

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

**EFEITO DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA
MEDULA ÓSSEA DE RATAS**

JANKERLE NEVES BOELONI

**BELO HORIZONTE
ESCOLA DE VETERINÁRIA – UFMG
2008**

Jankerle Neves Boeloni

**EFEITO DA TRIIODOTIRONINA (T3) NA DIFERENCIAÇÃO
OSTEOGÊNICA *IN VITRO* DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA
MEDULA ÓSSEA DE RATAS**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em
Medicina Veterinária
Área: Patologia Animal
Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides

Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária

Dissertação defendida e aprovada em 25 de janeiro de 2008, pela Comissão examinadora constituída por:

Prof^a. Dra. Rogéria Serakides
Presidente

Prof^a. Dra. Patrícia Valério

Prof^a. Dra. Maria Marta Sarquis Soares

Prof^a. Dra. Eliane Gonçalves de Melo

Prof^a. Dra. Adriana Bozzi de Melo

Aos meus pais, Carlos e Erminia, pela educação, amor, incentivo e carinho que tanto me deram em vida. Como gostaria que eles estivessem compartilhando comigo este momento tão importante em minha vida.

Aos meus irmãos, Jancarlos e Jonerlei pelo amor, carinho e incentivo.

Ao meu namorado Tyrone, pelo amor, paciência, carinho e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, porque sem Ele eu nada seria.

À professora Rogéria Serakides pela orientação, paciência, ensinamentos e amizade que foram essenciais para minha formação profissional e pessoal. Pelo apoio em todos os momentos em que mais precisei principalmente nos momentos em que a saúde falhou e na redação dos seminários e da dissertação. Obrigada pela orientação paciente, sempre presente e excelente e acima de tudo por ser um exemplo de humildade, inteligência, honestidade e perseverança a ser seguido. Obrigada sempre!

Ao professor Alfredo Miranda de Góes pelos ensinamentos, oportunidade e principalmente pela prontidão em ajudar e ceder o laboratório e os reagentes necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao professor Geovanni Dantas Cassali, por ceder tão prontamente o Laboratório de Patologia Comparada do ICB.

Aos professores do Setor de patologia, Ernane Fagundes do Nascimento, Roberto Maurício Carvalho Guedes, Renato de Lima Santos e Roselene Ecco pelos ensinamentos tão importantes para a minha formação.

A doutoranda, amiga e “irmã”, Natália de Melo Ocarino, pela amizade, apoio e ajuda incondicionais tão importantes em todos os momentos da realização do experimento. E pelo exemplo de perseverança, humildade e inteligência a ser seguido. Obrigada por tudo!

Às componentes da banca Eliane Gonçalves de Melo, Patrícia Valério, Maria Marta Sarquis Soares e Adriana Bozzi de Melo pela prontidão em compor a banca para avaliação desta dissertação.

Aos amigos da patologia, Fabiana, Alcina, Tati, Aline, Fábio, Cíntia, Silvia França, Silvia, Cristiane, Núbia, Samanta, Raquel, Juliana, Mariana, Teane e Adão.

Aos alunos de iniciação científica, Juneo, Luana e Renata pelo apoio e ajuda.

Às técnicas do laboratório de histopatologia, Marilene e Mel, sempre prontas a ajudar.

Aos amigos do ICB sempre prontos a ajudar, Natália Breyner, Viviane, Luiza, Juliana, Jú, Caryne, Cíntia, Inácio, Guilherme, Tercio, Carol, Paula, Cris Correa, Adriana, Mário, Ana Paula, Bete e Alessandra.

Aos amigos da república, Carla, Silvia, Aliny, Paulo, Hayala e aos animais, Flor, Otto, Mel e Penélope.

Às amigas, Fátima, Fabíola, Silke, Angélica e Natalie.

Ao Colegiado de Pós-graduação em especial à profa. Marília e à Nilda sempre pronta para esclarecer minhas dúvidas.

Ao porteiro Fábio pela ajuda.

Aos meus tios e “pais” Vitim e Sandra, e Clauzia e Pedro, pelo apoio, paciência e carinho. Obrigada.

Aos meus avós, Hilário e Mercedes pelo apoio e exemplo de caráter, dignidade e humildade a ser seguido. Amo vocês e sei que sempre estarão olhando por mim.

A minha amiga Perla que mesmo distante, sempre torceu por mim.

À minha tia e amiga Marilza, pelo apoio e por ter me dado uma afilhada maravilhosa, Ana Luiza.

A Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que não foram citadas, mas que de alguma forma me apoiaram e contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE FIGURAS	17
RESUMO	19
ABSTRACT	21
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1 Tecido ósseo	24
2.2 Células tronco.....	24
2.3 Células tronco mesenquimais.....	25
2.3.1 Diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais.....	27
2.4 Efeito dos hormônios nas células ósseas diferenciadas e na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Extração e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em DMEM.....	32
3.1.1 Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea por citometria de fluxo.....	33
3.2 Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em meio osteogênico.....	33
3.2.1 Conversão do MTT em cristais de formazan.....	34
3.2.2 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina.....	34
3.2.3 Dosagem de colágeno.....	34
3.2.4 Caracterização do tipo de colágeno pela coloração de <i>picro-sirius red</i> sob luz polarizada.....	35
3.2.5 Determinação da porcentagem de células/ campo.....	35
3.2.6 Quantificação e mensuração do diâmetro médio dos nódulos de mineralização.....	35
3.3 Determinação da massa mitocondrial pelo Mito Tracker Green (MTG) e análise por citometria de fluxo.....	35
3.4 Análise estatística.....	36
4. RESULTADOS	36
4.1 Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea.....	36
4.2 Conversão do MTT em cristais de formazan.....	36

4.3 Atividade da fosfatase alcalina.....	38
4.4 Dosagem e maturação do colágeno.....	38
4.5 Número e diâmetro médio dos nódulos de mineralização.....	40
4.6 Porcentagem de células/campo.....	43
4.7 Massa mitocondrial.....	44
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8. ANEXOS.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

1,25 (OH)₂ D₃ – 1,25 diidroxicolecalciferol
ALCAM – Molécula de adesão leucócito ativada
BCIP – 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine
BMP – Proteína morfogênica óssea
CTM – Células tronco mesenquimais
DMEM – Dulbecco's modified Eagles's medium
EGF – Fator de crescimento epidermal
FACS – Fluorescence-activated cell sorter
FGF – Fator de crescimento fibroblástico
FL1 – Fluorescência relativa
FSC – "Forward scatter"
GH – Hormônio do crescimento
GM-CSF – Fator estimulador da colônia de macrófagos/granulócitos
ICAM-1 – Molécula de adesão intracelular 1
IFN- α – Interferon alfa
IFN- γ – Interferon gama
IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL – Interleucina
IP – Intraperitoneal
M-CSF – Fator estimulador da colônia de macrófagos
MSC – Mesenchymal stem cells
MTG – Mito Tracker Green
MTT – Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]
NBT – Nitro-blue tetrazolium chloride
PBS – Solução tampão de fosfato padrão ("phosphate buffer solution")
PDGF – Fator de crescimento derivado de plaquetas
PGE-2 – Prostaglandina E2
PLGA – Porous poly lactide-co-glycolide
RNAm – Ácido dextribonucléico mensageiro
SFB – Soro fetal bovino
SNK – Student-Newman-Keuls
SSC – "Side scatter"
T3 – Triiodotironina
T4 – Tiroxina
TGF- β – Fator de crescimento transformante β
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Análise da expressão de CD45, CD90, CD73 e CD54 em CTM da medula óssea de ratas cultivadas em DMEM por citometria de fluxo após quatro repiques e confluência de 80 a 90% para caracterização fenotípica. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de 10^1 . O pico preto vazio corresponde às células tronco não marcadas (controle negativo). O pico vermelho preenchido corresponde às células tronco marcadas com anticorpos fluorescentes.....	37
Figura 2	Redução do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.....	37
Figura 3	Atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.....	38
Figura 4	Síntese de colágeno em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.....	39
Figura 5	Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico, coloração de <i>picro-sirius red</i> sob luz polarizada, 62,5X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. (C) 1nM de T3. (D) 10^{-2} nM de T3. (E) 10^{-3} nM de T3. Dose de 10^{-2} nM de T3 com fibras de colágeno vermelhas mais densas e mais birrefringentes em comparação aos demais grupos e densamente distribuídas em forma de rede. Grupo tratado com 10^{-3} nM de T3 com fibras menos birrefringentes e menos densas quando comparadas ao controle.....	40
Figura 6	Número de nódulos de mineralização em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.....	41
Figura 7	Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico, coloração de Von Kossa, 25X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. (C) 1nM de T3. (D) 10^{-2} nM de T3. (E) 10^{-3} nM de T3. Número maior de nódulos de mineralização amarronzados ou negros no grupo tratado com 10^{-2} nM de T3.....	41
Figura 8	Diâmetro médio dos nódulos de mineralização em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.....	42

- Figura 9 Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico, coloração de Von Kossa, 25X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. (C) 1nM de T3. (D) 10^{-2} nM de T3. (E) 10^{-3} nM de T3. Diâmetro médio dos nódulos de mineralização amarronzados ou negros maior no grupo tratado com 10^{-2} nM de T3 em relação aos demais grupos avaliados..... 42
- Figura 10 Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 15 dias de cultivo em meio osteogênico, 101,5X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. Cristais com forma característica de “cruz de malta” em intensa quantidade sob a superfície de cultivo do grupo tratado com 100nM de T3. Ausência de cristais no grupo controle..... 43
- Figura 11 Percentagem de células/campo em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3..... 43
- Figura 12 Análise da massa mitocondrial de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico nos grupos controle (sem T3) e tratado com 10^{-2} nM de T3. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de 10^1 . O pico vermelho preenchido corresponde às células tronco não marcadas (Branco). O pico preto vazio corresponde às células tronco cultivadas em meio osteogênico sem T3 e marcadas com MTG (controle) e o pico verde vazio corresponde as células tronco cultivadas em meio osteogênico tratadas com a dose de 10^{-2} nM de T3 e marcadas com MTG (10^{-2} nM de T3)..... 44

