clone 1A29 *mouse*), anti-CD73 (clone 5 F/B9 *mouse*) e anti-CD90 (clone Ox-7 *mouse*)<sup>77</sup>.

### **Extração e cultivo de osteoblastos**

A extração de osteoblastos da calvaria foi realizada conforme protocolo já estabelecido (Valério et al., 2004). A calvaria de ratos Wistar neonatos com dois dias de idade foi colhida assepticamente em fluxo laminar, para obtenção dos osteoblastos. Inicialmente, realizou-se antissepsia da pele que recobre a cabeça, seguido do corte e colheita dos ossos frontais e parietais. Os fragmentos foram lavados em PBS, recortados em fragmentos pequenos e incubados em tripsina 1% por 15 minutos e posteriormente em colagenase 0,25%<sup>78</sup> diluídas em PBS 0,15M por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com PBS e após centrifugação por 10 minutos a 1400g, foram cultivadas em garrafas T75<sup>79</sup> contendo DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>80</sup> e 10% de soro fetal bovino<sup>81</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, as mesmas foram utilizadas para extração do RNA total e posterior análise da expressão de proteínas colagênicas e não colagênicas

<sup>73</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>74</sup> Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Oregon, USA

<sup>75</sup> FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA

<sup>76</sup> The Cell Quest™ Sftware, Becton Dickinson Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

<sup>77</sup> BD Biosciences, San Jose, CA, USA

<sup>78</sup> Collagenase from *Clostridium histolyticum*, Type I, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>79</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>80</sup> Sigma, USA

<sup>81</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

pela técnica de RT-PCR em tempo real e assim usadas como controle positivo de células diferenciadas.

#### ***Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán***

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM-TA de cada grupo experimental foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripán. Inicialmente, as CTM-TA foram cultivadas em garrafas T75 ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) com DMEM e no momento do teste foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400g por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul de Tripán. As células de cada grupo inviáveis (em azul) e viáveis (transparentes) foram quantificadas em câmara de Neubauer.

#### ***Cultivo de células tronco mesenquimais do tecido adiposo visceral em meio de diferenciação osteogênico***

Após o cultivo em DMEM e obtenção de confluência das células de 80 a 90%, o meio foi substituído por meio osteogênico constituído por DMEM e enriquecido com ácido ascórbico (50 µg/mL), β-glicerofosfato (10 mM)<sup>82</sup> e dexametasona (0,1 µM)<sup>83</sup>, acrescido de 10% de soro fetal bovino. As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim, as CTM-TA das ratas adultas com e sem osteoporose e jovens foram cultivadas em uma densidade previamente padronizada ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), em seis repetições, em garrafas T25 e em placas de 6 e 24 poços<sup>84</sup> durante sete, 14 e 21 dias. Sendo que as CTM-TA de ratas adultas com osteoporose foram cultivadas ainda com diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM). As doses de 3,3',5-triiodo-L-

tironina foram estabelecidas conforme estudos realizados por Ishida et al. (1995) e por Boeloni et al. (2009), sendo a dose de 0,01nM Semelhante à dose fisiológica.

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

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM-TA/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante sete, 14 e 21 dias. Ao término de cada período, as culturas foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com soro fetal bovino em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL)<sup>85</sup>. A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-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 de acordo com Valério et al. (2004).

#### ***Avaliação da atividade da fosfatase alcalina***

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM-TA/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 24 poços com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante sete, 14 e 21 dias. Ao término de cada período, as culturas foram lavadas com PBS (0,15 molar). Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de

<sup>82</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>83</sup> Aché, Guarulhos, SP, Brasil

<sup>84</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>85</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

BCIT/NBT<sup>86</sup> (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4μL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3μL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras ficaram duas horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e foram posteriormente fotografadas. Em seguida, foi adicionado 210μL de solução detergente SDS 10% para incubação *overnight*. Posteriormente, 100μL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm de acordo com Ocarino et al. (2008) e Boeloni et al. (2009).

#### **Determinação da porcentagem de células/campo**

Foram cultivadas 1x10<sup>4</sup> CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 6 poços com lamínulas (22x22mm) estéreis com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante 21 dias. Ao término desse período, as culturas foram fixadas em álcool 70% e submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (Prophet et al., 1992). Posteriormente foi determinado o número de células/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma graticula com 121 pontos e objetiva de 20x em 40 campos tomados em toda a extensão da lamínula e objetiva de 20x.

#### **Avaliação da porcentagem de nódulos de mineralização**

Foram cultivadas 1x10<sup>4</sup> CTM-TA/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 6 poços com lamínulas (22x22mm) estéreis, com meio osteogênico, acrescido ou não de diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM), dependendo do grupo experimental, durante sete, 14 e 21 dias. Ao término de cada período, as CTM-

TA foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas com álcool 70% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (adaptada de Prophet et al., 1992) para avaliação da porcentagem de nódulos/campo. Somente os nódulos de coloração marrom ou negro foram avaliados. Foi determinada a porcentagem de nódulos/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma graticula com 121 pontos em 50 campos em objetiva de 20x de acordo com Ocarino et al. (2010).

#### **Quantificação relativa dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, osteopontina e BMP-2 por RT-PCR em tempo real**

Realizou-se, em todos os grupos e nos três períodos estudados, a avaliação da quantificação relativa da expressão de colágeno I, osteocalcina, osteopontina e BMP-2 pela técnica de RT-PCR em tempo real. A extração do RNA total das células foi feita em três garrafas T25 por grupo pelo uso do Trizol<sup>87</sup>. O método de extração consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. O lisado foi transferido para um microtubo de 1,5mL e foram adicionados 0,2mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, três minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, para separação em três fases onde a fase incolor superficial continha o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi então lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500g por cinco minutos a 4°C. O RNA foi

<sup>86</sup> Zymed Laboratories, CA, USA

<sup>87</sup> Invitrogen, USA

solubilizado em água DEPC<sup>88</sup> livre de RNase e imediatamente armazenado a -80°C. A concentração de RNA de cada grupo foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial<sup>89</sup>, sendo que se utilizou 1 µg de RNA total para a síntese de cDNA com um volume final de 20µL. Realizaram-se ainda as reações de PCR em tempo real utilizando-se 2 µg de cDNA, 5 pM de cada iniciador e 12,5µL do reagente syber Green<sup>90</sup> em um volume final de 25 µL de reação em um tubo<sup>91</sup>, no aparelho *SmartCycler System*<sup>92</sup>. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tab. 1). A expressão gênica foi calculada usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*.

### **Análise estatística**

O delineamento foi multifatorial (7x3), ou seja, sete grupos e três períodos. Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste de SNK (Student Newman Keuls) utilizando o programa *Graphpad Instat 3*<sup>93</sup>. As alterações na expressão medidas pelo

RT-PCR em tempo real foram comparadas pelo teste de SNK após transformação logarítmica dos dados. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

---

<sup>88</sup> Água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC), Invitrogen, USA

<sup>89</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>90</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>91</sup> SmartCycler® Tube-25µL, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA

<sup>92</sup> SmartCycler® System, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA

<sup>93</sup> GraphPad Software Inc., San Diego, USA

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

| <b>Gene</b>  | <b>Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')</b>                             | <b>Nº acesso</b> |
|--------------|---|------------------|
| GAPDH        | <i>forward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA<br><i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA  | NM_002046        |
| Colágeno I   | <i>forward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG<br><i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG    | NM_000088        |
| Osteocalcina | <i>forward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT<br><i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG      | NM_013414.1      |
| Osteopontina | <i>forward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT<br><i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA | AB001382         |
| BMP-2        | <i>forward</i> : TAGTGACTTTTGGCC ACGACG<br><i>reverse</i> : GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG    | NM_017178        |

## RESULTADOS

### Histomorfometria dos ossos longos (fêmur e tibia)

Com o objetivo de confirmar a indução da osteoporose, foi realizada análise morfológica e quantificação da porcentagem de tecido ósseo trabecular do fêmur e tibia dos grupos OVX e não OVX três meses após a cirurgia.

#### **Grupo adulto não ovariectomizado (normal)**

Os animais do grupo normal apresentaram morfologia óssea compatível com a normalidade. As trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos apresentavam-se em grande quantidade, espessas, confluentes e com grande retenção de matriz cartilaginosa (coração condróide). A cobertura osteoblástica era formada por células ora cuboidais com núcleos grandes e

ora achatadas com núcleos fusiformes. Os osteócitos mostravam-se ora ativos, com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas e ora inativos com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas.

#### **Grupo adulto ovariectomizado (osteoporose)**

As ratas do grupo ovariectomizado apresentavam redução da quantidade de osso, principalmente nas regiões com tecido ósseo trabecular. O número de trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos era menor quando comparado ao do grupo normal, o que foi confirmado pela análise da porcentagem de tecido ósseo trabecular, significativamente menor neste grupo (Fig. 1; Anexo. 68). As trabéculas eram delgadas e fragmentadas e a cobertura osteoblástica era rarefeita e constituída por células fusiformes, caracterizando a osteoporose.

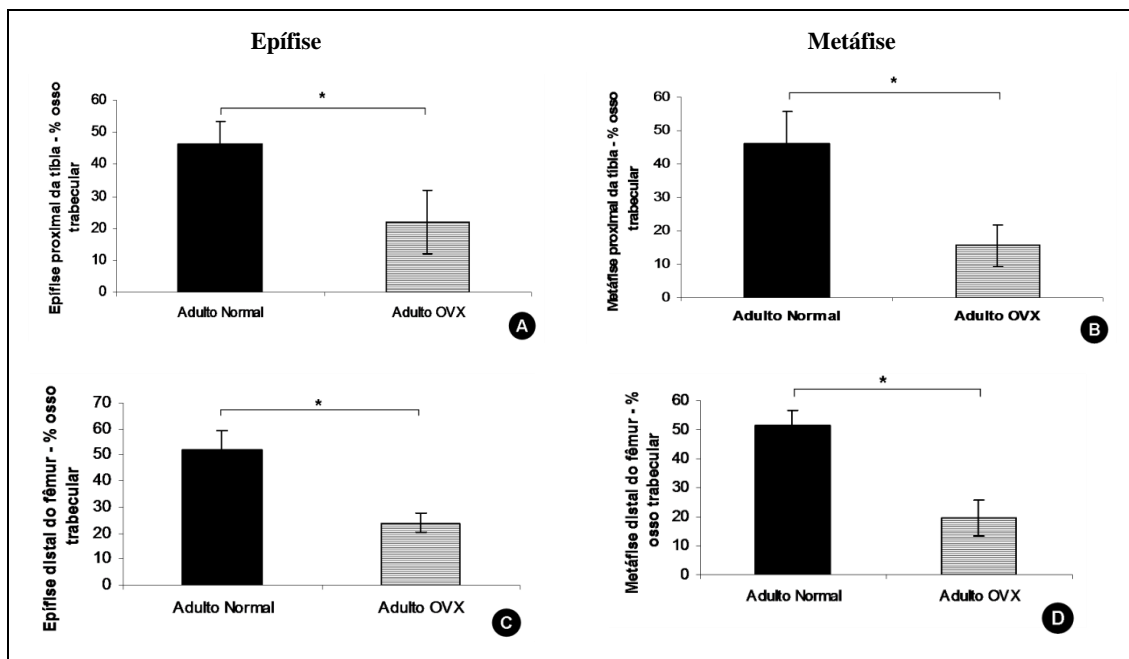


Figura 1. Porcentagem de tecido ósseo trabecular (média  $\pm$  desvio padrão) no fêmur e tíbia de ratas adultas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. (A) Epífise proximal da tíbia. (B) Metáfise proximal da tíbia. (C) Epífise distal do fêmur. (D) Metáfise distal do fêmur. \* $p < 0,05$ . Ovariectomizado (OVX). (Anexo 68).

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

As características fenotípicas das células extraídas do tecido adiposo de ratas adultas com e sem osteoporose e de ratas jovens

sem osteoporose foram compatíveis com a de células tronco. Houve expressão de CD45 em no máximo 6,34% das células e expressão para CD54, CD73 e CD90 acima de 52,03%, 81,80% e 78,98% das células, respectivamente (Tabela 2; Anexo 69).

Tabela 2. Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e adultas com osteoporose, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%.

| Grupos                                    | Expressão de moléculas de superfície (%) |       |       |       |
|---|--|-------|-------|-------|
|   | CD45                                     | CD54  | CD73  | CD90  |
| Jovem sem osteoporose (1 mês de idade)    | 3,04                                     | 91,90 | 99,24 | 90,26 |
| Adulto sem osteoporose (5 meses de idade) | 4,69                                     | 52,03 | 81,80 | 78,98 |
| Adulto com osteoporose (5 meses de idade) | 6,34                                     | 80,19 | 85,94 | 85,83 |

### **Viabilidade celular pelo azul de Tripán**

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação osteogênico, as CTM de todos os grupos apresentavam 100% de viabilidade.

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

Em comparação às CTM-TA das ratas jovens, as células das ratas adultas sem osteoporose apresentaram menor conversão do MTT em formazan nos três períodos avaliados. As CTM-TA das ratas OVX e com osteoporose sem tratamento com T3 apresentaram menor conversão do MTT em comparação às CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose aos sete e 14 dias. O tratamento hormonal com T3 não aumentou a conversão do MTT em formazan em nenhuma das doses e dos períodos estudados. Ao contrário, as doses de 0,01 e 1nM de T3 reduziram a conversão do MTT pelas CTM-TA das ratas OVX e com osteoporose aos 14 e 21 dias e a dose de 1000nM reduziu a conversão aos 21 dias quando comparadas as CTM-TA das ratas OVX e com osteoporose sem tratamento (Figs. 2A,2B,2C; Anexo 70).

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

Assim como no resultado do MTT, o efeito da idade sobre a atividade da fosfatase alcalina também foi observado em todos os períodos estudados, uma vez que as CTM-TA das ratas adultas sem osteoporose apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao das CTM-TA de ratas jovens aos sete, 14 e 21 dias. A osteoporose diminuiu a atividade da fosfatase alcalina somente aos sete dias. O tratamento com T3 não aumentou a atividade da fosfatase alcalina das CTM-TA de ratas adultas com osteoporose. Ao contrário, o efeito foi negativo, ou seja, caracterizado pela redução da atividade da fosfatase alcalina na dose de 1nM aos 21 dias (Fig. 3A,3B,3C; Anexo 71).

### **Porcentagem de células/campo**

As CTM-TA das ratas adultas sem osteoporose apresentaram celularidade significativamente menor em comparação ao das CTM-TA das ratas jovens aos 21 dias, reafirmando o efeito da idade. Ratas OVX e com osteoporose também apresentaram redução da porcentagem de CTM-TA. Ao contrário, do que se esperava, mais uma vez o tratamento com T3 não surtiu efeito positivo. A porcentagem de CTM-TA de ratas adultas com osteoporose reduziu significativamente nas doses de 0,01 e 1000nM aos 21 dias (Fig. 4; Anexo 72).

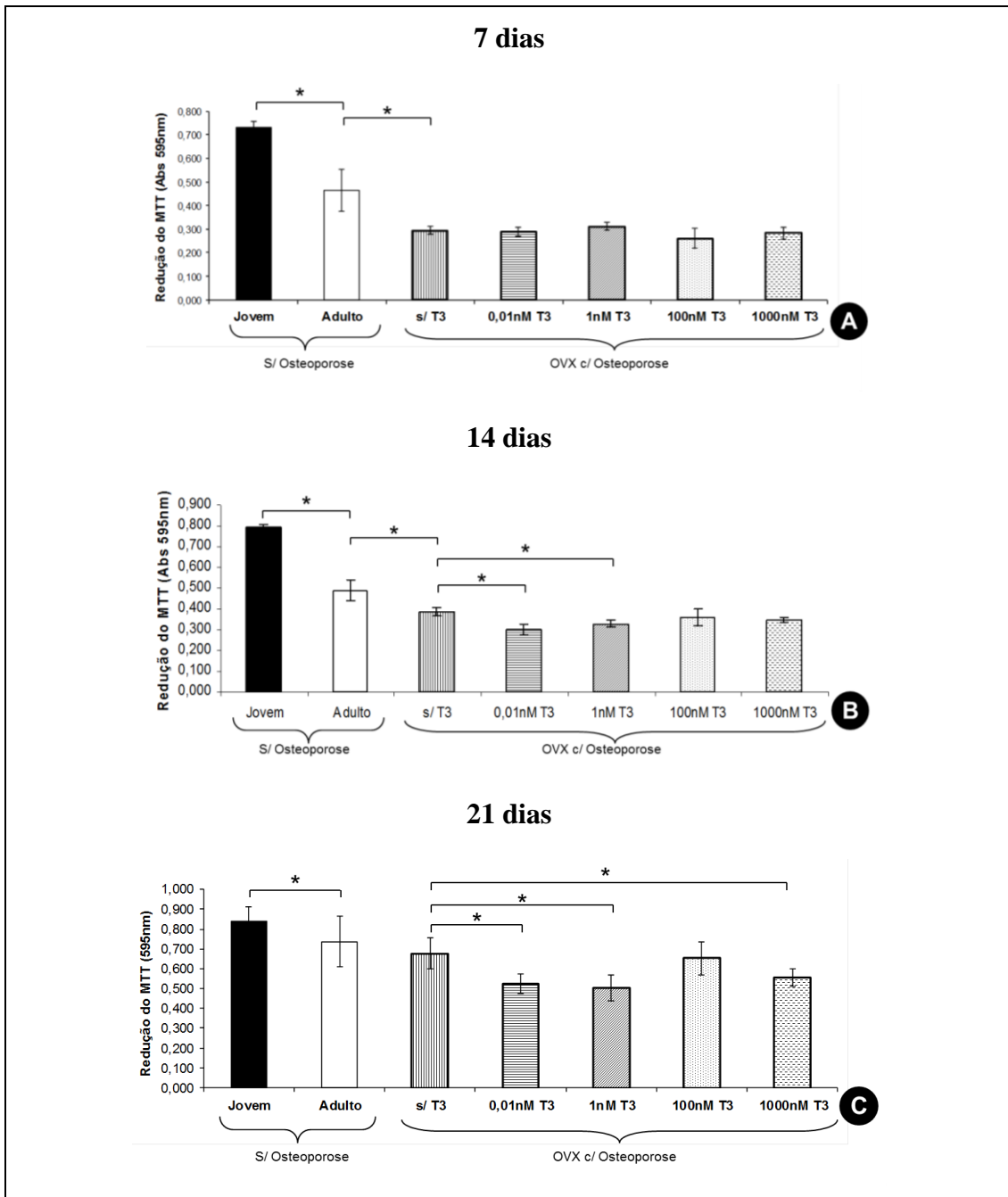


Figura 2. Conversão do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 70).



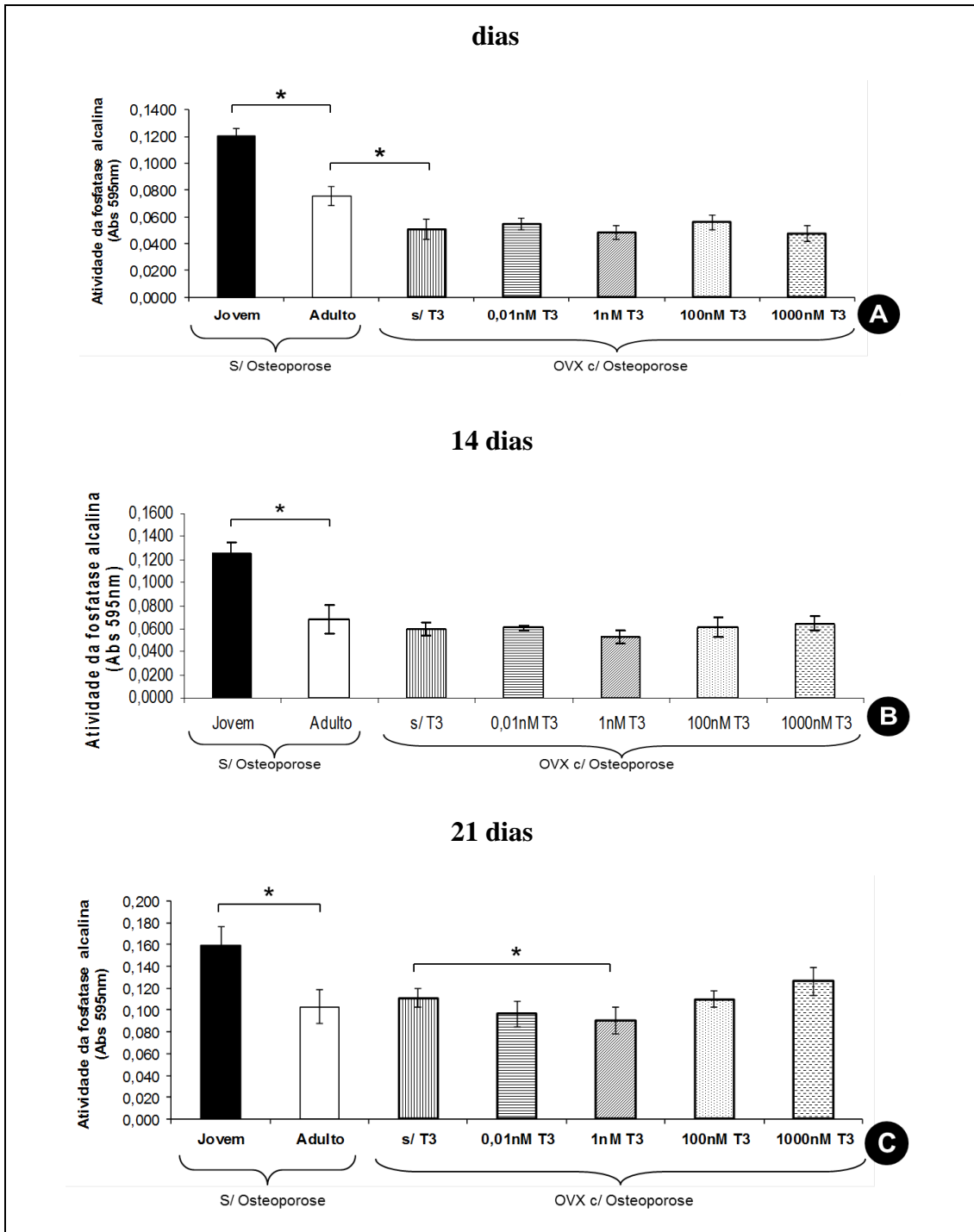


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 71).

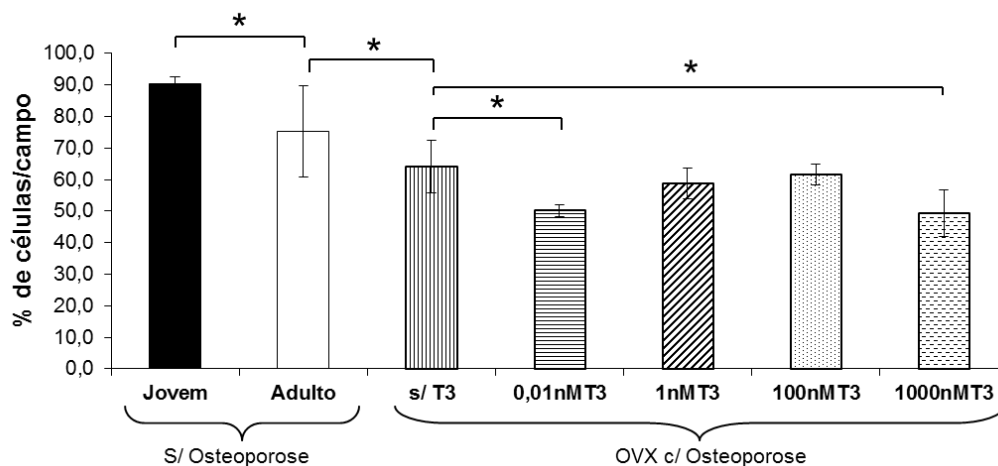


Figura 4. Porcentagem de células/campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 72).

#### Porcentagem de nódulos de mineralização

O efeito da idade mais uma vez foi evidenciado sob a síntese de nódulos de mineralização, já que a cultura de CTM-TA de ratas adultas apresentou número de nódulos de mineralização significativamente menor nos três períodos avaliados em comparação às culturas de células de ratas jovens. CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose também apresentaram redução significativa do número de nódulos de

mineralização em comparação às culturas de CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose aos sete e 14 dias. No entanto, o tratamento com T3 não alterou esse resultado, já que o número de nódulos de mineralização nos grupos tratados, independentemente da dose de T3, foi semelhante ao das CTM-TA de ratas com osteoporose sem tratamento (Fig. 5A, 5B, 5C; Anexo 73).

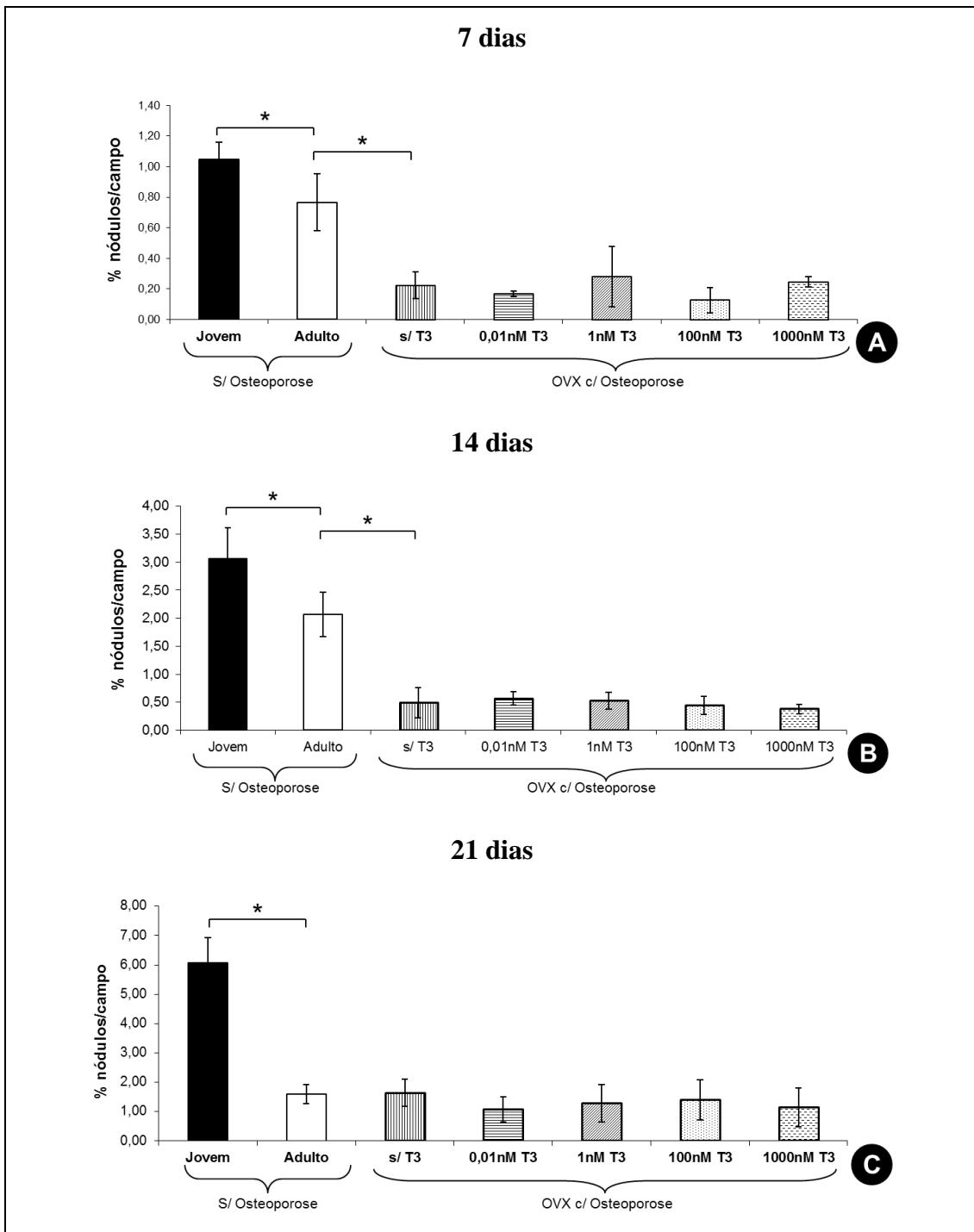


Figura 5. Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 73).

### **Expressão de colágeno I, osteocalcina, osteopontina e BMP-2**

A expressão dos transcritos gênicos para colágeno I, osteocalcina, osteopontina e BMP-2 em cultura de CTM-TA dos sete grupos foram comparados entre si e com a expressão em osteoblastos (controle positivo da diferenciação osteogênica).

A expressão de colágeno I, aos sete dias de diferenciação, foi superior a do osteoblasto em todos os grupos estudados (Fig. 6A, Anexo 74). Entretanto, aos 14 e 21 dias de diferenciação, essa expressão foi superior a do osteoblasto na maioria dos grupos estudados, com exceção do grupo de CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose aos 14 e 21 dias e dos grupos de CTM-TA de ratas adultas com osteoporose tratadas com 100 e 1000nM de T3 aos 21 dias (Fig. 6B,C; Anexo 74).

O efeito da idade não foi evidenciado sob a expressão de colágeno I, já que a cultura de CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose apresentou expressão semelhante à cultura de células de ratas jovens nos três períodos de diferenciação. Mas CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose apresentou expressão de colágeno I significativamente menor aos sete e 14 dias em comparação às culturas de CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose (Fig. 6A,B; Anexo 74). O tratamento com T3 das CTM-TA de ratas adultas com osteoporose não surtiu efeito positivo sobre a expressão de colágeno I. Ao contrário, as doses de 0,01 e 1000nM de T3 reduziram significativamente, aos 14 dias, a expressão de colágeno I quando comparado as CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose sem tratamento (Fig. 6A,B,C; Anexo 74).

A expressão de osteocalcina, nos três períodos avaliados, foi inferior a do osteoblasto em todos os grupos (Fig. 7A,B,C; Anexo 75). Além disso, não houve efeito da idade sob a expressão de

osteocalcina. Ratas OVX e com osteoporose também não apresentaram alteração da expressão de osteocalcina quando comparadas as ratas adultas sem osteoporose. No entanto, aos sete dias de diferenciação, o tratamento com 0,01nM de T3 elevou significativamente a expressão de osteocalcina em comparação as CTM-TA de ratas com osteoporose sem tratamento (Fig. 7A; Anexo 75).

Ao contrário da expressão de osteocalcina, o efeito da idade sob a expressão de osteopontina foi marcante, já que a cultura de CTM-TA de ratas adultas apresentou expressão significativamente menor em comparação às culturas de células de ratas jovens em todos os períodos estudados (Fig. 8A,B,C; Anexo 76). Entretanto, CTM-TA de ratas OVX com osteoporose não apresentaram alteração significativa da expressão de osteopontina nos três períodos de diferenciação. O tratamento com T3 também não surtiu efeito positivo em nenhum dos períodos estudados (Fig. 8A,B,C; Anexo 76).

A expressão de BMP-2, aos sete dias de diferenciação, foi superior a do osteoblasto somente no grupo de CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose (Fig. 9A, Anexo 77). Aos 14 dias de diferenciação, essa expressão foi superior a do osteoblasto nas CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose e nas CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose tratadas com 100 e 1000nM de T3 (Fig. 9B,C; Anexo 77). Aos 21 dias de diferenciação, a expressão de BMP-2 foi superior a do osteoblasto nas CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose e de ratas OVX e com osteoporose (Fig. 9B,C; Anexo 77).

O efeito da idade também foi observado sob a expressão de BMP-2. No entanto, ao contrário dos parâmetros anteriormente descritos, a expressão de BMP-2 foi superior nas CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose nos três períodos estudados

quando comparada a de ratas jovens (Fig. 9B,C; Anexo 77). CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose apresentaram redução significativa da expressão de BMP-2 aos sete e 14 dias, em comparação às CTM-TA de ratas adultas sem osteoporose (Fig. 9A,B;

Anexo 77). O tratamento com T3 das CTM-TA de ratas adultas OVX e com osteoporose não surtiu nenhum efeito significativo sob a expressão de BMP-2 (Fig. 9A,B,C; Anexo 77).

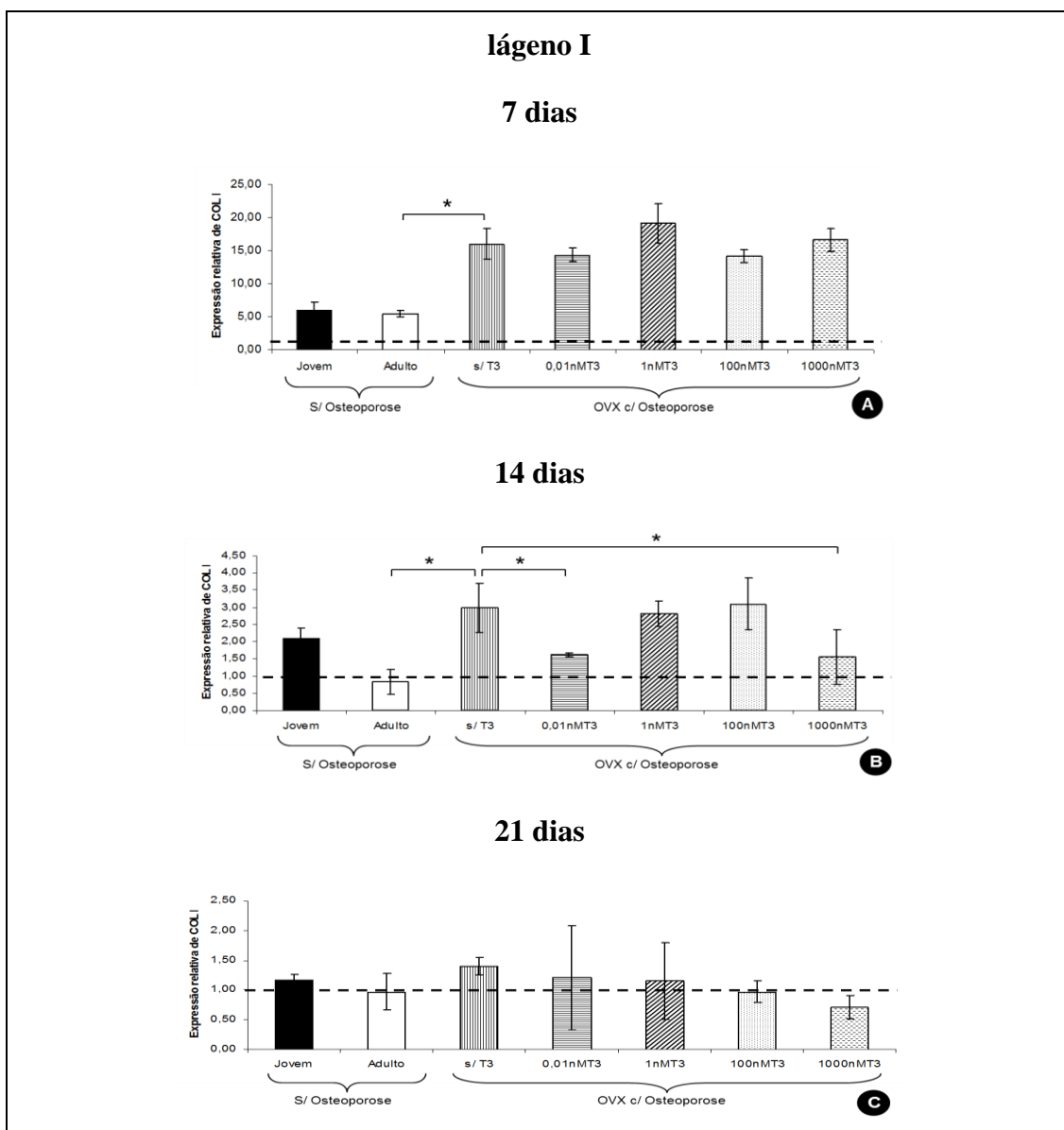


Figura 6. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 74).