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar o efeito dose dependente de T3 na diferenciação osteogênica de CTM de ratas. Utilizaram-se fêmur e tíbia de ratas Wistar (30 dias) para extração das CTM da medula óssea, cultivadas em DMEM enriquecido e soro fetal bovino a 37°C e 5% de CO₂. Após quatro repiques, 1x10⁵ CTM foram cultivadas em triplicata em DMEM enriquecido acrescido de ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona por 7, 14 e 21 dias com T3 (doses de 10⁻³nM, 10⁻²nM, 1nM e 100 nM) e sem T3 (controle). A caracterização fenotípica das células foi realizada antes da diferenciação osteogênica por citometria de fluxo. Durante a diferenciação osteogênica, foi avaliada a atividade da fosfatase alcalina pelo ensaio BCIP-NBT e a capacidade de conversão do MTT em cristais de formazan, ambos por espectrofotometria. O colágeno foi corado pelo *sirius red*, dosado em espectrofotômetro e avaliado em microscopia de campo escuro. Nódulos de mineralização foram corados pelo Von Kossa para avaliação do número de nódulos/campo e do diâmetro médio dos nódulos. As médias foram comparadas pelo teste SNK. Antes da diferenciação osteogênica, as células apresentaram expressão de CD73 (93,99%), CD54 (95,10%) e CD90 (86,77%) e ausência de expressão de CD45 (96,94%). A dose de 100nM apresentou efeito negativo na diferenciação osteogênica de CTM, com menor síntese de colágeno em comparação ao controle com formação de inúmeros cristais de fosfato de cálcio. A dose de 10⁻³nM apresentou síntese de colágeno, atividade de fosfatase alcalina e número de nódulos de mineralização superiores ao controle e semelhantes à dose de 10⁻²nM. Mas, 10⁻²nM demonstrou resultados ainda melhores sob a diferenciação osteogênica das CTM, havendo maior redução do MTT, melhor maturação do colágeno e maior diâmetro médio dos nódulos de mineralização. Conclui-se que o efeito de T3 na diferenciação *in vitro* das CTM é dose dependente, sendo 10⁻²nM a dose que promove melhor diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais, triiodotironina, diferenciação osteogênica, ratas

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the dose-dependent effect of T3 in the osteogenic differentiation of MSC of female rats. Long bones (femur and tibia) from female Wistar rats (30 days) were obtained for the extraction of MSC from bone marrow, expanded in culture in enriched DMEM supplemented with fetal calf serum at 37°C and 5% of CO₂. After four passages, 1×10^5 MSC were cultivated in triplicate in enriched DMEM added to ascorbic acid, β -glycerophosphate and dexamethasone for 7, 14 and 21 days with T3 (doses of 10^{-3} nM, 10^{-2} nM, 1 nM and 100 nM) and without T3 (control). The phenotypic characterization of the cells was accomplished before the osteogenic differentiation by flow cytometry. During the osteogenic differentiation, the alkaline phosphatase activity was evaluated by the BCIP-NBT assay and the capacity of conversion of MTT in formazan crystals, both by espectrofotometry. The collagen was stained with sirius red, dosed in spectrophotometer and appraised in polarization microscopy. Mineralized nodules were stained by Von Kossa for evaluation of the number of nodules/field and mean nodules diameter. The means were compared by the SNK test. Before the osteogenic differentiation, the cells were positive for CD73 (93,99%), CD54 (95,10%) and CD90 (86,77%) and were negative for CD45 (96,94%). The dose of 100nM showed negative effect in the MSC osteogenic differentiation, with less collagen synthesis in comparison to the control and formation of countless calcium phosphate crystals. The 10^{-3} nM dose showed collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and mineralized nodules number higher then the control and similar to the 10^{-2} nM dose. Nevertheless, the 10^{-2} nM dose demonstrated better results under the MSC osteogenic differentiation, with more MTT reduction, better collagen maturation and larger mean diameter of the mineralized nodules. It was concluded that the T3 effect in the MSC in vitro differentiation is dose-dependent and the 10^{-2} nM dose promotes better bone marrow MSC osteogenic differentiation.

Key Words: Mesenchymal stem cells, triiodothyronine, osteogenic differentiation, female rats

1. INTRODUÇÃO

Os hormônios tireoidianos representados pela tiroxina (T4) e triiodotironina (T3) são essenciais 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 (Nunes, 2003; Incerpi et al., 2005) e para o crescimento, diferenciação e controle do metabolismo de vários órgãos também na vida pós-natal (Gauthier et al., 1999; Klaushofer et al., 1995). O efeito dos hormônios tireoidianos se deve principalmente a ligação da T3, metabolicamente ativa, nos receptores TR α e TR β presentes em células de diversos tecidos (Moeller et al., 2005), incluindo os osteoblastos (Allain et al., 1996; Gruber et al., 1999) e as células tronco mesenquimais (CTM) (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002).

O uso de células tronco na medicina regenerativa tem sido uma esperança para os pesquisadores que vislumbram tratar de doenças incuráveis ou daquelas com tratamento insatisfatório, como algumas osteopatias (Murphy et al., 2003; Potier e Petite, 2005; Kraus e Kirker-Head, 2006; Wang et al., 2006). Além de freqüentes, várias doenças ósseas tais como as fraturas, as osteítes e até mesmo as doenças ósseas generalizadas como a osteoporose podem causar perdas tissulares consideráveis, sobrepondo a capacidade de reparo completo e normal do tecido ósseo. Dessa forma, as pesquisas baseadas na diferenciação osteogênica de células tronco são pertinentes e necessárias na tentativa de melhorar o prognóstico das doenças ósseas e a qualidade de vida dos pacientes (Potier e Petite, 2005). Através dessas pesquisas, atualmente já se sabe que a proliferação e a diferenciação das CTM estão sob o comando de vários fatores (Lindblad, 2001). Esses fatores são sinais celulares

internos e externos representados por produtos de expressão gênica (c-fos), citocinas, fatores de crescimento, fatores humorais, densidade celular, contato físico com as células vizinhas e pelo estímulo físico (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006) e mecânico (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006; Ocarino et al., 2007).

Apesar da diversidade de estudos que empregam células tronco no tratamento de várias doenças, existem muitos aspectos, com relação à biologia dessas células, que ainda são desconhecidos. Exemplo disso tem sido a falta de conhecimento sobre o efeito dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica das CTM. Apesar de se ter conhecimento da existência de receptores para os hormônios tireoidianos nessas células (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002), somente um estudo, na literatura consultada, tem demonstrado que o hormônio tireoidiano aumenta a expressão de RNAm para o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) em cultura mista de células da medula óssea, mas sem menção ao efeito dose dependente desses hormônios (Milne et al., 1998).

No entanto, são inúmeras as pesquisas que demonstram o efeito *in vitro* dos hormônios tireoidianos sobre a atividade de síntese dos osteoblastos (Ernst e Froesch, 1987; Ohishi et al., 1994; Luegmayr et al., 1996; Fratzi-Zelman et al., 1997; Varga et al., 1997) e sobre as consequências clínicas e bioquímicas das disfunções tireoidianas no metabolismo ósseo e mineral (Greenspan e Greenspan, 1999; Serakides et al., 2000; Serakides et al., 2004; Murphy e Williams, 2004). O efeito *in vivo* das disfunções tireoidianas sobre o tecido ósseo é variável entre indivíduos, dependendo dos níveis séricos dos hormônios tireoidianos e sexuais e do curso da doença. Mas, de forma geral, a T3 estimula tanto a síntese quanto a reabsorção óssea, sendo seus

efeitos no tecido ósseo saudável ou com osteoporose dose e período dependentes. Dessa forma, a administração de tiroxina por curto período ou em pequenas doses em ratas com osteoporose pode minimizar ou reverter as alterações ósseas por estimular a síntese de matriz. No entanto quando administrada por longo período ou em doses elevadas a tiroxina agrava a osteopenia por causar supremacia da reabsorção óssea frente à síntese de matriz (Bianco et al., 2001; Serakides et al., 2004).

Pelo fato das pesquisas *in vivo* demonstrarem que o tecido ósseo de ratas com osteoporose tratadas com tiroxina apresenta focos de hiperplasia de osteoblastos (Serakides et al., 2004), célula que deriva da diferenciação das CTM da medula óssea (Tropel et al., 2004), postulou-se que os hormônios tireoidianos sejam importantes para a diferenciação osteogênica das CTM. Assim, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito *in vitro* de várias doses da triiodotironina na diferenciação osteogênica das CTM extraídas da medula óssea de ratas e cultivada ao longo de vários períodos. A importância de se estudar o efeito da T3 na diferenciação osteogênica das células tronco recai sobre a possibilidade de incrementar o processo de diferenciação *in vitro*, trazendo benefícios quando da utilização dessas células *in vivo* para o tratamento de doenças ou defeitos ósseos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido metabolicamente ativo que está em constante renovação. Isso mantém sua integridade estrutural e a homeostasia mineral (Raisz, 1999), ambas dependentes do equilíbrio entre os processos anabólico (aposição) e catabólico

(reabsorção) (Bland, 2000). Além disso, é um tecido multifuncional constituído por três tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. O primeiro tipo celular deriva-se das CTM da medula óssea e se localiza na superfície das trabéculas, no canal de Havers do tecido ósseo osteônico e no perioste, e tem a função principal de sintetizar matriz óssea não mineralizada (osteóide) constituída por colágeno tipo I, por proteínas não colagênicas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fibronectina e tenascina) (Robey, 1989; Nefussi et al., 1997; Bellows et al., 1999), e por proteoglicanos (sulfato de condroitina), dentre outros (Robey, 1989; Ocarino e Serakides, 2006). Cerca de 70% da matriz óssea é mineralizada logo após a sua síntese e o restante sofre mineralização gradual (Nunes e Nunes, 1988).

O controle dos processos anabólico e catabólico são influenciados por fatores locais como citocinas [IL-4, IL-13, IL-1, TNF, IL-6, IL-11], fatores de crescimento [IGF, TGF- β , FGF], estímulo mecânico, óxido nítrico, e comunicações intercelulares. Adicionalmente, o controle sistêmico é exercido pela ação de fatores de crescimento como IGF e hormônios como paratormônio, calcitonina, 1,25-diidroxivitamina D3, estrógeno, hormônio do crescimento, glicocorticóides, andrógenos e hormônios tireoidianos (Raisz, 1999; Bland, 2000). Sendo que o PTH, o 1,25-diidroxivitamina D3 e a calcitonina são os principais reguladores da homeostasia mineral. Já o estrógeno, a tiroxina e a triiodotironina influenciam o metabolismo ósseo, controlando, de forma diferenciada, a reabsorção e a aposição ósseas (Serakides et al., 2004).

2.2 Células tronco

As células tronco são células indiferenciadas que podem ser obtidas do embrião, do feto ou de indivíduos adultos (Shenfield et al., 2002). Independente de

sua origem, elas são capazes de se dividir por longos períodos e de se diferenciar em tipos celulares especializados (McLaren, 2001).

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 Weissman, 2004).

As células tronco embrionárias são derivadas do blastocisto e são capazes de 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 de manter ou reparar os tecidos nos quais residem (Shenfield et al., 2002). Mas, algumas pesquisas têm sugerido que as células tronco adultas são pluripotentes e apresentam potencial de diferenciação próximo ao das células tronco embrionárias, 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 de CTM da medula óssea em hepatócitos (Sato et al., 2005) e pela diferenciação das células do sistema

nervoso e musculares em células hematopoéticas (Wagers e Weissman, 2004).

O uso das células tronco embrionárias e adultas apresenta vantagens e desvantagens. A utilização das células tronco embrionárias pode trazer 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 de células tronco embrionárias não se aplicam ao uso das células tronco adultas (McLaren, 2001). Outra vantagem das células tronco adultas 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 células tronco embrionárias (Bobis et al., 2006). Mas a capacidade proliferativa e de diferenciação das células tronco adultas 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 células tronco adultas 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).