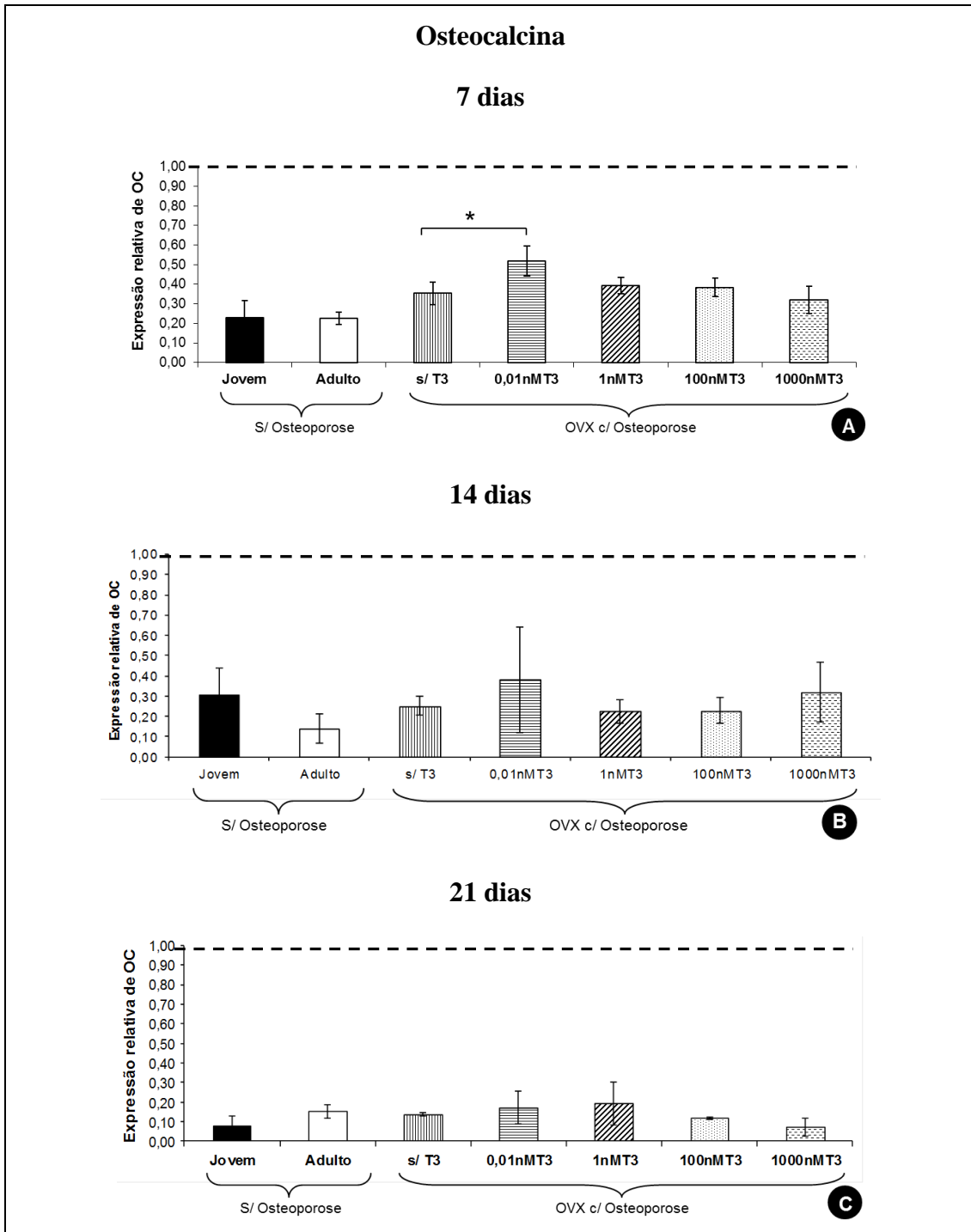


Figura 7. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 75).

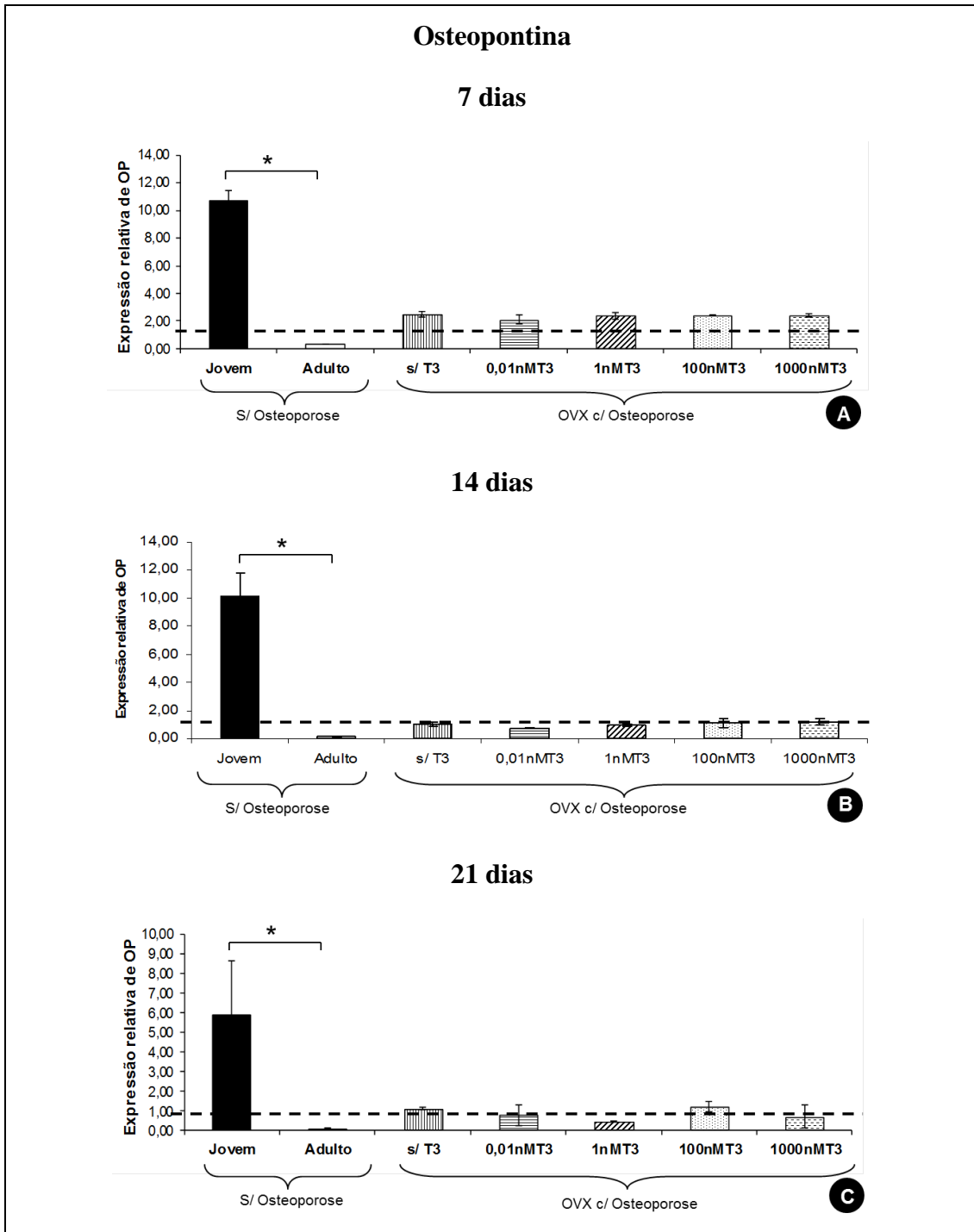


Figura 8. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 76).

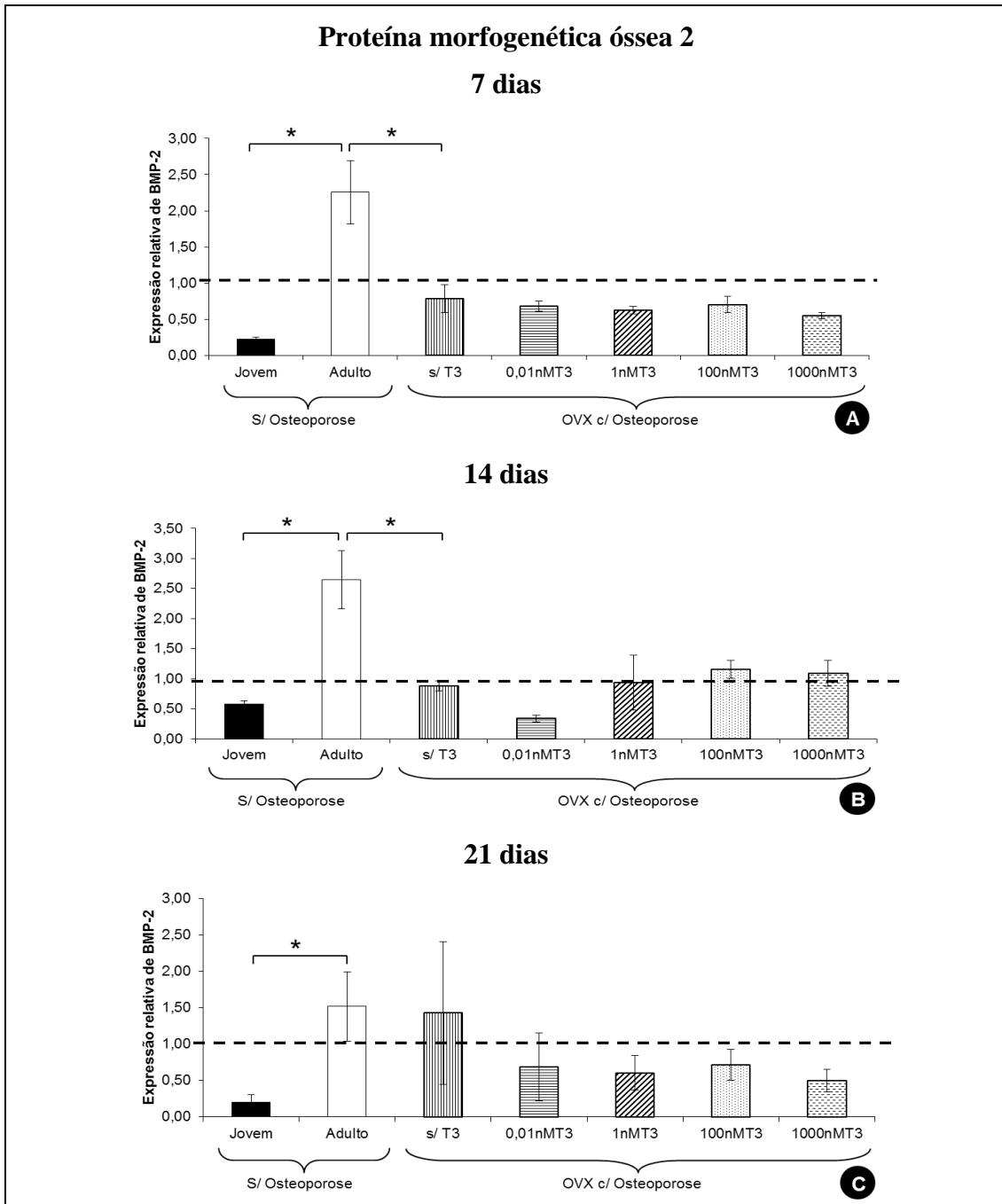


Figura 9. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de CTM do tecido adiposo de ratas jovens e adultas sem osteoporose e de ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 77).



## DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das células demonstrou que, independente do grupo, as células apresentaram características compatíveis com a de células tronco, ou seja, dentre outras moléculas expressaram CD54, CD73 e CD90 e quase não expressaram CD45. Essa caracterização é importante, pois a fração estromal vascular extraída do tecido adiposo contém CTM-TA, células endoteliais, pericitos, fibroblastos e células hematopoiéticas (Zuk et al., 2002). O “*Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy*” propôs que as CTM expressam CD73 e CD90, e não expressam CD45 (Schäffler e Büchler, 2007). As células hematopoiéticas expressam, dentre outras moléculas, CD45 (Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006) que também pode ser expressa em fibroblastos (Ishii et al., 2005b). CD54 (ICAM-1) não é exclusivo de CTM e pode ser expresso em baixas concentrações em leucócitos e células endoteliais (Roebuck e Finnegan, 1999). Apesar disso, leucócitos e outras células hematopoiéticas não são aderentes em superfícies plásticas, ao contrário das CTM (Payushina et al., 2006). Adicionalmente, no tecido adiposo somente as CTM apresentam capacidade de diferenciação osteogênica (Zuk et al., 2001; Zhu et al., 2008).

Semelhante ao observado nas CTM-MO, o efeito da idade também reduziu a diferenciação osteogênica das CTM-TA, caracterizada por redução da atividade da fosfatase alcalina, da celularidade, da formação dos nódulos de mineralização e da expressão de osteopontina e sialoproteína em pelo menos um dos períodos estudados. Com relação às CTM-MO, a literatura é quase unânime em afirmar que a idade reduz a diferenciação osteogênica dessas células (Mueller e Glowacki, 2001; Kretlow et al., 2008; Roobrouck et al., 2008; Zhang et al., 2008; Zhou et al., 2008; Hell et al., 2012).

Mas, com relação às CTM-TA, há controvérsia no que concerne ao efeito da idade sob a diferenciação osteogênica dessas células. Sabe-se que com a idade ocorre redução da diferenciação osteogênica de CTM-TA do subcutâneo de seres humanos (Zhu et al., 2009) enquanto, em camundongos, foi demonstrado que o potencial osteogênico de CTM-TA visceral não diminui com a idade (Shi et al., 2005). Outros fatores além da idade, como a espécie e o local de onde é removido o tecido adiposo podem influenciar no potencial de diferenciação das CTM-TA. Já foi demonstrado que, em coelhos, as CTM-TA do tecido adiposo da cavidade abdominal apresentam maior potencial de diferenciação osteogênica do que as CTM-TA do subcutâneo (Peptan et al., 2006). Mas, o contrário se observa em humanos, onde as CTM-TA do subcutâneo é que apresentam maior potencial de diferenciação (Toyoda et al., 2009). Além disso, também já foi comprovado que pode haver diferença no potencial osteogênico entre espécies. As CTM-TA de cães parecem ter maior capacidade proliferativa, enquanto as CTM-TA de seres humanos apresentam maior potencial osteogênico (Levi et al., 2011).

A expressão de BMP-2 foi o único parâmetro que aumentou com a idade em todos os três períodos estudados. Com base na literatura e no presente estudo fica difícil explicar a razão desse aumento da expressão de BMP-2 decorrente da idade. Mas, apesar disso, a idade resultou em perda do potencial osteogênico. A BMP-2 é um fator importante na diferenciação osteogênica das CTM (Skillington et al., 2002; Knippenberg et al., 2006; Wan et al., 2006). Então, seria esperado que as CTM-TA de ratas adultas saudáveis não apresentassem redução tão significativa nos parâmetros que caracterizam a diferenciação osteogênica como observado, neste caso, em comparação às ratas jovens. Mas, estudos recentes enfatizam que a BMP-2 pode não influenciar a diferenciação osteogênica das CTM-TA

(Chou et al., 2011; Zuk et al., 2011). No entanto, outros estudos demonstraram exatamente o contrário, ou seja, que a BMP-2 pode aumentar a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de nódulos de mineralização (Song et al., 2011) e a expressão de Runx2 e de osteocalcina em culturas de CTM-TA tratadas com BMP-2 (Panetta et al., 2010).

Resultado interessante foi observado nas CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose. Nas CTM-TA dessas ratas houve redução da diferenciação osteogênica caracterizada por redução da atividade da fosfatase alcalina, da formação dos nódulos de mineralização e da expressão de BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados. Resultado semelhante também foi demonstrado no capítulo anterior com relação às CTM-MO dessas mesmas ratas.

Sabe-se que as CTM-TA também apresentam receptores para o estrógeno (Dieudonné et al., 2004) e que a adição de estrógeno em culturas de CTM-TA visceral de ratas jovens saudáveis (Taskiran e Evren, 2011) e de CTM-TA do subcutâneo de seres humanos saudáveis aumenta a diferenciação osteogênica dessas células (Hong et al., 2007). Assim, seria esperado que a deficiência de estrógeno causasse redução da diferenciação osteogênica das CTM-TA. Diante dessa hipótese, os resultados apresentados neste estudo não surpreendem. No entanto, existem relatos de que a diferenciação osteogênica de CTM-TA subcutâneo é mantida em camundongos SAMP 6 com osteoporose (Mirsaidi et al., 2011). É provável que a redução do potencial osteogênico das CTM-TA de camundongos SAMP 6 não tenha sido observada, uma vez que essa linhagem de camundongos apresenta aumento do comprimento do telômero e da expressão e da atividade da telomerase, ao contrário das ratas utilizadas no presente estudo que, com cinco meses de idade já apresentam redução da expressão de telomerase (Hell et al.,

2012). Além disso, ao contrário do estudo de Mirsaidi et al. (2011) onde a osteoporose é decorrente de manipulação genética, no presente estudo, a osteoporose foi induzida pela deficiência dos esteróides sexuais que é a causa mais frequente de osteoporose na mulher e que direta ou indiretamente pode afetar a diferenciação osteogênica das CTM (Hong et al., 2006). Dessa forma, a deficiência dos hormônios sexuais pode não ser o único fator que diminui a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas OVX, já que existem outros fatores como vitamina D (Malladi et al., 2006), ácido retinóico (Skillington et al., 2002; Malladi et al., 2006; Wan et al., 2006), BMP-2 (Skillington et al., 2002; Knippenberg et al., 2006; Wan et al., 2006), IGF-1 (Levi et al., 2010a), TGF- $\beta$  (Levi et al., 2010b) e leptina (Thomas et al., 1999) que influenciam a diferenciação osteogênica e que podem estar reduzidos em indivíduos com deficiência de esteróides sexuais, como a leptina (Shimizu et al., 1997), a BMP-2 e o TGF- $\beta$  (Zhou et al., 2001).

No caso da CTM-TA, a redução da diferenciação osteogênica é provavelmente resultado direto ou indireto da deficiência dos hormônios sexuais. No entanto, no caso das CTM-MO, a redução da diferenciação osteogênica além de ser resultante da deficiência dos esteróides sexuais, poderia também ser resultante da própria osteoporose, uma vez que no microambiente da medula óssea, há forte interação e relação entre os diferentes tipos celulares e a matriz extracelular com o comportamento das CTM-MO. A matriz extracelular parece ser importante no controle da proliferação e da diferenciação das CTM em resposta a fatores apropriados. Além disso, ela modula a atividade de fatores de crescimento, como o TGF- $\beta$  e sequestra fatores tais como o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e as BMP. Proteínas Wnt que pertencem à família de ligantes ligam-se aos glicosaminoglicanos da matriz extracelular e regulam a diferenciação osteogênica das

CTM (Chen et al., 2007). Sendo assim, no caso das CTM-MO não somente a perda do potencial osteogênico pode ser um dos fatores envolvidos na gênese da osteoporose, como a própria osteoporose, que se caracteriza por redução da matriz extracelular, e que pode comprometer a diferenciação osteogênica das CTM-MO.

Diante de algumas informações e constatações, como a presença de receptores para os hormônios tireoidianos nas CTM do tecido adiposo, tanto subcutâneo quanto visceral (Ortega et al., 2009), o aumento da diferenciação osteogênica causada pela adição de T3 em CTM-MO de ratas jovens saudáveis (Boeloni et al., 2009) e de ratas adultas e com osteoporose, como demonstrado no capítulo anterior, outro objetivo foi verificar se a redução da diferenciação osteogênica apresentada pelas CTM-TA aumentaria também diante da adição de T3. Mas, surpreendentemente e contrariando todas as assertivas anteriores, o tratamento com T3 não aumentou a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose.

Poderia se pensar que a presença de maior quantidade de receptores ( $TR\alpha$ ) para hormônios tireoidianos no tecido adiposo subcutâneo em comparação ao tecido adiposo visceral de pacientes obesos (Ortega et al., 2009) poderia explicar o porquê de não ter ocorrido aumento da diferenciação osteogênica, uma vez que a fonte de CTM-TA deste estudo foi o tecido adiposo visceral. Mas, a diferença no número de receptores não parece ter sido a razão desse achado, uma vez que o tratamento hormonal teve efeito, porém negativo, reduzindo vários dos parâmetros que caracterizam a diferenciação osteogênica. Uma provável explicação pode ser que, no caso do tecido ósseo, a importância dos hormônios tireoidianos *in vivo* recai sobre a diferenciação e a atividade dos osteoblastos para a síntese da matriz óssea, bem como seu envolvimento em todo o metabolismo

ósseo. No entanto, no caso do tecido adiposo, os hormônios tireoidianos regulam, *in vivo*, a expressão do gene da adiponectina que por sua vez está envolvida no metabolismo de lipídios e carboidratos (Seifi et al., 2011). Outra razão provável seria que, no tecido adiposo, os hormônios tireoidianos estejam mais envolvidos com a adipogênese, já que foi comprovado que a T4 aumenta a síntese de IGF em culturas de CTM-TA de suínos, favorecendo a adipogênese (Chen et al., 1996). Assim, pode ser que, pela distinta função que T3 e T4 tenham no osso e no tecido adiposo, esses hormônios também tenham efeitos distintos sob a diferenciação osteogênica das CTM-TA quando comparada à CTM-MO. Porém, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese e verificar as razões pelas quais T3 tem efeitos distintos sobre a diferenciação osteogênica das CTM do tecido adiposo e da medula óssea de ratas OVX e com osteoporose.

## CONCLUSÕES

- 1) O aumento da idade reduziu significativamente a diferenciação osteogênica das CTM-TA de ratas, caracterizada pela redução da atividade da fosfatase alcalina, da formação dos nódulos de mineralização e da expressão de osteopontina em pelo menos um dos períodos estudados;
- 2) O aumento da idade aumenta significativamente a expressão de BMP-2 pelas CTM-TA aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação;
- 3) Ratas OVX e com osteoporose apresentam redução da diferenciação osteogênica das CTM-TA caracterizada por redução da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de nódulos de mineralização e da expressão de BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados;

4) O tratamento com T3 não melhora o potencial de diferenciação reduzido das CTM-TA de ratas OVX e com osteoporose. Ao contrário, o tratamento com T3 apresenta

efeitos negativos sobre alguns dos fatores envolvidos na diferenciação osteogênica, sem, no entanto, reduzir a formação de nódulos de mineralização.

## Capítulo 5

### **Estudo comparativo do potencial osteogênico de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens, adultas e ovariectomizadas com osteoporose**

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi comparar o potencial osteogênico das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) e do tecido adiposo (CTM-TA) dentro dos grupos de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose. Foram colhidas CTM da medula óssea e do tecido adiposo da cavidade abdominal de ratas Wistar jovens saudáveis (n=6), adultas saudáveis (n=6) e adultas OVX com osteoporose (n=6). As ratas jovens e adultas tinham um e cinco meses de idade, respectivamente. Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina, a conversão do substrato dimetiltiliazol (MTT) em cristais de formazan e a expressão de colágeno I, de osteocalcina, de sialoproteína óssea, de osteopontina e de BMP-2 aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação. A expressão de caspase 3 e as porcentagens de células e de nódulos de mineralização foram avaliados aos 21 dias de diferenciação. Os dados foram submetidos à análise de variância com comparação das médias pelo teste t de *Student*. As células, independente do grupo, apresentaram características fenotípicas compatíveis com a de células tronco. A diferença no potencial osteogênico entre as CTM-MO e as CTM-TA variou de acordo com a idade e a higidez do tecido ósseo. No grupo de ratas jovens, as CTM-TA apresentaram maior conversão de MTT, maior porcentagem de nódulos de mineralização e maior expressão de osteopontina, de colágeno I e de BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados. No grupo de ratas adultas saudáveis, as CTM-TA apresentaram maior conversão de MTT, maior atividade da fosfatase alcalina e maior expressão de colágeno I e de BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados. Mas, a porcentagem de nódulos de mineralização não diferiu significativamente entre CTM-TA e CTM-MO nesta faixa etária. Em ratas OVX com osteoporose, as CTM-TA apresentaram maior conversão de MTT, maior atividade da fosfatase alcalina, maior porcentagem de nódulos de mineralização e maior expressão de colágeno I, osteocalcina e de BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados. No entanto, a expressão de sialoproteína e osteocalcina foi significativamente menor nas CTM-TA de ratas jovens, adultas saudáveis e adultas OVX por todo o período experimental. Conclui-se que: as CTM-TA de ratas jovens e de ratas OVX com osteoporose apresentam maior potencial osteogênico que as CTM-MO; que no grupo de ratas adultas, o potencial osteogênico é semelhante entre as CTM-MO e as CTM-TA e que as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose têm potencial osteogênico semelhante ao das CTM-MO de ratas jovens.

Palavras chave: célula tronco mesenquimal, medula óssea, tecido adiposo, diferenciação osteogênica, idade, ovariectomia, osteoporose, rata.

## INTRODUÇÃO

Tanto a medula óssea (Spangrude et al., 1988; Jiang et al., 2002; Gronthos et al., 2003) quanto o tecido adiposo (Zuk et al., 2001; Zhu et al., 2008) são fontes consideráveis de células tronco mesenquimais (CTM) com enorme potencial para serem utilizadas no tratamento de várias doenças, inclusive em defeitos ou reparos ósseos (Oreffo e Triffitt, 1999; Lee et al., 2003; Murphy et al., 2003; Luyten, 2004; Tae et al., 2006; Wang et al., 2006b; Li et al., 2007; Arthur et al., 2009; Rada et al., 2009; Ocarino et al., 2010; Shoji et al., 2010; Levi e Longaker, 2011).

Apesar das CTM do tecido adiposo (CTM-TA) serem semelhantes às CTM da medula óssea (CTM-MO) com relação à morfologia e à expressão de marcadores de superfície (Nakanishi et al., 2011), alguns pesquisadores têm maior preferência pelo tecido adiposo como fonte de CTM em decorrência deste tecido apresentar maior número de células tronco e pelo fato dessas células serem obtidas do produto das lipoaspirações, sem haver necessidade de se realizar um procedimento invasivo, visando exclusivamente à obtenção das CTM (Zuk et al., 2001). Além disso, *in vitro*, as CTM do tecido adiposo (CTM-TA) se proliferam mais rapidamente (Nakanishi et al., 2011), demoram mais tempo para entrar em senescência (Dmitrieva et al., 2012) e apresentam maior habilidade para serem criopreservadas, quando comparadas as CTM da medula óssea (CTM-MO) (Carvalho et al., 2008; Mambelli et al., 2009).

Além dessas vantagens, vários pesquisadores, a partir de resultados *in vitro*, também afirmam que as CTM-TA têm grande potencial osteogênico (Zuk et al., 2001; Cowan et al., 2004; Weinzierl et al., 2006; Qu et al., 2007). No entanto, há estudos que comprovaram que as CTM-MO apresentam maior capacidade de

diferenciação osteogênica quando comparadas às CTM-TA (Zaminy et al., 2008; Shafiee et al., 2011). É provável que essa controvérsia seja decorrente de comparações realizadas entre CTM da medula óssea e do tecido adiposo de indivíduos diferentes, ou seja, com idades distintas, com estado de saúde variável e submetidos a fatores físicos, químicos e ambientais diferentes. Além disso, resultados comparativos devem ser realizados entre CTM de fontes diferentes, mas submetidas *in vitro* ao mesmo protocolo experimental, uma vez que, a capacidade proliferativa e o potencial de diferenciação das CTM variam de acordo com as condições da cultura (Lee et al., 2004).

As CTM-MO e as CTM-TA apresentam algumas semelhanças, principalmente com relação aos fatores que estimulam sua diferenciação para osteoblastos (Egusa et al., 2007; Peng et al., 2008), mas também apresentam diferenças com relação à expressão de alguns fatores (Nakanishi et al., 2011). Fatores parácrinos como fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), interleucina 8 (Hsiao et al., 2011) e interleucina 6 são mais expressos em CTM-TA do que nas CTM-MO (Nakanishi et al., 2011). Em ratos, os genes mais expressos nas CTM-TA estão envolvidos com o ciclo celular e com as atividades proliferativa e inflamatória, enquanto os genes mais expressos nas CTM-MO estão relacionados com organogênese e morfogênese (Nakanishi et al., 2011). Além disso, nem todos os fatores que estimulam a síntese de matriz mineralizada pelas CTM-MO, irão estimular também a síntese de matriz pelas CTM-TA. Exemplo disso foi observado, nos capítulos anteriores, com relação à adição de triiodotironina nas culturas de CTM-TA e CTM-MO de ratas OVX com osteoporose.

O potencial de diferenciação osteogênico das CTM é medido pela capacidade de sintetizarem matriz mineralizada e de

expressarem proteínas, genes e/ou fatores de transcrição como a osteocalcina, osteopontina, BMP, sialoproteína, Sox-9, Runx, osteomodulina dentre outros (Mosna et al, 2010). Mas, deve-se considerar que, durante a diferenciação osteoblástica existam diferenças entre a expressão de fatores osteogênicos pelas CTM-MO e CTM-TA, o que torna essencial que a comparação também seja realizada dentro dos mesmos ensaios experimentais. Exemplo disso é a osteomodulina que é um gene envolvido com a osteogênese e que é mais expresso nas CTM-MO que nas CTM-TA (Nakanishi et al., 2011).

Alterações no comportamento das CTM relacionadas à proliferação e diferenciação, têm sido causadas pelo envelhecimento e por doenças ósseas. Nos capítulos anteriores, a capacidade de diferenciação osteogênica tanto das CTM da medula óssea quanto do tecido adiposo diminui com a idade e também em ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose. Mas, apesar da redução ocorrer tanto nas CTM-MO quanto nas CTM-TA, um dos objetivos deste estudo foi verificar qual dos dois tipos celulares tem maior potencial osteogênico diante dessas variações, e poderia ser mais indicado para terapia celular como fonte autóloga de CTM. Para isso, foi comparado o potencial osteogênico das CTM da medula óssea e do tecido adiposo colhidos do mesmo animal e dentro de diferentes categorias, considerando a idade e a higidez do tecido ósseo das ratas. O segundo objetivo foi comparar as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose, que apresentaram o pior potencial osteogênico dentro do grupo das CTM do tecido adiposo, com as CTM-MO de ratas jovens, que dentro do grupo das CTM da medula óssea apresentou o melhor potencial osteogênico.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos laboratórios de Experimentação Animal, de Cultivo de Células Tronco e Terapia Celular e de Biologia Molecular do Depto. de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG. As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

### *Extração e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo*

A extração das CTM-MO foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Lee et al., 2003; Tropel et al., 2004; Nadri et al., 2007; Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). No fluxo laminar, inicialmente, realizou-se a remoção dos pelos e a antisepsia na pele da região do membro posterior direito. Em seguida, os fêmures e as tíbias direitos das ratas jovens e adultas foram dissecados de tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção da medula óssea da diáfise. No fluxo laminar, a medula óssea foi lavada com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>94</sup>. Após centrifugação por 10 minutos a 1400g, as células foram cultivadas em garrafas T75<sup>95</sup> contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de soro fetal bovino<sup>96</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos.

---

<sup>94</sup> Sigma, USA

<sup>95</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>96</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

A extração das CTM-TA foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Zuk et al., 2001; Baglioni et al., 2009, Gomide et al., 2011). O tecido adiposo visceral foi colhido assepticamente. No fluxo laminar, inicialmente, realizou-se a remoção dos pelos e a antissepsia na pele da região abdominal ventral com posterior laparotomia para colheita do tecido adiposo abdominal. O tecido adiposo foi colhido em DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>97</sup>. Em seguida, o tecido, cortado em pequenos fragmentos, foi transferido para um tubo com colagenase 0,15%<sup>98</sup> diluída em PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M e incubado por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, agitando-o de 15 em 15 minutos. Após a incubação, a colagenase foi inativada pela adição de DMEM com 10% SFB (soro fetal bovino)<sup>99</sup>. Posteriormente, fez-se a centrifugação por 10 minutos a 1400g, obtendo-se três fases: gordura, hemáceas e outras células sanguíneas e precipitado (fase estromal). O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos mais 10% SFB e cultivado em garrafas T75 em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM-TA por citometria de fluxo. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos.

#### ***Extração e cultivo de osteoblastos***

A extração de osteoblastos da calvaria foi realizada conforme protocolo já estabelecido (Valério et al., 2004). A calvaria de ratos

Wistar neonatos com dois dias de idade foi colhida assepticamente em fluxo laminar, para obtenção dos osteoblastos. Inicialmente, realizou-se antissepsia da pele que recobre a cabeça, seguido do corte e colheita dos ossos frontais e parietais. Os fragmentos foram lavados em PBS, recortados em fragmentos pequenos e incubados em tripsina 1% por 15 minutos e, posteriormente, em colagenase 0,25%<sup>100</sup> diluídas em PBS 0,15M por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As células foram lavadas com PBS e, após centrifugação por 10 minutos a 1400g, foram cultivadas em garrafas T75<sup>101</sup> contendo DMEM enriquecido com gentamicina (60µg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100µg/mL) e anfotericina (25µg/L)<sup>102</sup> e 10% de soro fetal bovino<sup>103</sup> em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, as mesmas foram utilizadas para extração do RNA total e posterior análise da expressão de proteínas colagênicas e não colagênicas pela técnica de RT-PCR em tempo real e assim usadas como controle positivo de células diferenciadas.

#### ***Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo visceral***

Após o cultivo em garrafas T75 das CTM-MO e das CTM-TA em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90%, as células de cada grupo experimental foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96

<sup>97</sup> Sigma, USA

<sup>98</sup> *Collagenase from Clostridium histolyticum*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>99</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil

<sup>100</sup> *Collagenase from Clostridium histolyticum*, Type I, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>101</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>102</sup> Sigma, USA

<sup>103</sup> LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil



poços<sup>104</sup> (fundo redondo) com concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço, sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação para cada grupo experimental. Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição de 2µL do anticorpo primário e 20µL de PBS 0,15M/poço. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário<sup>105</sup> com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, adicionaram-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100µL de PBS 0,15M e 100µL de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence Activated Cell Analyser*)<sup>106</sup> empregando o *software Cell Quest*,<sup>107</sup> com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (*Forward scatter*) e SSC (*Side scatter*) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento

de onda de 530nm, que corresponde a fluorescência verde, para análises pelo programa WinMDI por gráficos de *dot plot* e histogramas (Tropel et al., 2004; Ishii et al., 2005a). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 *mouse*), anti-CD54 (clone 1A29 *mouse*), anti-CD73 (clone 5 F/B9 *mouse*) e anti-CD90 (clone Ox-7 *mouse*)<sup>108</sup>.