2.3 Células tronco mesenquimais

Vários tecidos são fontes de CTM, em maior ou menor número. Dentre eles tem-se: pele (Toma et al., 2001), músculo esquelético, tecido adiposo, 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), pâncreas (Mayhall et al., 2004), líquido amniótico, sangue do cordão umbilical,

placenta (Bobis et al., 2006), vasos sanguíneos, córnea, retina (Grove et al., 2004) e medula óssea (Jiang et al., 2002).

As CTM da medula óssea, também chamadas de células do estroma, foram primariamente descritas por Fridenstein e colaboradores em 1976 (Grove et al., 2004). Essas células são mais estudadas em comparação às de outros sítios do organismo pelo fato de serem facilmente isoladas, possuírem grande capacidade de expansão *in vitro* e amplo potencial de diferenciação (Minguell et al., 2001; Payushina et al., 2006; Tae et al., 2006). Além disso, em humanos, apresentam melhor diferenciação osteogênica e condrogênica, quando comparadas às células tronco do tecido adiposo (Tae et al., 2006). Além dos osteoblastos e dos condroblastos, essas células podem se diferenciar em tenócitos, adipócitos, miócitos (Payushina et al., 2006) e em células não mesenquimais representadas pelas células neurais e epiteliais (Tae et al., 2006).

A medula óssea também apresenta células tronco hematopoéticas (Bianco et al., 2001; Bobis et al., 2006) que *in vitro* podem ser facilmente separadas das CTM. Ao contrário das CTM, essas células não apresentam capacidade de adesão sendo facilmente separadas durante as trocas de meio de cultura (Payushina et al., 2006). Além disso, as CTM não expressam alguns marcadores fenotípicos das células tronco hematopoéticas, tais como: CD14, CD34, CD45 (Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006), CD11b, CD31, CD33 e CD133 (Bobis et al., 2006). Mas, uma em 100.000 células do estroma da medula óssea pode ser considerada CTM (Heng et al., 2004) e existem marcadores das CTM que também podem ser expressos em fibroblastos (Ishii et al., 2005a; Hughes et al., 2006), o que dificulta a obtenção de uma cultura totalmente pura e a identificação destas células *in vivo* (Bobis et al., 2006). Mas a

despeito disso, somente as células tronco teriam, *in vitro*, capacidade para diferenciarem-se nos mais variados tipos celulares (Minguell et al., 2001; Payushina et al., 2006; Tae et al., 2006).

As CTM expressam uma grande variedade de moléculas de adesão, proteínas de matriz, citocinas, receptores para fatores de crescimento e uma grande variedade de antígenos característicos também de outros tipos celulares como osteoblastos, condócitos, mioblastos (células satélites), células endoteliais e epiteliais e neurônios (Payushina et al., 2006). As CTM da medula óssea expressam CD44, CD71, CD106, CD 120a, CD124, CD29 (Pittenger et al., 1999), CD166 (ALCAM), CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD117, STRO-1, Sca-1, CD105 (SH2), MHC (Bobis et al., 2006) e CD54 (Covas et al., 2003; Tocci e Forte, 2003). Mas esta expressão pode variar de acordo com a idade e o estágio de diferenciação das células tronco (Bobis et al., 2006). Além disso, em quantidades distintas, alguns destes marcadores como CD105 (SH2), CD73 (SH3), CD166 e STRO-1 podem estar presentes tanto nas CTM quanto em fibroblastos (Ishii et al., 2005a). No entanto, as moléculas CD90 e CD54 são expressas exclusivamente pelas CTM (Covas et al., 2003; Tocci e Forte, 2003; Bobis et al., 2006)

As CTM da medula óssea são morfológicamente heterogêneas contendo no mínimo dois tipos celulares distintos: células alongadas e células cuboidais grandes (Bianco et al., 2001). Há também pesquisadores que as diferenciam, quanto ao potencial proliferativo, em células pequenas com rápida proliferação, e em células grandes com baixa proliferação (Bobis et al., 2006). Contrariamente, há pesquisas que verificaram células pequenas com baixa capacidade proliferativa determinada pela não reatividade dessas células com o antígeno Ki-67 (marcador de proliferação celular) (Colter et al., 2000).

Mas há outros estudos que independentemente da morfologia, ressaltaram que somente 10% das CTM da medula óssea estão proliferando e se encontram nas fases S, G2 e M do ciclo celular, enquanto a maioria das células tronco está nas fases G0 e G1 do ciclo celular (Conget e Minguell, 1999). Essas células podem ser expandidas por até 30 a 40 passagens, mas tornam-se senescentes e morrem por apoptose quando o número de passagens é superior a 40 (Tae et al., 2006).

As CTM têm papel importante no microambiente da medula óssea, dando suporte físico para as células do sistema hemocitopoético. Além disso, as CTM são importantes para manter a proliferação e a diferenciação das células tronco hematopoéticas por meio da síntese de proteínas da matriz extracelular representadas pela fibronectina, laminina, vimentina, colágenos tipo I, III (Payushina et al., 2006), IV, V e VI, hialuronato (Minguell et al., 2001), osteonectina e proteoglicanos (Payushina et al., 2006). As CTM também secretam fatores de crescimento e citocinas que participam do controle da hematopoiese tais como: IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, fator de necrose tumoral alfa (TNF α), fator estimulador da colônia de macrófagos (M-CSF) e fator estimulador da colônia de macrófagos/granulócitos (GM-CSF) (Bobis et al., 2006).

2.3.1 Diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais

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).

A proliferação e a diferenciação das CTM em células especializadas *in vivo* e *in vitro* estão sob o comando de fatores que vem

sendo pouco a pouco elucidados (Lindblad, 2001). Esses fatores são sinais celulares internos e externos representados por produtos de expressão gênica (c-fos), citocinas, fatores de crescimento, fatores humorais, densidade celular, contato físico com as células vizinhas e estímulo físico (Bobis et al., 2006, Payushina et al., 2006) e mecânico (Bobis et al., 2006, Payushina et al., 2006; Ocarino et al., 2007).

Os fatores de crescimento são representados pelo fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento transformante- β (TGF- β), IGF-1 (Bianco et al., 2001), fator de crescimento fibroblástico-4 (FGF-4), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Payushina et al., 2006), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) (Tae et al., 2006) e pelo fator de crescimento fibroblástico-1 (FGF-1). Esses fatores são importantes para a proliferação das CTM (Hughes et al., 2006). Outros fatores como IL-3, IL-6, GM-CSF e concentrações fisiológicas de glicocorticóides (dexametasona e hidrocortisona) também são importantes para a proliferação dessas células (Payushina et al., 2006). No entanto, a proliferação celular pode ser inibida por fatores como: interferon- α (IFN- α), IL-4 (Bobis et al., 2006), interferon- γ (IFN- γ), IL-7, IL-10 e IL-13 (Hughes et al., 2006) e por altas concentrações de glicocorticóides (Payushina et al., 2006).

Vários protocolos têm sido propostos para o crescimento e expansão *in vitro* das CTM. De modo geral, essas células requerem meio básico representado por *Dulbecco's modified Eagles's médium* (DMEM) enriquecido com antibióticos, antifúngicos e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Tae et al., 2006). 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

adquirem aparência semelhante à fibroblastos. Mas, diferentemente dos fibroblastos, as CTM apresentam receptores de adesão na membrana como: molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão leucócito ativada (ALCAM), e subunidades de integrinas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\beta 3$ e $\beta 4$ (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006). Além disso, as CTM alteram completamente sua morfologia durante o processo de diferenciação, adquirindo morfologia e características semelhantes à das células maduras (Payushina et al., 2006).

Durante a diferenciação osteogênica, as células adquirem morfologia semelhante à dos osteoblastos, com formato cuboidal ou poligonal e produzem: fosfatase alcalina, que é um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006), colágeno I e matriz extracelular rica em cálcio (nódulos de mineralização). Essas células também expressam osteocalcina, osteopontina, osteonectina dentre outras proteínas não colagênicas importantes para a mineralização da matriz óssea (Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2001; Payushina et al., 2006).

As células tronco podem se diferenciar em osteoblastos, dependendo das condições do meio de cultivo. Para a diferenciação osteogênica das células tronco, a dexametasona, o ácido ascórbico e o β -glicerofosfato são fatores indispensáveis (Bruder et al., 1998). 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 β -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).

A partir do cultivo das células tronco em meio osteogênico, muitos fatores que estimulam o recrutamento e a sua diferenciação em células osteoprogenitoras já foram descobertos. Sabe-se que as proteínas morfogênicas ósseas (BMPs) (Katagiri e Takahashi, 2002; Chaudhary et al., 2004), a prostaglandina E2 (PGE2) (Keila et al., 2001), o IGF-1 (Jia e Heersche, 2002), o FGF (Chaudhary et al., 2004; Hughes et al., 2006) e o PDGF (Chaudhary et al., 2004) são importantes para a diferenciação osteogênica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Hughes et al., 2006). O TGF- β também tem sido considerado importante na diferenciação osteogênica *in vitro* (Hughes et al., 2006). Mas, existem fatores inibidores dessa diferenciação como o fator inibitório leucêmico, o oncostatin M, o EGF, o calcitriol (Payushina et al., 2006) e o TNF- α (Hughes et al., 2006).

O mecanismo de ação dos fatores de crescimento citados anteriormente está sendo amplamente estudado. O TGF- β pertence à superfamília das TGF- β e é sintetizado e encontrado no tecido ósseo, onde interage com receptores transmembrana serina/treonina quinase e tem importante papel no controle da proliferação e da diferenciação celular e na produção de matriz extracelular. Mas esse efeito depende do estágio da diferenciação celular. Nos estágios iniciais, o TGF- β recruta e estimula a proliferação das células osteoprogenitoras. Mas, nos estágios tardios, o TGF- β bloqueia a diferenciação e a mineralização da matriz extracelular (Hughes et al., 2006).

As BMPs são glicoproteínas pleiotrópicas pertencentes à superfamília das TGF- β (Tae et al., 2006), envolvidas no recrutamento, na proliferação e na diferenciação de células osteoprogenitoras, além de serem encontradas em grande quantidade na matriz óssea (Santos et al., 2005). Essas moléculas interagem com os receptores serina/treonina quinase tipos I e II (Hughes

et al., 2006). Apesar de já terem sido identificadas mais de 20 BMPs, as BMPs 2, 4, 6 e 7 são consideradas as mais importantes para a diferenciação osteogênica das CTM (Chaudhary et al., 2004).

O PDGF interage com os receptores a e b tirosina quinase, sendo secretado por plaquetas durante as fases iniciais da injúria tissular. Esse fator pode ser encontrado em vários tecidos saudáveis, incluindo o tecido ósseo, onde atua no recrutamento das CTM durante a formação e a remodelação óssea. Além disso, o PDGF exerce efeito parácrino sobre o TGF- β com relação ao controle da proliferação e da diferenciação osteoblástica e sobre a produção de matriz extracelular. (Hughes et al., 2006) descrito anteriormente. O FGF também interage com receptores de membrana tirosina quinase e apresenta papel importante na proliferação e na diferenciação osteogênica das CTM (Chaudhary et al., 2004).