### ***Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán***

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM-MO e CTM-TA de cada grupo experimental foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de Tripán. Inicialmente, as CTM foram cultivadas em garrafas T75 ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) com DMEM e no momento do teste foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1400g por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul de Tripán. As células de cada grupo inviáveis (em azul) e viáveis (transparentes) foram quantificadas em câmara de Neubauer.

### ***Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo visceral em meio de diferenciação osteogênico***

Após o cultivo, tanto das CTM-MO quanto das CTM-TA, em DMEM e obtenção de confluência das células de 80 a 90%, o meio foi substituído por meio osteogênico que é enriquecido com ácido ascórbico (50 µg/mL), β-glicerofosfato (10 mM)<sup>109</sup> e dexametasona (0,1 µM)<sup>110</sup>, acrescido de 10% de soro fetal bovino, sendo que as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim, as CTM de cada grupo foram cultivadas em uma densidade previamente padronizada ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), em seis repetições, em garrafas

<sup>104</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>105</sup> Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Oregon, USA

<sup>106</sup> FACScan, Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA

<sup>107</sup> The Cell Quest™ Sftware, Becton Dickinson Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

<sup>108</sup> BD Biosciences, San Jose, CA, USA

<sup>109</sup> Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

<sup>110</sup> Aché, Guarulhos, SP, Brasil

T25 e em placas de 6 e 24 poços<sup>111</sup> durante sete, 14 e 21 dias. Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina, a conversão do substrato dimetiltiazol (MTT) em cristais de formazan, a expressão de colágeno I, de osteocalcina, de sialoproteína óssea, de osteopontina e de BMP-2, por RT-PCR em tempo real aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação. A expressão de caspase 3 e as porcentagens de nódulos de mineralização foram determinados aos 21 dias de diferenciação.

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

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 24 poços com meio osteogênico durante sete, 14 e 21 dias. Ao término de cada período, as culturas foram submetidas ao teste de conversão do MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]} em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com soro fetal bovino em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL)<sup>112</sup>. A placa foi incubada por duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-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 de acordo com Valério et al. (2004).

#### ***Avaliação da atividade da fosfatase alcalina***

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de 24 poços com meio osteogênico durante sete,

14 e 21 dias. Ao término de cada período, as culturas foram lavadas com PBS (0,15 molar). Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIT/NBT<sup>113</sup> (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3µL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras ficaram duas horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> e foram posteriormente fotografadas. Em seguida, foi adicionado 210µL de solução detergente SDS 10% para incubação *overnight*. Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm de acordo com Ocarino et al. (2008) e Boeloni et al. (2009).

Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIP/NBT<sup>114</sup> (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3µL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras permaneceram duas horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, adicionou-se 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 de acordo com Ocarino et al., (2008) e Boeloni et al. (2009).

#### ***Determinação da porcentagem de células/campo***

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de seis poços com lamínulas (22×22mm) estéreis e com meio osteogênico durante 21 dias. Ao término desse período, as culturas foram fixadas em álcool 70% e submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (Prophet

<sup>111</sup> TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

<sup>112</sup> Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

<sup>113</sup> Zymed Laboratories, CA, USA

<sup>114</sup> Zymed Laboratories, CA, USA

et al., 1992). Posteriormente foi determinado o número de células/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma grátula com 121 pontos e objetiva de 20× em 40 campos tomados em toda a extensão da lamínula e objetiva de 20×.

#### ***Avaliação da porcentagem de nódulos de mineralização***

Foram cultivadas  $1 \times 10^4$  CTM/cm<sup>2</sup> de cada grupo em seis repetições, em placas de seis poços com lamínulas (22x22mm) estéreis e com meio osteogênico durante 21 dias. Após esse período, as CTM-TA foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas com álcool 70% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (adaptada de Prophet et al., 1992) para avaliação da porcentagem de nódulos/campo. Somente os nódulos de coloração marrom ou negro foram avaliados. Foi determinada a porcentagem de nódulos/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma grátula com 121 pontos em 50 campos em objetiva de 20× de acordo com Ocarino et al. (2010).

#### ***Quantificação relativa dos transcritos gênicos para caspase 3, colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 por RT-PCR em tempo real***

Realizou-se, em todos os grupos, a quantificação relativa da expressão de colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2 nos três períodos estudados e da expressão de caspase 3 aos 21 dias pela técnica de RT-PCR em tempo real. A extração do RNA total das células foi feita em três garrafas T25 por grupo pelo uso do Trizol<sup>115</sup>. O método de extração consistiu de uma etapa inicial de lise e homogeneização da monocamada de células por cinco minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos nucleoprotéicos. O lisado foi transferido

para um microtubo de 1,5mL e foram adicionados 0,2mL de clorofórmio, seguido de 15 segundos de homogeneização, três minutos de incubação à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000g por 15 minutos à 4°C, para separação em três fases, onde a fase incolor superficial continha o RNA. Na terceira etapa, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, com a adição de 0,5mL de álcool isopropílico e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, seguido de centrifugação a 12.000g por 10 minutos a 4°C para precipitação do RNA. O *pellet* foi então lavado com 1 mL de etanol a 75%, homogeneizado e centrifugado a 7.500g por cinco minutos a 4°C. O RNA foi solubilizado em água DEPC<sup>116</sup> livre de RNase e imediatamente armazenado a -80°C. A concentração de RNA foi determinada pela leitura da absorbância a 260/280 nm por espectrofotometria. Foram realizadas as reações de transcrição reversa utilizando-se Kit comercial<sup>117</sup>, sendo que se utilizou 1 µg de RNA total para a síntese de cDNA com um volume final de 20µL. Realizaram-se ainda, as reações de PCR em tempo real utilizando-se 2 µg de cDNA, 5 pM de cada iniciador e 12,5µL do reagente syber Green<sup>118</sup> em um volume final de 25 µL de reação em um tubo<sup>119</sup>, no aparelho SmartCycler System<sup>120</sup>. Os parâmetros utilizados para amplificação foram: 50°C por 120 segundos, 95°C por 150 segundos e 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 30 segundos. Os iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *Rattus norvegicus* (Tab. 1). A expressão gênica foi calculada usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , onde os resultados obtidos para cada grupo foram comparados

<sup>116</sup> Água tratada com dimetil pirocarbonato (DEPC), Invitrogen, USA

<sup>117</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>118</sup> SuperScript™ III Platinum® Two-Step qRT-PCR Kit with SYBR Green, Invitrogen, CA, USA

<sup>119</sup> SmartCycler® Tube-25µL, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA

<sup>120</sup> SmartCycler® System, Cepheid, Sunnyvale, CA, USA

<sup>115</sup> Invitrogen, USA

quantitativamente após a normalização baseada na expressão de gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) *Rattus norvegicus*.

### **Análise estatística**

Realizou-se análise de variância (ANOVA) e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste t de Student utilizando o programa Graphpad Instat 3 .

As alterações na expressão medidas pelo RT-PCR em tempo real foram comparadas pelo teste de t de Student após transformação logarítmica dos dados. Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

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

| <b>Gene</b>         | <b>Iniciadores (sequências de nucleotídeos 5' a 3')</b>                            | <b>Nº acesso</b> |
|---------------------|--|------------------|
| GAPDH               | <i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA<br><i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA  | NM_002046        |
| Colágeno I          | <i>foward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG<br><i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG    | NM_000088        |
| Osteocalcina        | <i>foward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT<br><i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG      | NM_013414.1      |
| Sialoproteína óssea | <i>foward</i> : TGTCTTCTGAACGGGTTTC<br><i>reverse</i> : CTTCCCCATACTCAACCGTG       | NM_012587.2      |
| Osteopontina        | <i>foward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT<br><i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA | AB001382         |
| BMP-2               | <i>foward</i> : TAGTGACTTTTGGCC ACGACG<br><i>reverse</i> : GCTTCCGCTGTTTGTGTTTG    | NM_017178        |
| Caspase 3           | <i>foward</i> : TGGAGGAGGCTGACCGGCAA<br><i>reverse</i> : CTCTGTACCTCGGCAGGCCTGAAT  | NM_012922.2      |

## RESULTADOS

### Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo

As características fenotípicas das células extraídas da medula óssea e do tecido

adiposo de ratas jovens e adultas saudáveis e com osteoporose foram compatíveis com a de células tronco. Houve expressão de CD45 em no máximo 6,34% das células e expressão para CD54, CD73 e CD90 acima de 52,03%, 81,80% e 78,98% das células, respectivamente (Tabela 2; Anexo 104).

Tabela 2. Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80 a 90%.

| Grupos                     | Expressão de moléculas de superfície (%) |       |       |       |
|----------------------------|--|-------|-------|-------|
|                            | CD45                                     | CD54  | CD73  | CD90  |
| CTM-MO Jovem               | 3,06                                     | 95,10 | 93,99 | 86,77 |
| CTM-MO Adulto              | 1,09                                     | 96,94 | 84,27 | 95,93 |
| CTM-MO OVX com osteoporose | 1,01                                     | 97,94 | 92,20 | 95,99 |
| CTM-TA Jovem               | 3,04                                     | 91,90 | 99,24 | 90,26 |
| CTM-TA Adulto              | 4,69                                     | 52,03 | 81,80 | 78,98 |
| CTM-TA OVX com osteoporose | 6,34                                     | 80,19 | 85,94 | 85,83 |

### Viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação osteogênico, as CTM de todos os grupos apresentavam 100% de viabilidade.

### Conversão do MTT em cristais de formazan

A conversão do MTT em cristais de formazan foi significativamente maior nas CTM-TA de ratas jovens, de ratas adultas e também de ratas OVX com osteoporose em pelo menos um dos períodos estudados. Nas ratas jovens, as CTM-TA apresentaram maior conversão do MTT em cristais de formazan nos três períodos avaliados (Fig. 1; Anexo 105). Nas ratas adultas saudáveis, as CTM-TA apresentaram conversão de MTT

significativamente maior aos 14 e 21 dias em comparação as CTM-MO. Aos sete dias, a conversão de MTT pelas CTM-TA e pelas CTM-MO não diferiu significativamente (Fig. 1; Anexo 106). No grupo de ratas OVX com osteoporose, aos sete dias, as CTM-MO apresentaram maior conversão do MTT em comparação as CTM-TA, ao contrário do que foi observado aos 21 dias, quando as CTM-TA apresentaram maior conversão de MTT (Fig. 1; Anexo 107).

Surpreendentemente, a conversão de MTT nas CTM-TA de ratas OVX com osteoporose foi significativamente maior aos 21 dias e semelhante a das CTM-MO de ratas jovens aos sete dias. Aos 14 dias, a conversão de MTT foi significativamente maior nas CTM-MO de ratas jovens (Fig. 2; Anexo 108).

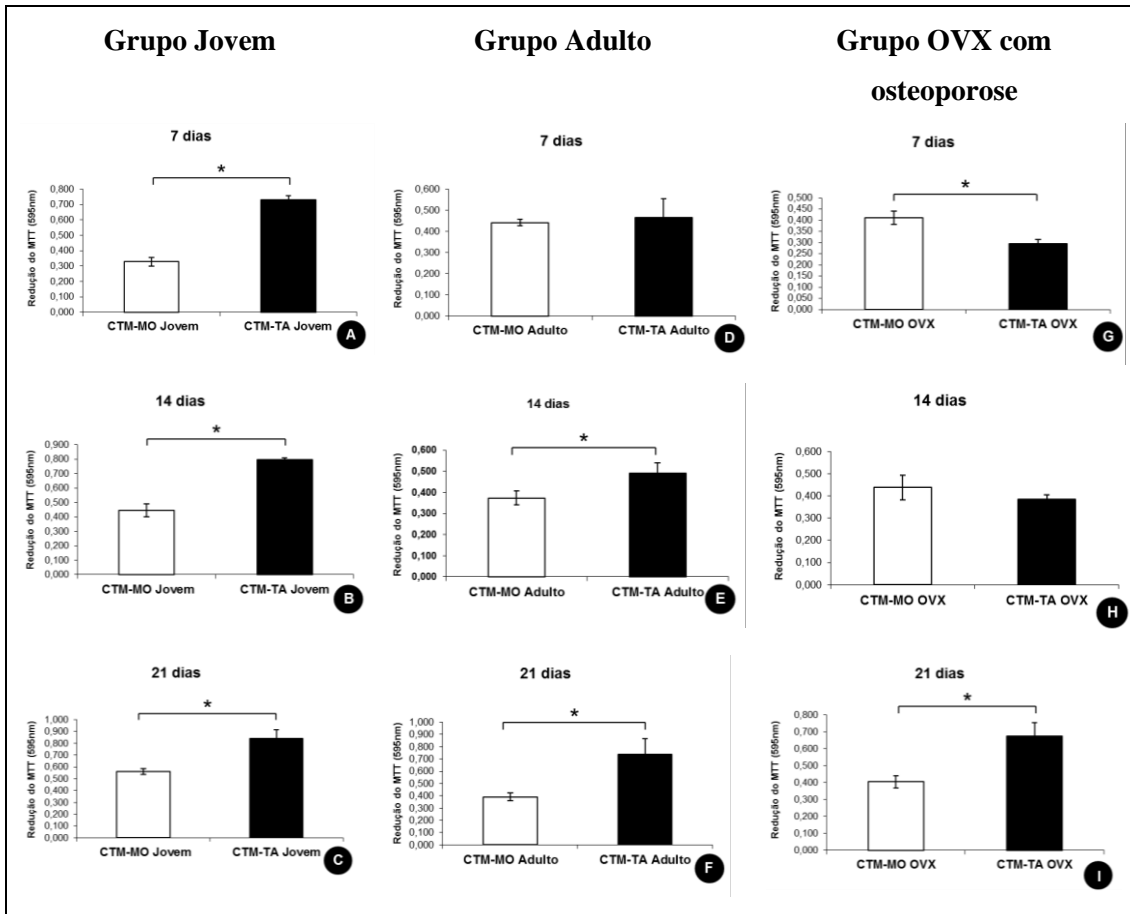


Figura 1. Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexos 105, 106 e 107).

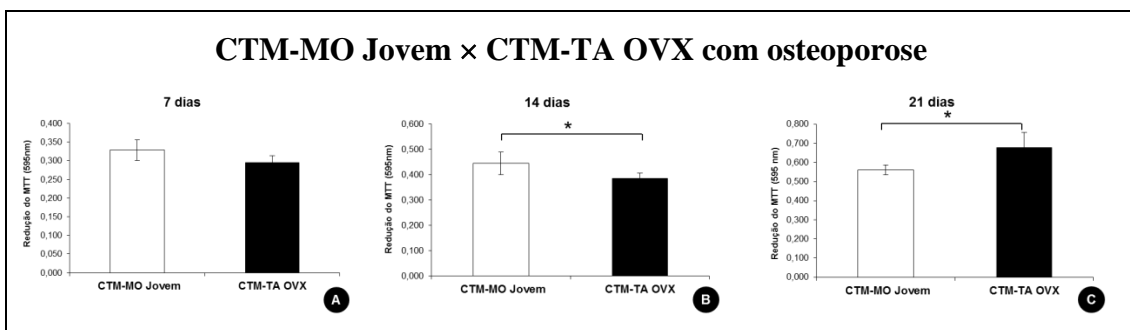


Figura 2. Comparação da conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 108).

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

O comportamento da atividade da fosfatase alcalina foi bem heterogêneo. Nas ratas jovens, as CTM-TA apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor aos sete e 14 dias em comparação às CTM-MO (Fig. 3; Anexo 109). No entanto, no grupo de ratas adultas, as CTM-TA apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente maior aos sete dias, não havendo diferença significativa entre os dois

tipos de CTM aos 14 e 21 dias (Fig. 3; Anexo 110). Nas ratas OVX com osteoporose a atividade da fosfatase alcalina das CTM-TA foi significativamente menor aos sete e 14 dias e significativamente maior aos 21 dias, em comparação às CTM-MO (Fig. 3; Anexo 111).

A atividade da fosfatase alcalina das CTM-TA de ratas OVX com osteoporose foi significativamente menor em comparação a das CTM-MO de ratas jovens nos três períodos avaliados (Fig. 4; Anexo 112).

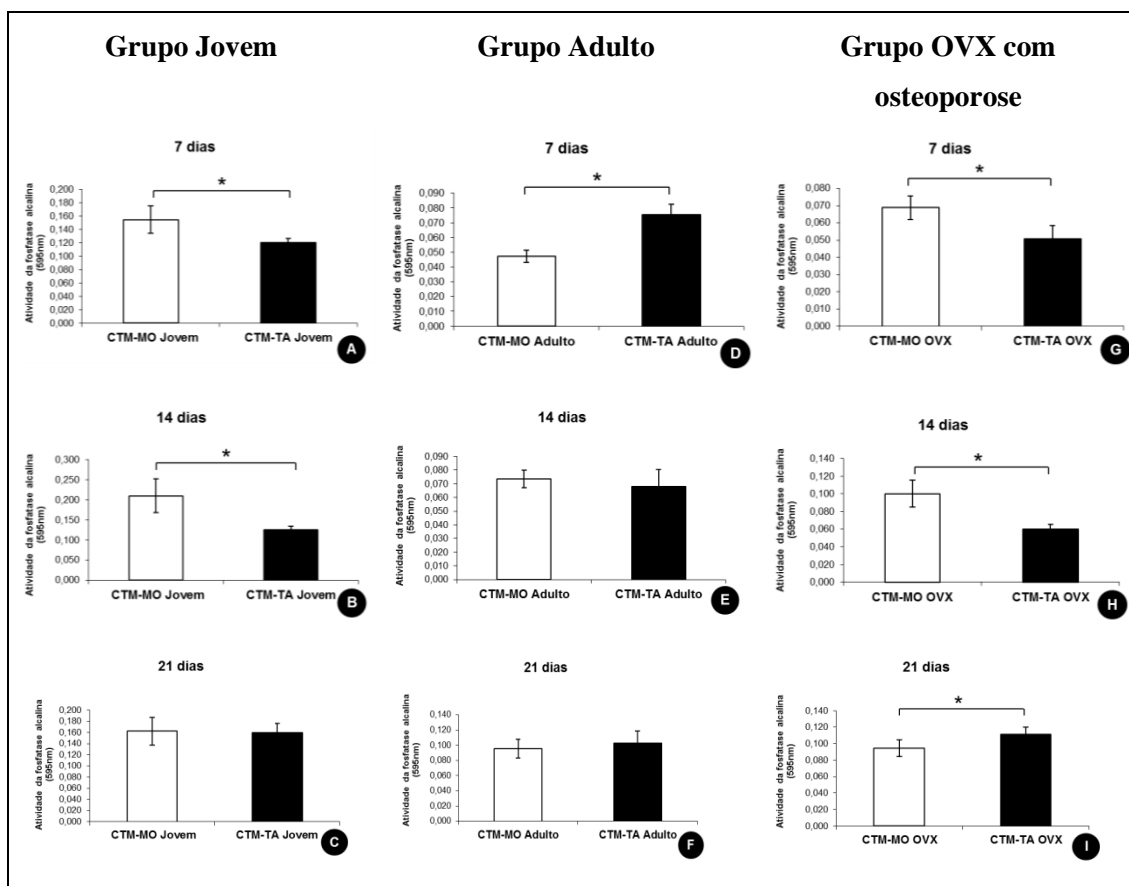


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 (C,F,I) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexos 109, 110 e 111).

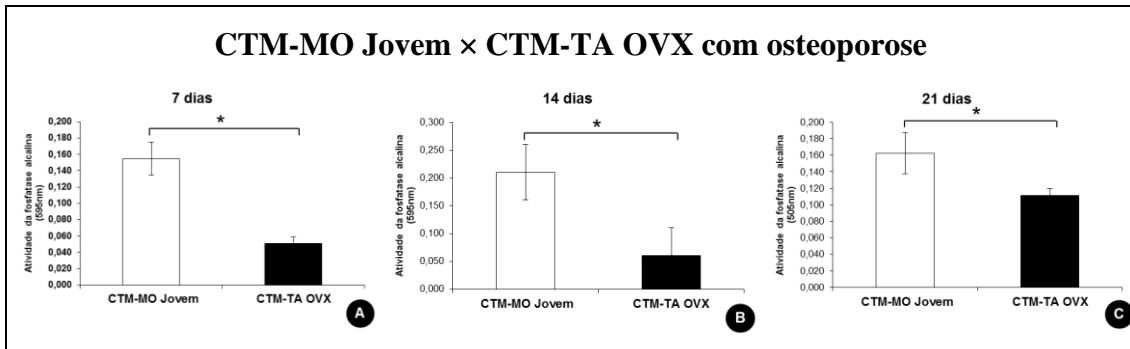


Figura 4. Comparação da atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 112).

#### Porcentagem de células/campo

No grupo de ratas jovens e adultas, as CTM-TA apresentaram maior porcentagem de células/campo aos 21 dias em comparação as CTM-MO. No entanto, no grupo de ratas OVX com osteoporose, não houve diferença significativa da celularidade entre as culturas

de CTM-TA e a CTM-MO (Fig. 5; Anexos 113, 114 e 115).

Surpreendentemente, a porcentagem de células/campo aos 21 dias presente nas culturas de CTM-TA de ratas OVX com osteoporose foi maior que a das CTM-MO de ratas jovens (Fig. 6; Anexo 116).

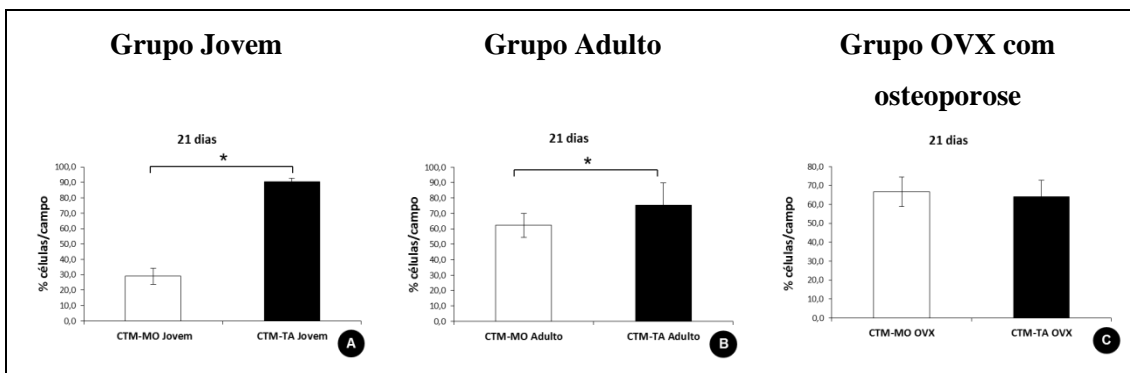


Figura 5. Porcentagem de células/campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexos 113, 114 e 115).



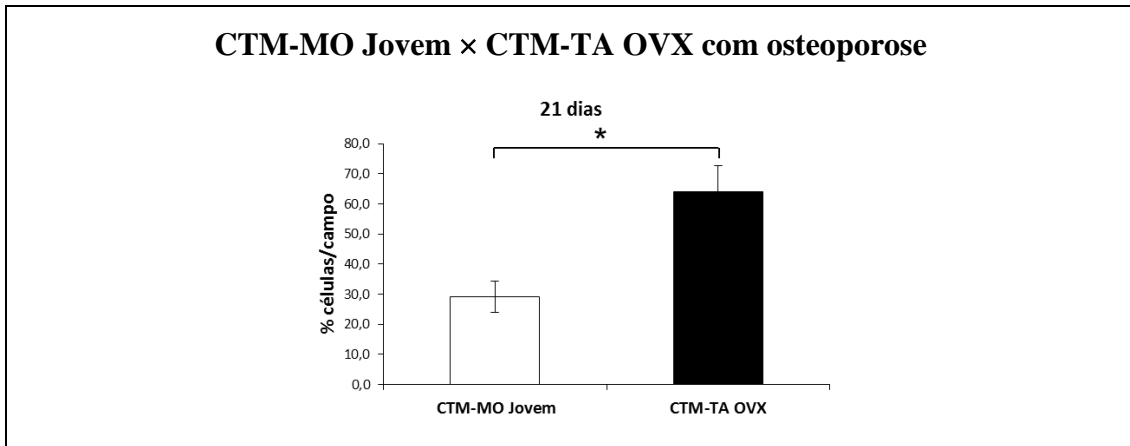


Figura 6. Comparação da porcentagem de células/campo (média  $\pm$  desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexo 116).

#### Porcentagem de nódulos de mineralização

Tanto em ratas jovens quanto em ratas OVX com osteoporose, a porcentagem de nódulos de mineralização, aos 21 dias de diferenciação, foi significativamente maior nas culturas de CTM-TA. No grupo de ratas adultas, não houve diferença significativa entre as culturas de CTM do tecido adiposo

e da medula óssea com relação à porcentagem de nódulos de mineralização (Fig. 7; Anexos 117, 118 e 119).

Surpreendentemente, a porcentagem de nódulos presente nas culturas de CTM-TA de ratas OVX com osteoporose foi estatisticamente semelhante ao das CTM-MO de ratas jovens (Fig. 8; Anexo 120).

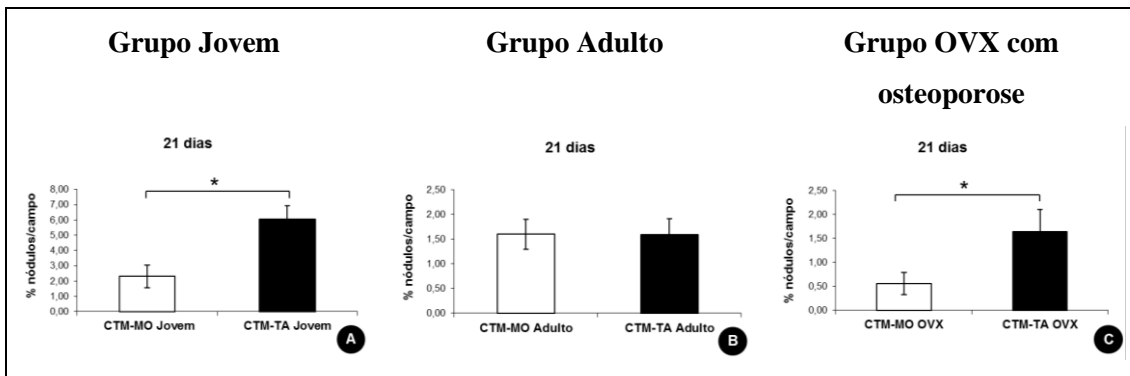


Figura 7. Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ . (Anexos 117, 118 e 119).

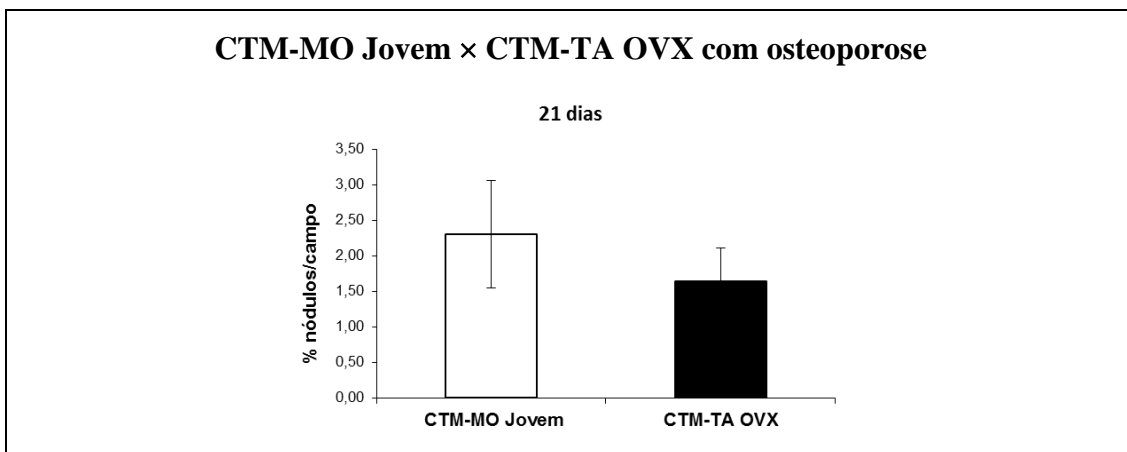


Figura 8. Comparação da porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média  $\pm$  desvio padrão) entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de cultivo. (Anexo 120).

### **Expressão de caspase 3, colágeno I, osteocalcina, sialoproteína óssea, osteopontina e BMP-2**

#### ***Expressão de caspase 3***

No grupo de ratas jovens e adultas, a expressão de caspase 3 não apresentou diferença significativa entre as CTM-TA e as CTM-MO (Fig. 9; Anexos 121 e 122). No entanto, no grupo de ratas OVX com osteoporose, a expressão de caspase 3 nas CTM-TA foi significativamente maior em comparação às CTM-MO (Fig. 9; Anexo 123).

Mais uma vez, as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose foram estatisticamente semelhantes às CTM-MO de ratas jovens quanto à expressão de caspase 3 (Fig. 10; Anexo 124).

#### ***Expressão de osteopontina***

Com relação à osteopontina, no grupo de ratas jovens, tanto as CTM-TA quanto as CTM-MO apresentaram expressão de osteopontina superior a do osteoblasto nos três períodos estudados (Fig. 11; Anexo

125). Entretanto, somente aos 14 dias de diferenciação, as CTM-TA apresentaram expressão de osteopontina significativamente maior em comparação às CTM-MO. Aos sete e 21 dias, não houve diferença entre os dois tipos celulares (Fig. 11; Anexo 125).

No grupo de ratas adultas, a expressão de osteopontina foi superior a do osteoblasto somente nas CTM-MO e nos três períodos estudados (Fig. 11; Anexo 126). Além disso, a expressão de osteopontina nas CTM-MO foi significativamente maior em comparação às CTM-TA em todos os períodos estudados (Fig. 11; Anexo 126).

No grupo de ratas OVX com osteoporose, tanto as CTM-TA quanto as CTM-MO apresentaram expressão de osteopontina superior a do osteoblasto nos três períodos estudados (Fig. 11; Anexo 127). Semelhante ao grupo de ratas adultas, nas ratas OVX com osteoporose, a expressão de osteopontina nas CTM-MO também foi significativamente maior em comparação às CTM-TA em todos os períodos estudados (Fig. 11; Anexo 127).

Quando se compara a expressão de osteopontina entre CTM-TA de ratas OVX com osteoporose e CTM-MO de ratas jovens, observa-se que a expressão foi

significativamente maior nas CTM-MO de ratas jovens nos três períodos avaliados (Fig. 12; Anexo 128).

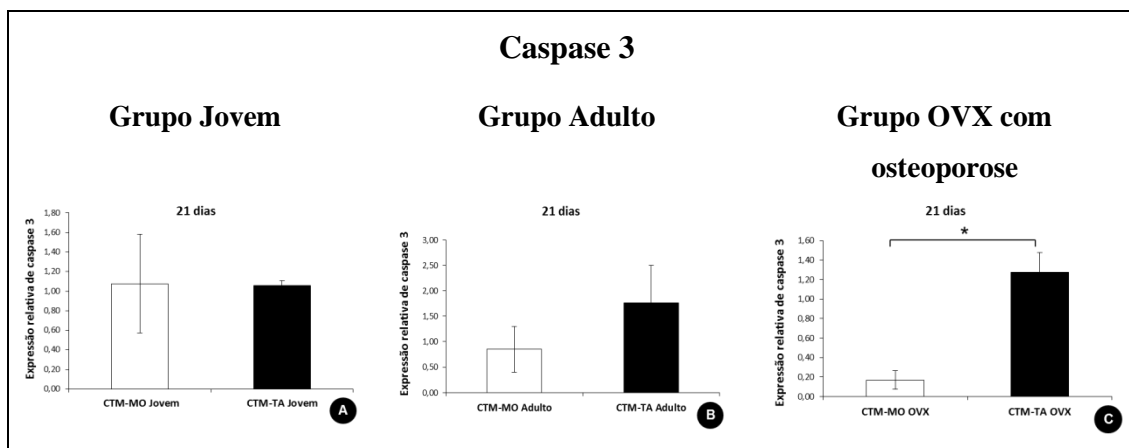


Figura 9. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para caspase 3 pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de diferenciação. \* $p < 0,05$ . (Anexos 121, 122 e 123).

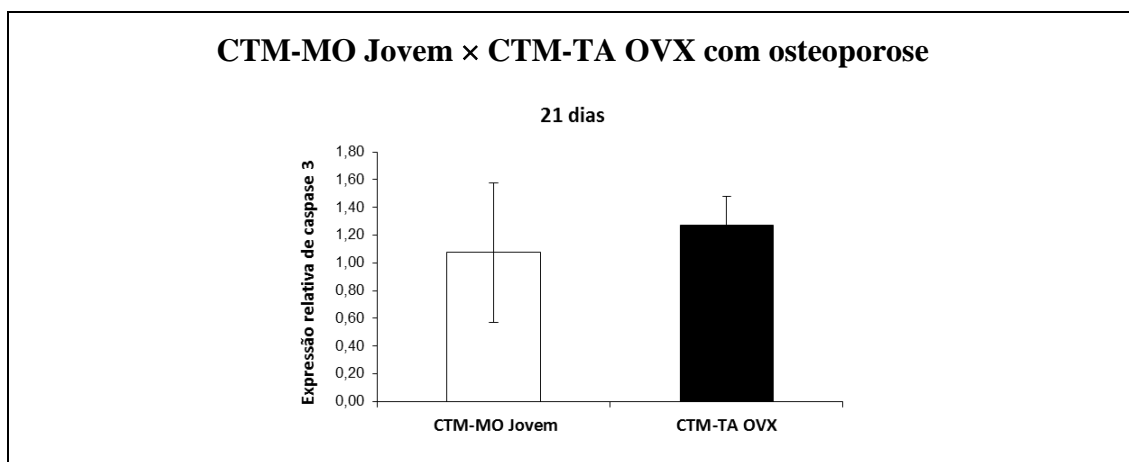


Figura 10. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para caspase 3 pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias de diferenciação. (Anexo 124).

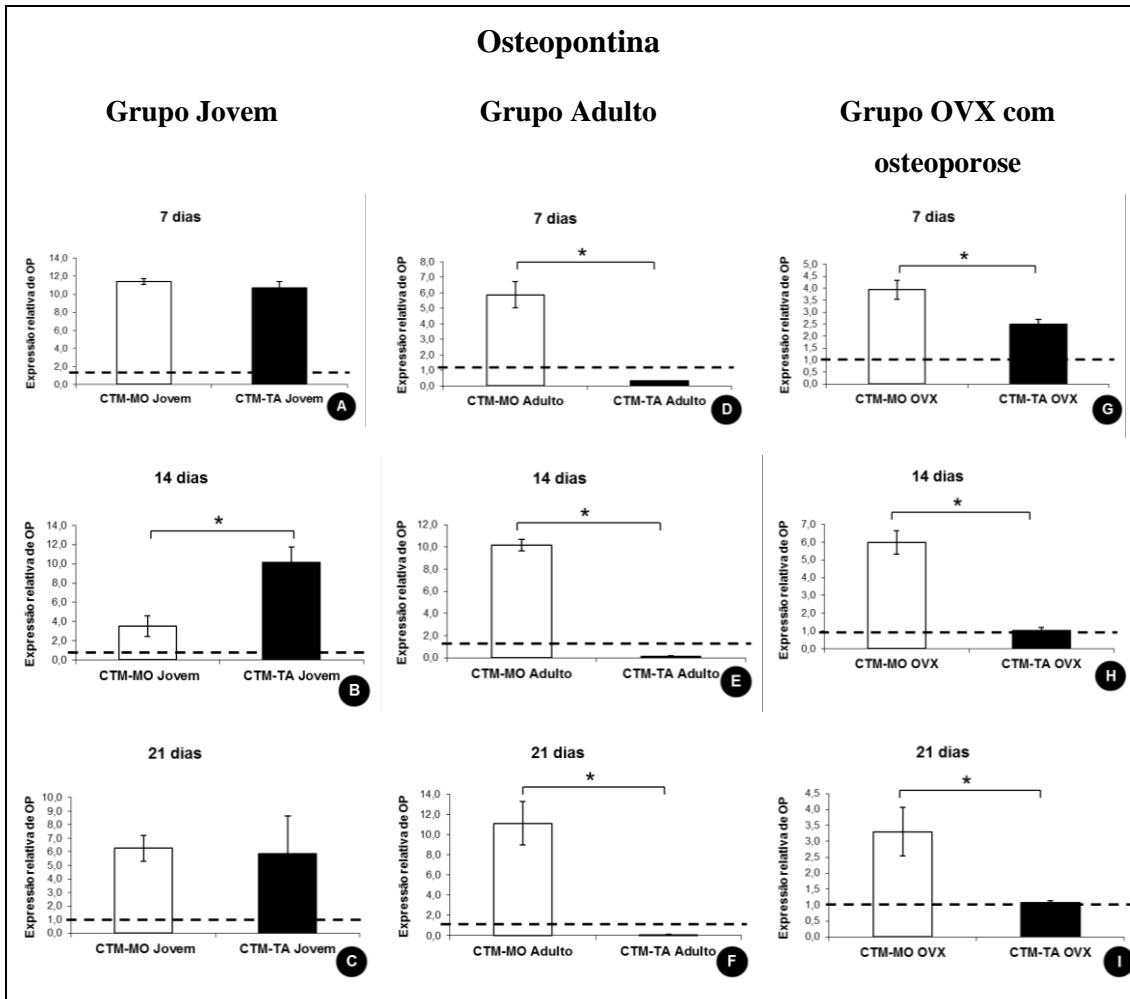


Figura 11. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexos 125, 126 e 127).

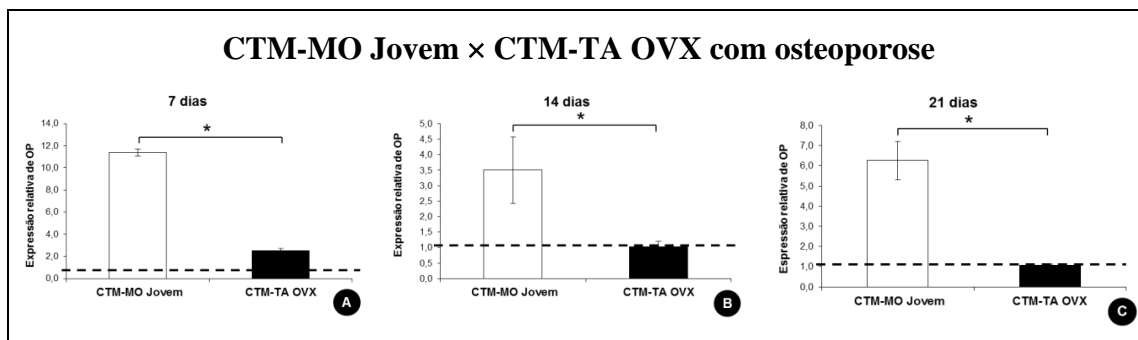


Figura 12. Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteopontina (OP) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 128).

#### *Expressão de sialoproteína*

A expressão de sialoproteína foi semelhante entre os grupos de ratas. Independentemente do grupo, somente as CTM-MO apresentaram expressão de sialoproteína superior a do osteoblasto em pelo menos um dos períodos estudados (Fig. 13; Anexos 129, 130 e 131). Em todos os três grupos, ou seja, de ratas jovens, adultas e de ratas OVX com osteoporose, as CTM-MO apresentaram expressão de sialoproteína significativamente maior nos três períodos, em comparação as CTM-TA (Fig. 13; Anexos 129, 130 e 131).

Na comparação entre CTM-TA de ratas OVX com osteoporose e CTM-MO de ratas jovens, a expressão de sialoproteína, semelhante à de osteopontina, foi significativamente maior nas CTM-MO de ratas jovens nos três períodos avaliados (Fig. 14; Anexo 132).

#### *Expressão de osteocalcina*

Tanto nas CTM-MO quanto nas CTM-TA, a expressão de osteocalcina nos grupos de ratas jovens, adultas ou de ratas OVX com osteoporose foi quase sempre inferior a do osteoblasto. No grupo de ratas jovens, as CTM-MO apresentaram expressão de osteocalcina superior a das CTM-TA somente aos 21 dias. Aos sete e 14 dias, não houve diferenças entre os dois tipos de células. No grupo de ratas adultas, não houve diferença significativa na expressão de osteocalcina entre CTM-MO e CTM-TA. Nas ratas OVX com osteoporose, as CTM-TA apresentaram expressão de osteocalcina significativamente maior que a das CTM-MO aos 14 dias (Fig. 15; Anexos 133, 134 e 135).

Na comparação entre CTM-TA de ratas OVX com osteoporose e CTM-MO de ratas jovens, a expressão de osteocalcina foi semelhante entre os dois grupos de células aos sete e 14 dias. Mas, aos 21 dias a expressão de osteocalcina foi significativamente menor nas CTM-TA de ratas OVX com osteoporose (Fig. 16; Anexo 136).

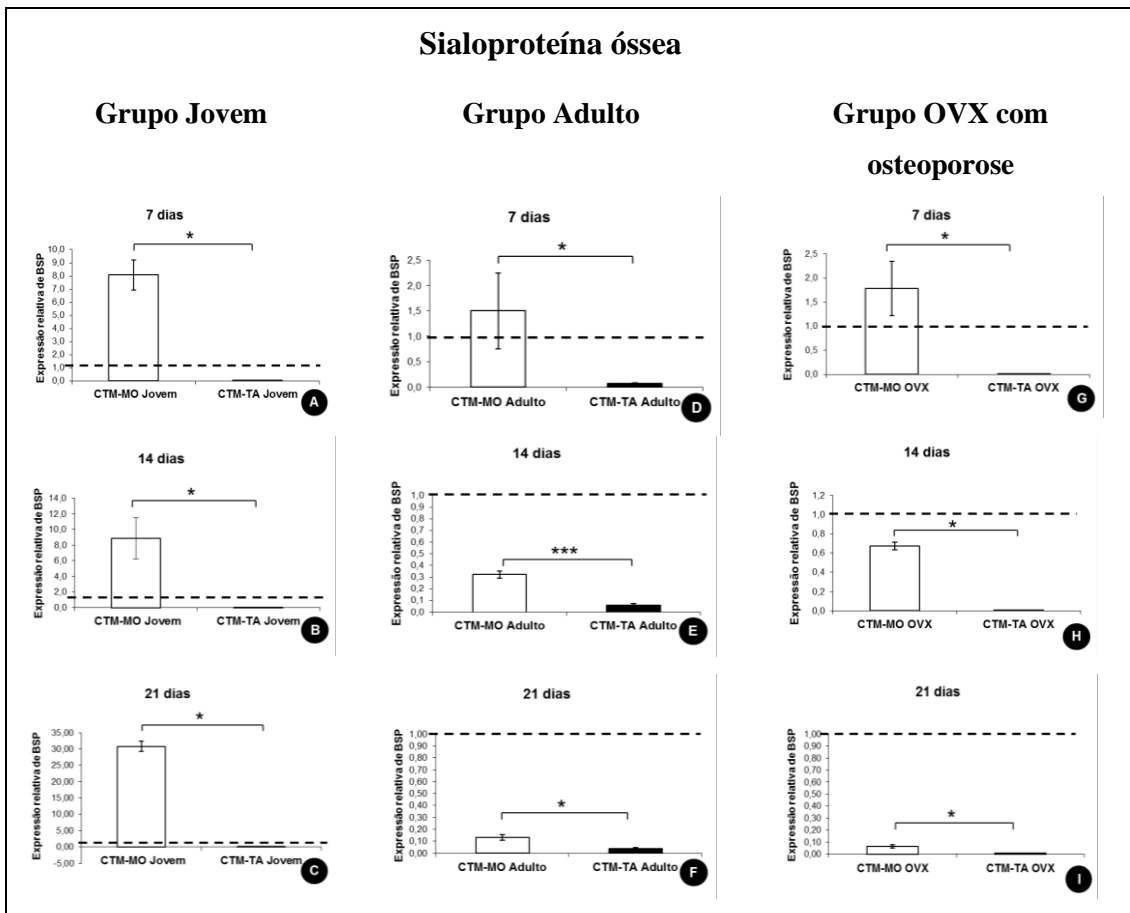


Figura 13. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea (BSP) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexos 129, 130 e 131).

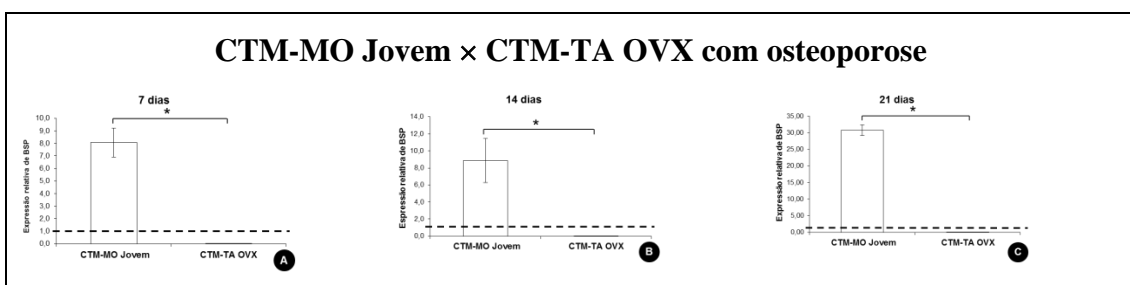


Figura 14. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea (BSP) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 132).

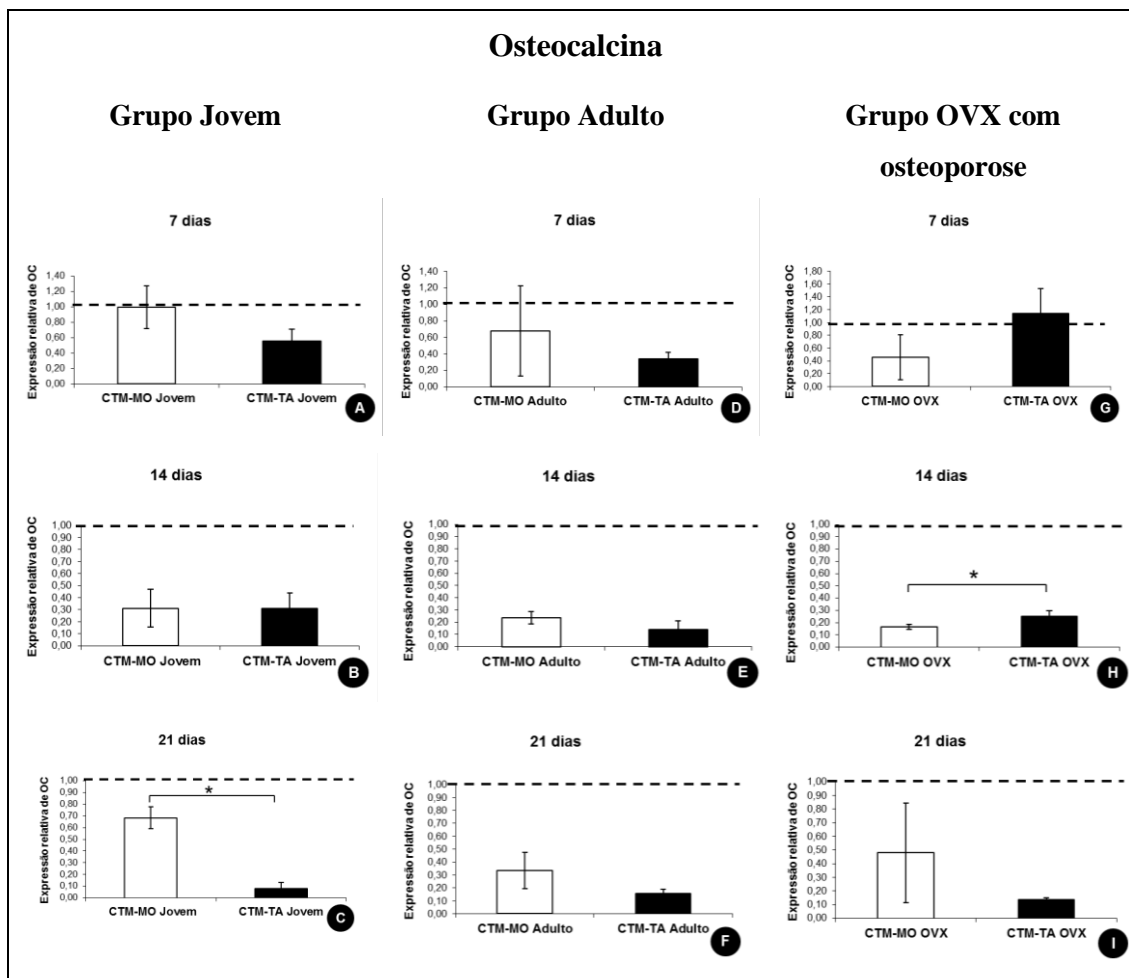


Figura 15. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexos 133, 134 e 135).

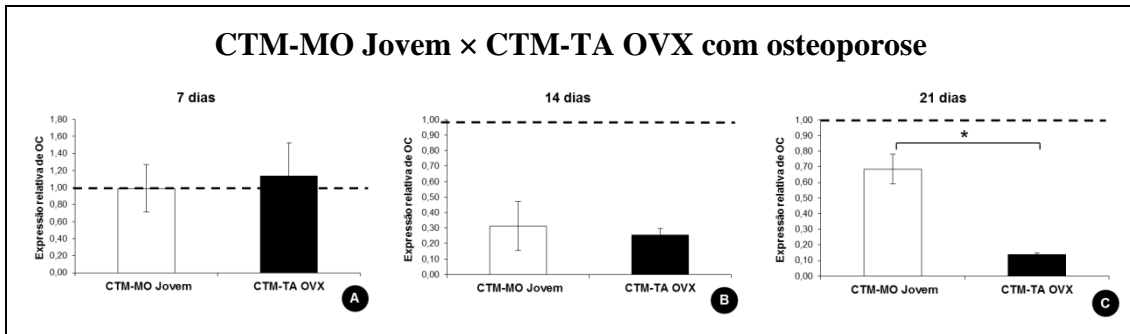


Figura 16. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (OC) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexos 136).

### *Expressão de colágeno I*

A expressão de colágeno I nas CTM-MO e CTM-TA foi igual ou superior a do osteoblasto no grupo de ratas jovens e de ratas adultas nos períodos estudados. No grupo de ratas OVX com osteoporose, somente as CTM-TA apresentaram expressão de colágeno I superior a do osteoblasto. Em todos os três grupos, ou seja, de ratas jovens, adultas e de ratas OVX com osteoporose, a expressão de colágeno I foi significativamente maior nas CTM-TA em pelo menos um dos períodos avaliados (Fig. 17; Anexos 137, 138 e 139).

Na comparação entre CTM-TA de ratas OVX com osteoporose e CTM-MO de ratas jovens, a expressão de colágeno I foi significativamente maior nas CTM-TA de ratas OVX com osteoporose aos sete e 14 dias e semelhante a das CTM-MO de ratas jovens aos 21 dias de diferenciação (Fig. 18; Anexo 140).

### *Expressão de BMP-2*

No grupo de ratas adultas e de ratas OVX com osteoporose, a expressão de BMP-2 nas CTM-TA e nas CTM-MO foi quase sempre semelhante ou superior a do osteoblasto. Ao contrário, no grupo de ratas jovens, nas CTM, independente da fonte, a expressão de BMP-2 foi inferior a do osteoblasto, exceto aos 21 dias. A expressão de BMP-2 foi significativamente maior nas CTM-TA em pelo menos um dos períodos avaliados (Fig. 19; Anexos 141, 142 e 143).

Na comparação entre CTM-TA de ratas OVX com osteoporose e CTM-MO de ratas jovens, a expressão de BMP-2 foi significativamente maior nas CTM-TA de ratas OVX com osteoporose aos sete e 14 dias e semelhante a das CTM-MO de ratas jovens aos 21 dias de diferenciação (Fig. 20; Anexo 144).



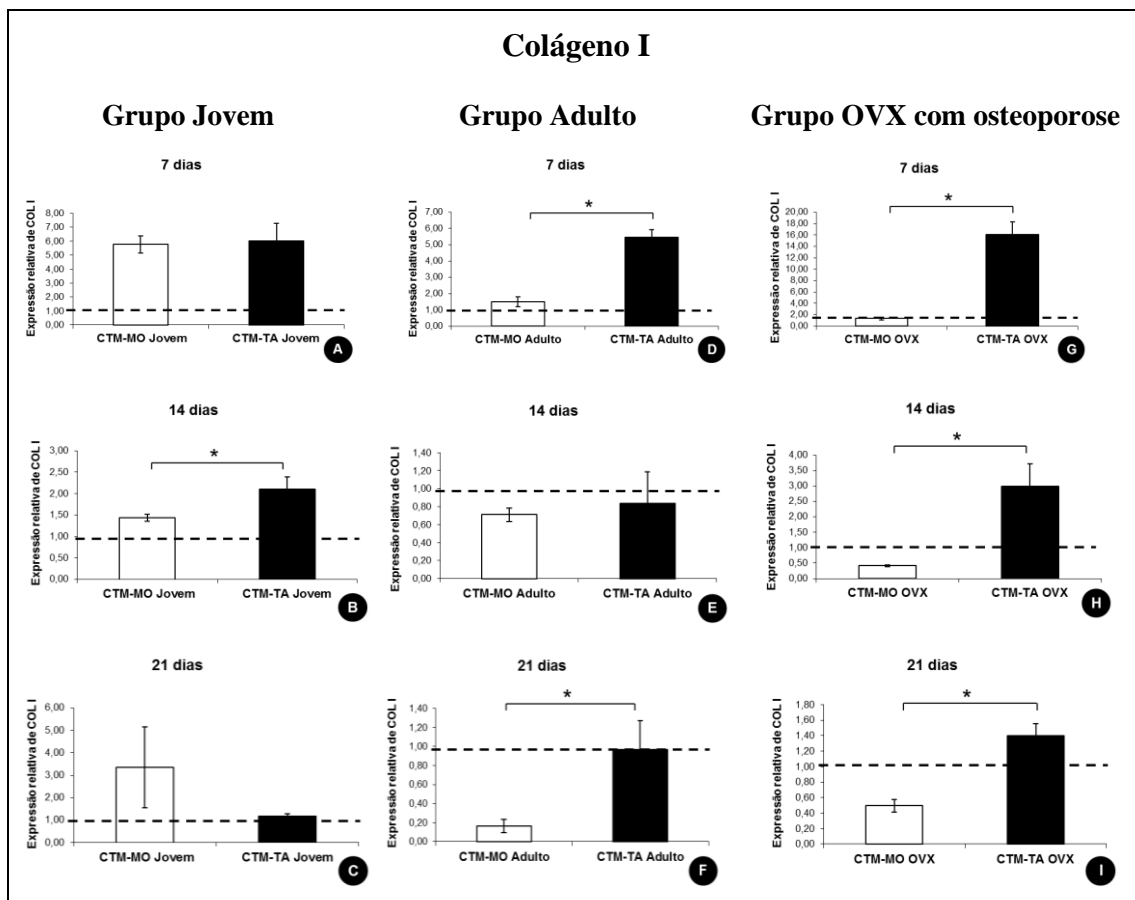


Figura 17. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexos 137, 138 e 139).

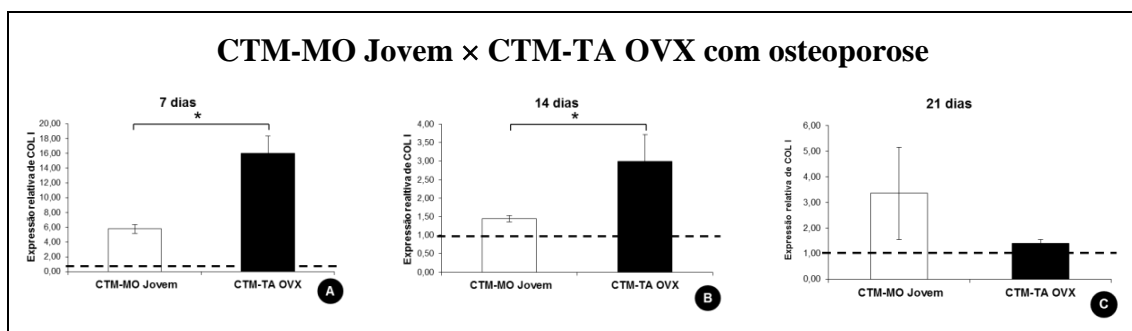


Figura 18. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para colágeno I (COL I) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 140).

## Proteína morfogenética óssea 2

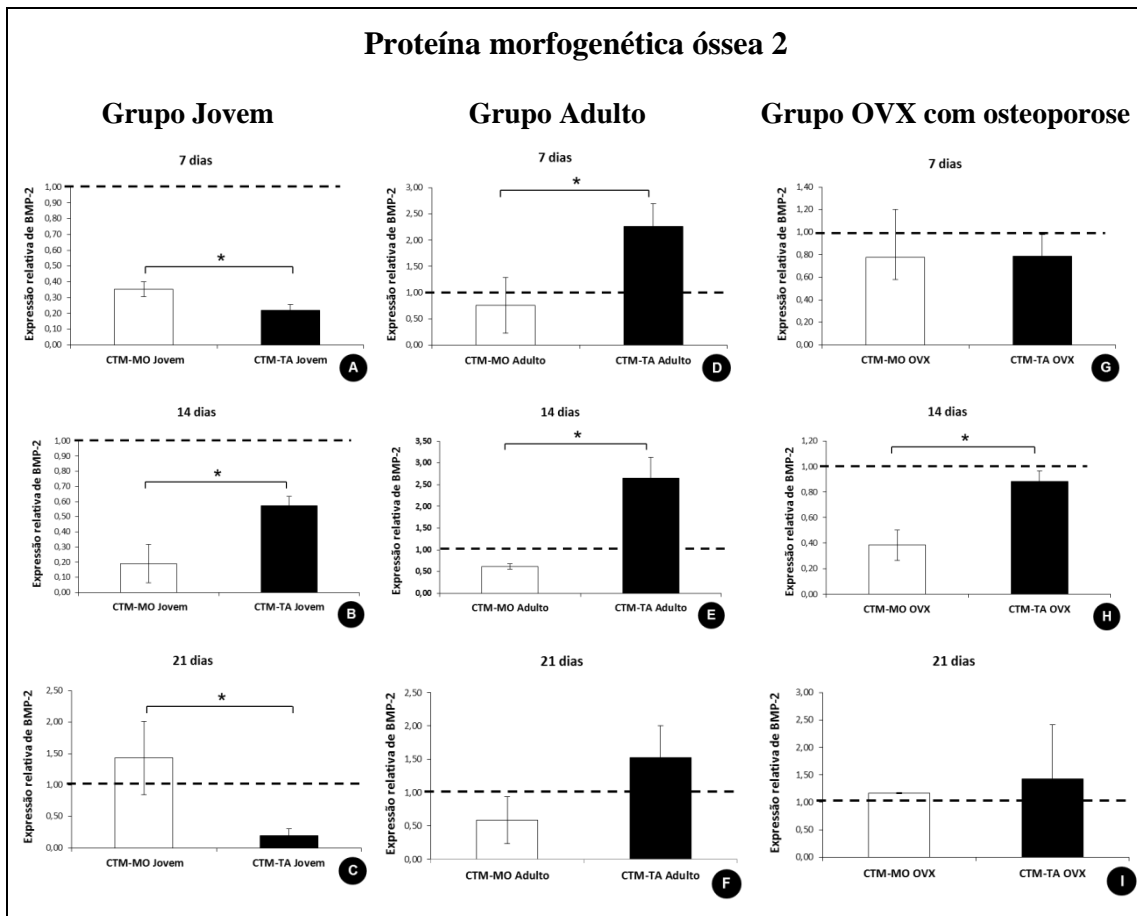


Figura 19. Quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real em culturas de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de ratas jovens, de ratas adultas e de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,D,G), 14 (B,E,H) e 21 dias (C,F,I) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexos 141, 142 e 143).

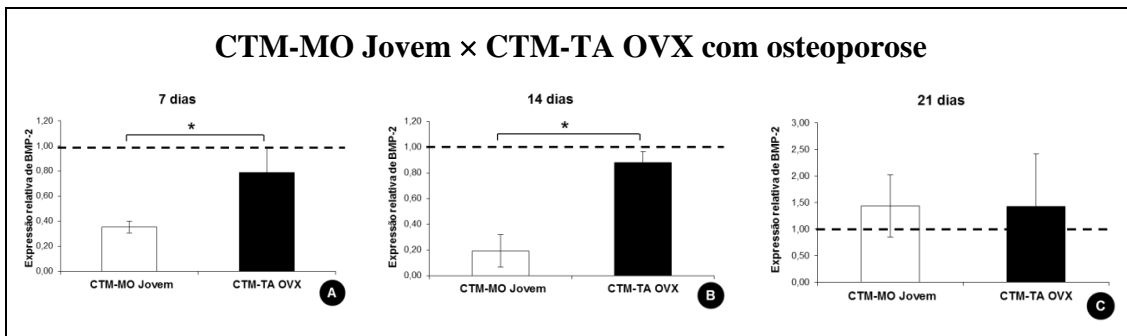


Figura 20. Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para proteína morfogenética óssea 2 (BMP-2) pela técnica de RT-PCR em tempo real entre culturas de CTM da medula óssea (MO) de ratas jovens com CTM do tecido adiposo (TA) de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 dias (C) de diferenciação. Os dados estão expressos em relação ao osteoblasto (linha tracejada). \* $p < 0,05$ . (Anexo 144).

## DISCUSSÃO

As características morfológicas e a expressão de marcadores de superfície para caracterização fenotípica foram semelhantes entre as CTM do tecido adiposo e da medula óssea como já tem sido relatado por outros pesquisadores (Nakanishi et al., 2011).

Como demonstrado nos capítulos anteriores, tanto a idade quanto a ovariectomia associada à osteoporose influenciaram na síntese de matriz mineralizada e na expressão gênica de marcadores relacionados com a diferenciação osteogênica das CTM-MO e das CTM-TA. Mas, a despeito da influência desses fatores, uma das hipóteses iniciais desse estudo foi a de que as CTM-TA apresentassem maior potencial osteogênico quando comparadas às CTM-MO. Há vários estudos que compararam o potencial osteogênico das CTM-MO e das CTM-TA (Zaminy et al., 2008; Hsiao et al., 2011; Nakanishi et al., 2011; Shafiee et al., 2011), mas este parece ser o primeiro estudo que comparou o potencial osteogênico de CTM-TA e de CTM-MO dentro de diferentes categorias de

animais, considerando a idade e o perfil dos hormônios sexuais.

No grupo de ratas jovens, as CTM-TA apresentaram maior diferenciação osteogênica, caracterizada por maior síntese de matriz mineralizada e aumento da expressão de osteopontina, de colágeno I e de BMP-2 em pelo menos um dos períodos estudados. No entanto, nas CTM-TA de ratas jovens, nem todos os parâmetros estudados foram observados em níveis semelhantes ou superiores ao das CTM-MO. Exemplo disso foi a atividade da fosfatase alcalina e a expressão de sialoproteína, de osteocalcina e de BMP-2 que foi significativamente maior nas CTM-MO em pelo menos um dos períodos.

É provável que a maior síntese de nódulos de mineralização observada em culturas de CTM-TA de ratas jovens tenha sido decorrente da maior expressão de BMP-2, de osteopontina e de colágeno I. O maior potencial osteogênico das CTM-TA foi observado apesar da expressão de sialoproteína ter sido bem superior nas CTM-MO em todos os períodos estudados e apesar da expressão de osteocalcina e de

BMP-2 ter sido superior nas CTM-MO aos 21 dias. A expressão de caspase, que é uma enzima importante no processo de apoptose (Mancini et al., 1998), não diferiu entre os dois tipos de CTM. Mas, não se pode afastar a possibilidade de que a maior síntese de nódulos de mineralização e a maior conversão do MTT em cristais de formazan evidenciada nas culturas de CTM-TA possam ter sido também decorrentes do maior potencial proliferativo das CTM-TA, uma vez que o crescimento delas foi bem maior quando comparado ao das CTM-MO. Mais estudos são necessários para verificar se além do maior potencial proliferativo e da maior expressão de BMP-2, osteopontina e de colágeno I evidenciado nas CTM-TA, outros fatores e genes relacionados à osteogênese poderiam ser expressos em maior quantidade nessas células para justificar o maior potencial osteogênico observado nas CTM-TA de ratas jovens. No entanto, já foi demonstrado que as CTM-TA de ratas jovens expressam muito mais genes relacionados ao ciclo celular e à proliferação do que as CTM-MO que expressam mais genes associados à morfogênese como BMP-4, osteomodulina e Wnt, dentre vários outros (Nakanishi et al., 2011).

Ao contrário do grupo de ratas jovens, no grupo de ratas adultas, o potencial osteogênico não parece ter sido diferente entre os dois tipos de CTM. Não houve diferença significativa na porcentagem de nódulos de mineralização observada nas culturas de CTM-TA e de CTM-MO. A expressão de caspase 3 e de osteocalcina também não diferiu significativamente entre os dois tipos de CTM, assim como a conversão do MTT e a atividade da fosfatase alcalina aos sete e 14/21 dias, respectivamente. Apesar da expressão de colágeno I e de BMP-2, da conversão do MTT e da atividade da fosfatase alcalina ter sido maior nas CTM-TA em pelo menos um dos períodos avaliados, a expressão de sialoproteína e osteopontina foi maior nas CTM-MO em todos os três períodos.

Interessante é que a semelhança do potencial osteogênico entre as CTM-MO e as CTM-TA foi observada apesar da celularidade ter sido maior nas culturas de CTM-TA.

No grupo de ratas OVX com osteoporose, assim como no grupo de ratas jovens, o potencial osteogênico das CTM-TA parece ter sido maior. A síntese de nódulos de mineralização, a atividade da fosfatase alcalina e a conversão do MTT foram maiores aos 21 dias nas culturas de CTM-TA. Além disso, a expressão de osteocalcina, colágeno I e de BMP-2 também foi maior nas CTM-TA em pelo menos um dos períodos estudados. Mais uma vez, à semelhança dos grupos de ratas jovens e de ratas adultas, a expressão de osteopontina e de sialoproteína foi maior nas CTM-MO. Com base nisso, pode-se sugerir que, a expressão de osteopontina e de sialoproteína é sempre maior nas CTM-MO independentemente da idade do animal ou da presença de osteoporose por deficiência hormonal. É importante salientar que, ratas ovariectomizadas apresentam redução da expressão de osteopontina pelas CTM-MO, como demonstrado nos capítulos anteriores. Mas, que, apesar disso, a expressão de osteopontina continua maior em comparação a das CTM-TA e que, esse resultado não é suficiente para fazer com que a síntese de nódulos de mineralização seja maior nas culturas de CTM-MO. No grupo de ratas OVX com osteoporose, a celularidade entre as CTM-TA e as CTM-MO foi semelhante. Este resultado provavelmente não foi porque a taxa de proliferação das CTM-TA tenha sido menor, mas porque a apoptose celular tenha sido maior uma vez que a expressão de caspase 3 foi bem superior nas CTM-TA.

Dentro do grupo de CTM-TA o pior potencial osteogênico foi observado no grupo de ratas OVX com osteoporose, como demonstrado no capítulo 4 e, dentro do grupo de CTM-MO, o melhor potencial osteogênico foi observado no grupo de ratas jovens. Assim comparando-se as CTM-TA

de ratas OVX com osteoporose com as CTM-MO de ratas jovens, alguns resultados interessantes e surpreendentes foram observados. A síntese de nódulos de mineralização e a expressão de caspase 3 foram semelhantes nas culturas dos dois tipos celulares. A conversão do MTT e a expressão de osteocalcina, colágeno I e de BMP-2 foi superior nas CTM-TA de ratas OVX com osteoporose ou foi semelhante a das CTM-MO de ratas jovens. Esse resultado é surpreendente, porque demonstra que no caso da necessidade de se obter as CTM do próprio paciente com osteoporose, as CTM do tecido adiposo seriam a melhor escolha, pois embora sofram influência da idade e da ovariectomia, seu potencial osteogênico não é inferior ao das CTM da medula óssea de indivíduos jovens. O potencial osteogênico das CTM-TA de ratas OVX com osteoporose é melhor até mesmo ao das CTM-MO de ratas OVX com osteoporose após o tratamento com triiodotironina (T3), já que foi demonstrado no capítulo 3 que o potencial osteogênico das CTM-MO tratadas *in vitro* com T3 aumenta, mas não se iguala ao de ratas jovens.

Mas, antes de indicar as CTM do tecido adiposo, como a melhor opção de célula para terapia, são necessários mais estudos que comparem também *in vivo* o potencial osteogênico das CTM-MO e das CTM-TA no tratamento de defeitos ou doenças ósseas.

### **CONCLUSÕES**

O potencial osteogênico entre as CTM do tecido adiposo e da medula óssea depende da idade e da higidez do tecido ósseo da rata: as CTM-TA de ratas jovens e de ratas OVX com osteoporose apresentam maior potencial osteogênico quando comparadas às CTM-MO; as CTM-TA de ratas adultas apresentam potencial osteogênico semelhante ao das CTM-MO e as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose têm potencial

osteogênico semelhante ao das CTM-MO de ratas jovens.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os hormônios tireoidianos são fundamentais para a formação e para o crescimento e diferenciação da maioria dos tecidos. Assim, as disfunções tireoidianas podem causar consequências diversas, inclusive no tecido ósseo, pois tanto a triiodotironina (T3) quanto a tiroxina (T4) influenciam a formação e a reabsorção ósseas por controlarem a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos. Dessa forma, as alterações ósseas decorrentes das disfunções tireoidianas se instalam quando o equilíbrio entre aposição e reabsorção é perdido.

Nesse contexto, o hipotireoidismo pode causar osteoporose ou agravar a osteoporose em pacientes ou animais com deficiência de esteróides sexuais por reduzir o número e a atividade dos osteoblastos. O hipertireoidismo, por sua vez, tem efeito variável sobre o osso, podendo aumentar, diminuir ou não alterar a massa óssea dependendo do curso da doença, da dose de tiroxina administrada e dos níveis séricos dos esteróides sexuais. Adicionalmente, a T3 *in vitro* aumenta a atividade de síntese dos osteoblastos e o potencial osteogênico das células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas jovens saudáveis de forma dose dependente. Assim, hipotetizou-se que as CTM-MO participam da gênese das alterações ósseas causadas pelo hipo e pelo hipertireoidismo associados ou não à deficiência de esteróides sexuais. Este estudo parece ser o primeiro a confirmar essa hipótese, demonstrando que a redução do potencial osteogênico das CTM-MO de ratas com hipotireoidismo pode ser um dos mecanismos pela qual a hipofunção tireoidiana causa osteopenia.