2.4 Efeito dos hormônios nas células ósseas diferenciadas e na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais

Comprovadamente, as células do estroma da medula óssea apresentam receptores para estrógeno (Bellido et al., 1993; Gruber et al., 1999. Wang et al., 2006), andrógeno (Gruber et al., 1999), 1,25-diidroxivitamina D3 [1,25 (OH) $_2$ D3] (Bellido et al., 1993; Gruber et al., 1999), hormônios tireoidianos (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002), hormônio do crescimento (Cool et al., 2005) e glicocorticóides (Derfoul et al., 2006). Sendo assim, comprovadamente ou hipoteticamente, vários hormônios, tais como o estrógeno, a vitamina D, o paratormônio, o hormônio do crescimento, os hormônios tireoidianos e os glicocorticóides podem ser importantes moduladores da proliferação celular, da diferenciação osteogênica das CTM e da síntese de matriz óssea (Ebert et al., 2007).

O estrógeno atua tanto *in vivo* quanto *in vitro* no controle da atividade osteoblástica (Holzer et al., 2002). Nos osteoblastos, o estrógeno estimula a expressão dos genes que codificam o colágeno I, a fosfatase alcalina, a osteopontina, a osteocalcina, a osteonectina (Ernst et al., 1988; Robinson et al., 1997; Qu et al., 1998) e a osteoprotegerina, além de inibir a expressão de RANKL (Zallone, 2006). Dessa forma, o estrógeno estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea (Tomkinson et al., 1998; Liel et al., 1999; Bland, 2000). Além disso, o estrógeno inibe a síntese de IL-1 β , IL-6, TNF- α , PGE2 e do M-CSF (Hofbauer e Khosla, 1999; Zhou et al., 2003). No entanto, outros estudos com células do estroma comprovaram que o estrógeno não afeta a liberação de IL-1, IL-6 e TNF- α (Ramalho et al., 2001).

Além da sua ação sob as células ósseas diferenciadas, o estrógeno também estimula *in vitro* a diferenciação das CTM em osteoblastos (Pan et al., 2005), controlando a expressão de fosfatase alcalina (Holzer et al., 2002), de colágeno I e de TGF- β (Zhou et al., 2001). Além disso, as CTM da medula óssea de ratas ovariectomizadas apresentam menor diferenciação osteogênica, comprovando a ação *in vivo* dos hormônios sexuais sob essas células (Ocarino et al., 2007).

Com relação à progesterona, estudos em ratos comprovaram a existência de receptores em osteoblastos e em células osteoprogenitoras (Namara e Loughrey, 1998) e seu efeito direto na proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos (Ishida et al., 1996; Ishida e Heersche, 1997). No entanto, o efeito da progesterona na proliferação e na diferenciação osteogênica das CTM é dose dependente (Ishida et al., 1997) e sexo dependente, sendo seu efeito superior nas células de ratas fêmeas (Ishida e Heersche, 1997).

Os glicocorticóides aumentam a diferenciação dos osteoblastos e das células osteoprogenitoras (Boden et al., 1997; Ishida et al., 1996; Ishida et al., 1997; Ishida e Heersche, 1997; Bellows et al., 1998) e, ao contrário da progesterona, não tem efeito sexo dependente (Ishida e Heersche, 1997). Este aumento na diferenciação osteoblástica está associado com a indução da expressão de marcadores da diferenciação osteogênica tais como: fosfatase alcalina (Green et al., 1990; Kasugai et al., 1991), osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea (Kasugai et al., 1991; Shalhoub et al., 1998). Além disso, estudos confirmaram que a indução da diferenciação osteogênica de osteoblastos da calvária de ratos, é mediada em parte pela BMP-6 (Boden et al., 1997). Em células tronco humanas, 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) os glicocorticóides inibem a proliferação, sem afetar a diferenciação (Walsh et al., 2001).

Os andrógenos estimulam a aposição e a mineralização da matriz óssea (Vanderschueren e Vandenput, 2000), por promover a proliferação e a diferenciação dos pré-osteoblastos (Masuyama et al., 1992; Ishida et al., 1996; Karsperk et al., 1997; Notelovitz, 2002) e das CTM (Ishida e Heersche, 1997). Além disso, os andrógenos também controlam a síntese de várias citocinas como IL-1 β , IL-6, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), PGE2 e de TGF- β que podem ser responsáveis pelo efeito indireto dos andrógenos na diferenciação osteogênica das células tronco e das células osteoprogenitoras (Chiu et al., 2000).

A 1,25 diidroxicolecalciferol (1,25(OH)₂D3), forma ativa da vitamina D, estimula o recrutamento de células

osteoprogenitoras da calvária (Zhang et al., 2006) e promove a diferenciação osteogênica das CTM extraídas da medula óssea tanto *in vitro* quanto *in vivo*, por inibir a proliferação e estimular a liberação de marcadores da diferenciação osteogênica, como fosfatase alcalina (Rickard et al., 1995; Fromigue et al., 1997; D'Ippolito et al., 2002), osteopontina (Bellows et al., 1999) e osteocalcina (Lian et al., 1985; Bellows et al., 1999), além de inibir a síntese de colágeno I por células osteoprogenitoras (Rowe e Kream, 1982). Estudos *in vitro* com CTM da medula óssea humana, utilizando a associação de 1,25(OH)₂D3 e dexametasona no meio de cultivo, demonstraram efeito aditivo na atividade da fosfatase alcalina (Fromigue et al., 1997).

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) e inibidor da degradação do colágeno ósseo (Canalis et al., 1995). Além disso, o GH potencializa o efeito do IGF-1 na proliferação e diferenciação de osteoblastos de ratos (Langdahl et al., 1998) e estimula a proliferação de células osteoprogenitoras (Kassem et al., 1993; Kassem et al., 1994) e a diferenciação osteogênica de CTM da medula óssea de ratos (Cool et al., 2005).

Os hormônios tireoidianos, T3 e T4, são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normal de indivíduos jovens e afetam a remodelação óssea em indivíduos adultos, além de influenciar tanto a formação quanto a reabsorção ósseas *in vivo* e *in vitro* (Varga et al., 1994). Os efeitos dos hormônios tireoidianos *in vitro* são vastamente estudados em osteoblastos e pré-osteoblastos (Oishi et al., 1994; Klaushofer et al., 1995; Varga et al., 1997), mas não têm sido estudados em

células tronco. Os efeitos moleculares dos hormônios tireoidianos são mediados pela ligação dos mesmos a receptores nucleares chamados TR α e TR β pertencentes à superfamília de receptores de hormônios esteróide/tireóide e quatro principais isoformas denominadas $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\beta 1$ e $\beta 2$ (Siddiqi et al., 2002).

Os hormônios tireoidianos influenciam a proliferação e a diferenciação de pré-osteoblastos (Varga et al., 1997). Estudos *in vitro* demonstraram que a T3 diminui a proliferação de osteoblastos MC3T3-E1 (Varga et al., 1994; Fratzl-Zelman et al., 1997) e aumenta a atividade de síntese de osteoblastos maduros (Ohishi et al., 1994). Além disso, a T3 aumenta a proliferação e a diferenciação de pré-osteoblastos da calvária de ratos (Ernst e Froesch, 1987). O efeito dos hormônios tireoidianos em culturas de pré-osteoblastos é dose dependente. Em elevadas concentrações (100nM) a T3 inibe a proliferação e em baixas concentrações, estimula a proliferação dos pré-osteoblastos (Klaushofer et al., 1995).

Em culturas de osteoblastos e de pré-osteoblastos, os hormônios tireoidianos regulam a síntese de genes que codificam diversos fatores, tais como a fosfatase alcalina, a osteocalcina e o colágeno, sendo importantes para a diferenciação dessas células (Klaushofer et al., 1995). Além disso, T3 nas doses de 10^{-8} e 10^{-9} M, diminui a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos da calvária de ratos (Ohishi et al., 1994), e na dose de 10^{-7} M estimula a atividade da fosfatase alcalina em osteoblastos MC3T3-E1 (Fratzl-Zelman et al., 1997; Varga et al., 1997), o que demonstra mais uma vez o efeito dose dependente da T3. Tanto T3 quanto T4 estimulam a expressão de genes que codificam o IGF-1 em cultura de osteoblastos MC3T3-E1 de ratos (Varga et al., 1994) e estimula a expressão de receptores para IGF-1 em osteoblastos

humanos (Pepene et al., 2001). T3 também aumenta os níveis de RNAm para osteocalcina em osteoblastos MC3T3-E1 (Varga et al., 1997; Varga et al., 2004) e em osteoblastos ROS 17/2.8 (Gouveia et al., 2001).

Com relação à síntese e à distribuição de colágeno na matriz extracelular, em cultivos de osteoblastos MC3T3-E1 tratados com T3, as fibras de colágeno apresentavam-se em pequena quantidade, porém distribuídas por toda a matriz extracelular, ao contrário do grupo sem T3, onde as fibras de colágeno apresentam-se densamente arranjadas na matriz extracelular (Fratzl-Zelman et al., 1997). Pesquisas confirmam que T3 aumenta também a quantidade de filamentos de actina F no citoesqueleto de osteoblastos MC3T3-E1 (Luegmayer et al., 1996).

Além de estimular a atividade osteoblástica, a triiodotironina *in vitro* também estimula a reabsorção óssea osteoclástica diretamente (Mundy et al., 1976) ou indiretamente mediada por osteoblastos (Allain et al., 1992; Britto et al., 1994). Esta ação pode ser mediada pela liberação de IL-6 por células do estroma da medula óssea humana (Kim et al., 1999). A IL-6, juntamente com a IL-11 são consideradas importantes para a formação osteoclástica e para a reabsorção óssea (Kim et al., 1999). Outro estudo confirmou que a triiodotironina, além de estimular a liberação de IL-6 também estimula a liberação e a expressão dos genes que codificam a IL-8, tanto por osteoblastos MG63, quanto por células do estroma da medula óssea humanas. A IL-8 regula a osteoclastogênese e estimula a atividade dos osteoclastos (Siddiqi et al., 1998). Além disso, em cultura de osteoblastos em associação com biomateriais, a T3 aumenta a expressão de genes que codificam a osteocalcina, mas não altera a expressão de osteoprotegenina (Rumpler et al., 2007) que também é um importante regulador da formação

osteoclástica (Varga et al., 2004). No entanto, a T3 aumenta a expressão de genes que codificam a osteoprotegenina em osteoblastos MC3T3-E1 maduros (Varga et al., 2004).

Com relação especificamente às CTM da medula óssea, apesar de se ter conhecimento da existência de receptores para os hormônios tireoidianos nessas células (Gruber et al., 1999; Siddiqi et al., 2002), sendo que a isoforma TR α 1 é a mais expressada, seguida de TR β 1 e TR β 2 (Siddiqi et al., 2002), somente um estudo, na literatura consultada, demonstrou que em cultura mista de células da medula óssea, a dose de 100nM de T3 aumenta a expressão de RNAm para IGF-1 (Milne et al., 1998) e que seu efeito é dependente do sítio ósseo de origem dessas células. Em células da medula óssea do fêmur, a T3 aumenta os níveis de RNAm para osteocalcina e para colágeno I, com aumento discreto nos níveis de RNAm para IGF-1. No entanto, nas vértebras, a T3 não afeta os níveis de RNAm para osteocalcina e colágeno I, mas aumenta consideravelmente os níveis de RNAm para IGF-1 (Milne et al., 1998).

3. MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos Laboratórios de Biologia Molecular e Cultivo Celular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e de Histopatologia do Setor de Patologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, na Escola de Veterinária da UFMG. Os animais foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo 3/2007) (Anexo 8.1).

Foram utilizadas oito ratas Wistar com 30 dias de idade que foram eutanasiadas por punção cardíaca após anestesia com pentobarbital sódico (30mg/Kg IP). Seus ossos longos (fêmur e tibia) foram colhidos assepticamente e imediatamente submetidos à extração das CTM da medula óssea.

O experimento foi conduzido utilizando-se CTM cultivadas em meio de diferenciação osteogênico e acrescidas ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina¹, constituindo cinco grupos experimentais: controle (sem 3,3',5-triiodo-L-tironina) e tratados com 100, 1, 10⁻² e 10⁻³ nM de 3,3',5-triiodo-L-tironina, com três repetições cada, durante três períodos (7, 14 e 21 dias).

3.1 Extração e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em DMEM

A extração das CTM da medula óssea foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Jaiswal et al., 2000; Lee et al., 2003; Tropel et al., 2004) e adotados no laboratório de cultivo celular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Os animais foram eutanasiadas por punção cardíaca, após anestesia², os ossos longos (fêmur e tibia bilaterais) 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 laminar³, a medula óssea foi lavada com DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)⁴ enriquecido com gentamicina, penicilina (10.000 um/ml), estreptomicina

¹ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

² Anestesia pelo uso de pentobarbital sódico (30mg/kg) por via peritoneal

³ Nuaire class II type A/B3

⁴ Gibco, Grand Island, NY, USA

(1000µg/mL) e anfotericina (25µg/mL)⁵. Após centrifugação por 10 minutos a 1400rpm, as células foram cultivadas em garrafas T75⁶ contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de soro fetal bovino⁷ em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 24h as células foram lavadas com PBS (solução tampão de fosfato padrão) para remoção das células não aderidas. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Após quatro repiques e até que se obteve a confluência de 80 a 90% das células, realizou-se a caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo para demonstrar a pureza da cultura.

3.1.1 Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea por citometria de fluxo

Após o cultivo em garrafas T75⁶ das CTM em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90%, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer (Anexo 8.2) e distribuídas em placas de 96 poços⁸ (fundo redondo) com concentração de 1x10⁶ células/poço, sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação. Posteriormente, realizou-se a centrifugação da placa por 10 minutos a 1400rpm 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. Adicionou-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 1400rpm 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 1400rpm e 10°C. Adicionou-se 2µL do anticorpo secundário e 20µL de PBS 0,15M/poço. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, adicionou-se 150µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1400rpm e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1400rpm 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*)⁹ empregando o software *Cell Quest*¹⁰, 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 (cat#610266), anti-CD90 (cat#554895), anti-CD73 (cat#551123) e anti-CD54 (cat#554967)¹¹.

3.2 Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea em meio osteogênico

Após o cultivo em DMEM, três a quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, o meio foi substituído

⁵ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

⁶ 75cm² - TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

⁷ Soral, Campo Grande, MS, Brasil

⁸ TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

⁹ FACScan, Becton Dicknson

Immunocytometry, San Jose, CA, USA

¹⁰ The Cell QuestTM Software, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

¹¹ BD Biosciences, San Jose, CA USA

por meio osteogênico que é enriquecido com ácido ascórbico (50µg/mL), β-glicerofosfato (10mM)¹² e dexametasona (0,1µM)¹³, acrescido de 10% de soro fetal bovino, sendo que as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Assim, 1x10⁵ células foram cultivadas, em triplicata, em placas de 24 ou 6 poços¹⁴ com diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (100, 1, 10⁻² e 10⁻³nM) em três períodos de tempo (7, 14 e 21 dias). As doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina foram estabelecidas conforme estudos com cultivo de osteoblastos (Ishida et al., 1995; Milne et al., 1998). Para cada período 1x10⁵ células/poço sem tratamento com T3 foram utilizadas para compor o grupo controle. Assim, foram constituídos cinco grupos: 1) 100nM de T3, 2) 1nM de T3, 3) 10⁻²nM de T3, 4) 10⁻³nM de T3 e 5) controle (sem T3) que foram submetidos aos testes descritos a seguir aos sete, 14 e 21 dias de cultivo.

3.2.1 Conversão do MTT em cristais de formazan

Ao término de cada período (7, 14 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-difeniltetrazolio]} 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)¹⁵. A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS-10% HCl que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços

para leitura em espectrofotômetro¹⁶ com comprimento de onda de 595nm.

3.2.2 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

Ao término de cada período (7, 14 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/NBT¹⁷ (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3µL BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida adicionou-se 210µL de solução detergente SDS 10% para incubação *overnight*. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm.

3.2.3 Dosagem de colágeno

Ao término de cada período (7, 14 e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS 0,15M. Em seguida adicionou-se 4mL de Bouin em cada poço, para incubação por uma hora a 37°C sob agitação. As placas foram lavadas em água corrente por 15 minutos para posterior coloração pelo *Sirius Red* durante 30 minutos a 37°C sob agitação. O excesso de corante foi removido e em seguida as células foram lavadas abundantemente com 0,01N de HCl. Posteriormente foram adicionados 300µL de NaOH 0,5M por 30 minutos sob agitação. Foram removidos 100µL para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm.

¹² Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

¹³ Aché, Guarulhos, SP, Brasil

¹⁴ TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

¹⁵ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

¹⁶ ELx 800, Bio-tek instruments, INC.

¹⁷ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

3.2.4 Caracterização do tipo de colágeno pela coloração de *picro-sirius red* sob luz polarizada

Ao término de cada período (7, 14 e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas (22×22mm) estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M. Em seguida adicionaram-se 4mL de Bouin em cada poço, para incubação por uma hora a 37°C sob agitação. As placas foram lavadas em água corrente por 15 minutos para posterior coloração pelo *Sirius Red* durante 30 minutos a 37°C sob agitação. O excesso de corante foi removido e em seguida as células foram lavadas abundantemente com 0,01N de HCl. Posteriormente adicionou-se álcool 70% para fixação por 24 horas. As lamínulas foram removidas da placa, imersas em álcool absoluto, em xilol e montadas em lâminas com bálsamo para observação em microscopia de campo escuro sob luz polarizada segundo técnica descrita por Junqueira et al. (1979).

3.2.5 Determinação da porcentagem de células/campo

Ao término de cada período (7, 14 e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas (22×22mm) estéreis, foram fixadas em álcool 70% e submetidas à coloração por hematoxilina-eosina (Prophet et al., 1992) (Anexo 8.3). Posteriormente foi determinado o número de células/campo em 50 campos tomados em toda a extensão da lamínula com auxílio de gráticula e objetiva de 20×.

3.2.6 Quantificação e mensuração do diâmetro médio dos nódulos de mineralização

Ao término de cada período (7, 14 e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas (22×22mm) estéreis, foram

lavadas com PBS 0,15M e fixadas com álcool 70% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (Prophet et al., 1992) (Anexo 8.4) para avaliação do número de nódulos/campo e do diâmetro médio dos nódulos de mineralização. Somente os nódulos de coloração marrom ou negra foram quantificados. Foi determinado o número de nódulos/campo em 35 campos em objetiva de 10×. O diâmetro médio dos mesmos foi mensurado com auxílio de ocular micrométrica¹⁸ em 50 campos em objetiva de 20×. Em seguida os valores obtidos foram transformados para micrômetros com auxílio de uma lâmina micrométrica.

3.3 Determinação da massa mitocondrial pelo Mito Tracker Green (MTG) e análise por citometria de fluxo

O MTG fluorescente tem sido usado como instrumento para a determinação da massa mitocondrial (Pendergrass et al., 2004). Uma quantidade previamente padronizada das CTM (1×10^5 células/poço) foi cultivada em triplicata, em placas de seis poços com meio de diferenciação osteogênico acrescido de 10% de soro fetal bovino (grupo controle) e com meio de diferenciação osteogênico acrescido de T3 na concentração de 10^{-2} nM (grupo tratado), sendo que as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Ao término de 21 dias, as células foram lavadas com PBS 0,15M e coradas com MTG diluído 1:1000 em PBS 0,15M e incubadas por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Utilizaram-se células não coradas como branco. Após a incubação, as células foram observadas em microscópio, tripsinizadas e centrifugadas a 1400rpm por 10 min. O *pellet* foi ressuspendido com meio osteogênico. A leitura das células foram realizadas em citômetro de fluxo FACScan (*Fluorescence*

¹⁸ Carl Zeiss, KLP-W 10x

Activated Cell Analyser)¹⁹ empregando o *software Cell Quest*²⁰, com aquisição de 10.000 eventos, tendo como parâmetros FSC e SSC em escala linear e FL1 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.

3.4 Análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso e multifatorial 5x3 (cinco grupos e três períodos). Para cada variável estudada foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK) (Sampaio, 1998).

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea

Após quatro repiques, a caracterização fenotípica das CTM da medula óssea de ratas por citometria de fluxo demonstrou a expressão de CD45 em 3,06% das células, CD90 em 86,77%, CD73 em 93,99% e CD54 em 95,10% das células (Fig. 1).

4.2 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 de cor azul escura. Esta capacidade, que somente células viáveis possuem, indica atividade mitocondrial e conseqüente viabilidade celular (Mossmann, 1983; Hansen et al., 1989).

Aos sete dias de cultivo, independente da dose utilizada (100, 1, 10⁻² e 10⁻³nM de T3), todos os grupos tratados com T3 apresentaram maior capacidade de conversão do MTT em cristais de formazan em relação ao grupo controle (sem T3). No entanto, aos 14 e 21 dias de cultivo, somente os valores das doses de 1 e 10⁻²nM de T3 permaneceram superiores em relação ao controle (Fig. 2, anexo 8.5).

Os grupos tratados com 100nM e 10⁻³nM de T3, de sete para 14 dias apresentaram uma redução na conversão do MTT em cristais de formazan, mas aumentaram a conversão dos 14 para 21 dias de cultivo. Enquanto, os grupos tratados com 1 e 10⁻²nM de T3, de sete para 14 dias de cultivo, demonstraram aumento na conversão do MTT em cristais de formazan e aumentaram essa conversão de 14 dias para 21 dias de cultivo. No grupo controle, a conversão do MTT em cristais de formazan permaneceu inferior e estável durante os três períodos (7, 14 e 21 dias) de cultivo (Anexo 8.5).