Além disso, como as células tronco mesenquimais são consideradas fontes importantes para o tratamento de lesões ou defeitos ósseos, qualquer fator que interfira com a diferenciação osteogênica das mesmas, como a presença de doenças, pode

ser um fator limitante quando se deseja utilizar células do próprio paciente para a terapia celular. Assim, pacientes ou animais com osteoporose decorrente da deficiência dos esteróides caracterizada por diminuição da massa óssea por insuficiência osteoblástica e por diminuição do potencial osteogênico das CTM-MO, ficariam impossibilitados de utilizarem as CTM para a terapia autóloga. E como, a utilização de células de outros pacientes poderia causar rejeição, faz-se necessário estudar algum fator que aumente o potencial osteogênico reduzido das CTM-MO de indivíduos com osteoporose. Dessa forma, este estudo contribuiu mais uma vez de forma importante comprovando que, a adição de T3 *in vitro*, melhora o potencial osteogênico das CTM-MO de ratas ovariectomizadas (OVX) com osteoporose, mas não o iguala ao de CTM-MO de ratas jovens, demonstrando assim, que células do próprio indivíduo tratadas com T3 *in vitro* podem ser utilizadas para o tratamento de ratas com osteoporose. Mas, é importante ressaltar que estudos *in vivo* são necessários para comprovar se essa eficiência é também observada quando do uso dessa célula tratada com T3 em defeitos ou doenças ósseas.

Várias pesquisas também demonstram que as células tronco mesenquimais do tecido adiposo (CTM-TA) também são fontes importantes de células tronco e que apresentam potencial de diferenciação osteogênica semelhante ao das CTM-MO e que, por isso, também têm sido utilizadas para o tratamento de defeitos ósseos. Mas, não se tinha conhecimento se, assim como as CTM-MO, as CTM-TA também apresentam redução do potencial osteogênico em pacientes com deficiência dos esteróides sexuais, o que foi demonstrado neste estudo. Entretanto, quando essas células foram tratadas *in vitro* com T3, o potencial osteogênico não aumentou como ocorreu com as CTM-MO de ratas OVX, sendo que a T3 chegou a

causar diminuição de alguns dos fatores relacionados à diferenciação osteogênica. Essa diferença do efeito de T3 sobre as CTM da medula óssea e do tecido adiposo pode ser atribuída ao fato de que os hormônios tireoidianos apresentam funções diferentes no tecido ósseo e no tecido adiposo e que por isso também podem ter efeitos diferentes sobre a diferenciação osteogênica das CTM-MO e das CTM-TA. No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Importante salientar ainda que, tanto a diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea quanto do tecido adiposo, podem sofrer influência de fatores como idade e presença de doença óssea como a osteoporose, o que também foi observado nesta pesquisa. Por isso, comparar o potencial osteogênico entre essas células, considerando essas variações foi necessário, pois apesar de já existirem estudos que tenham feito a comparação entre as duas fontes de CTM, os mesmos não consideraram a coleta das CTM do mesmo indivíduo e dentro de categorias diferentes de animais determinadas pela idade e pelo perfil dos hormônios sexuais. Assim, de maneira interessante, verificou-se que o potencial osteogênico das CTM-TA de ratas OVX com osteoporose, mesmo sofrendo variações com a idade e com a deficiência de esteróides sexuais, apresentou potencial osteogênico superior ao das CTM-MO de ratas jovens saudáveis. Além disso, as CTM-TA de ratas OVX com osteoporose apresentaram potencial inclusive superior ao das CTM-MO de ratas OVX tratadas com T3 *in vitro*. Mas é importante ressaltar que, antes de eleger as CTM-TA como melhor fonte para a terapia celular autóloga, faz-se necessário a realização de experimentos *in vivo* para validar esse resultado.

Alguns pesquisadores acreditam que o potencial osteogênico da CTM-TA é maior que o da CTM-MO por essas células apresentarem maior capacidade

proliferativa. De fato, essa pode até ser uma das explicações, mas não parece ser a via mais importante pelo qual há maior diferenciação osteogênica, visto que na categoria de ratas OVX com osteoporose, o potencial osteogênico das CTM-TA foi maior que o das CTM-MO apesar da celularidade entre os dois grupos de células ter sido semelhante. Outro resultado interessante observado nos estudos apresentados aqui é que os fatores ou proteínas expressos pelas CTM-TA e pelas CTM-MO envolvidos na diferenciação osteogênica são diferentes. Exemplo disso é a expressão de osteopontina e de sialoproteína que é quase sempre bem inferior nas CTM-TA em comparação a das CTM-MO, apesar do potencial de diferenciação osteogênico das CTM-TA ser superior ao das CTM-MO.

Os resultados deste estudo proporcionaram avanços importantes nas pesquisas com as células tronco da medula óssea e do tecido adiposo e contribuirão para as futuras pesquisas que vislumbram dar continuidade aos estudos do tratamento da osteoporose com células tronco.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, E.; YAMAMOTO, M.; TAGUCHI, Y. et al. Essential requirement of BMPs 2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin. *J. Bone Miner. Res.*, v.15, p.663-673, 2000.
- ABU, E.O.; BORD, S.; HORNER, A. et al. The expression of thyroid hormone receptors in human bone. *Bone*, v.21, p.137-142, 1997.
- AFFINITO, P.; SORRENTINO, C.; FARACE, M.J. et al. Effects of thyroxine therapy on bone metabolism in postmenopausal women with hypothyroidism. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, v.75, p.843-848, 1996.
- AKALIN, A.; COLAK, O.; ALATAS, O. et al. Bone remodeling markers and serum cytokines in patients with hyperthyroidism. *Clin. Endocrinol.*, v.57, p.125-129, 2002.
- ALCADE, A.I.; SARASA, M.; RALDÚA, D. et al. Role of thyroid hormone in regulation of renal phosphate transport in young and aged rats. *Endocrinology*, v.140, p.1544-1551, 1999.
- ALLAIN, T.J.; CHAMBERS, T.J.; FLANAGAN, A.M. et al. Triiodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J. Endocrinol.*, v.133, p.327-331, 1992.
- ALLAIN, T.J.; MCGREGOR, A.M. Thyroid hormones and bone. *J. Endocrinol.*, v.139, p.9-18, 1993.
- ALLAIN, T.J.; THOMAS, M.R.; MCGREGOR, A.M. et al. A histomorphometric study of bone changes in thyroid dysfunction in rats. *Bone*, v.16, p.505-509, 1995.
- ALLAIN, T.J.; YEN, P.M.; FLANAGAN, A.M. et al. The isoform-specific expression of the tri-iodothyronine receptor in osteoblasts and osteoclasts. *Eur. J. Clin. Invest.*, v.26, p.418-425, 1996.
- AMATO, G.; MAZZIOTTI, G.; SORVILLO, F. et al. High serum osteoprotegerin levels in patients with hyperthyroidism: effect of medical treatment. *Bone*, v.35, p.785-791, 2004.
- 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.
- ARRIGONI, E.; LOPA, S.O.; GIROLAMO, L. et al. Isolation, characterization and osteogenic differentiation of adipose tissue-derived stem cells: from small to large animal models. *Cell. Tissue Res.*, v.338, p.401-411, 2009.
- ARTHUR, A.; ZANNETTINO, A.; GRONTHOS, S. The therapeutic applications of multipotential mesenchymal/stromal stem cells in skeletal tissue repair. *J. Cell. Physiol.*, v. 218, p. 237-245, 2009.
- ASAI, S.; CAO, X.; YAMAUCHI, M. et al. Thyroid hormone non-genomically suppresses Src thereby stimulating osteocalcin expression in primary mouse calvarial osteoblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.387, p.92-96, 2009.
- AUWERX, J.; BOUILLON, R. Mineral and bone metabolism in thyroid disease: a review. *Q. J. Med.*, v.60, p.737-752, 1986.
- BAGLIONI, S.; FRANCALANCI, M.; SQUECCO, R. et al. Characterization of human adult stem-cell populations isolated from visceral and subcutaneous adipose tissue. *FASEB Journal*, v.23, p.3494-3505, 2009.

- BALASCH, J. Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum. Reprod. Update*, v.9, p.201-222, 2003.
- BANOVAC, K.; KOREN, E. Triiodothyronine stimulates the release of membrane-bound alkaline phosphatase in osteoblastic cells. *Calcif. Tissue Int.*, v.67, p.460-465, 2000.
- BARRETT-CONNOR, E.; WEISS, T.W.; McHORNEY, C.A. et al. Predictors of falls among postmenopausal women: results from the national osteoporosis risk assessment (NORA). *Osteoporos. Int.*, v.20, p.715-722, 2009.
- BASSETT, J.H.; WILLIAMS, G.R. Critical role of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in bone. *Bone*, v.43, p.418-426, 2008.
- BELAYA, Z.E.; MELNICHENKO, G.A.; ROZHINSKAYA, L.Y. et al. Subclinical hyperthyroidism of variable etiology and its influence on bone in postmenopausal women. *Hormones (Athens)*, v.6, p.62-70, 2007.
- BELLIDO, T.; JILKA, R.L.; BOYCE, B.F. et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens: the role of the androgen receptor. *J. Clin. Invest.*, v.95, p.2886-2895, 1995.
- BELLOWS, C.G.; REIMERS, S.M.; HEERSCHKE, J.N.M. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Res.*, v.297, p. 249-259, 1999.
- 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.
- BEN-SHLOMO, A.; HAGAG, P.; EVANS, S.; WEISS, M. Early postmenopausal bone loss in hyperthyroidism. *Maturitas*, v.39, p.19-27, 2001.
- BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, v.19, p.180-92, 2001.
- BIJLSMA, J.W.; DUURSMA, S.A.; ROELOFS, J.M. et al. Thyroid function and bone turnover. *Acta Endocrinol.*, v.104, p.42-49, 1983.
- 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.
- BOELAERT, K.; FRANKLYN, J.A. Thyroid hormone in health and disease. *J. Endocrinol.*, v.187, p.1-15, 2005.
- BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; BOZZI, A. et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Horm Res.*, v.71, p.88-97, 2009.
- BOELONI, J.N.; SILVA, J.F.; MAGALHÃES, F.C. et al. Efeitos sítio-ósseo dependentes no fêmur e vértebras lombares de ratas com disfunções tireoidianas. *Acta Ortop. Bras.*, v.18, p.291-294, 2010.
- BONEWALD, L. Osteocytes as multifunctional cells. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, v.6, p.331-333, 2006.

- BOYLE, W.J.; SIMONET, W.S.; LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.423, p.337-342, 2003.
- BRITTO, O.M.; FENTON, A.J.; HOLLOWAY, W.R. et al. Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology*, v.134, p.169-176, 1994.
- BRUNO, A.N.; POCHMANN, D.; RICACHENEVSKY, F.K. et al. 5' nucleotide activity is altered by hypo- and hyperthyroidism in platelets from adult rats. *Platelets*, v.16, p.25-30, 2005.
- BURSTEIN, P.J.; DRAZNIN, B.; JOHNSON, C.J. et al. The effect of hypothyroidism on growth, serum growth hormone, the growth hormone-dependent somatomedin, insulin-like growth factor, and its carrier protein in rats. *Endocrinology*, v.104, p.1107-1111, 1979.
- CANALIS, E.; RAISZ, L.G. Effect of fibroblast growth factor on cultured fetal rat calvaria. *Metabolism*, v.29, p.108-114, 1980.
- CANALIS, E.; CENTRELLA, M. MCCARTHY, T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation *in vitro*. *J. Clin. Invest.*, v.81, p.1572-1577, 1988.
- CANO, A.; BAUM, M.; MOE, O.W. Thyroid hormone stimulates the renal Na/H exchanger NHE3 by transcriptional activation. *Am. J. Physiol.*, v.276, p.C102-C108, 1999.
- CAMPOS-PASTOR, M.M.; MUÑOS-TORRES, M.; ESCOBAR-JIMÉNEZ, F. et al. Bone mass in females with different thyroid disorders: influence of menopausal status. *Bone Miner.*, v.21, p.1-8, 1993.
- CARNEIRO-RAMOS, M.S.; SILVA, V.B.; JÚNIOR, M.B.C. et al. Thyroid hormone stimulates 5'-ecto-nucleotidase of neonatal rat ventricular myocytes. *Mol. Cell Biochem.*, v.265, p.195-201, 2004.
- CARRASCOSA, A.; FERRÁNDEZ, M.A.; AUDI, L. et al. Effects of triiodothyronine (T<sub>3</sub>) and identification of specific nuclear T<sub>3</sub>-binding sites in cultured human fetal epiphyseal chondrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.75, p.140-144, 1992.
- CARVALHO, K.A.T.; CURY, C.C.; OLIVEIRA, L. et al. Evaluation of bone marrow mesenchymal stem cell standard cryopreservation procedure efficiency. *Transplant. Proc.*, v.40, p.839-841, 2008.
- CELIL, A.B.; CAMPBELL, P.G. BMP-2 and insulin-like growth factor-I mediate Osterix (Osx) expression in human mesenchymal stem cells via the MAPK and protein kinase D signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, v.280, p.31353-31359, 2005.
- CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B. et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v.25, p.2739-2749, 2007.
- CHAN, K.M.; ANDERSON, M.; LAU, E.M.C. Exercise interventions: defusing the world's osteoporosis time bomb. *Bull. World Health Organ.*, v.81, p.827-830, 2003.
- CHANG, L.; KARIN, M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, v.410, p.37-40, 2001.
- CHAO, D.T.; KORSMEYER, S.J. BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu. Rev. Immunol.*, v. 16, p.395-419, 1998.
- CHAUDHARY, L.R.; HOFMEISTER, A.M.; HRUSKA, K.A. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*, v.34, p.402-411, 2004.

- CHEN, T.L.; BATES, R.L.; DUDLEY, A. et al. Bone morphogenetic protein-2b stimulation of growth and osteogenic phenotypes in rat osteoblast-like cells: comparison with TGF- $\beta$ 1. *J. Bone Miner. Res.*, v.6, p.1387-1393, 1991.
- CHEN, N.C.; HAUSMAN, G.J.; WRIGHT, J.T. Hormonal regulation of insulin-like growth factor binding proteins and insulin-like growth factor I (IGF-I) secretion in porcine stromal-vascular cultures. *J. Anim. Sci.*, v.74, p.2369-2375, 1996.
- CHEN, X-D.; DUSEVICH, V.; FENG, J.Q. et al. Extracellular matrix made by bone marrow cells facilitates expansion of marrow-derived mesenchymal progenitor cells and prevents their differentiation into osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, v.22, p.1943-1956, 2007.
- CHEN, Y.; SHAO, J-Z.; XIANG, L-X. et al. Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.40, p.815-820, 2008.
- CHIANG, C.; CHIU, M.; MOORE, A.J. et al. Mineralization and bone resorption are regulated by the androgen receptor in male mice. *J. Bone Miner. Res.*, v.24, p.621-631, 2009.
- CHIU, K.M.; ARANAUD, C.D.; JU, J. et al. Correlation of estradiol, parathyroid hormone, interleukin-6 receptor during the normal menstrual cycle. *Bone*, v.26, p.79-85, 2000.
- CHOU, Y.F.; ZUK, P.A.; CHANG, T.L. et al. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 1. BMP2-treated adipose-derived stem cells do not improve repair of segmental femoral defects. *Connect. Tissue Res.*, v.52, p.109-118, 2011.
- CHOW, J.; TOBIAS, J.H.; COLSTON, K.W. et al. Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J. Clin. Invest.*, v.89, p.74-78, 1992.
- CIPRIANI, C.; ROMGNOLI, E.; SCARPIELLO, A. et al. Phalangeal quantitative ultrasound and bone mineral density in evaluating cortical bone loss: a study in postmenopausal women with primary hyperthyroidism and subclinical iatrogenic hyperthyroidism. *J. Clin. Densitom.*, v.12, p.456-460, 2009.
- CIVITELLI, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.473, p.188-192, 2008.
- COINDRE, J.M.; DAVID, J.P.; RIVIÈRE, L. et al. Bone loss in hypothyroidism with hormone replacement: a histomorphometric study. *Arch. Intern. Med.*, v.146, p.48-53, 1986.
- COMPSTON, J.E. Sex steroids and bone. *Physiol. Rev.*, v.81, p.419-447, 2001.
- COMPSTON, J.E. Bone marrow and bone: a functional unit. *J. Endocrinol.*, v.173, p.387-394, 2002.
- COOL, S.M.; GRÜNERT, M.; JACKSON, R. et al. Role of growth hormone receptor signaling in osteogenesis from murine bone marrow progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.338, p.1048-1058, 2005.
- COWAN, C.M.; SHI, Y-Y.; AALAMI, O.O. et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat. Biotechnol.*, v.22, p.560-567, 2004.
- CROSS, H.S.; PÖLZLEITNER, D.; PETERLIK, M. Intestinal phosphate and calcium absorption: joint regulation by thyroid hormones and 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Acta Endocrinol.*, v.113, p.96-103, 1986.

- CROSS, H.S.; PETERLIK, M. Differentiation-dependent expression of calcitriol actions on absorptive processes in cultured chick intestine: modulation by triiodothyronine. *Acta Endocrinol.*, v.124, p.679-684, 1991.
- DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A. et al. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.*, v.61, p.577-587, 2008.
- DAY, T.F.; GUO, X.; GARRET-BEAL, L. et al. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev. Cell*, v.8, p.739-750, 2005.
- DEMERS, L.M. Thyroid disease: pathophysiology and diagnosis. *Clin. Lab. Med.*, v.24, p.19-28, 2004.
- DERFOUL, A.; PERKINS, G.L.; HALL, D.J. et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, v.24, p.1487-1495, 2006.
- DIEDERICHS, S.; BÖHMS, S.; PETERBAUER, A. et al. Application of different strain regimes in two-dimensional adipose tissue-derived stem cell cultures induces osteogenesis: implications for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*, v.94, p.927-936, 2010.
- DIEUDONNÉ, M.N.; LENEVEU, M.C.; GIUDICELLI, Y.A. et al. Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, v.286, p.C655-C661, 2004.
- DMITRIEVA, R.I.; MINULLINA, I.R.; BILIBINA, A.A. et al. Bone marrow- and subcutaneous adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: differences and similarities. *Cell Cycle*, v.11, p.377-383, 2012.
- D'IPPOLITO, G.; SCHILLER, P.C.; PEREZ-STABLE, C. et al. Cooperative actions of hepatocyte growth factor and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in osteoblastic differentiation of human vertebral bone marrow stromal cells. *Bone*, v.31, p.269-275, 2002.
- DIXON, R.M.; REID, S.W.J.; MOONEY, C.T. Epidemiological, clinical, hematological and biochemical characteristics of canine hypothyroidism. *Vet. Rec.*, v.145, p.481-487, 1999.
- DONOVAN, P. D.; GEARHART, J. The end of beginning for pluripotent stem cells. *Nature*, v. 414, p.92-97, 2001.
- DONZELLI, E.; SALVADÈ, A.; MIMO, P. et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: *in vitro* osteogenic differentiation. *Arch. Oral Biol.*, v.52, p.63-73, 2007.
- DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V. et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, v.89, p.747-754, 1997.
- DUCY, P.; KARSENTY, G. Genetic control of cell differentiation in the skeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.10, p.614-619, 1998.
- EBERT, R.; SCHÜTZE, N.; SCHILLING, T. et al. Influence of hormones on osteogenic differentiation processes of mesenchymal stem cells. *Expert Rev. Endocrinol. Metabol.*, v.2, p.59-78, 2007.
- EGUSA, H.; IIDA, K.; KOBAYASHI, M. et al. Down regulation of extracellular matrix-related gene clusters during osteogenic differentiation of human bone marrow-and adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.*, v.13, p.2589-2600, 2007.

- EIJKEN, M.; KOEDAM, M.; VAN DRIEL, M. et al. The essential role of glucocorticoids for proper human osteoblast differentiation and matrix mineralization. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.248, p.87-93, 2006.
- ERIKSEN, E.F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Kinetics of trabecular bone resorption and formation in hypothyroidism: evidence for a positive balance per remodeling cycle. *Bone*, v.7, p.101-108, 1986.
- ERIKSEN, E.F.; COLVARD, D.S.; BERG, N.J. et al. Evidence of estrogen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Science*, v.241, p.84-86, 1988.
- ERNST, M.; FROESCH, E.R. Triiodothyronine stimulates proliferation of osteoblast-like cells in serum-free culture. *FEBS Lett.*, v.220, p.163-166, 1987.
- ERNST, M.; SCHMID, C.H.; FROESCH, E.R. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.85, p.2307-2310, 1988.
- ESPINOSA, R.E.; KELLER, M.J.; YUSUFI, A.N.; DOUSA, T.P. Effect of thyroxine administration on phosphate transport across renal cortical brush border membrane. *Am. J. Physiol.*, v.246, p.F133-F139, 1984.
- FADAEI, F.F.; NOROUZIAN, M.; AZIZI, F. Effect of hypothyroidism on bone repair in mature female rats. *Int. J. Endocrinol. Metab.*, v.1, p.126-129, 2005.
- FENG, Y.; SUN, Y.; JIA, W. et al. Platelet-rich plasma and 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D<sub>3</sub> synergistically stimulate osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. Lett.*, v.32, p.635-642, 2010.
- FÖLDES, J.; TARJÁN, G.; SZATHMARIM. et al. Bone mineral density in patients with endogenous subclinical hyperthyroidism: is this thyroid status a risk factor for osteoporosis? *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, v.39, p.521-527, 1993.
- FRANCESCHI, R.T.; GE, C.; XIAO, G. et al. Transcriptional regulation of osteoblasts. *Cells Tissues Organs*, v.189, p.144-152, 2009.
- FRANKLYN, J.A.; BOELAERT, K. Thyrotoxicosis. *Lancet*, 2012 (no prelo).
- FRATZL-ZELMAN, N.; HÖRANDNER, H.; LUEGMAYR, E. et al. Effects of triiodothyronine on the morphology of cells and matrix, the localization of alkaline phosphatase, and the frequency of apoptosis in long-term cultures of MC3T3-E1 cells. *Bone*, v.20, p.225-236, 1997.
- FROMIGUÉ, O.; MARIE, P.J.; LOMRI, A. Differential effects of transforming growth factor  $\beta$ 2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells. *Cytokine*, v.9, p.613-623, 1997.
- FUCHS, E.; SEGRE, J. A. Stem cells: a new lease on life. *Cell*, v.100, p.143-155, 2000.
- FULLER, K.; MURPHY, C.; KIRSTEIN, B. et al. TNF $\alpha$  potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*, v.143, p.1108-1118, 2002.
- GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science*, v.287, p.1433-1438, 2000.
- GUANG-DA, X.; HUI-LING, S.; ZHI-SONG, C. et al. Alteration of plasma concentrations of OPG before and after levothyroxine replacement therapy in hypothyroid patients. *J. Endocrinol. Invest.*, v.28, p.965-972, 2005.

- GARNERO, P.; VASSY, V.; BERTHOLIN, A. et al. Markers of bone turnover in hyperthyroidism and the effects of treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.78, p.955-959, 1994.
- GAUMET-MEUNIER, N.; COXAM, V.; ROBINS, S. et al. Gonadal steroids and bone metabolism in young castrated male rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.66, p.470-475, 2000.
- GIRASOLE, G.; JILKA, R.L.; PASSERI, G. 17 $\beta$ -estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts *in vitro*: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clin. Invest.*, v.89, p.883-891, 1992.
- GOLDSMITH, J.R.; GROSSMAN, C.M.; MORTON, W.E. et al. Juvenile hypothyroidism among two populations exposed to radioiodine. *Environ. Health Perspect.*, v.107, p.303-308, 1999.
- GOMIDE, V.; ZONARI, A.A.C.; BREYNER, N.M. et al. Attachment and proliferation of human-adipose-tissue-derived stem cells on bioactive glass/PVA hybrid scaffolds. *ISRN Materials Science*, 2011 (no prelo).
- GOUVEIA, H.A.; JORGETTI, V.; BIANCO, A.C. Effects of thyroid hormone administration and estrogen deficiency on bone mass of female rats. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.2098-2107, 1997.
- GOUVEIA, C.H.; SCHULTZ, J.J.; BIANCO, A.C. et al. Thyroid hormone stimulation of osteocalcin gene expression in ROS 17/2.8 cells is mediated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. *J. Endocrinol.*, v.170, p.667-675, 2001.
- GRAY, T.; FLYNN, T.C.; GRAY, K.M. et al. 17 beta-estradiol acts directly on the clonal osteoblastic cell line UMR106. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.84, p.6267-6271, 1987.
- GRONTHOS, S.; FRANKLIN, D.M.; LEDDY, H.A. et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, v.189, p.54-63, 2001.
- GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A. C.; HAY, S. J. et al. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell. Sci.*, v.116, p.1827-35, 2003.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells*, v.22, p.487-500, 2004.
- 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, p.465-473, 1999.
- GUGGENBUHL, P. Osteoporosis in males and females: is there really a difference? *Joint Bone Spine*, v.76, p.595-601, 2009.
- HADJIDAKIS, D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone remodeling. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1092, p.385-396, 2006.
- HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Methods*, v.119, p.203-210, 1989.
- HARVEY, A.M.; HIBBERT, A.; BARRETT, E.L. et al. Scintigraphic

- findings in 120 hyperthyroid cats. *J. Feline Med. Surg.*, v.11, p.96-106, 2009.
- 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. Metab.*, v.55, p.339-344, 2011.
- HELL, R.C.R.; BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M. et al. Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats bone-marrow derived mesenchymal stem cells. *Acta Physiol.(Oxf)*, 2012 (no prelo).
- 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.
- HESS, R.; PINO, A.M.; RÍOS, S. et al. High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors. *J. Cell. Biochem.*, v.94, p.50-57, 2005.
- HEYMANN, M.; RIET, A.; GOFF, B.L. et al. OPG, RANK and RANK ligand expression in thyroid lesions. *Regul. Pept.*, v.148, p.46-53, 2008.
- HOFBAUER, L.C.; KHOSLA, S.; DUNSTAN, C.R. et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, v.140, p.4367-4370, 1999.
- HOLZER, G.; EINHORN, T.A.; MAJESKA, R.J. Estrogen regulation of growth and alkaline phosphatase expression by cultured human bone marrow stromal cells. *J. Orthop. Res.*, v.20, p.281-288, 2002.
- HONG, J.H.; HWANG, E.S.; MCMANUS, M.T. et al. TAZ, a transcriptional modulator of mesenchymal stem cell differentiation. *Science*, v.309, p.1074-1078, 2005.
- HONG, L.; COLPAN, A.; PEPTAN, I.A. Modulations of 17- $\beta$  estradiol on osteogenic and adipogênica differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, v.12, p.2747-2753, 2006.
- 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, p.1197-1203, 2007.
- HONG, L.; SULTANA, H.; PAULIUS, K. et al. Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.114, p.180-185, 2009.
- HSIAO, S.T.; ASGARI, A.; LOKMIC, Z. et al. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose and dermal tissue. *Stem Cells Dev.*, 2011(no prelo).
- HUANG, B.K.; GOLDEN, L.A.; TARJAN, G. et al. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, v.15, p.188-197, 2000.
- HUANG, T.H.; MÜHLBAUER, R.C.; TANG, C.H. et al. Onion decreases the ovariectomy-induced osteopenia in young adult rats. *Bone*, v.42, p.1154-1163, 2008.
- HUANG, S.C.; WU, T.C.; YU, H.C. et al. Mechanical strain modulates age-related changes in the proliferation and differentiation of mouse adipose-derived stromal cells. *BMC Cell Biol.*, v.11, p.1-14, 2010.



- HUGHES, D.E.; DAI, A.; TIFFEE, J.C. et al. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat. Med.*, v.2, p.1132136, 1996.
- HUGHES, F.J.; TURNER, W.; BELIBASAKIS, G. et al. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, v.41, p.48-72, 2006.
- HURLEY, M.M.; ABREU, C. HARRISON, J.R. et al. Basic fibroblast growth factor inhibits type I collagen gene expression in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.*, v.268, p.5588-5593, 1993.
- IMAI, Y.; NAKAMURA, T.; MATSUMOTO, T. et al. Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J. Bone Miner. Metab.*, v.27, p.127-130, 2009.
- 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.
- ISHIDA, H.; BELLOWS, C. G.; AUBIN, J. E. et al. Tri-iodothyronine (T3) and dexamethasone interact to modulate osteoprogenitor cell differentiation in fetal rat calvaria cell cultures. *Bone*, v.16, p. 545-549, 1995.
- ISHIDA, Y.; TERTINEGG, I.; HEERSHE, J.N.M. Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. *J. Bone Miner. Res.*, v.11, p.921-930, 1996.
- ISHIDA, Y.; HEERSCHE, J.N.M. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone cell population derived from adult female but not from adult male rats. *Bone*, v.20, p.17-25, 1997.
- ISHIDA, Y.; KILLINGER, D.W.; KHALIL, M.W. et al. Expression of steroid-converting enzymes in osteoblasts derived from rat vertebrae. *Osteoporos. Int.*, v.13, p.235-240, 2002.
- JACKSON, L.; JONES, D.R.; SCOTTING, P. et al. Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad. Med.*, v.53, p.121-127, 2007.
- JIA, D.; HEERSCHE, J.N.M. Expression of insulin-like growth factor system constituents in differentiating rat osteoblastic cell populations. *Growth Horm. IGF Res.*, v.12, p.399-410, 2002.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v.418, p.41-49, 2002.
- KAKUDO, N.; SHIMOTSUMA, A.; KUSUMOTO, K. Fibroblast growth factor-2 stimulates adipogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.359, p.239-244, 2007.
- KAMEDA, T.; MANO, H.; YUASA, T. et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J. Exp. Med.*, v.186, p.489-495, 1997.
- KARAOZ, E.; AKSOY, A.; AYHAN, S. et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and

- immunophenotypic markers. *Histochem. Cell Biol.*, v.132, p.533-546, 2009.
- KARGA, H.; PAPAPETROU, P.D.; KORAKOVOUNI, A. et al. Bone mineral density in hyperthyroidism. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v.61, p.466-472, 2004.
- KASUGAI, S.; TODESCAN, R.; NAGATA, T. et al. Expression of bone-matrix proteins associated with mineralized tissue formation by adult-rat bone-marrow cells *in vitro* – inductive effects of dexamethasone on the osteoblast phenotype. *J. Cell. Physiol.*, v.147, p.111-120, 1991.
- KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.*, v.8, p.147-159, 2002.
- KATZ, A.J.; THOLPADY, A.; THOLPADY, S.S. et al. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. *Stem Cells*, v.23, p.412-423, 2005.
- KEILA, S.; KELNER, A.; WEINREB, M. Systemic prostaglandin E2 increases cancellous bone formation and mass in aging rats and stimulates their bone marrow osteogenic capacity *in vivo* and *in vitro*. *J. Endocrinol.*, v.168, p. 131-139, 2001.
- KIM, C-H.; KIM, H-K.; SHONG, Y.K. et al. Thyroid hormone stimulates basal and interleukin (IL)-1-induced IL-6 production in human bone marrow stromal cells: a possible mediator of thyroid hormone-induced bone loss. *J. Endocrinol.*, v.160, p.97-102, 1999.
- KIM, J.; KANG, J.W.; PARK, J.H. et al. Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch. Pharm. Res.*, v.32, p.117-126, 2008.
- KLAUSHOFER, K.; HOFFMANN, O.; GLEISPACH, H. et al. Bone-resorbing activity of thyroid hormones is related to prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvaria. *J. Bone Miner. Res.*, v.4, p.305-312, 1989.
- KLAUSHOFER, K.; VARGA, F.; GLANTSCHNIG, H. et al. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J. Nutr.*, v.125, p.1996S-2003S, 1995.
- KNIPPENBERG, M.; HELDER, M.N.; DOULABI, Z.B. et al. Osteogenesis versus chondrogenesis by BMP-2 and BMP-7 in adipose stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.342, p.902-908, 2006.
- KOCH, H.; JADLOWIEC, J.A.; CAMPBELL, P.G. Insulin-like growth factor-I induces early osteoblast gene expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.*, v.14, p.621-631, 2005.
- KOUSTENI, S.; BELLIDO, T.; PLOTKIN, L.I. et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell*, v.104, p.719-730, 2001.
- KRETLOW, J.D.; JIN, Y.Q.; LIU, W. et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol.*, v.9, p.1-13, 2008.
- KRUGER, G.M.; MOSHER, J.T.; BIXBY, S. et al. Neural crest stem cells persist in the adult gut but undergo changes in self-renewal, neuronal subtype potential, and factor responsiveness. *Neuron*, v.35, p.657-669, 2002.
- LADENSON, P.W.; SINGER, P.A.; AIN, K.B. et al. American thyroid association guidelines for detection of thyroid

- dysfunction. *Arch. Intern. Med.*, v.160, p.1573-1575, 2000.
- LEE, H-S.; HUANG, G-T; CHIANG, H. et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells*, v.21, p.190-199, 2003.
- LEE, R.H.; KIM, B.; CHOI, I. et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell. Physiol. Biochem.*, v. 14, p. 311-324, 2004.
- LEE, S-Y.; LIM, J.; KHANG, G. et al. Enhanced ex vivo expansion of human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells by fibroblast growth factor-2 and dexamethasone. *Tissue Eng.*, v.15, p.2491-2499, 2009.
- LEROU, P. H.; DALEY, G. Q. Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.*, v.19, p.321-331, 2005.
- LEVI, B.; JAMES, A.W.; WAN, D.C. et al. Regulation of human adipose-derived stromal cell osteogenic differentiation by insulin-like growth factor-1 and platelet-derived growth factor- $\alpha$ . *Plast. Reconstr. Surg.*, v.126, p. 41-52, 2010a.
- LEVI, B.; JAMES, A.W.; XU, Y. et al. Divergent modulation of adipose-derived stromal cell differentiation by TGF- $\beta$  based on species of derivation. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.126, p. 412-425, 2010b.
- LEVI, B.; LONGAKER, M.T. Adipose derived stromal cells for skeletal regenerative medicine. *Stem Cells*, v.29, p.576-582, 2011.
- LEVI, B.; NELSON, E.R.; BROWN, K. et al. Differences in osteogenic differentiation of adipose-derived stromal cells from murine, canine, and human sources *in vitro* and *in vivo*. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.128, p.373-386, 2011.
- LI, H.; DAI, K.; TANG, T. et al. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.356, p.836-842, 2007.
- LIU, Z-J.; ZHUGE, Y.; VELAZQUEZ, C. Trafficking and differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, v.106, p.984-991, 2009a.
- LIU, G.; VIJAYAKUMAR, S.; GRUMOLATO, L. et al. Canonical Wnts function as potent regulators of osteogenesis by human mesenchymal stem cells. *J. Cell Biol.*, v.185, p.67-75, 2009b.
- LOCKE, M.; WINDSOR, J.; DUNBAR, R. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ. J. Surg.*, v.79, p.235-244, 2009.
- LUU, H.H.; SONG, W-X.; LUO, X. et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v.25, p.665-677, 2007.
- LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.*, v.16, p.599-603, 2004.
- MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.35, p.1301-1305, 2003.
- MALLADI, P.; XU, Y.; YANG, G.P. et al. Functions of vitamin D, retinoic acid, and dexamethasone in mouse adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, v.12, p.2031-2040, 2006.
- MAMBELLI, L.I.; SANTOS, E.J.C.; FRAZÃO, P.J.R. et al. Characterization of

- equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. *Tissue Eng. Part C*, v.15, p.87-94, 2009.
- MANCINI, M.; NICHOLSON, D.W.; ROY, S. et al. The caspase-3 precursor has a cytosolic and mitochondrial distribution: implications for apoptotic signaling. *J. Cell. Biol.*, v.140, p.1485-1495, 1998.
- MANOLAGAS, S.C. Birth and Death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, v.21, p.115-137, 2000.
- MANOLAGAS, S.C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R.L. Sex steroids and bone. *Recent Prog. Horm. Res.*, v.57, p.385-409, 2002.
- MARIE, P.J. The molecular genetics of bone formation. *Am. J. Pharmacogenomics*, v.1, p.175-187, 2001.
- MATIKAINEN, T.; LAINE, J. Placenta - An alternative source of stem cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v.207, p.544-549, 2005.
- McKAY, R. Stem cells – hype and hope. *Nature*, v.406, p.361-364, 2000.
- McLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, v.414, p.129-131, 2001.
- MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, v.119, p.2204-2213, 2006.
- MILNE, M.; KANG, M.; QUAIL, J.M. et al. 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.139, p.2527-2534, 1998.
- MILNE, M.; KANG, M-L.; CARDONA, G. et al. Expression of multiple thyroid hormone receptor isoforms in rat femoral and vertebral bone and in bone marrow osteogenic cultures. *J. Cell. Biochem.*, v.74, p.684-693, 1999.
- MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; GONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, v.226, p.507-520, 2001.
- MIRSAIDI, A.; KLEINHANS, K.N.; RIMANN, M. et al. Telomere length, telomerase activity and osteogenic differentiation are maintained in adipose-derived stromal cells from senile osteoporotic SAMP6 mice. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, 2011 (no prelo).
- MIURA, M.; TANAKA, K.; KAMATSU, Y. et al. A Novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in osteoclast formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.291, p.987-994, 2002.
- MIZUNO, H. Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *J. Nippon. Med. Sch.*, v.76, p.56-66, 2009.
- MOELLER, L.C.; DUMITRESCU, A.M.; WALKER, R.L. et al. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.90, p.936-943, 2005.
- MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. A Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. *Acta Path. Microbiol. Scand*, v.86, p.56-62, 1978.
- MOSEKILDE, L.; ERIKSEN, E.F.; CHARLES, P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, v.19, p.35-63, 1990.