¹⁹ FACScan, Becton Dicknson Immunocytometry, San Jose, CA, USA

²⁰ The Cell QuestTM Sftware, Becton Dickinson Dicknson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA

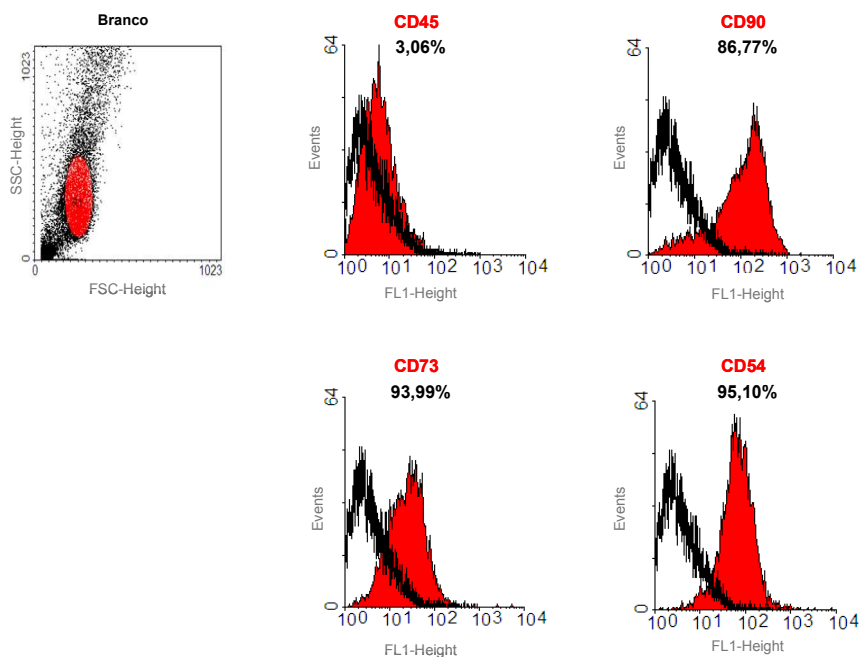


Figura 1. Análise da expressão de CD45, CD90, CD73 e CD54 em CTM da medula óssea de ratas cultivadas em DMEM por citometria de fluxo após quatro repiques e confluência de 80 a 90% para caracterização fenotípica. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de 10^1 . O pico preto vazio corresponde às células tronco não marcadas (controle negativo). O pico vermelho preenchido corresponde às células tronco marcadas com anticorpos fluorescentes.

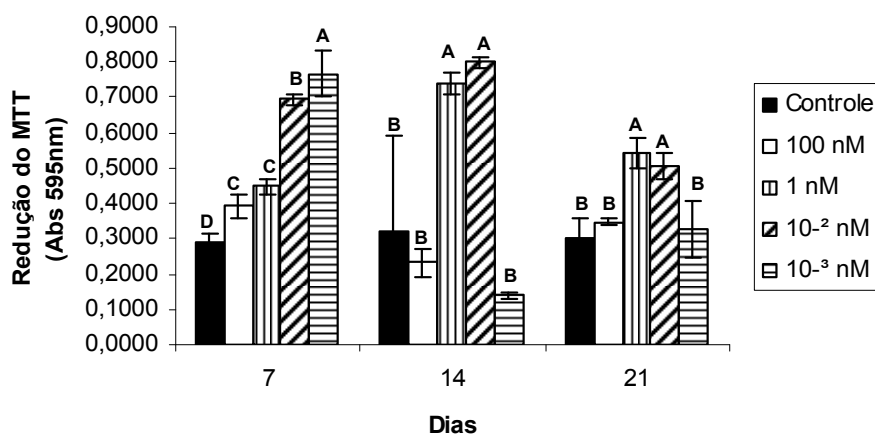


Figura 2. Redução do MTT em cristais de formazan em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3. *Letras maiúsculas distintas no topo das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de cada período.

4.3 Atividade da fosfatase alcalina

Este teste baseia-se no princípio de que os cromógenos BCIP e NBT reagem com a fosfatase alcalina, onde o BCIP é hidrolisado e o NBT é reduzido formando um produto azul escuro (Smejkal e Kaul, 2001). Este teste pode indicar o início da diferenciação celular, visto que a fosfatase alcalina é um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006).

Aos sete dias de cultivo, houve aumento precoce da atividade da fosfatase alcalina nos grupos tratados com as doses de 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3 em relação aos demais grupos controle e tratados com T3. Enquanto aos 14 dias, a dose de 10^{-2} nM de T3 foi a que apresentou maior atividade da

fosfatase alcalina em relação aos demais grupos avaliados. Mas, aos 21 dias de cultivo a atividade da fosfatase alcalina foi semelhante em todos os grupos tratados com T3 e controle (Fig. 3, anexo 8.6).

Os grupos controle e tratado com 1 nM de T3, de sete para 21 dias de cultivo, apresentaram aumento na atividade da fosfatase alcalina. Enquanto, os grupos tratados com 100, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3, de sete para 21 dias de cultivo, apresentaram a atividade da fosfatase alcalina estável (Anexo 8.6).

O teste da atividade da fosfatase alcalina também foi realizado no sobrenadante, no entanto, o resultado obtido foi negativo, chegando a ser inferior ao grupo controle e por isso não foram demonstrados.

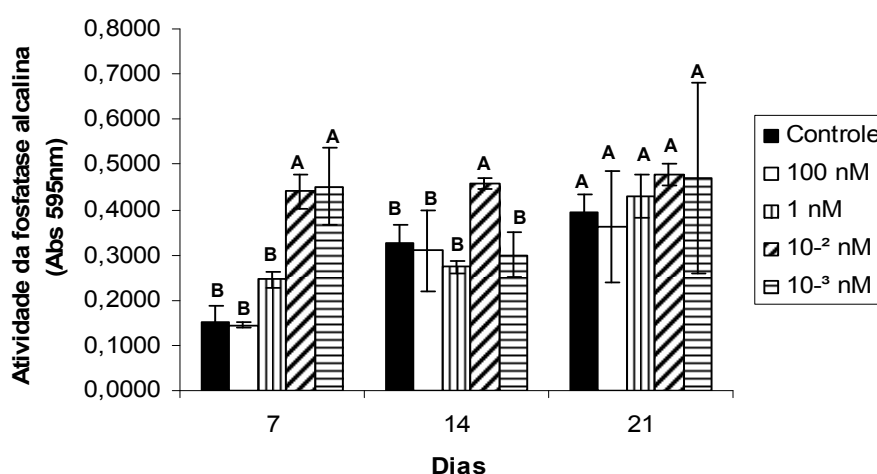


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTM da medula óssea de ratos em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.

*Letras maiúsculas distintas no topo das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de cada período.

4.4 Dosagem e maturação do colágeno

A coloração de *picro-sirius* é um excelente método para corar o colágeno e isto ocorre pois o *sirius red* reage, via grupos

sulfônicos, com grupos básicos presentes na molécula de colágeno. As fibras de colágeno coradas ficam arranjadas paralelamente com as moléculas de *sirius red* e essa relação em paralelo resulta na

birrefringência observada em microscópio de campo escuro sob luz polarizada (Junqueira et al., 1979).

Aos sete dias de cultivo, os grupos tratados com as doses de 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3 apresentaram maior síntese de colágeno em relação ao grupo controle. Aos 14 dias, somente as células tratadas com 10^{-3} nM de

T3 demonstraram maior produção de colágeno em relação aos demais grupos. Mas, aos 21 dias de cultivo, nos grupos tratados com as doses de 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3 a produção de colágeno foi superior em comparação ao controle. Efeito negativo sob a síntese de colágeno foi observado aos 21 dias somente na dose de 100nM de T3 em relação ao controle (Fig. 4, anexo 8.7).

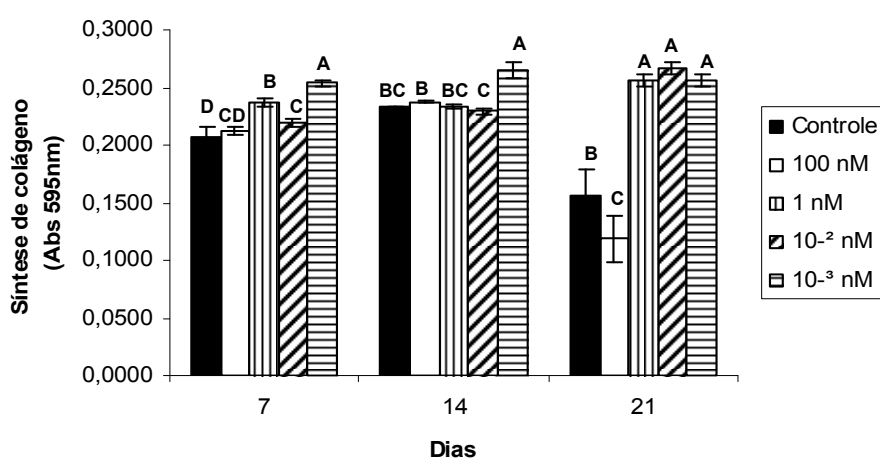


Figura 4. Síntese de colágeno em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.

*Letras maiúsculas distintas no topo das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de cada período.

Os grupos controle e tratado com 100nM de T3, de sete para 21 dias de cultivo, apresentaram redução na produção de colágeno. Enquanto, os grupos tratados com 1 e 10^{-2} nM de T3, de sete para 21 dias de cultivo, demonstraram aumento na síntese de colágeno. No grupo tratado com 10^{-3} nM de T3, a produção de colágeno permaneceu elevada e estável durante os três períodos de cultivo (Anexo 8.7).

Pela coloração de *picro-sirius red* sob luz polarizada, o grupo tratado com 10^{-2} nM de

T3 aos 21 dias de cultivo, além de demonstrar maior quantidade de colágeno apresentou também, em comparação ao controle e aos demais grupos tratados, fibras de colágeno predominantemente vermelhas ou amareladas (colágeno tipo I) de permeio a menor quantidade de fibras de colágeno verdes (colágeno tipo III). Além disso, em comparação ao controle e aos demais grupos tratados com T3, as fibras apresentavam birrefringência maior, eram espessas, e densamente distribuídas em forma de rede.

Interessante, é que o grupo tratado com a dose de 10^{-3} nM de T3 apesar de ter apresentado maior síntese de colágeno em relação ao controle aos 21 dias (Fig. 4),

apresentou fibras de colágeno vermelhas com birrefringência inferior aos demais grupos, inclusive ao grupo controle (Fig. 5).

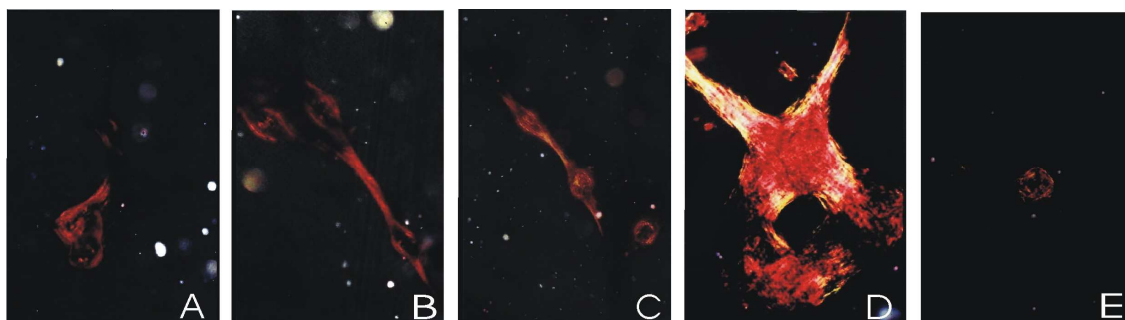


Figura 5. Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico, coloração de *picro-sirius red* sob luz polarizada, 62,5X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. (C) 1nM de T3. (D) 10^{-2} nM de T3. (E) 10^{-3} nM de T3. Dose de 10^{-2} nM de T3 com fibras de colágeno vermelhas mais densas e mais birrefringentes em comparação aos demais grupos e densamente distribuídas em forma de rede. Grupo tratado com 10^{-3} nM de T3 com fibras menos birrefringentes e menos densas quando comparadas ao controle.

4.5 Número e diâmetro médio dos nódulos de mineralização

Aos sete e 14 dias de cultivo, o maior número de nódulos de mineralização amarronzados ou negros, foi encontrado na dose de 1nM de T3. Mas, aos 21 dias somente o grupo tratado com 10^{-2} nM de T3 apresentou número de nódulos de mineralização significativamente maior em comparação ao grupo controle (Fig. 6, anexo 8.8). Além disso, o teor de cálcio dos nódulos, refletido pela coloração enegrecida era mais intenso nos grupos tratados com 10^{-2} nM e 10^{-3} nM de T3 (Fig. 7).

Os grupos controle e tratados com 100, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3, de sete para 21 dias de cultivo, apresentaram aumento no número de nódulos de mineralização. Enquanto, o grupo tratado com 1nM de T3, permaneceu elevada e estável durante os três períodos (7, 14 e 21 dias) de cultivo (Anexo 8.8).

Com relação ao diâmetro médio dos nódulos de mineralização, não houve diferença significativa entre grupos aos sete dias de cultivo. No entanto, aos 14 e 21 dias de cultivo, o diâmetro médio dos nódulos de mineralização foi significativamente maior no grupo tratado com 10^{-2} nM de T3 em comparação aos demais grupos (Fig. 8 e 9, anexo 8.9).

A partir dos 15 dias de cultivo, o grupo tratado com 100nM de T3 apresentou a formação de incontáveis cristais não aderidos a matriz colagênica com forma característica de “cruz de malta” e amplamente distribuídos por toda a superfície de cultivo. Esses cristais não foram observados em nenhum período nos demais grupos tratados com T3 e no grupo controle (Fig. 10).

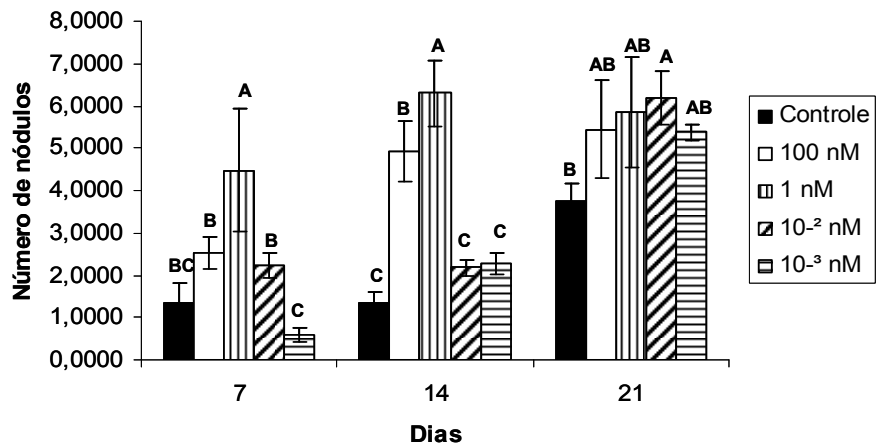


Figura 6. Número de nódulos de mineralização em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10⁻² e 10⁻³ nM de T3. *Letras maiúsculas distintas no topo das barras representam diferenças significativas (p<0,05) entre grupos dentro de cada período.

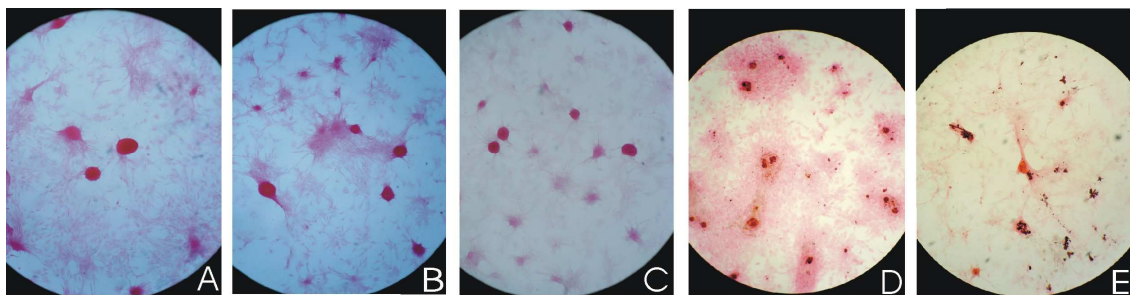


Figura 7. Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico, coloração de Von Kossa, 25X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. (C) 1nM de T3. (D) 10⁻²nM de T3. (E) 10⁻³nM de T3. Número maior de nódulos de mineralização amarronzados ou negros no grupo tratado com 10⁻²nM de T3.

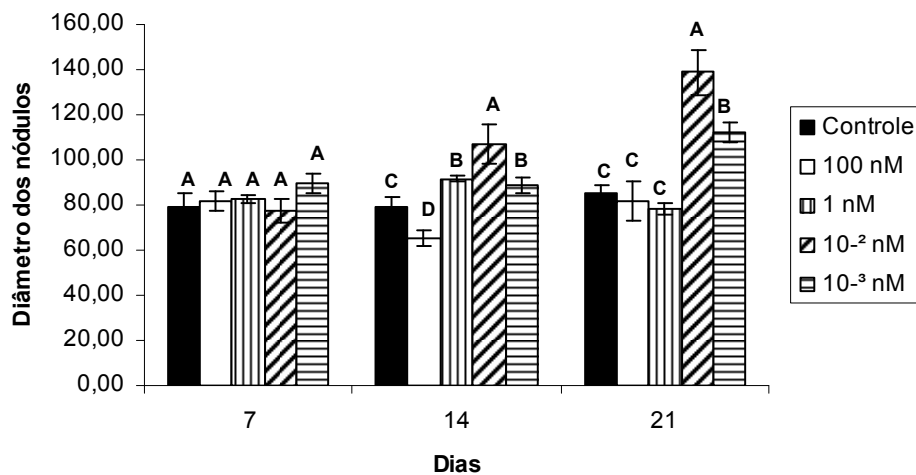


Figura 8. Diâmetro médio dos nódulos de mineralização em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10⁻² e 10⁻³ nM de T3.

*Letras maiúsculas distintas no topo das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de cada período.

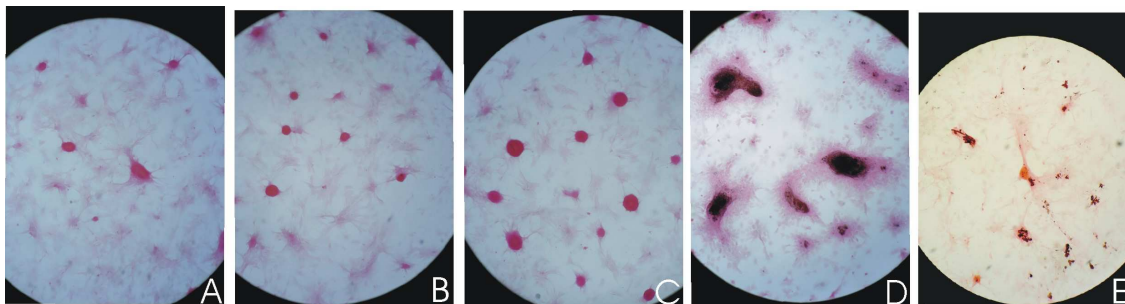


Figura 9. Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico, coloração de Von Kossa, 25X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. (C) 1nM de T3. (D) 10⁻²nM de T3. (E) 10⁻³nM de T3. Diâmetro médio dos nódulos de mineralização amarronzados ou negros maior no grupo tratado com 10⁻²nM de T3 em relação aos demais grupos avaliados.

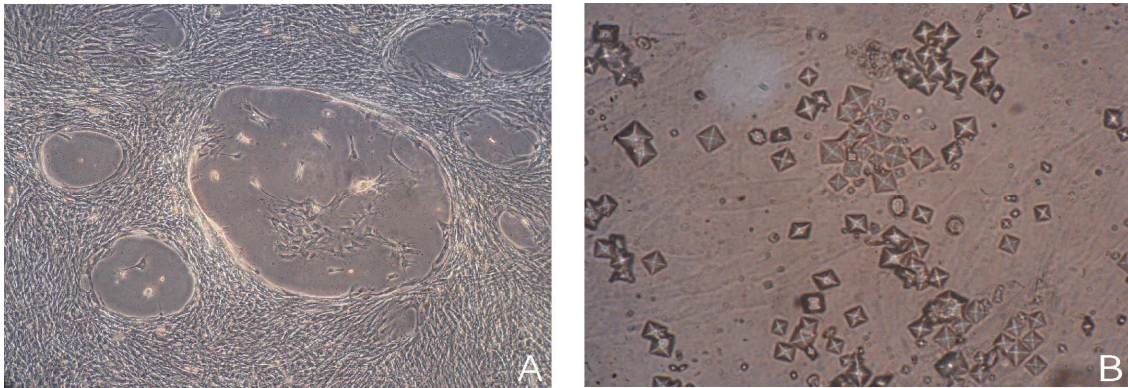


Figura 10. Cultivo de CTM da medula óssea de ratas aos 15 dias de cultivo em meio osteogênico, 101,5X. (A) Controle (sem T3). (B) 100nM de T3. Cristais com forma característica de “cruz de malta” em intensa quantidade sob a superfície de cultivo do grupo tratado com 100nM de T3. Ausência de cristais no grupo controle.

4.6 Porcentagem de células/campo

Embora o número inicial de células tenha sido padronizado, ao longo do cultivo, o número de células/campo variou entre as doses de T3 e entre os períodos estudados. A dose de 10^{-2} nM de T3 foi a única dose de T3 que apresentou menor porcentagem de

células em todos os períodos avaliados (7, 14 e 21 dias) quando comparada ao controle (sem T3). No entanto, a dose de 10^{-3} nM de T3 foi a única dose que não alterou o número de células em todos os períodos avaliados (7, 14 e 21 dias) em relação ao controle (sem T3) (Fig. 11, anexo 8.10).