- MOSNA, F.; SENSEBÉ, L.; KRAMPERA, M. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide. *Stem Cells Dev.*, v.19, p.1449-1470, 2010.
- MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v.65, p.55-63, 1983.
- MUELLER, S.M.; GLOWACKI, J. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J. Cell. Biochem.*, v.82, p.583-590, 2001.
- MUNDY, G.R.; SHAPIRO, J.L.; BANDELIN, J.G. et al. Direct stimulation of bone resorption by thyroid hormones. *J. Clin. Invest.*, v.58, p.529-534, 1976.
- MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B. et al. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.48, p.3464-3474, 2003.
- NAAN, E.C.; KIRPENSTEIJN, J.; KOOISTRA, H.S. et al. Results of thyroidectomy in 101 cats with hyperthyroidism. *Vet. Surg.*, v.35, p.287-293, 2006.
- NADRI, S.; SOLEIMANI, M.; HOSSENI, R.H. et al. An efficient method of isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int. J. Dev. Bio.*, v.51, p.723-729, 2007.
- NAGASAKI, T.; INABA, M.; JONO, S. et al. Increased levels of serum osteoprotegerin in hypothyroid patients and its normalization with restoration of normal thyroid function. *Eur. J. Endocrinol.*, v.152, p.347-353, 2005.
- NAKAMURA, A.; DOHI, Y.; AKAHANE, M. et al. Osteocalcin secretion as an early marker of *in vitro* osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part C Methods*, v.15, p.169-180, 2009.
- NAKANISHI, C.; NAGAYA, N.; OHNISHI, S. et al. Gene and protein expression analysis of mesenchymal stem cells derived from rat adipose tissue and bone marrow. *Circ. J.*, v.75, p.2260-2268, 2011.
- NAMARA, P.M.; LOUGHREY, H.C. Progesterone receptor A e B isoform expression in human osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.*, v.63, p.39-46, 1998.
- NEFUSSI, J.R.; BRAMI, G.; MODROWSKI, D. et al. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation *in vitro*. *J. Histochem. Cytochem.*, v.45, p.493-503, 1997.
- NELSON, H.D. Menopause. *Lancet*, v.371, p.760-770, 2008.
- NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil. Steril.*, v.77, Suppl 4, p.S34-S41, 2002.
- NUNES, I.J.; NUNES, V.A. Doenças metabólicas do osso. *Cad. Téc. Esc. Vet. UFMG.*, n.3, p.1-66, 1988.
- NUNES, M.T. Hormônios tireoidianos: mecanismo de ação e importância biológica. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.47, p.639-643, 2003.
- OCARINO, N.M.; MARUBAYASHI, U.; CARDOSO, T.G.S. et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, v.7, p.84-93, 2007.
- OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; GOES, A.M. et al. Osteogenic differentiation of

- mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*, v.19, p.320-325, 2008.
- OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; JORGETTI, V.; GOMES, D.A.; GOES, A.M.; SERAKIDES, R. Intra-bone marrow injection of mesenchymal stem cells improves the femur bone mass of osteoporotic female rats. *Connect. Tissue Res.*, v.51, p.426-436, 2010.
- 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. *J. Cell. Physiol.*, v.161, p.544-552, 1994.
- OREFFO, R.O.; TRIFFITT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone*, v.25, p.5S-9S, 1999.
- ORTEGA, F.J.; MORENO-NAVARRETE, J.M.; RIBAS, V. et al. Subcutaneous fat shows higher thyroid hormone receptor- $\alpha$ 1 gene expression than omental fat. *Obesity*, v.17, p. 2134-2141, 2009.
- OURSLER, M.J.; OSDOBY, P.; PYFFEROEN, J. et al. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.88, p.6613-7717, 1991.
- PACIFICI, R.; BROWN, C.; PUSCHECK, E. et al. Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.88, p.5134-5138, 1991.
- PAN, W.; QUARLES, L.D.; SONG, L.H. et al. Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J. Cell. Biochem.*, v.94, p.307-316, 2005.
- PANCIERA, D.L. Hypothyroidism in dogs: 66 cases (1987-1992). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.204, p.761-767, 1994.
- PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; QUARTO, N.; LONGAKER, M.T. Mesenchymal stem cells for skeletal tissue engineering. *Painminerva Med.*, v.51, p.25-41, 2009.
- PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; LEE, J.K. et al. Human adipose-derived stromal cells respond to and elaborate bone morphogenetic protein-2 during *in vitro* osteogenic differentiation. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.125, p.483-493, 2010.
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol.*, v.33, p.2-18, 2006.
- PEARCE, E.N. Thyroid dysfunction in perimenopausal and postmenopausal women. *Menopause Int.*, v.13, p.8-13, 2007.
- PENG, L.; JIA, Z.; YIN, X. et al. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev.*, v.17, p.761-774, 2008.
- PEPENE, C.E.; KASPERK, C.H.; PFEILSCHIFTER, J. et al. Effects of triiodothyronine on the insulin-like growth factor system in primary human osteoblastic cells *in vitro*. *Bone*, v.29, p.540-546, 2001.
- PEPENE, C.E.; SECK, T.; PFEILSCHIFTER, J. et al. The effects of triiodothyronine on human osteoblastic-like cells metabolism and interactions with growth hormone. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, v.111, p.66-72, 2003.

- PEPTAN, I.A.; HONG, L.; MAO, J.J. Comparison of osteogenic potentials of visceral and subcutaneous adipose-derived cells of rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.117, p.1462-1470, 2006.
- PHILLIPS, J.E.; GERSBACH, C.A.; WOJTOWICZ, A.M. et al. Glucocorticoid-induced osteogenesis is negatively regulated by Runx2/Cbfa1 serine phosphorylation. *J. Cell. Sci.*, v.119, p.581-591, 2006.
- PIEROTTI, S.; GANDINI, L.; LENZI, A. et al. Pre-receptorial regulation of steroid hormones in bone cells: insights on glucocorticoid-induced osteoporosis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.108, p.292-299, 2008.
- 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.
- PLANAT-BENARD, V.; SILVESTRE, J-S.; COUSIN, B. et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives. *Circulation*, v. 109, p. 656-663, 2004.
- POUNTOS, I.; GEORGOULI, T.; HENSHAW, K. et al. The effect of bone morphogenetic protein-2, bone morphogenetic protein-7, parathyroid hormone, and platelet-derived growth factor on the proliferation and osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from osteoporotic bone. *J. Orthop. Trauma*, v.24, p.552-556, 2010.
- PRESNELL S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell Dev. Biol.*, v.13, p.369-76, 2002.
- PROPHET, E.B.; MILLS, B.; ARRINGTON, J.B. et al. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington D. C.: Armed Forces Institute of Pathology, 1992. 278p.
- QU, Q.; PERÄLÄ-HEAPE, M.; KAPANEN, A. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, v.22, p.201-209, 1998.
- QU, C.Q.; ZHANG, G.H.; ZHANG, L.J. et al. Osteogenic and adipogenic potential of porcine adipose mesenchymal stem cells. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, v.43, p.95-100, 2007.
- RADA, T.; REIS, R.L.; GOMES, M.E. Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Eng.*, v.15, p.113-125, 2009.
- RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem.*, v.45, p.1353-1358, 1999.
- RAO, M.S. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev.*, v.13, p.452-455, 2004.
- RESTA, R.; THOMPSON, L.F. T cell signaling through CD73. *Cell. Signal.*, v.9, p.131-139, 1997.
- RIBEIRO, A.F.C.; SERAKIDES, R.; OCARINO, N. et al. Efeito da associação hipotireoidismo castração no osso e nas paratireóides de ratas adultas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.48, p.525-534, 2004.
- RICARDO, S.D.; DEANE, J.A. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology*, v.10, p.276-282, 2005.
- RICKARD, D.J.; KAZHDAN, I.; LEBOY, P.S. Importance of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the nonadherent cells of marrow for osteoblast differentiation from rat marrow stromal cells. *Bone*, v.16, p.671-678, 1995.

- RIGGS, B.L.; KHOSLA, S.; MELTON, L.J. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr. Rev.*, v.23, p.279-302, 2002.
- ROBERTS, C.G.P.; LADENSON, P.W. Hypothyroidism. *Lancet*, v.363, p.793-803, 2004.
- ROBINSON, J.A.; HARRIS, S.A.; RIGGS, B.L. et al. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, v.138, p.2919-2927, 1997.
- ROBSON, H.; SIEBLER, T.; STEVENS, D. A. et al. Thyroid hormone acts directly on growth plate chondrocytes to promote hypertrophic differentiation and inhibit clonal expansion and cell proliferation. *Endocrinology*, v.141, p.3887-3897, 2000.
- ROBLING, A.G.; CASTILLO, A.B.; TURNER, C.H. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, v.8, p.455-498, 2006.
- RODAN, S.B.; WESOLOWSKI, G.; THOMAS, K.A. et al. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on osteoblastic cells. *Connect. Tissue Res.*, v.20, p.283-288, 1989.
- RODRÍGUEZ, J.P.; MONTECINOS, L.; RÍOS, S. et al. Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients produce a type I collagen-deficient extracellular matrix favoring adipogenic differentiation. *J. Cell. Biochem.*, v.79, p.557-565, 2000.
- ROEBUCK, K.A.; FINNEGAN, A. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) gene expression. *J. Leukoc. Biol.*, v.66, p.876-888, 1999.
- ROMANOV, Y.A.; DAREVSKAYA, A.N.; MERZLIKINA, N.V. et al. Mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue: isolation, characterization, and differentiation potentialities. *Bull. Exp. Biol. Med.*, v.140, p.138-143, 2005.
- ROOBROUCK, V.D.; ULLOA-MONTOYA, F.; VERFAILLIE, C.M. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*, v.314, p.1937-1944, 2008.
- RYDÉN, M.; DICKER, A.; GÖTHERSTRÖM, C. et al. Functional characterization of human mesenchymal stem cell-derived adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.311, p.391-397, 2003.
- SAMMONS, J.; AHMED, N.; EL-SHEEMY, M. et al. The role of BMP-6, IL-6, and BMP-4 in mesenchymal stem cell-dependent bone development: effects on osteoblastic differentiation induced by parathyroid hormone and vitamin D3. *Stem Cells Dev.*, v.13, p.273-280, 2004.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998, 211p.
- SATO, Y.; ARAKI, H.; KATO, J. et al. Human mesenchymal stem cells xenografted directly to rat liver are differentiated into human hepatocytes without fusion. *Blood*, v.106, p.756-763, 2005.
- SCARLETT, J.M. Epidemiology of thyroid diseases of dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, v.24, p.477-486, 1994.
- SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells - basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, v.25, p.818-827, 2007.



- SCHINDLER, A.E. Thyroid function and postmenopause. *Gynecol. Endocrinol.*, v.17, p.79-85, 2003.
- SCHOUTENS, A.; LAURENT, E.; MARKOWICZ, E. et al. Serum triiodothyronine, bone turnover, and bone mass changes in euthyroid pre- and postmenopausal women. *Calcif. Tissue Int.*, v.49, p.95-100, 1991.
- SEGERS, O.; MUSCH, W.; SCHOORS, D.F. Early complications of radioiodine treatment for hyperthyroidism. *Acta Clin. Belg.*, v.48, p.253-258, 1993.
- SEIFI, S.; TABANDEH, M.R.; NAZIFI, S. et al. Regulation of adiponectin gene expression in adipose tissue by thyroid hormones. *J. Physiol. Biochem.*, 2011 (no prelo).
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F. et al. Relação tireóide-gônadas e níveis plasmáticos de fósforo, cálcio e fosfatase alcalina em ratas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.579-585, 2000a.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; NASCIMENTO, E.F. et al. Hipogonadismo e função tireoidiana em ratas hipertireóideas e eutireóideas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.52, p.571-578, 2000b.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; OCARINO, N.M. et al. Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.48, p. 875-884, 2004.
- SERAKIDES, R.; OCARINO, N.M.; MAGALHÃES, F.C. et al. Histomorfometria óssea de ratas hipertireóideas lactantes e não-lactantes. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.52, p.677-683, 2008.
- SHAFIEE, A.; SEYEDJAFARI, E.; SOLEIMANI, M. et al. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol. Lett.*, v.33, p.1257-1264, 2011.
- SHENFIELD, F.; PENNINGS, G.; SUREAU, C. et al. Stem cells. *Hum. Reprod.*, v.17, p.1409-1410, 2002.
- SHI, Y-Y.; NACAMULI, R.P.; SALIM, A. et al. The osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal cells is maintained with aging. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.116, p.1686-1696, 2005.
- SHIMIZU, H.; SHIMOMURA, Y.; NAKANISHI, Y. et al. Estrogen increases *in vivo* leptin production in rats and human subjects. *J. Endocrinol.*, v.154, p.285-292, 1997.
- SHOJI, T.; LI, M.; MIFUNE, Y. et al. Local transplantation of human multipotent adipose-derived stem cells accelerates fracture healing via enhanced osteogenesis and angiogenesis. *Lab. Invest.*, v.90, p.637-649, 2010.
- SIDDIQI, A.; BURRIN, J.M.; WOOD, D.F. et al. Tri-iodothyronine regulates the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *J. Endocrinol.*, v.157, p.453-461, 1998.
- SIDDIQI, A.; PARSONS, M.P.; LEWIS, J.L. et al. TR expression and function in human bone marrow stromal and osteoblast-like cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.87, p.906-914, 2002.
- SKILLINGTON, J.; CHOY, L.; DERYNCK, R. Bone morphogenetic protein and retinoic acid signaling cooperate to induce osteoblast differentiation of

- preadipocytes. *J. Cell Biol.*, v.159, p.135-146, 2002.
- SIMONET, W.S.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, v.89, p.309-319, 1997.
- SMEJKAL, G.B.; KAUL, C.A. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J. Histochem. Cytochem.*, v.49, p.1189-1190, 2001.
- SONG, H.Y.; JEON, E.S.; JUNG, J.S. et al. Oncostatin M induces proliferation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.37, p.2357-2365, 2005.
- SONG, H.W.; JEON, E.S.; KIM, J.I. et al. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.*, v.101, p.1238-1251, 2007.
- 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, p.126-131, 2011.
- SPANGRUDE, G. J.; HEIMFELD, S.; WEISSMAN, I. L. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*, v.241, p.58-62, 1988.
- SRIVASTAVA, S.; TORALDO, G.; WEITZMANN, M.N. et al. Estrogen decreases osteoclast formation by down-regulating receptor activator of NF-kappa B ligand (RANKL)-induced JNK activation. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.8836-8840. 2001.
- STENDERUP, K.; JUSTESEN, J.; CLAUSEN, C. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, v.33, p.919-926, 2003.
- STERN, P.H. Thyroid hormone and bone. In: Bilezikian, J.P.; Raisz, L.G.; Rodan, G.A. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press, 1996. p.521-532.
- SUWANWALAIKORN, S.; ONGPHIPHADHANAKUL, B.; BRAVERMAN, L.E. et al. Differential responses of femoral and vertebral bones to long-term excessive L-thyroxine administration in adult rats. *Eur. J. Endocrinol.*, v.134, p.655-659, 1996.
- SYED, E.; KHOSLA, S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biophys. Res. Commun.*, v.328, p.688-696, 2005.
- TAE, S.; LEE, S.; PARK, J. et al. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed. Mater.*, v.1, p.63-71, 2006.
- TASKIRAN, D.; EVREN, V. Stimulatory effect of 17 $\beta$ -estradiol on osteogenic differentiation potential of rat adipose tissue-derived stem cells. *Gen. Physiol. Biophys.*, v.30, p.167-174, 2011.
- TATE, M.L.K.; ADAMSON, J.R.; TAMI, A.E. et al. The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.36, p.1-8, 2004.
- THEOLEYRE, S.; WITTRANT, Y.; TAT, S.K. et al. The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.15, p.49-60, 2004.
- THOMAS, T.; GORI, F.; KHOSLA, S. et al. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*, v.140, p.1630-1638, 1999.

- THOMSON, J.A.; ITS KOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, S.S. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, v.282, p.1145-1147, 1998.
- TOCCI, A.; FORTE, L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. *Hematol. J.*, v.4, p.92-96, 2003.
- TOMA, J.G.; AKHAVAN, M.; FERNANDES, K.J. et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nat. Cell Biol.*, v.3, p.778-784, 2001.
- TOMKINSON, A.; GEVERS, E.F.; WIT, J.M. et al. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, p.1243-1250, 1998.
- TOYODA, M.; MATSUBARA, Y.; LIN, K. et al. Characterization and comparison of adipose tissue-derived cells from human subcutaneous and omental adipose tissues. *Cell Biochem. Funct.*, v.27, p.440-447, 2009.
- TROPEL, P.; NOËL, D.; PLATET, N. et al. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res.*, v.295, p.395-406, 2004.
- UELAND, T. GH/IGF-1 and bone resorption *in vivo* and *in vitro*. *Eur. J. Endocrinol.*, v.152, p.327-332, 2005.
- VALÉRIO, P.; PEREIRA, M.M.; GOES, A.M. et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials.*, v.25, p.2941-2948, 2004.
- VAN DE VEN, A.C.; ERDTSIECK, R.J. Changes of bone mineral density, quantitative ultrasound parameters and markers of bone turnover during treatment of hyperthyroidism. *Neth. J. Med.*, v.66, p.428-432, 2008.
- VANDERSCHUEREN, D.; BOONEN, S.; BOUILLON, R. Action of androgens versus estrogens in male skeletal homeostasis. *Bone*, v.23, p.391-394, 1998.
- VANDERSCHEREN, D.; VANDENPUT, L. Androgens and osteoporosis. *Andrologia*, v.32, p.125-130, 2000.
- VARGA, F.; RUMPLER, M.; KLAUSHOFER, K. Thyroid hormones increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3-E1. *FEBS Lett.*, v.345, p.67-70, 1994.
- VARGA, F.; RUMPLER, M.; LUEGMAYR, E. et al. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-fun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif. Tissue Int.*, v.61, p.404-411, 1997.
- VARGA, F.; SPITZER, S.; KLAUSHOFER, K. Triiodothyronine (T3) and 1,25-dihydroxyvitamin D3 (1,25 D3) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcif. Tissue Int.*, v.74, p.382-387, 2004.
- VIEIRA, N.M.; BRANDALISE, V.; ZUCCONI, E. et al. Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplant.*, v.19, p.279-289, 2010.
- WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v.116, p.639-648, 2004.
- WALSH, S.; JORDAN, G.R.; JEFFERISS, C. et al. High concentrations of dexamethasone suppress the proliferation

- but not the differentiation or further maturation of human osteoblast precursors *in vitro*: relevance to glucocorticoid-induced osteoporosis. *Rheumatology*, v.40, p.74-83, 2001.
- WALL, M.E.; BERNACKI, S.H.; LOBOA, E.G. Effects of serial passaging on the adipogenic and osteogenic differentiation potential of adipose-derived human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.*, v.13, p.1291-1298, 2007.
- WAN, D.C.; SHI, Y-Y.; NACAMULI, R.P. et al. Osteogenic differentiation of mouse adipose-derived adult stromal cells requires retinoic acid and bone morphogenetic protein receptor type IB signaling. *PNAS*, v.103, p.12335-12340, 2006.
- WANG, Q.; YU, J.; ZHAI, H. et al. Temporal expression of estrogen receptor alpha in rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.347, p.117-123, 2006a.
- WANG, Z.; GOH, J.; DE, S.D. et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng.*, v.12, p.1753-1761, 2006b.
- WANG, L.; ZHOU, X.; ZHOU, T. et al. Ecto-5'-nucleotidase promotes invasion, migration and adhesion of human breast cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v.134, p.365-372, 2008.
- WEI, S.; KITAURA, H.; ZHOU, P. et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.*, v.115, p.282-290, 2005.
- WEINZIERL, K.; HEMPRICH, A. FRERICH, B. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *J. Craniomaxillofac. Surg.*, v.34, p.466-471, 2006.
- WEISSMAN, I. L. Pluripotent stem cells. *Nature*. v.439, p.145-148, 2006.
- WEITZMANN, M.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J. Clin. Invest.*, v.116, p.1186-1194, 2006.
- WILKINS, J.N.; MAYER, S.E.; VANDERLAAN, W.P. The effects of hypothyroidism and 2,4-dinitrophenol on growth hormone synthesis. *Endocrinology*, v.95, p.1259-1267, 1974.
- WILLIAMS, G.R.; ROBSON, H.; SHALET, S.M. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J. Endocrinol.*, v.157, p.391-403, 1998.
- WINK, M.R.; TAMAJUSUKU, A.S.K.; BRAGANHOL, E. et al. Thyroid hormone upregulates ecto-5'-nucleotidase/CD73 in C6 rat glioma cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, v.205, p.107-114, 2003.
- WOLF, M.; INGBAR, S.H.; MOSES, A.C. Thyroid hormone and growth hormone interact to regulate insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid and circulating levels in the rat. *Endocrinology*, v.125, p.2905-2914, 1989.
- WOOD, K.J.; GOTO, R. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, v.93, p.1-10, 2012.
- WRONSKI, T.J.; LOWRY, P.L.; WALSH, C.C. et al. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.37, p.324-328, 1985.
- YEN, P.M. Physiological and molecular basis of thyroid hormone. *Physiol Rev.*, v.81, p.1097-1141, 2001.

- ZAMINY, A.; KASHANI, I.R.; BARBARESTANI, M. et al. Osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells from adipose tissue in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells: melatonin as a differentiation factor. *Iran. Biomed. J.*, v.12, p.133-141, 2008.
- ZHANG, W.; OU, G.; HAMRICK, M. et al. Age-related changes in the osteogenic differentiation potential of mouse bone marrow stromal Cells. *J. Bone Mine.r Res.*, v.23, p.1118-1128, 2008.
- ZHOU, S.; ZILBERMAN, Y.; WASSERMANN, K. et al. Estrogen modulates estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J. Cell. Biochem.*, v.81, p.144-55, 2001.
- ZHOU, S.; TURGEMAN, G.; HARRIS, S.E. et al. Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells. *Mol. Endocrinol.*, v.17, p.56-66, 2003.
- ZHOU, S.; GREENBERGER, J.S.; EPPERLY, M.W. et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*, v.7, p.335-343, 2008.
- ZHU, X.; LIU, T.; SONG, K. et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem. Funct.*, v. 26, p.664-675, 2008.
- ZHU, M.; KOHAN, E.; BRADLEY, J. et al. The effect of age on osteogenic, adipogenic and proliferative potential of female adipose-derived stem cells. *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, v.3, p.290-301, 2009.
- ZUK, P.A.; ZHU, M.; MIZUNO, H. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.*, v.7, p.211-228, 2001.
- ZUK, P.A.; ZHU, M.; ASHJIAN, P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell*, v.13, p.4279-4295, 2002.
- ZUK, P.; CHOU, Y.F.; MUSSANO, F. et al. Adipose-derived stem cells and BMP2: part 2. BMP2 may not influence the osteogenic fate of human adipose-derived stem cells. *Connect. Tissue Res.*, v.52, p.119-132, 2011.

## ANEXOS

### ANEXOS DO CAPÍTULO 2

Anexo 1. Média e desvio-padrão da concentração plasmática de T4 livre (ng/dl) em ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Variável         | Grupos       |              |              |              |               |              |
|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
|                  | Normal       | OVX          | Hipo não OVX | Hipo OVX     | Hiper não OVX | Hiper OVX    |
| T4 livre (ng/dl) | 1,70 ± 0,42D | 2,80 ± 0,75C | 0,03 ± 0,05E | 0,11 ± 0,03E | 4,18 ± 0,93B  | 5,43 ± 0,95A |

\*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 2. Média e desvio-padrão da porcentagem de osso trabecular nos ossos longos (fêmur e tíbia) de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Variável                  | Grupos         |                 |                 |               |                |                 |
|---------------------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|----------------|-----------------|
|                           | Normal         | OVX             | Hipo não OVX    | Hipo OVX      | Hiper não OVX  | Hiper OVX       |
| Tíbia proximal (epífise)  | 25,21 ± 7,63AB | 25,90 ± 5,23AB  | 28,49 ± 10,56AB | 17,19 ± 5,16B | 30,19 ± 8,51A  | 25,34 ± 5,79AB  |
| Tíbia proximal (metáfise) | 37,17 ± 6,99A  | 16,42 ± 10,30C  | 27,81 ± 6,51B   | 13,53 ± 5,09C | 39,56 ± 3,46A  | 18,49 ± 4,62C   |
| Fêmur distal (epífise)    | 37,21 ± 6,06A  | 28,90 ± 6,50ABC | 26,48 ± 2,83BC  | 23,35 ± 7,81C | 34,92 ± 4,96AB | 30,29 ± 3,81ABC |
| Fêmur distal (metáfise)   | 45,39 ± 9,14A  | 16,90 ± 1,63C   | 26,92 ± 7,20B   | 15,0 ± 6,72C  | 46,20 ± 6,92A  | 19,01 ± 5,98C   |

\*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

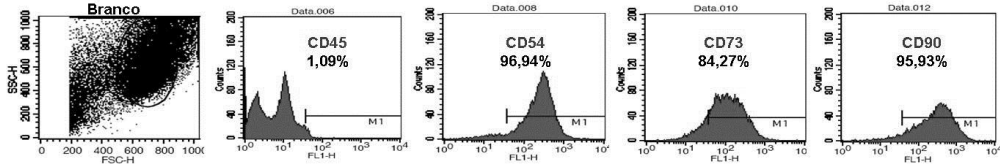
Anexo 3. Média e desvio-padrão da deflexão específica em tíbias de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Variável | Grupos       |              |              |               |               |              |
|----------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
|          | Normal       | OVX          | Hipo não OVX | Hipo OVX      | Hiper não OVX | Hiper OVX    |
| Deflexão | 5,72 ± 1,92A | 3,13 ± 0,76D | 2,75 ± 0,94D | 3,42 ± 1,14CD | 4,82 ± 0,74AB | 4,41 ± 0,6BC |

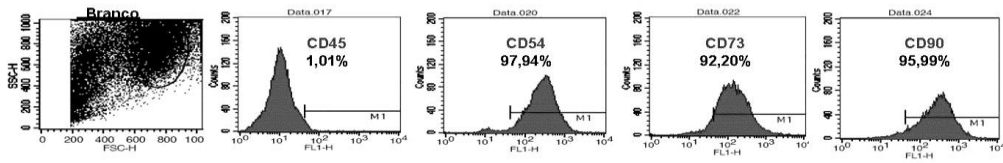
\*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 4. Expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 em CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas, e cultivadas em DMEM. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$  e o eixo y corresponde ao número de eventos avaliados. M1 demonstra o deslocamento da fluorescência positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$ .

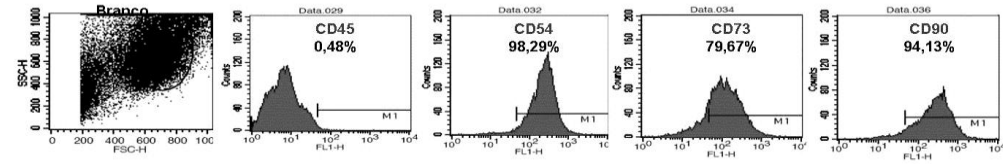
### Grupo normal



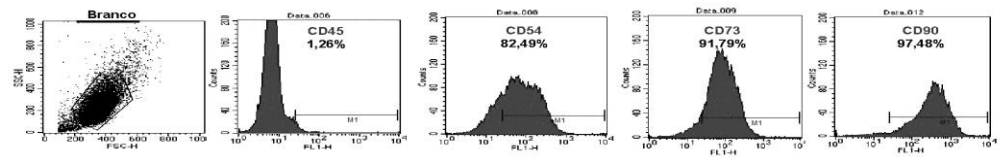
### Grupo ovariectomizado



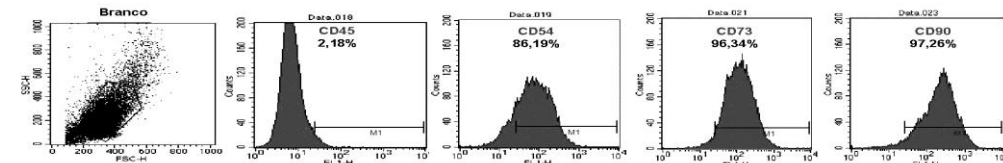
### Grupo hipotireóideo não ovariectomizado



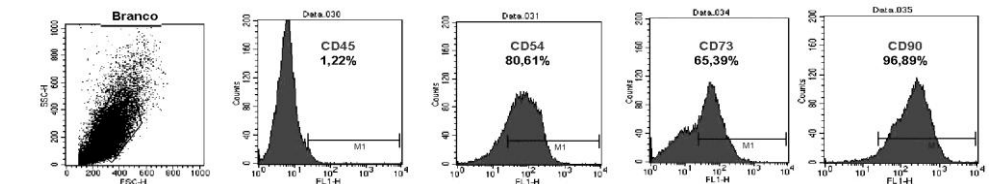
### Grupo hipotireóideo ovariectomizado



### Grupo hipertireóideo não ovariectomizado



### Grupo hipertireóideo ovariectomizado



Anexo 5. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Períodos de observação   | Grupos         |                |                |                 |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|----------------|
|                          | Normal         | OVX            | Hipo não OVX   | Hipo OVX        | Hiper não OVX  | Hiper OVX      |
| 7 dias de diferenciação  | 0,496± 0,025BC | 0,388 ± 0,014D | 0,521 ± 0,019B | 0,467 ± 0,006C  | 0,518 ± 0,004B | 0,597 ± 0,019A |
| 21 dias de diferenciação | 0,434± 0,015BC | 0,495 ± 0,021B | 0,372 ± 0,022C | 0,418 ± 0,071BC | 0,498 ± 0,047B | 0,646 ± 0,010A |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Anexo 6. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Períodos de observação   | Grupos         |                |                |                |                |                |
|--------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                          | Normal         | OVX            | Hipo não OVX   | Hipo OVX       | Hiper não OVX  | Hiper OVX      |
| 7 dias de diferenciação  | 0,023 ± 0,004C | 0,008 ± 0,002D | 0,052 ± 0,004B | 0,051 ± 0,003B | 0,056 ± 0,008B | 0,087 ± 0,011A |
| 21 dias de diferenciação | 0,065 ± 0,003B | 0,095±0,025AB  | 0,073 ± 0,007B | 0,066 ± 0,008B | 0,11 ± 0,011AB | 0,15 ± 0,067A  |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Anexo 7. Média e desvio-padrão do número de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Períodos de observação   | Grupos       |              |              |              |               |              |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
|                          | Normal       | OVX          | Hipo não OVX | Hipo OVX     | Hiper não OVX | Hiper OVX    |
| 7 dias de diferenciação  | 1,12 ± 0,39A | 0,14 ± 0,02C | 0,23 ± 0,04C | 0,18 ± 0,02C | 0,27 ± 0,08C  | 0,82 ± 0,14B |
| 21 dias de diferenciação | 2,81 ± 0,16A | 0,80 ± 0,23C | 1,15 ± 0,17C | 1,86 ± 0,24B | 2,40 ± 0,46A  | 2,41 ± 0,19A |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ).



Anexo 8. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM-MO nos grupos normal, ovariectomizado, hipotireóideo não ovariectomizado, hipotireóideo ovariectomizado, hipertireóideo não ovariectomizado e hipertireóideo ovariectomizado aos sete e 21 dias de diferenciação.

| Períodos de observação   | Grupos       |              |              |               |               |              |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|
|                          | Normal       | OVX          | Hipo não OVX | Hipo OVX      | Hiper não OVX | Hiper OVX    |
| 7 dias de diferenciação  | 0,49 ± 0,10A | 0,55 ± 0,08A | 0,17 ± 0,02B | 0,15 ± 0,001B | 0,59 ± 0,11A  | 0,16 ± 0,01B |
| 21 dias de diferenciação | 0,07 ± 0,01C | 0,53 ± 0,14A | 0,32 ± 0,03B | 0,09 ± 0,01C  | 0,01 ± 0,01C  | 0,06 ± 0,01C |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 9. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM-MO nos grupos normal, ovariectomizado, hipotireóideo não ovariectomizado, hipotireóideo ovariectomizado, hipertireóideo não ovariectomizado e hipertireóideo ovariectomizado aos sete e 21 dias de diferenciação.

| Períodos de observação   | Grupos       |               |               |               |               |              |
|--------------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
|                          | Normal       | OVX           | Hipo não OVX  | Hipo OVX      | Hiper não OVX | Hiper OVX    |
| 7 dias de diferenciação  | 0,30 ± 0,01B | 0,43 ± 0,02AB | 0,36 ± 0,04AB | 0,39 ± 0,09AB | 0,36 ± 0,09AB | 0,47 ± 0,06A |
| 21 dias de diferenciação | 0,14 ± 0,01A | 0,20 ± 0,04A  | 0,23 ± 0,06A  | 0,18 ± 0,05A  | 0,16 ± 0,08A  | 0,13 ± 0,01A |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 10. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para sialoproteína óssea em culturas de CTM-MO nos grupos normal, ovariectomizado, hipotireóideo não ovariectomizado, hipotireóideo ovariectomizado, hipertireóideo não ovariectomizado e hipertireóideo ovariectomizado aos sete e 21 dias de diferenciação.

| Períodos de observação   | Grupos         |                |                 |                |                 |               |
|--------------------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|---------------|
|                          | Normal         | OVX            | Hipo não OVX    | Hipo OVX       | Hiper não OVX   | Hiper OVX     |
| 7 dias de diferenciação  | 0,013 ± 0,003B | 0,038 ± 0,02AB | 0,055 ± 0,008AB | 0,012 ± 0,007B | 0,027 ± 0,013AB | 0,093 ± 0,06A |
| 21 dias de diferenciação | 0,023 ± 0,02A  | 0,61 ± 0,74A   | 0,10 ± 0,04A    | 0,13 ± 0,04A   | 0,03 ± 0,01A    | 2,45 ± 2,15A  |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 11. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM-MO nos grupos normal, ovariectomizado, hipotireóideo não ovariectomizado, hipotireóideo ovariectomizado, hipertireóideo não ovariectomizado e hipertireóideo ovariectomizado aos sete e 21 dias de diferenciação.

| Períodos de observação   | Grupos       |              |              |              |               |              |
|--------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|
|                          | Normal       | OVX          | Hipo não OVX | Hipo OVX     | Hiper não OVX | Hiper OVX    |
| 7 dias de diferenciação  | 4,32 ± 0,89B | 2,53 ± 0,41C | 2,41 ± 0,74C | 2,15 ± 0,03C | 0,76 ± 0,31D  | 7,15 ± 0,41A |
| 21 dias de diferenciação | 4,48 ± 0,20A | 1,25 ± 0,44B | 2,42 ± 0,46B | 5,55 ± 1,64A | 1,55 ± 0,09B  | 5,10 ± 0,74A |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 12. Análise de variância da concentração plasmática de T4 livre (ng/dl) em ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 81                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 59,708         | 129,72  | 0,0001        |
| Erro               | 76                 | 0,4603         | -       | -             |

Anexo 13. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise da tíbia proximal de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 37                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 138,30         | 2,533   | 0,0485        |
| Erro               | 32                 | 54,603         | -       | -             |

Anexo 14. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise da tíbia proximal de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 37                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 804,81         | 19,496  | 0,0001        |
| Erro               | 32                 | 41,281         | -       | -             |

Anexo 15. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise do fêmur distal de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 38                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 174,29         | 5,553   | 0,0008        |
| Erro               | 33                 | 31,386         | -       | -             |

Anexo 16. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise do fêmur distal de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 38                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 1325,8         | 29,912  | 0,0001        |
| Erro               | 33                 | 44,322         | -       |               |

Anexo 17. Análise de variância da deflexão específica em tíbias de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 62                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 13,928         | 11,035  | 0,0001        |
| Erro               | 57                 | 1,262          | -       |               |

Anexo 18. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,01420        | 52,299  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 0,0002715      | -       |               |

Anexo 19. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,02746        | 19,443  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 0,001412       | -       |               |

Anexo 20. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,002279       | 59,237  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 3,847          | -       |               |

Anexo 21. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,003262       | 3,677   | 0,0300        |
| Erro               | 12                 | 0,0008870      | -       |               |

Anexo 22. Análise de variância do número médio de nódulos de mineralização por campo aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 24                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,7477         | 21,179  | 0,0001        |
| Erro               | 19                 | 0,03530        | -       |               |

Anexo 23. Análise de variância do número médio de nódulos de mineralização por campo aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 28                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 2,699          | 37,788  | 0,0001        |
| Erro               | 23                 | 0,07143        | -       |               |

Anexo 24. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,1371         | 28,212  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 0,004861       | -       |               |

Anexo 25. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,1207         | 37,150  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 0,003250       | -       |               |

Anexo 26. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,01067        | 2,854   | 0,0634        |
| Erro               | 12                 | 0,003739       | -       |               |

Anexo 27. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,003827       | 1,636   | 0,2244        |
| Erro               | 12                 | 0,002339       | -       |               |

Anexo 28. Análise de variância do transcrito gênico para sialoproteína óssea aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 0,002826       | 3,566   | 0,0330        |
| Erro               | 12                 | 0,0007926      | -       |               |

Anexo 29. Análise de variância do transcrito gênico para sialoproteína óssea aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 2,720          | 3,145   | 0,0482        |
| Erro               | 12                 | 0,8647         | -       |               |

Anexo 30. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 14,977         | 50,715  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 0,2953         | -       |               |

Anexo 31. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas adultas eutireóideas e com disfunções tireoidianas ovariectomizadas ou não ovariectomizadas em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 17                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 5                  | 10,619         | 17,306  | 0,0001        |
| Erro               | 12                 | 0,6136         | -       |               |

### ANEXOS DO CAPÍTULO 3

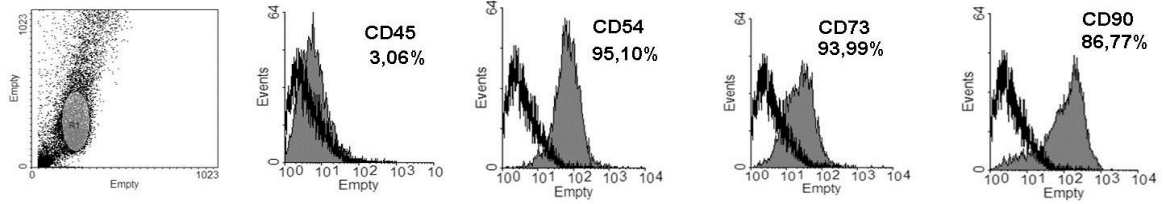
Anexo 32. Média e desvio-padrão da porcentagem de osso trabecular nos ossos longos (fêmur e tibia) de ratas normais ou com osteoporose.

| Variável                  | Grupos        |                 |
|---------------------------|---------------|-----------------|
|                           | Normal        | Ovariectomizado |
| Tibia proximal (epífise)  | 46,17 ± 7,35A | 21,87 ± 9,99B   |
| Tibia proximal (metáfise) | 46,12 ± 9,66A | 15,61 ± 6,17B   |
| Fêmur distal (epífise)    | 51,71 ± 7,84A | 23,84 ± 3,54B   |
| Fêmur distal (metáfise)   | 51,45 ± 5,25A | 19,51 ± 6,12B   |

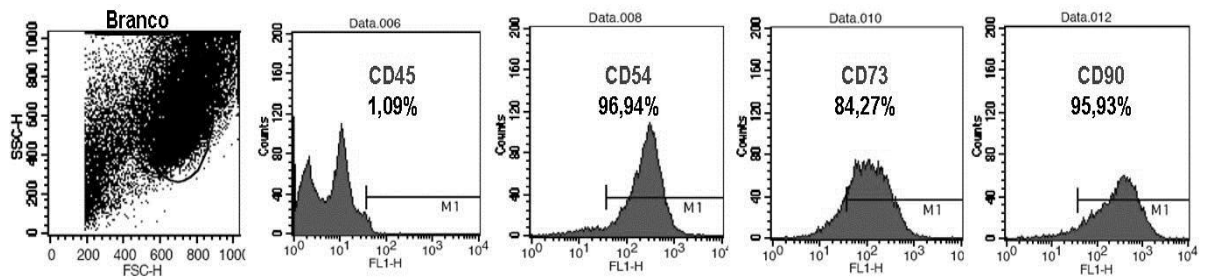
\*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 33. Expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 em CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose cultivadas em DMEM. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$  e o eixo y corresponde ao número de eventos avaliados. M1 demonstra o deslocamento da fluorescência positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$ .

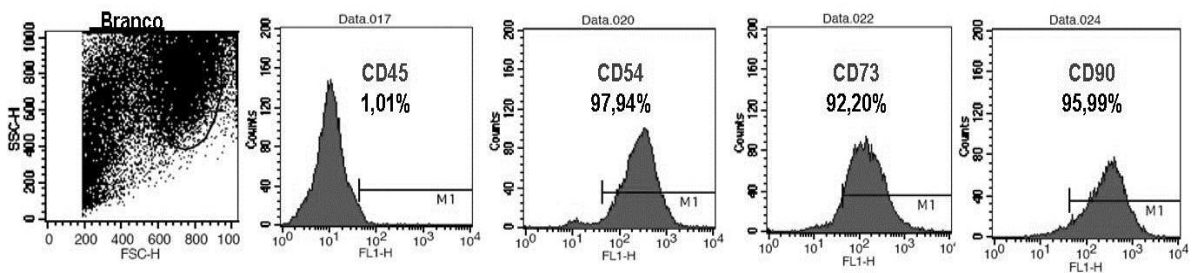
### Grupo jovem normal



### Grupo adulto normal



### Grupo adulto ovariectomizado



Anexo 34. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,328 ± 0,028D                | 0,445 ± 0,045A           | 0,561 ± 0,024A           |
| Adulto normal     | 0,441 ± 0,016B                | 0,373 ± 0,032A           | 0,390 ± 0,029B           |
| Adulto OVX        | 0,412 ± 0,030C                | 0,438 ± 0,056A           | 0,405 ± 0,030B           |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,300 ± 0,013D                | 0,406 ± 0,008A           | 0,380 ± 0,039B           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,507 ± 0,017A                | 0,427 ± 0,045A           | 0,569 ± 0,058A           |
| Adulto OVX 100nM  | 0,310 ± 0,017D                | 0,409 ± 0,060A           | 0,450 ± 0,055B           |
| Adulto OVX 1000nM | 0,295 ± 0,034D                | 0,420 ± 0,010A           | 0,370 ± 0,036B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 35. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,155 ± 0,020A                | 0,210 ± 0,041A           | 0,162 ± 0,025A           |
| Adulto normal     | 0,047 ± 0,004C                | 0,073 ± 0,006CD          | 0,095 ± 0,012BCD         |
| Adulto OVX        | 0,069 ± 0,007B                | 0,100 ± 0,015BC          | 0,094 ± 0,010BCD         |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,066 ± 0,005B                | 0,107 ± 0,011B           | 0,111 ± 0,007B           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,044 ± 0,008C                | 0,055 ± 0,009D           | 0,086 ± 0,011CD          |
| Adulto OVX 100nM  | 0,068 ± 0,005B                | 0,084 ± 0,016BCD         | 0,094 ± 0,007BCD         |
| Adulto OVX 1000nM | 0,060 ± 0,007B                | 0,114 ± 0,004B           | 0,085 ± 0,009D           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).



Anexo 36. Média e desvio-padrão da porcentagem de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Período de observação    |
|-------------------|--------------------------|
|                   | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 2,70 ± 0,29A             |
| Adulto normal     | 2,05 ± 0,53B             |
| Adulto OVX        | 1,02 ± 0,14C             |
| Adulto OVX 0,01nM | 1,45 ± 0,31B             |
| Adulto OVX 1nM    | 1,27 ± 0,39C             |
| Adulto OVX 100nM  | 1,32 ± 0,34C             |
| Adulto OVX 1000nM | 1,84 ± 0,37B             |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 37. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Períodos de observação  |                          |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 5,774 ± 0,609A          | 1,440 ± 0,084A           | 3,349 ± 1,806A           |
| Adulto normal     | 1,490 ± 0,314BC         | 0,709 ± 0,075B           | 0,165 ± 0,070B           |
| Adulto OVX        | 1,325 ± 0,254BC         | 0,422 ± 0,029C           | 0,494 ± 0,082B           |
| Adulto OVX 0,01nM | 1,636 ± 0,142BC         | 0,813 ± 0,022B           | 0,266 ± 0,062B           |
| Adulto OVX 1nM    | 1,940 ± 0,008B          | 0,688 ± 0,101B           | 0,197 ± 0,046B           |
| Adulto OVX 100nM  | 0,403 ± 0,015D          | 0,497 ± 0,079C           | 0,277 ± 0,017B           |
| Adulto OVX 1000nM | 1,170 ± 0,282C          | 1,485 ± 0,055A           | 0,343 ± 0,003B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 38. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,990 ± 0,226A                | 0,311 ± 0,158A           | 0,684 ± 0,094A           |
| Adulto normal     | 0,677 ± 0,447A                | 0,236 ± 0,052A           | 0,335 ± 0,141A           |
| Adulto OVX        | 0,454 ± 0,285A                | 0,166 ± 0,020A           | 0,480 ± 0,366A           |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,226 ± 0,094A                | 0,296 ± 0,129A           | 0,096 ± 0,031A           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,479 ± 0,134A                | 0,181 ± 0,097A           | 0,339 ± 0,109A           |
| Adulto OVX 100nM  | 0,565 ± 0,352A                | 0,141 ± 0,017A           | 0,610 ± 0,453A           |
| Adulto OVX 1000nM | 0,311 ± 0,129A                | 0,263 ± 0,049A           | 0,093 ± 0,048A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 39. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para sialoproteína óssea em culturas de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 8,076 ± 1,153A                | 8,876 ± 2,602A           | 30,770 ± 1,572A          |
| Adulto normal     | 1,501 ± 0,743B                | 0,323 ± 0,030B           | 0,133 ± 0,023B           |
| Adulto OVX        | 1,786 ± 0,565B                | 0,674 ± 0,040B           | 0,063 ± 0,015B           |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,038 ± 0,024C                | 0,312 ± 0,123B           | 0,076 ± 0,026B           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,040 ± 0,011C                | 0,735 ± 0,174B           | 0,348 ± 0,047B           |
| Adulto OVX 100nM  | 2,179 ± 0,747B                | 0,830 ± 0,092B           | 0,334 ± 0,032B           |
| Adulto OVX 1000nM | 0,119 ± 0,012C                | 0,354 ± 0,121B           | 0,355 ± 0,006B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 40. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 11,395 ± 0,326A               | 3,503 ± 1,070C           | 6,261 ± 0,955CD          |
| Adulto normal     | 5,864 ± 0,841B                | 10,175 ± 0,516A          | 11,138 ± 2,162A          |
| Adulto OVX        | 3,937 ± 0,395CD               | 5,990 ± 0,666B           | 3,297 ± 0,762E           |
| Adulto OVX 0,01nM | 2,972 ± 0,302D                | 4,464 ± 1,167B           | 2,152 ± 0,191E           |
| Adulto OVX 1nM    | 3,186 ± 0,358D                | 5,872 ± 1,440B           | 7,428 ± 0,758BC          |
| Adulto OVX 100nM  | 4,274 ± 0,869C                | 5,740 ± 0,796B           | 9,524 ± 1,723AB          |
| Adulto OVX 1000nM | 2,047 ± 0,253E                | 4,166 ± 0,361BC          | 4,039 ± 1,354DE          |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 41. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 em culturas de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,352 ± 0,047A                | 0,191 ± 0,125D           | 1,429 ± 0,584A           |
| Adulto normal     | 0,761 ± 0,530A                | 0,616 ± 0,063BC          | 0,585 ± 0,354B           |
| Adulto OVX        | 0,777 ± 0,425A                | 0,384 ± 0,119CD          | 1,163 ± 0,011AB          |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,524 ± 0,175A                | 0,997 ± 0,252A           | 0,556 ± 0,063B           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,661 ± 0,134A                | 0,743 ± 0,081AB          | 0,691 ± 0,211AB          |
| Adulto OVX 100nM  | 0,838 ± 0,513A                | 0,725 ± 0,099AB          | 0,429 ± 0,285B           |
| Adulto OVX 1000nM | 0,672 ± 0,226A                | 0,355 ± 0,117CD          | 0,901 ± 0,317AB          |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 42. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise da tíbia proximal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 1574,6400      | 18,29   | 0,0016        |
| Erro               | 11                 | 86,0880        | -       |               |

Anexo 43. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise da tíbia proximal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 2469,2930      | 45,01   | 0,0001        |
| Erro               | 11                 | 54,8584        | -       |               |

Anexo 44. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise do fêmur distal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 2385,1598      | 78,55   | 0,0001        |
| Erro               | 11                 | 30,3657        | -       |               |

Anexo 45. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise do fêmur distal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 3137,5891      | 92,70   | 0,0001        |
| Erro               | 11                 | 33,8472        | -       |               |

Anexo 46. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 41                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,04135        | 75,404  | 0,0001        |
| Erro               | 35                 | 0,0005484      | -       |               |

Anexo 47. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 35                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,002925       | 1,860   | 0,1222        |
| Erro               | 29                 | 0,001573       | -       |               |

Anexo 48. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 35                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,04242        | 21,454  | 0,0001        |
| Erro               | 29                 | 0,001977       | -       |               |

Anexo 49. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 41                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,008407       | 92,812  | 0,0001        |
| Erro               | 35                 | 0,003170       | -       |               |

Anexo 50. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 37                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,01364        | 53,947  | 0,0001        |
| Erro               | 31                 | 0,0003794      | -       |               |

Anexo 51. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 35                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,004311       | 23,335  | 0,0001        |
| Erro               | 29                 | 0,0001847      | -       |               |

Anexo 52. Análise de variância da porcentagem de nódulos de mineralização/campo aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 45                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 10,579         | 50,224  | 0,0001        |
| Erro               | 39                 | 0,2106         | -       |               |

Anexo 53. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 8,690          | 19,016  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,4570         | -       |               |

Anexo 54. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,4553         | 8,676   | 0,0005        |
| Erro               | 14                 | 0,05248        | -       |               |

Anexo 55. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 4,032          | 8,276   | 0,0006        |
| Erro               | 14                 | 0,4872         | -       |               |

Anexo 56. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,1917         | 1,789   | 0,1733        |
| Erro               | 14                 | 0,1072         | -       |               |

Anexo 57. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,01043        | 1,535   | 0,2378        |
| Erro               | 14                 | 0,006795       | -       |               |

Anexo 58. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,1609         | 2,939   | 0,0452        |
| Erro               | 14                 | 0,05474        | -       |               |

Anexo 59. Análise de variância do transcrito gênico para sialoproteína óssea aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 24,085         | 60,868  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,3957         | -       |               |

Anexo 60. Análise de variância do transcrito gênico para sialoproteína óssea aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 19,950         | 9,083   | 0,0004        |
| Erro               | 14                 | 2,197          | -       |               |

Anexo 61. Análise de variância do transcrito gênico para sialoproteína óssea aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 479,94         | 77,462  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 6,196          | -       |               |

Anexo 62. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 22                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 30,361         | 48,325  | 0,0001        |
| Erro               | 16                 | 0,6283         | -       |               |

Anexo 63. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 26                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 26,030         | 10,645  | 0,0001        |
| Erro               | 20                 | 2,445          | -       |               |

Anexo 64. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,3386         | 6,126   | 0,0025        |
| Erro               | 14                 | 0,05528        | -       |               |

Anexo 65. Análise de variância do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,5071         | 0,7152  | 0,6438        |
| Erro               | 14                 | 1,654          | -       |               |

Anexo 66. Análise de variância do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 1,388          | 12,706  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,2549         | -       |               |



Anexo 67. Análise de variância do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-MO de ratas normais ou com osteoporose tratadas com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 2,372          | 3,967   | 0,0158        |
| Erro               | 14                 | 1,395          | -       |               |

#### ANEXOS DO CAPÍTULO 4

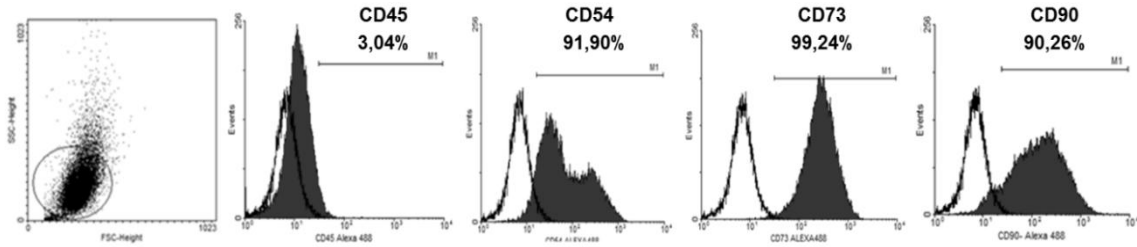
Anexo 68. Média e desvio-padrão da porcentagem de osso trabecular nos ossos longos (fêmur e tíbia) de ratas normais ou com osteoporose.

| Variável                  | Grupos        |                 |
|---------------------------|---------------|-----------------|
|                           | Normal        | Ovariectomizado |
| Tíbia proximal (epífise)  | 46,17 ± 7,35A | 21,87 ± 9,99B   |
| Tíbia proximal (metáfise) | 46,12 ± 9,66A | 15,61 ± 6,17B   |
| Fêmur distal (epífise)    | 51,71 ± 7,84A | 23,84 ± 3,54B   |
| Fêmur distal (metáfise)   | 51,45 ± 5,25A | 19,51 ± 6,12B   |

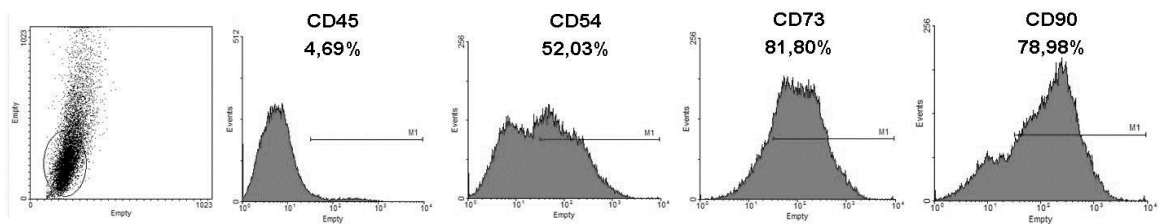
\*Médias seguidas de mesma letra na linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 69. Expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 em CTM-TA de ratas jovens e adultas com e sem osteoporose, e cultivadas em DMEM. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$  e o eixo y corresponde ao número de eventos avaliados. M1 demonstra o deslocamento da fluorescência positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$ .

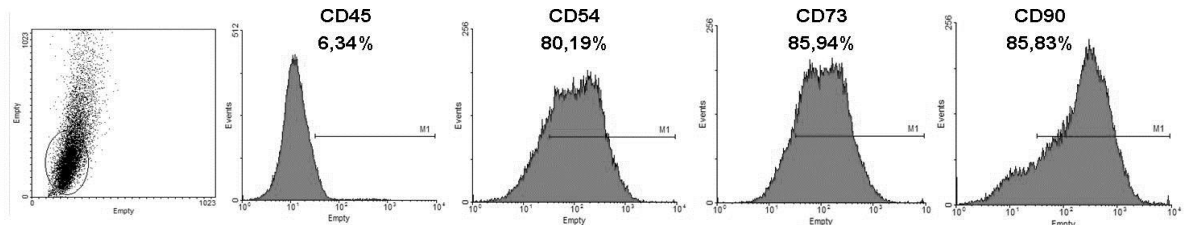
### Grupo jovem normal



### Grupo adulto normal



### Grupo adulto ovariectomizado



Anexo 70. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,731 ± 0,027A                | 0,795 ± 0,013A           | 0,834 ± 0,075A           |
| Adulto normal     | 0,464 ± 0,091B                | 0,489 ± 0,050B           | 0,737 ± 0,127B           |
| Adulto OVX        | 0,294 ± 0,018C                | 0,385 ± 0,021C           | 0,677 ± 0,079B           |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,288 ± 0,018C                | 0,300 ± 0,024E           | 0,523 ± 0,049C           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,310 ± 0,016C                | 0,329 ± 0,018DE          | 0,501 ± 0,065C           |
| Adulto OVX 100nM  | 0,261 ± 0,043C                | 0,358 ± 0,040CD          | 0,652 ± 0,083B           |
| Adulto OVX 1000nM | 0,283 ± 0,024C                | 0,344 ± 0,013CD          | 0,556 ± 0,044C           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 71. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,120 ± 0,006A                | 0,125 ± 0,009A           | 0,159 ± 0,017A           |
| Adulto normal     | 0,075 ± 0,007B                | 0,068 ± 0,012B           | 0,103 ± 0,015BCD         |
| Adulto OVX        | 0,051 ± 0,008C                | 0,060 ± 0,005BC          | 0,111 ± 0,008BC          |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,055 ± 0,004C                | 0,061 ± 0,002BC          | 0,096 ± 0,012CD          |
| Adulto OVX 1nM    | 0,048 ± 0,005C                | 0,053 ± 0,006C           | 0,090 ± 0,012D           |
| Adulto OVX 100nM  | 0,056 ± 0,005C                | 0,062 ± 0,008BC          | 0,110 ± 0,007BC          |
| Adulto OVX 1000nM | 0,047 ± 0,006C                | 0,065 ± 0,006BC          | 0,126 ± 0,013B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 72. Média e desvio-padrão da porcentagem de células/campo em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Período de observação    |
|-------------------|--------------------------|
|                   | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 90,36 ± 2,14A            |
| Adulto normal     | 75,39 ± 14,45B           |
| Adulto OVX        | 64,11 ± 8,46C            |
| Adulto OVX 0,01nM | 50,08 ± 1,97D            |
| Adulto OVX 1nM    | 58,76 ± 4,82CD           |
| Adulto OVX 100nM  | 61,58 ± 3,39CD           |
| Adulto OVX 1000nM | 49,32 ± 7,29D            |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 73. Média e desvio-padrão da porcentagem de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Períodos de observação  |                          |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 1,05 ± 0,11A            | 3,07 ± 0,55A             | 6,07 ± 0,86A             |
| Adulto normal     | 0,77 ± 0,19B            | 2,07 ± 0,40B             | 1,60 ± 0,32B             |
| Adulto OVX        | 0,22 ± 0,09C            | 0,49 ± 0,27C             | 1,64 ± 0,46B             |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,17 ± 0,02C            | 0,57 ± 0,12C             | 1,07 ± 0,42B             |
| Adulto OVX 1nM    | 0,28 ± 0,20C            | 0,53 ± 0,15C             | 1,28 ± 0,64B             |
| Adulto OVX 100nM  | 0,13 ± 0,08C            | 0,45 ± 0,16C             | 1,40 ± 0,68B             |
| Adulto OVX 1000nM | 0,25 ± 0,04C            | 0,38 ± 0,09C             | 1,14 ± 0,67B             |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 74. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 6,001 ± 1,253C                | 2,100 ± 0,290ABC         | 1,164 ± 0,106A           |
| Adulto normal     | 5,466 ± 0,461C                | 0,834 ± 0,354C           | 0,969 ± 0,302A           |
| Adulto OVX        | 16,027 ± 2,310AB              | 2,994 ± 0,725A           | 1,403 ± 0,151A           |
| Adulto OVX 0,01nM | 14,345 ± 1,009B               | 1,627 ± 0,064BC          | 1,207 ± 0,878A           |
| Adulto OVX 1nM    | 19,105 ± 2,937A               | 2,821 ± 0,366AB          | 1,149 ± 0,641A           |
| Adulto OVX 100nM  | 14,148 ± 0,978B               | 3,100 ± 0,751A           | 0,971 ± 0,188A           |
| Adulto OVX 1000nM | 16,600 ± 1,734AB              | 1,557 ± 0,791BC          | 0,712 ± 0,193A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 75. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,228 ± 0,089C                | 0,307 ± 0,130A           | 0,078 ± 0,052A           |
| Adulto normal     | 0,226 ± 0,031C                | 0,139 ± 0,073A           | 0,155 ± 0,034A           |
| Adulto OVX        | 0,354 ± 0,057BC               | 0,253 ± 0,044A           | 0,138 ± 0,010A           |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,518 ± 0,076A                | 0,382 ± 0,259A           | 0,174 ± 0,083A           |
| Adulto OVX 1nM    | 0,393 ± 0,043B                | 0,225 ± 0,056A           | 0,194 ± 0,109A           |
| Adulto OVX 100nM  | 0,384 ± 0,046BC               | 0,229 ± 0,063A           | 0,120 ± 0,006A           |
| Adulto OVX 1000nM | 0,319 ± 0,071BC               | 0,319 ± 0,146A           | 0,074 ± 0,045A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 76. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Períodos de observação  |                          |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 10,684 ± 0,745A         | 10,161 ± 1,608A          | 5,848 ± 2,790A           |
| Adulto normal     | 0,327 ± 0,008C          | 0,124 ± 0,032B           | 0,061 ± 0,046B           |
| Adulto OVX        | 2,495 ± 0,215B          | 1,027 ± 1,171B           | 1,079 ± 0,058B           |
| Adulto OVX 0,01nM | 2,105 ± 0,341B          | 0,722 ± 0,028B           | 0,755 ± 0,545B           |
| Adulto OVX 1nM    | 2,377 ± 0,218B          | 0,955 ± 0,071B           | 0,431 ± 0,012B           |
| Adulto OVX 100nM  | 2,407 ± 0,058B          | 1,102 ± 0,311B           | 1,180 ± 0,282B           |
| Adulto OVX 1000nM | 2,408 ± 0,101B          | 1,157 ± 0,245B           | 0,680 ± 0,587B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 77. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 em culturas de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Períodos de observação  |                          |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| Jovem normal      | 0,220 ± 0,035C          | 0,572 ± 0,061B           | 0,198 ± 0,111B           |
| Adulto normal     | 2,256 ± 0,440A          | 2,651 ± 0,484A           | 1,521 ± 0,477A           |
| Adulto OVX        | 0,786 ± 0,194B          | 0,882 ± 0,083B           | 1,426 ± 0,983AB          |
| Adulto OVX 0,01nM | 0,679 ± 0,072BC         | 0,336 ± 0,059B           | 0,689 ± 0,468AB          |
| Adulto OVX 1nM    | 0,627 ± 0,053BC         | 0,934 ± 0,460B           | 0,605 ± 0,236AB          |
| Adulto OVX 100nM  | 0,700 ± 0,114B          | 1,156 ± 0,150B           | 0,718 ± 0,213AB          |
| Adulto OVX 1000nM | 0,549 ± 0,040BC         | 1,088 ± 0,215B           | 0,497 ± 0,156AB          |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 78. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise da tíbia proximal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 1574,6400      | 18,29   | 0,0016        |
| Erro               | 11                 | 86,0880        | -       |               |

Anexo 79. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise da tíbia proximal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 2469,2930      | 45,01   | 0,0001        |
| Erro               | 11                 | 54,8584        | -       |               |

Anexo 80. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise do fêmur distal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 2385,1598      | 78,55   | 0,0001        |
| Erro               | 11                 | 30,3657        | -       |               |

Anexo 81. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise do fêmur distal de ratas normais ou com osteoporose.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 12                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 1                  | 3137,5891      | 92,70   | 0,0001        |
| Erro               | 11                 | 33,8472        | -       |               |

Anexo 82. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 41                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,1744         | 98,895  | 0,0002        |
| Erro               | 35                 | 0,001764       | -       |               |

Anexo 83. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 39                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 1,049          | 205,89  | 0,0001        |
| Erro               | 33                 | 0,02802        | -       |               |

Anexo 84. Análise de variância da conversão do MTT em cristais de formazan aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 39                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,08759        | 15,618  | 0,4408        |
| Erro               | 33                 | 0,005608       | -       |               |

Anexo 85. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 41                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,004134       | 109,88  | 0,9142        |
| Erro               | 35                 | 3,762          | -       |               |

Anexo 86. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 39                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,02153        | 61,095  | 0,0001        |
| Erro               | 33                 | 0,001938       | -       |               |

Anexo 87. Análise de variância da atividade da fosfatase alcalina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 38                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,003186       | 20,926  | 0,0001        |
| Erro               | 32                 | 0,0001522      | -       |               |

Anexo 88. Análise de variância da porcentagem de células/campo aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 30                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 1057,5         | 20,974  | 0,0001        |
| Erro               | 24                 | 50,421         | -       |               |



Anexo 89. Análise de variância da porcentagem de nódulos de mineralização/campo aos 7 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 26                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,5626         | 24,712  | 0,0001        |
| Erro               | 20                 | 0,02276        | -       |               |

Anexo 90. Análise de variância da porcentagem de nódulos de mineralização/campo aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 35                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 6,243          | 65,904  | 0,0001        |
| Erro               | 29                 | 0,09472        | -       |               |

Anexo 91. Análise de variância da porcentagem de nódulos de mineralização/campo aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 41                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 19,365         | 52,927  | 0,4352        |
| Erro               | 35                 | 0,3659         | -       |               |

Anexo 92. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 84,099         | 28,398  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 2,961          | -       |               |

Anexo 93. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 2,212          | 7,501   | 0,0010        |
| Erro               | 14                 | 0,2949         | -       |               |

Anexo 94. Análise de variância do transcrito gênico para colágeno I aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,1459         | 0,7403  | 0,6263        |
| Erro               | 14                 | 0,1971         | -       |               |

Anexo 95. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,3386         | 6,126   | 0,0025        |
| Erro               | 14                 | 0,005528       | -       |               |

Anexo 96. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,01870        | 1,088   | 0,4155        |
| Erro               | 14                 | 0,2405         | -       |               |

Anexo 97. Análise de variância do transcrito gênico para osteocalcina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,006270       | 1,764   | 0,1788        |
| Erro               | 14                 | 0,003554       | -       |               |

Anexo 98. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 33,938         | 305,16  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,1112         | -       |               |

Anexo 99. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 37,546         | 94,568  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,3970         | -       |               |

Anexo 100. Análise de variância do transcrito gênico para osteopontina aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 11,797         | 9,700   | 0,0003        |
| Erro               | 14                 | 1,216          | -       |               |

Anexo 101. Análise de variância do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 aos sete dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 1,284          | 35,140  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,03653        | -       |               |

Anexo 102. Análise de variância do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 aos 14 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 1,673          | 22,126  | 0,0001        |
| Erro               | 14                 | 0,07560        | -       |               |

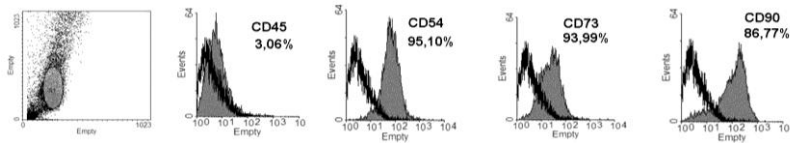
Anexo 103. Análise de variância do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 aos 21 dias de diferenciação em cultura de CTM-TA de ratas jovens e adultas sem osteoporose e ratas adultas com osteoporose tratadas ou não com triiodotironina em meio de diferenciação osteogênico.

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total              | 20                 | -              | -       | -             |
| Grupo              | 6                  | 0,7115         | 3,211   | 0,0338        |
| Erro               | 14                 | 0,2216         | -       |               |

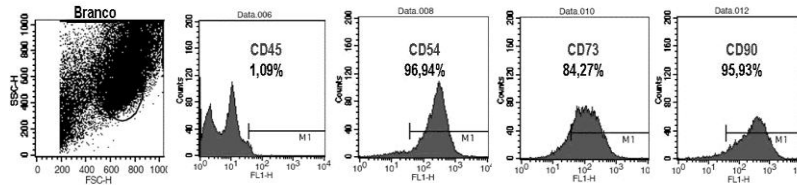
## ANEXOS DO CAPÍTULO 5

Anexo 104. Expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 em CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens e adultas cultivadas em DMEM. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$  e o eixo y corresponde ao número de eventos avaliados. M1 demonstra o deslocamento da fluorescência positiva quando o pico de células está acima de  $10^1$ .

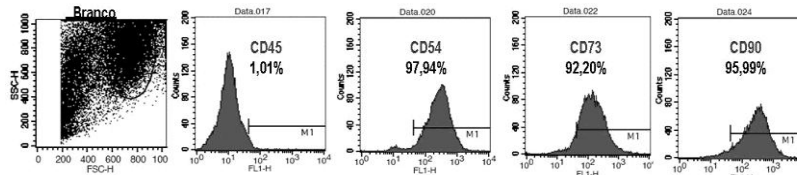
### Grupo CTM-MO Jovem (1 mês de idade)



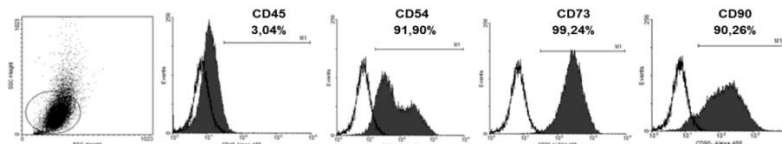
### Grupo CTM-MO Adulto saudável (5 meses de idade)



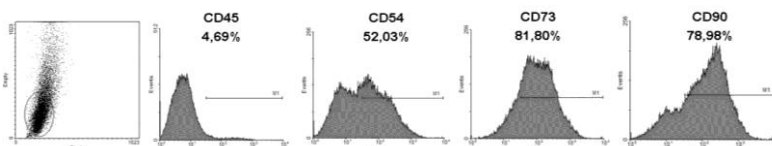
### Grupo CTM-MO Adulto OVX com osteoporose (5 meses de idade)



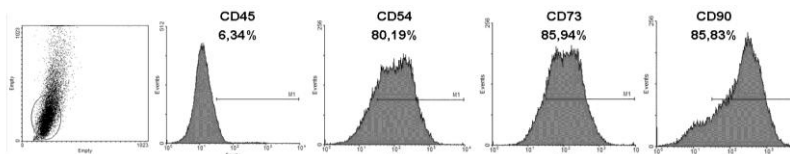
### Grupo CTM-TA Jovem (1 mês de idade)



### Grupo CTM-TA Adulto saudável (5 meses de idade)



### Grupo CTM-TA Adulto OVX com osteoporose (5 meses de idade)



Anexo 105. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem  | 0,328 ± 0,028B                | 0,445 ± 0,045B           | 0,561 ± 0,026B           |
| CTM-TA Jovem  | 0,731 ± 0,027A                | 0,795 ± 0,014A           | 0,840 ± 0,075A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 106. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 0,441 ± 0,016A                | 0,373 ± 0,032B           | 0,390 ± 0,031B           |
| CTM-TA Adulto | 0,464 ± 0,091A                | 0,489 ± 0,050A           | 0,737 ± 0,128A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 107. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX    | 0,412 ± 0,030A                | 0,438 ± 0,056A           | 0,405 ± 0,037B           |
| CTM-TA OVX    | 0,295 ± 0,018B                | 0,385 ± 0,021A           | 0,677 ± 0,079A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 108. Média e desvio-padrão da conversão do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 0,328 ± 0,028A                | 0,445 ± 0,045A           | 0,615 ± 0,026B           |
| CTM-TA Adulto OVX | 0,295 ± 0,018A                | 0,385 ± 0,021B           | 0,677 ± 0,079A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 109. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem  | 0,155 ± 0,020A                | 0,210 ± 0,041A           | 0,162 ± 0,025A           |
| CTM-TA Jovem  | 0,120 ± 0,006B                | 0,125 ± 0,009B           | 0,160 ± 0,017A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 110. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 0,047 ± 0,004B                | 0,073 ± 0,006A           | 0,095 ± 0,012A           |
| CTM-TA Adulto | 0,075 ± 0,007A                | 0,068 ± 0,012A           | 0,103 ± 0,016A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 111. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX    | 0,069 ± 0,007A                | 0,100 ± 0,015A           | 0,094 ± 0,010B           |
| CTM-TA OVX    | 0,051 ± 0,008B                | 0,060 ± 0,005B           | 0,111 ± 0,009A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 112. Média e desvio-padrão da atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 0,155 ± 0,020A                | 0,210 ± 0,041A           | 0,162 ± 0,025A           |
| CTM-TA Adulto OVX | 0,051 ± 0,008B                | 0,060 ± 0,005B           | 0,111 ± 0,009B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 113. Média e desvio-padrão da porcentagem de células/campo em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Jovem  | 29,09 ± 5,17B                |
| CTM-TA Jovem  | 90,36 ± 2,14A                |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 114. Média e desvio-padrão da porcentagem de células/campo em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Adulto | 62,21 ± 7,64B                |
| CTM-TA Adulto | 75,39 ± 14,45A               |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 115. Média e desvio-padrão da porcentagem de células/campo em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO OVX    | 66,64 ± 7,77A                |
| CTM-TA OVX    | 64,11 ± 8,46A                |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 116. Média e desvio-padrão da porcentagem de células/campo em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Período de observação</b> |
|-------------------|------------------------------|
|                   | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Jovem      | 29,09 ± 5,16B                |
| CTM-TA Adulto OVX | 64,11 ± 8,46A                |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 117. Média e desvio-padrão da porcentagem de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Jovem  | 2,31 ± 0,75B                 |
| CTM-TA Jovem  | 6,07 ± 0,86A                 |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 118. Média e desvio-padrão da porcentagem de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Adulto | 1,60 ± 0,31A                 |
| CTM-TA Adulto | 1,60 ± 0,32A                 |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 119. Média e desvio-padrão da porcentagem de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO OVX    | 0,56 ± 0,23B                 |
| CTM-TA OVX    | 1,64 ± 0,46A                 |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 120. Média e desvio-padrão da porcentagem de nódulos de mineralização/campo em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Período de observação</b> |
|-------------------|------------------------------|
|                   | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Adulto     | 2,31 ± 0,75A                 |
| CTM-TA Adulto OVX | 1,64 ± 0,46A                 |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).



Anexo 121. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para caspase 3 em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Jovem  | 1,077 ± 0,503A               |
| CTM-TA Jovem  | 1,059 ± 0,048A               |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 122. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para caspase 3 em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Adulto | 0,849 ± 0,452A               |
| CTM-TA Adulto | 1,761 ± 0,734A               |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 123. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para caspase 3 em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Período de observação</b> |
|---------------|------------------------------|
|               | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO OVX    | 0,168 ± 0,094B               |
| CTM-TA OVX    | 1,275 ± 0,204A               |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 124. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para caspase 3 em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Período de observação</b> |
|-------------------|------------------------------|
|                   | 21 dias de diferenciação     |
| CTM-MO Jovem      | 1,077 ± 0,503A               |
| CTM-TA Adulto OVX | 1,275 ± 0,204A               |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Anexo 125. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos       | Períodos de observação  |                          |                          |
|--------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|              | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem | 11,395 ± 0,326A         | 3,503 ± 1,070B           | 6,261 ± 0,955A           |
| CTM-TA Jovem | 10,684 ± 0,745A         | 10,161 ± 1,608A          | 5,848 ± 2,791A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 126. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos        | Períodos de observação  |                          |                          |
|---------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 5,864 ± 0,841A          | 10,175 ± 0,516A          | 11,138 ± 2,162A          |
| CTM-TA Adulto | 0,327 ± 0,008B          | 0,124 ± 0,032B           | 0,061 ± 0,046B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 127. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos     | Períodos de observação  |                          |                          |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX | 3,937 ± 0,395A          | 5,990 ± 0,666A           | 3,297 ± 0,762A           |
| CTM-TA OVX | 2,495 ± 0,215B          | 1,027 ± 0,171B           | 1,079 ± 0,058B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 128. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteopontina em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Períodos de observação  |                          |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 11,395 ± 0,326A         | 3,503 ± 1,070A           | 6,261 ± 0,955A           |
| CTM-TA Adulto OVX | 2,495 ± 0,215B          | 1,027 ± 0,171B           | 1,079 ± 0,058B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 129. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para sialoproteína óssea em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem  | 8,076 ± 1,153A                | 8,876 ± 2,602A           | 30,770 ± 1,572A          |
| CTM-TA Jovem  | 0,006 ± 0,002B                | 0,004 ± 0,003B           | 0,001 ± 0,001B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 130. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para sialoproteína óssea em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 1,501 ± 0,743A                | 0,323 ± 0,030A           | 0,133 ± 0,023A           |
| CTM-TA Adulto | 0,072 ± 0,006B                | 0,062 ± 0,014B           | 0,036 ± 0,011B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 131. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para sialoproteína óssea em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX    | 1,786 ± 0,565A                | 0,674 ± 0,040A           | 0,063 ± 0,015A           |
| CTM-TA OVX    | 0,005 ± 0,001B                | 0,007 ± 0,001B           | 0,007 ± 0,002B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 132. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para sialoproteína óssea em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 8,076 ± 1,153A                | 8,876 ± 2,602A           | 30,770 ± 1,572A          |
| CTM-TA Adulto OVX | 0,005 ± 0,001B                | 0,007 ± 0,001B           | 0,007 ± 0,002B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 133. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem  | 0,990 ± 0,277A                | 0,311 ± 0,158A           | 0,684 ± 0,094A           |
| CTM-TA Jovem  | 0,554 ± 0,154A                | 0,307 ± 0,130A           | 0,078 ± 0,052B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 134. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 0,680 ± 0,550A                | 0,236 ± 0,052A           | 0,335 ± 0,141A           |
| CTM-TA Adulto | 0,340 ± 0,080A                | 0,139 ± 0,073A           | 0,155 ± 0,034A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 135. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX    | 0,454 ± 0,350A                | 0,166 ± 0,020B           | 0,480 ± 0,366A           |
| CTM-TA OVX    | 1,137 ± 0,390A                | 0,253 ± 0,044A           | 0,138 ± 0,010A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 136. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para osteocalcina em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 0,990 ± 0,277A                | 0,311 ± 0,158A           | 0,684 ± 0,094A           |
| CTM-TA Adulto OVX | 1,137 ± 0,390A                | 0,253 ± 0,044A           | 0,138 ± 0,010B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 137. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem  | 5,774 ± 0,609A                | 1,440 ± 0,084B           | 3,349 ± 1,806A           |
| CTM-TA Jovem  | 6,001 ± 1,253A                | 2,101 ± 0,291A           | 1,164 ± 0,106A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 138. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 1,490 ± 0,314B                | 0,709 ± 0,075A           | 0,165 ± 0,070B           |
| CTM-TA Adulto | 5,466 ± 0,461A                | 0,834 ± 0,354A           | 0,970 ± 0,302A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 139. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b> | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|---------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX    | 1,325 ± 0,254B                | 0,422 ± 0,029B           | 0,494 ± 0,082B           |
| CTM-TA OVX    | 16,027 ± 2,310A               | 2,994 ± 0,725A           | 1,403 ± 0,151A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 140. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para colágeno I em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| <b>Grupos</b>     | <b>Períodos de observação</b> |                          |                          |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação       | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 5,774 ± 0,609B                | 1,440 ± 0,084B           | 3,349 ± 1,806A           |
| CTM-TA Adulto OVX | 16,027 ± 2,310A               | 2,994 ± 0,725A           | 1,403 ± 0,151A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 141. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas jovens em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos       | Períodos de observação  |                          |                          |
|--------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|              | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem | 0,352 ± 0,047A          | 0,191 ± 0,125B           | 1,430 ± 0,584A           |
| CTM-TA Jovem | 0,220 ± 0,035B          | 0,573 ± 0,061A           | 0,198 ± 0,111B           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 142. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas saudáveis em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos        | Períodos de observação  |                          |                          |
|---------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|               | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Adulto | 0,761 ± 0,530B          | 0,616 ± 0,063B           | 0,585 ± 0,354A           |
| CTM-TA Adulto | 2,256 ± 0,440A          | 2,651 ± 0,484A           | 1,521 ± 0,477A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 143. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 em culturas de CTM da medula óssea e do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos     | Períodos de observação  |                          |                          |
|------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|            | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO OVX | 0,777 ± 0,425A          | 0,384 ± 0,119B           | 1,163 ± 0,011A           |
| CTM-TA OVX | 0,786 ± 0,195A          | 0,882 ± 0,083A           | 1,427 ± 0,983A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

Anexo 144. Média e desvio-padrão da expressão relativa do transcrito gênico para proteína morfogenética óssea 2 em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e CTM do tecido adiposo de ratas adultas com osteoporose em meio de diferenciação osteogênico.

| Grupos            | Períodos de observação  |                          |                          |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
|                   | 7 dias de diferenciação | 14 dias de diferenciação | 21 dias de diferenciação |
| CTM-MO Jovem      | 0,352 ± 0,047B          | 0,191 ± 0,125B           | 1,430 ± 0,584A           |
| CTM-TA Adulto OVX | 0,786 ± 0,195A          | 0,882 ± 0,083A           | 1,427 ± 0,983A           |

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si (p>0,05).

## ANEXOS - PROTOCOLOS

### **Anexo 1. Preparo da solução de tiroxina (50µg/5mL) utilizada para indução do hipertireoidismo nas ratas.**

- Pesar 0,01g de tiroxina em balança de precisão farmacêutica.
- Adicionar 600mL de água destilada e agitar em agitador magnético.
- Transferir a solução para um balão volumétrico, completando o volume para 1000mL.
- Armazenar em frasco âmbar.

### **Anexo 2. Preparo da solução de propiltiouracil (1mg/5mL) utilizada para indução do hipotireoidismo nas ratas.**

- Pesar 200mg de propiltiouracil em balança de precisão farmacêutica.
- Adicionar 600mL de água destilada, aquecendo à 90°C durante 20 minutos.
- Transferir a solução para um balão volumétrico, completando o volume para 1000mL.
- Armazenar em frasco âmbar.

### **Anexo 3. Preparo da solução de ácido fórmico a 10%**

- Solução 1: dissolver 450g de citrato de sódio em 1L de água destilada.
- Diluir 200mL de ácido fórmico em 800mL de água destilada e colocar na solução 1.
- Acrescentar 1L de ácido fórmico e 2L de água destilada na solução 1

### **Anexo 4. Metodologia para descalcificação de ossos longos (fêmur e tíbia) em solução de ácido fórmico a 10%, processamento pela técnica de inclusão em parafina e coloração pela hematoxilina-eosina.**

- Fixar os ossos em formalina a 10%, neutra e tamponada.
- Retirar os tecidos musculares e conectivos adjacentes.
- Envolver os ossos em gaze e descalcificá-los em ácido fórmico a 10%, fazendo a troca de ácido fórmico a cada 2 dias.
- Após completa descalcificação controlada por raios-X, lavar os ossos em água corrente por 24 horas
- Seccionar os ossos em duas metades, pelo seu eixo longitudinal.
- Processar os ossos pela técnica de inclusão em parafina que consiste na passagem dos ossos nas seguintes etapas:

|                             |         |
|-----------------------------|---------|
| álcool 70% .....            | 2 horas |
| álcool 80% .....            | 2 horas |
| álcool 90% .....            | 2 horas |
| álcool absoluto usado ..... | 2 horas |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| álcool absoluto novo .....      | 2 horas                                 |
| xilol .....                     | 30 minutos (tíbia) e 50 minutos (fêmur) |
| embebição pela parafina .....   | 45 minutos (tíbia) e 25 minutos (fêmur) |
| inclusão em parafina (emblocar) |   |

- Corar as secções histológicas de 4µm pela técnica de hematoxilina-eosina que consiste nas seguintes etapas:

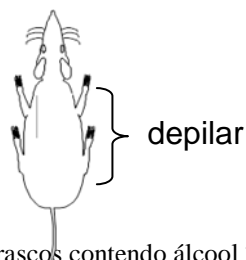
|                                |             |
|--------------------------------|-------------|
| estufa 60°C .....              | 15 minutos  |
| xilol I .....                  | 10 minutos  |
| xilol II .....                 | 10 minutos  |
| álcool absoluto I .....        | 5 minutos   |
| álcool absoluto II .....       | 5 minutos   |
| álcool absoluto III .....      | 5 minutos   |
| álcool 90% .....               | 5 minutos   |
| álcool 80% .....               | 5 minutos   |
| água destilada .....           | 3 minutos   |
| hematoxilina .....             | 1 minuto    |
| água corrente .....            | 15 minutos  |
| eosina .....                   | 2 minutos   |
| álcool 95% .....               | 20 segundos |
| álcool 95% .....               | 30 segundos |
| álcool absoluto I .....        | 2 minutos   |
| álcool absoluto II .....       | 15 minutos  |
| álcool absoluto III .....      | 15 minutos  |
| xilol I.....                   | 2 minutos   |
| xilol II.....                  | 2 minutos   |
| montagem da lâmina com bálsamo |             |



### Anexo 5. Extração de medula óssea para obtenção de células tronco mesenquimais.

- procedimentos fora do fluxo:

- realizar anestesia geral do animal (0,15 mL de xilazina e 0,2 mL de Quetamina, via intramuscular).
- realizar punção cardíaca para retirar o sangue do animal e evitar contaminação durante a colheita dos ossos.
- eutanasiar o rato.
- depilar toda a região posterior do animal ventral e dorsal



- imergir o animal em dois frascos contendo álcool 70% por 30 segundos em cada

- procedimentos dentro do fluxo com todo instrumental estéril:

- passar iodo povidine em toda a região depilada.
- retirar o fêmur e a tíbia (bilateral) com o mínimo de musculatura colocando os ossos em tubo falcon com aproximadamente 40mL de DMEM

OBS: antes de usar o fluxo, ligar a UV por 15 minutos

- procedimento dentro do fluxo da sala de cultura com todo instrumental estéril:

- retirar as epífises proximal e distal de cada osso utilizando tesoura e pinça estéreis.
- com uma seringa de 3 mL e agulha de insulina, lava-se a medula para dentro do tubo falcon estéril com DMEM sem SFB (não ultrapassar 30 mL por tubo).
- centrifugar por 10 min a 1400g.
- desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* em 20 mL de DMEM + 10% SFB.
- transferir 10 mL para garrafas T 75 e 6 mL para garrafas T 25.
- Incubar em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

### Anexo 6. Preparo de PBS (solução tampão de fosfato padrão) 1,5 M (10X)

- dissolver em água ultrapura aquecida e com agitação:

- 80g de NaCl (cloreto de sódio).
- 2g de KCl (cloreto de potássio).
- 11,5g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de sódio anidro).

- 2,0g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de potássio).
- conferir o pH que deve ser de 7,2 (acertar com NaOH).
- completar o volume para 1 L.
- transferir para frasco âmbar.
- armazenar a 4°C.

#### **Anexo 7. Preparo de PBS 0,15 M (1X)**

- diluir 100 mL de PBS 1,5 M em 900 mL de água ultrapura.
- dentro do fluxo laminar, fazer a filtração em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm ou colocar em frasco de 1L enchendo no máximo com 500mL de solução. Tampar com papel craft e autoclavar.
- armazenar a 4°C.

#### **Anexo 8. Preparo de DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)**

- diluir o DMEM (pó) em 800mL de água ultrapura (em agitador automático) e acrescentar 2g de bicarbonato de sódio 7,5%.
- acertar o pH para 7,2.
- acrescentar uma ampola de gentamicina.
- acrescentar 10mL do PSA:
  - P: penicilina 10.000 un/mL.
  - S: estreptomicina 1.000 µg/mL.
  - A: anfotericina 25 µg/mL.
- completar o volume para 1000mL.
- dentro do fluxo laminar, fazer a filtração em bomba à vácuo com membrana de 0,22 µm.
- armazenar à 4°C.

#### **Anexo 9. Preparo de DMEM acrescido de 10% SFB (soro fetal bovino)**

- medir 180mL de DMEM em um béquer e acrescentar 20mL de SFB inativado.
- filtrar em bomba à vácuo com membrana de 0,22 µm
- armazenar à 4°C.

#### **Anexo 10. Preparo de meio de diferenciação osteogênico (200 mL)**

- em 200 mL de DMEM + 10% SFB acrescentar:
  - 0,01 g de ácido ascórbico
  - 0,55 g de β-glicerofosfato
  - 2,17 µl de dexametasona (4mg/mL)
- filtrar em bomba à vácuo com membrana de 0,22 µm

- armazenar à 4°C.

#### **Anexo 11. Tripsinização para repique em garrafas:**

- verificar a cobertura de 80 a 90% da garrafa.
- retirar o meio, lavar com 5mL de PBS 0,15 molar.
- retirar o PBS e adicionar 2mL de tripsina (Gibco) na garrafa T75 e 1mL de tripsina na garrafa T25.
- incubar por 5 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.
- após a retirada da estufa, agitar gentilmente a garrafa para favorecer a soltura das células.
- acrescentar 10mL de DMEM + 10% de SFB e transferir 5mL para outra garrafa T75. Completar ambas as garrafas com mais 5mL de DMEM + 10% de SFB.
- caso a tripsinização seja de uma garrafa T25, após retirar da estufa, acrescentar 6mL de DMEM + 10% de SFB e transferir todo o conteúdo para uma garrafa T75 completando o volume desta para 10mL.

#### **Anexo 12. Diluição de azul de Tripán:**

- Preparo de azul de Tripán a 0,1% (solução estoque):
  - pesar 0,1g do pó de azul de Tripán
  - diluir em 100mL de solução salina (NaCl 0,9%)
  - homogeneizar 20 minutos em agitador magnético
  - filtrar em membrana 0,22 µm
  - manter estéril e em temperatura ambiente.
- Preparo de NaCl 0,9%:
  - Pesar 0,9g de NaCl e diluir em 100mL de água destilada.
- Preparo de azul de Tripán para uso (1:4):
  - pegar uma parte de azul de Tripán e diluir em quatro partes de solução salina

#### **Anexo 13. Tripsinização para repique em placas e contagem de células:**

- proceder a tripsinização das células como descrito no anexo 63, recolher todo o conteúdo da garrafa em tubo falcon de 50mL (o volume do tubo não deve ultrapassar 30mL).
- centrifugar por 10 min a 1400g.
- desprezar o sobrenadante e ressuspender o *pellet* com 2mL de DMEM + 10% de SFB.
- transferir 2µL para um eppendorf: utilizar a solução de *Turck* ou *azul de Tripán*.
- \**Turck*: acrescentar 98µL do reagente *Turck*.
- \**azul de Tripán*: acrescentar 49µL PBS 0,15 M + 49µL da solução de uso de azul de Tripán (anexo 1.12)

- retirar 10µL da nova solução e transferir para cada parte da câmara de *Newbauer*. Fazer a contagem das células dos dois quadrantes e utilizar a fórmula abaixo para calcular o número de células.

$$\text{n}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{média dos quadrantes}}{4} \times 50 \text{ (fator de diluição)} \times 10^4$$

4

OBS.: Caso precise de  $1 \times 10^4$  células/poço ou de qualquer outro número de células diferente do anteriormente encontrado, fazer regra de três, para calcular o volume com células a ser utilizado em cada poço.

- transferir o n° de células desejado para o poço e adicionar 1 mL de DMEM + 10% de SFB/poço (placa de 24 poços) ou 3 mL/poço (placa de 6 poços).

#### **Anexo 14. Coloração de Von Kossa**

- retirar o meio de cultura da placa de 6 poços.
- lavar as células com 3mL de PBS 0,15 M/poço.
- acrescentar 3mL de álcool 70%/poço para fixação das células por 24 horas.
- deixar as placas em água corrente por 10 minutos.
- lavar com água destilada.
- colocar em solução de prata a 5% por duas horas.
- lavar com água destilada
- colocar em solução de tiosulfato de sódio a 5% por cinco minutos.
- lavar em água corrente por 2 minutos
- corar com eosina por 40 segundos
- lavar em água corrente por 2 minutos
- passar em álcool 95% por 2 minutos, álcool absoluto por 2 minutos e em xilol por 2 minutos.
- montar em lâmina com bálsamo.

Soluções:

A) Solução de prata 5%

- Nitrato de prata.....5g
- Água destilada.....100mL

B) Solução de tiosulfato de sódio 5%

- Tiosulfato de sódio.....5g
- Água destilada.....100mL

#### **Anexo 15. Preparo de paraformaldeído a 4%**

- 0,4g paraformaldeído + 10mL de PBS 0,15M + 25µl de NaOH 5M
- Aquecer o banho-maria a 65°C e colocar a solução acima para solubilizar. Usar recipiente tampado.

Obs.: para preparar o paraformaldeído a 2% (solução de uso) pegar a solução de paraformaldeído a 4% e diluir da seguinte forma – Ex.: 3mL de PBS 0,15M + 3mL de paraformaldeído a 4%.

### **Anexo 16. Solução de SDS 10% HCl**

Solução A: 10g de SDS + 100mL de água

- dissolver a solução A sob agitação e aquecimento.
- adicionar à solução 333µl de HCl

### **Anexo 17. Extração de RNA total**

- retirar o meio das garrafas T-25 e lavar 1x com PBS 0,15M.
- colocar 1mL de trizol por garrafa T-25 e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- transferir o conteúdo (células + trizol) para eppendorfes de 1,5mL.
- adicionar 0,2mL de clorofórmio/eppendorfe, agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos em temperatura ambiente.
- centrifugar por 15 minutos a 12000g (4°C).
- transferir a fase aquosa para outro eppendorfe.
- adicionar 500µl de isopropanol e incubar por 30 minutos no freezer à -80°C.
- centrifugar por 10 minutos a 12000g (4°C).
- retirar o sobrenadante.
- lavar o pellet com 1mL de etanol 75%.
- centrifugar por cinco minutos a 10500g (4°C).
- secar o pellet por cinco minutos.
- dissolver o pellet em água DEPC (20µl por eppendorfe).
- incubar por 10 minutos a 55°C.
- dosar o RNA em espectrofotômetro. Antes de dosar fazer uma diluição de 1:50.
- estocar o RNA a -80°C.

### **Anexo 18. Síntese de cDNA**

- Kit utilizado: Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green (cat. n. 11735-032).

Obs. 1: Antes de sintetizar o cDNA, fazer a dosagem do RNA em espectrofotômetro e calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.

Obs. 2: Concentração de RNA - 1µg de RNA total.

Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 500µg/1000µl

$$400 \mu\text{g} \text{ _____ } 1000 \mu\text{l}$$

$$1 \mu\text{g} \text{ _____ } x$$

$$x = 2,5 \mu\text{l de RNA}$$

Assim colocar 2,5 µl de RNA + 5,5 µl de água DEPC, pois o volume total (RNA + água) é de 8 µl.

- Preparar o Master MIX (RT-PCR):

| Master MIX          | 1x    | Ex.: 5x |
|---------------------|-------|---------|
| 2x RT reaction MIX  | 10 µl | 50 µl   |
| RT enzyme MIX       | 2 µl  | 10 µl   |
| RNA (1µg)           | 2 µl  | -----   |
| Água DEPC qsp 20 µl | 6 µl  | -----   |

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase *free*. Pipetar 12 µl de MIX em cada tudo e acrescentar 8 µl de RNA + água DEPEC (um por amostra).

- Fazer um *spin* nos tubos e colocá-los na máquina de PCR programada da seguinte forma:

- *programação A:*

25°C por 10 minutos

42°C por 50 minutos

85°C por cinco minutos

- colocar no gelo e adicionar 1 µl de RNase H por tubo

- *programação B:*

37°C por 20 minutos

- Estocar o cDNA a -20°C.

### Anexo 19. Protocolo para diluição de primers

- Para as reações de qPCR, o recomendado pelo kit (Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green [cat. n. 11735-032]) é o uso de 1 µl de primer a 10 µM, ou seja, 10 pmol por reação de 50 µl. No entanto, como faremos apenas 25 µl de reação, utilizaremos 1 µl de primer a 5 pmol.

Ex.: Osteopontina Forward (F) - 5'ATC TCA CCA TTC CGA TGA ATC T3'

$$OD_{260} = 6,1 = 29,70 \text{ nmoles} = 0,20 \text{ mg}$$

Estoque: 100 pmol / µl

$$100 \times 10^{-12} \text{ mol} \text{ _____ } 1 \text{ µl}$$

$$29,70 \times 10^{-9} \text{ mol} \text{ _____ } x$$

$$x = 297 \text{ µl de água DEPC}$$

Uso: 5 pmol /  $\mu\text{l}$                       100 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{l}$  (estoque)  
 5 pmol \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{l}$                       250 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ x  
           x \_\_\_\_\_ 50  $\mu\text{l}$                       x = 2,5  $\mu\text{l}$  da solução estoque + 47,5  $\mu\text{l}$  de água DEPC  
           x = 250 pmol

Ex.: Osteopontina Reverse (R) - 5'TCA GTC CAT AAG CCA AGC TAT CA3'

OD260 = 6,6 = 28,90 nmoles = 0,20 mg

Estoque: 100 pmol /  $\mu\text{l}$   
 100 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{l}$   
 28,90 x 10<sup>-9</sup> mol \_\_\_\_\_ x  
           x = 298  $\mu\text{l}$  de água DEPC

Uso: 5 pmol /  $\mu\text{l}$                       100 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{l}$  (estoque)  
 5 pmol \_\_\_\_\_ 1  $\mu\text{l}$                       250 x 10<sup>-12</sup> mol \_\_\_\_\_ x  
           x \_\_\_\_\_ 50  $\mu\text{l}$                       x = 2,5  $\mu\text{l}$  da solução estoque + 47,5  $\mu\text{l}$  de água DEPC  
           x = 250 pmol

Obs.: Os primers chegam liofilizados e são armazenados a 4°C. Após a diluição, como demonstrado anteriormente, ficam armazenados a -20°C.

#### Anexo 20. Técnica de RT-PCR tempo real

- Kit utilizado: *Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green* (cat. n. 11735-032).
- Aparelho utilizado: *SmartCycler System*
- Tubos para aparelho de PCR: *SmartCycler® Tube-25 $\mu\text{L}$*
- Recomendação do kit: volume final de reação de 50  $\mu\text{l}$ , porém faz-se 25  $\mu\text{l}$  de volume final, ou seja, 2,0  $\mu\text{l}$  de cDNA para 25  $\mu\text{l}$  de reação.
- Reações:

| MIX                            | 1x                 | Ex.: 6x          |
|--------------------------------|--------------------|------------------|
| <i>SYBR Green</i>              | 12,5 $\mu\text{l}$ | 75 $\mu\text{l}$ |
| <i>Primer forward</i>          | 1 $\mu\text{l}$    | 6 $\mu\text{l}$  |
| <i>Primer reverse</i>          | 1 $\mu\text{l}$    | 6 $\mu\text{l}$  |
| cDNA                           | 2,0 $\mu\text{l}$  | -----            |
| Água DEPC qsp 25 $\mu\text{l}$ | 8,5 $\mu\text{l}$  | 51 $\mu\text{l}$ |

Obs 1.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase free. Pipetar 23  $\mu\text{l}$  de MIX em cada tudo e acrescentar 2,0  $\mu\text{l}$  de cDNA (um por amostra) ou 2,0  $\mu\text{l}$  de água DEPC (controle negativo).

Obs. 2: Preparar um MIX para cada *primer*, sendo que se coloca primeiro a água DEPC, segundo o *SYBR Green* e terceiro os *primers forward* e *reverse*.

- Após o dos tubos contendo MIX + cDNA é importante homogeneizar e dar um *spin* em todos os tubos antes de colocá-los na máquina de PCR tempo real.
- Procedimentos para utilização do programa de aparelho de PCR tempo real (*SmartCycler System*):
  - Clicar em *create run*, depois escrever o nome da reação no campo *run name*
  - Clicar em *Add/Remove sites*, selecionar *protocols (canine citokines SYBR)*, depois selecionar os *sites* que serão utilizados, colocá-los no campo da direita clicando na seta da direita e depois clicar em OK.
  - Clicar nos campos *sample ID* e escrever o nome de cada amostra.
  - Clicar em *select Graphs*, selecionar os gráficos *SYBR, Melt e Temperature*, colocá-los no campo da direita clicando na seta da direita e depois clicar em OK.
  - Clicar em *Start Run* para começar a reação.
- Após a conclusão da reação para salvar o arquivo clicar em *export*, selecionar a pasta desejada, clicar em default e depois clicar em salvar.

### Anexo 21. Diluição da triiodotironina (T3)

A- Solução estoque 1mM T3 (para 10mL de solução)

$$\begin{array}{l} 1 \times 10^{-3} \text{ mol} \text{ ----- } 1000 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad \times \text{ ----- } 10 \text{ mL} \\ \quad \quad \quad \times = 10 \times 10^{-6} \text{ mol} \end{array} \qquad \begin{array}{l} 1 \text{ mol T3 ----- } 672,95 \text{ g} \\ 10 \times 10^{-6} \text{ mol ----- } x \\ x = 0,00672 \text{ g em } 10 \text{ mL de NaOH } 1\text{M ou ET-OH } 100\% \end{array}$$

B- Solução intermediária 1uM T3

Diluir a solução estoque 1000x

1uL da solução **estoque** em 1000uL de PBS 0,15M

C-  $10^{-2}$  nM T3 em meio de cultura

Adicionar 2uL da solução **intermediária** a 200mL de meio de diferenciação osteogênico

D- 1 nM T3 em meio de cultura

Adicionar 0,2uL da solução **estoque** a 200mL de meio de diferenciação osteogênico

E- 100nM T3 em meio de cultura

Adicionar 20uL da solução **estoque** a 200mL de meio de diferenciação osteogênico

F- 1000nM T3 em meio de cultura

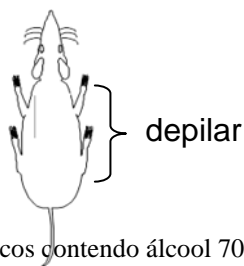


Adicionar 200 $\mu$ L da solução **estoque** a 200mL de meio de diferenciação osteogênico

#### **Anexo 22. Extração de células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo:**

- procedimentos fora do fluxo:

- eutanasiar o animal com sobredose de anestesia (0,15 mL de xilazina e 0,2 mL de quetamina via intramuscular).
- depilar toda a região abdominal ventral.



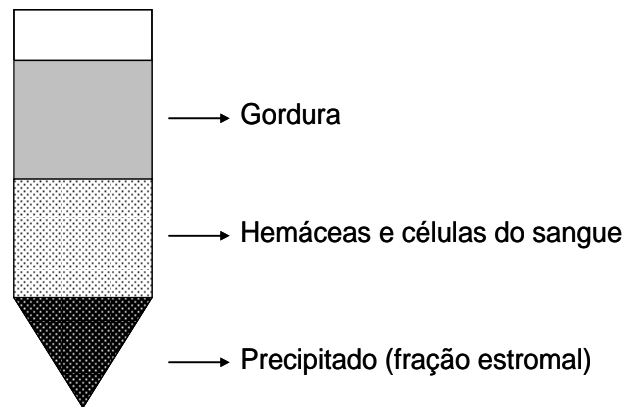
- imergir o animal em dois frascos contendo álcool 70% por 30 segundos em cada

- procedimentos dentro do fluxo com todo instrumental estéril:

- passar iodo povidine em toda a região depilada.
- fazer uma incisão na linha média do abdômen, seguido de coleta do tecido adiposo visceral.
- colocar o tecido adiposo DMEM enriquecido com gentamicina (60 $\mu$ g/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 $\mu$ g/mL) e anfotericina (25 $\mu$ g/L) sem soro fetal bovino.

- procedimentos dentro do fluxo da sala de cultura com todo instrumental estéril:

- transferir o tecido adiposo para outro DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos sem soro fetal bovino para lavagem.
- transferir o tecido adiposo para outro tubo contendo colagenase 0,15% (*Collagenase from Clostridium histolyticum*, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em PBS 0,15M e incubar por 60 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, agitando de 15 em 15 minutos.
- após a incubação, inativar a colagenase com DMEM mais 10% SFB.
- centrifugar por 10 minutos a 1400g para obtenção de três fases:



• o sobrenadante é descartado e o precipitado é suspenso em DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos mais 10% SFB e cultivado em garrafas T75 em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

**Anexo 23. Preparo de 20 mL de solução de colagenase 0,15%:**

- pesar 30mg de colagenase e diluir em 20mL de PBS 0,15M
- homogeneizar e filtrar a solução com membrana de 0,22µm.