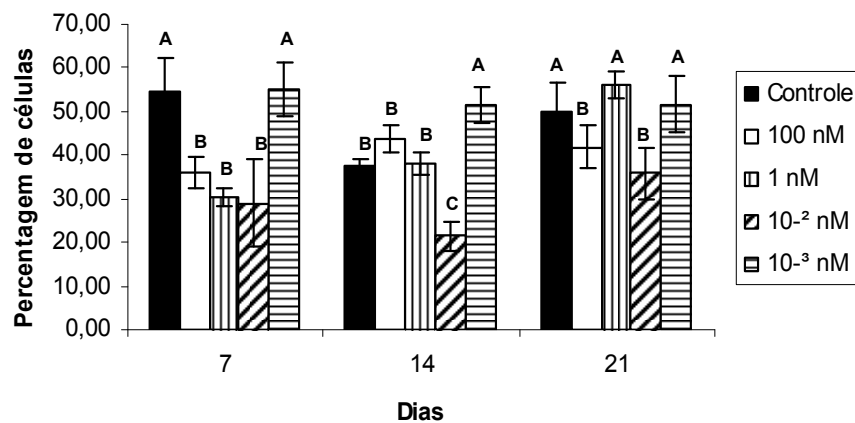


Figura 11. Porcentagem de células/campo em culturas de CTM da medula óssea de ratas em meio osteogênico distribuídas nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3.

*Letras maiúsculas distintas no topo das barras representam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre grupos dentro de cada período.

A conversão do MTT em cristais de formazan foi inversamente proporcional ao número de células nos grupos controle (sem T3) e tratados com 100, 1 e 10^{-2} nM de T3, apresentando correlação negativa significativa.

4.7 Massa mitocondrial

A massa mitocondrial das CTM dos grupos controle e tratado com 10^{-2} nM de T3 foi semelhante aos 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênico, visto que estes grupos apresentaram porcentagem semelhantes de células marcadas indicadas pelo deslocamento M1 ilustrado no histograma (Fig. 12).

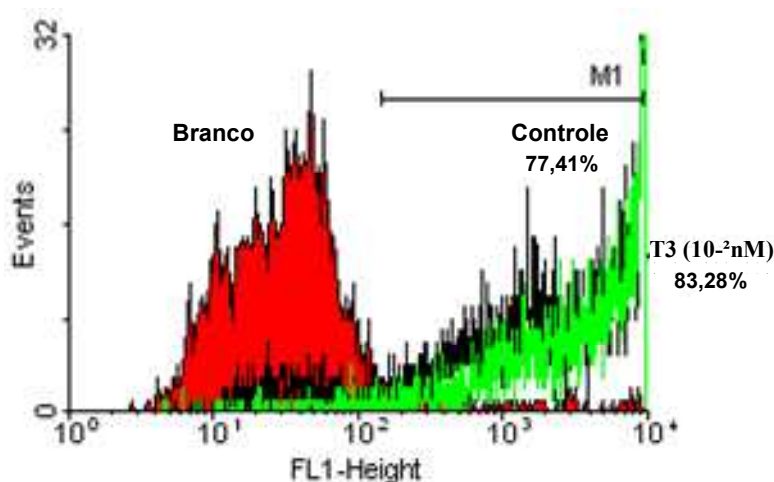


Figura 12. Análise da massa mitocondrial de CTM da medula óssea de ratas aos 21 dias de cultivo em meio osteogênico nos grupos controle (sem T3) e tratado com 10^{-2} nM de T3. Os histogramas demonstram a escala de fluorescência no eixo x considerada positiva quando o pico de células está acima de 10^1 . O pico vermelho preenchido corresponde às células tronco não marcadas (Branco). O pico preto vazio corresponde às células tronco cultivadas em meio osteogênico sem T3 e marcadas com MTG (controle) e o pico verde vazio corresponde as células tronco cultivadas em meio osteogênico tratadas com a dose de 10^{-2} nM de T3 e marcadas com MTG (10^{-2} nM de T3).

5. DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das CTM da medula óssea de ratas demonstrou ausência de marcação para CD45 em 96,94% das células, além da expressão de CD73, CD54 e CD90 em 93,99%, 95,10% e 86,77% das células, respectivamente. A caracterização

fenotípica das células antes da diferenciação celular é fundamental para informar sobre o grau de pureza da cultura, pois a medula óssea pode apresentar CTM, células hematopoéticas (Bianco et al., 2001; Bobis et al., 2006) e fibroblastos (Ishii et al., 2005a). As células hematopoéticas expressam, dentre outras moléculas, CD45

(Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006) que também pode ser expressa em fibroblastos (Ishii et al., 2005b). A molécula CD73 (Bobis et al., 2006) pode ser expressa tanto em fibroblastos quanto em CTM (Ishii et al., 2005a). Mas as moléculas CD90 (Bobis et al., 2006) e CD54 (Covas et al., 2003; Tocci e Forte, 2003) expressas em mais de 90% das células deste estudo, são exclusivas das CTM, não sendo expressas em fibroblastos e células hematopoéticas. Assim, a caracterização fenotípica confirmou a pureza de mais de 90% da cultura em CTM. Além disso, somente as CTM apresentam capacidade de diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Bianco et al., 2001; Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006).

Para caracterizar a diferenciação osteogênica destas células, alguns parâmetros foram utilizados, tais como: atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno e síntese e mineralização da matriz extracelular. Os parâmetros utilizados neste estudo para demonstrar a diferenciação osteogênica vêm sendo amplamente utilizados por outros pesquisadores (Ishida et al., 1995; Ishida et al., 1996; Ishida e Heersche, 1997; Lee et al., 2003; Moioli et al., 2007). Além disso, sempre há correlação entre a formação dos nódulos de mineralização e a expressão de proteínas não colagênicas durante a diferenciação osteogênica (Aronow et al., 1990; Owen et al., 1990; Ohishi et al., 1994; Cowles et al., 1998; Qu et al., 1998). A expressão de proteínas não colagênicas como osteocalcina, osteopontina e osteonectina pode ser adicional para caracterizar o estágio de diferenciação osteogênica, pois essas proteínas são indicadoras da diferenciação osteogênica tardia (Aronow et al., 1990; Owen et al., 1990; Ohishi et al., 1994; Nefussi et al., 1997; Cowles et al., 1998; Bellows et al., 1999; Shih et al., 2006).

A atividade da fosfatase alcalina nos grupos tratados com 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3 foi superior a dos demais grupos aos sete dias de cultivo. Por ser um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006) o aumento da fosfatase alcalina nestes grupos sugere a ocorrência de diferenciação osteogênica precoce em comparação as outras doses estudadas. No entanto, em cultivos de osteoblastos, a T3 nas doses de 1nM e 10nM de T3 diminui a atividade da fosfatase alcalina (Ohishi et al., 1994), apresentando efeito oposto na dose de 100nM (Fratzl-Zelman et al., 1997; Varga et al., 1997), confirmando que o efeito da T3 também depende da maturidade celular.

Dentre as doses de T3 estudadas, a dose de 10^{-3} nM apresentou síntese de colágeno, atividade de fosfatase alcalina e número de nódulos de mineralização superiores ao controle e semelhantes à dose de 10^{-2} nM. Mas, 10^{-2} nM de T3 demonstrou resultados ainda melhores sob a diferenciação osteogênica das CTM. Houve também maior redução do MTT em cristais de formazan, melhor maturação do colágeno e maior diâmetro dos nódulos de mineralização.

O efeito negativo da dose de 100nM de T3 sob a diferenciação osteogênica de CTM deveu-se a menor síntese de colágeno em comparação ao controle e a formação de incontáveis cristais livres e amplamente distribuídos pela cultura a partir dos 15 dias de cultivo. Apesar de não ter sido realizada análise da constituição química desses cristais, sabe-se que os cristais de fosfato de cálcio apresentam forma característica de “cruz de malta” (Meyer, 2003) semelhante ao evidenciado neste estudo. Esses cristais já foram observados em culturas de osteoblastos (Kuhn et al., 2000) e provavelmente se formaram somente no grupo tratado com 100nM de T3 por não ter apresentado matriz colagênica em quantidade suficiente para que houvesse

deposição desses minerais, havendo precipitação dos mesmos e formação dos cristais no meio de cultivo. Postula-se também que possa ter ocorrido falta de sincronia entre a síntese e a mineralização da matriz, já que esses dois eventos devem ocorrer concomitantemente, pois o colágeno I é essencial para a mineralização da matriz óssea (Marsh et al., 1995; Bellows et al., 1999). Além disso, *in vivo* 70% da matriz óssea é mineralizada imediatamente após sua síntese pelos osteoblastos (Nunes e Nunes, 1988) havendo íntima relação entre a disposição dos cristais e as fibras de colágeno do tecido ósseo (Robinson e Watson, 1952).

A dose de 10^{-2} nM de T3 além de estimular a síntese de colágeno, também promoveu melhor maturidade desse colágeno. No entanto, a dose de 10^{-3} nM de T3, apesar de resultar em síntese de colágeno semelhante à dose de 10^{-2} nM de T3 e superior ao controle, demonstrou maturação do colágeno inferior às demais doses de T3, inclusive ao controle, caracterizando claramente a relação dose dependente de T3 sobre as CTM da medula óssea de ratas. Estudos realizados com biomateriais como PLGA (*porous poly lactide-co-glycolide*) demonstraram que o colágeno I é efetivo em promover a adesão, a proliferação e a diferenciação de CTM da medula óssea de coelhos em associação com PLGA (Liu et al., 2004). Assim, pode-se sugerir que o colágeno I observado em maior quantidade nas culturas sob efeito da dose de 10^{-2} nM de T3, possa ter contribuído para o melhor potencial osteogênico das CTM.

Algumas doses de T3, em pelo menos um dos períodos estudados, causaram redução da densidade celular. Mas os cultivos com 10^{-2} nM de T3 apresentaram menor densidade celular em todos os períodos estudados. Sugere-se que a redução do número de células esteja relacionado à redução da proliferação celular e não a redução da viabilidade celular, já que a

conversão do MTT não foi menor neste grupo. Além disso, é provável que a T3 tenha estimulado a atividade de síntese em detrimento da proliferação celular, já que houve neste grupo maior atividade da fosfatase alcalina, maior síntese e maturação do colágeno e maior mineralização da matriz. Sugere-se que os hormônios tireoidianos possam ter influenciado o número ou a atividade de algumas organelas como a mitocôndria e o retículo endoplasmático. Alguns estudos confirmam que durante a diferenciação osteogênica existe inicialmente um período proliferativo seguido de um período de diferenciação (Owen et al., 1990) e que T3 diminui a proliferação após a confluência, estimulando a diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos (Ohishi et al., 1994). Além disso, a hipertrofia dos condrócitos da placa de crescimento é controlada pelos hormônios tireoidianos e é acompanhada pelo aumento do número de mitocôndria e de retículo endoplasmático (Ballock e O'Keefe, 2003). Assim, a análise ultra-estrutural dessas células poderia revelar se há alteração do número de organelas das CTM tratadas com T3 durante a diferenciação osteogênica.

Mas apesar de ter apresentado menor densidade celular, o grupo tratado com 10^{-2} nM de T3 demonstrou maior conversão do MTT. O teste de conversão do MTT em cristais de formazan tem sido utilizado para verificar a viabilidade celular, visto que somente mitocôndrias de células viáveis apresentam essa capacidade através da participação da succinato desidrogenase (Mossmann, 1983; Hansen et al., 1989). Sendo assim pode-se inferir que as células tratadas com 10^{-2} nM de T3 tenham apresentado maior viabilidade em comparação ao grupo controle. Mas, considerando o efeito de T3 no controle da atividade mitocondrial de outros tipos celulares (Casas et al., 1999; Wrutniak-Cabello et al., 2001) e a redução da densidade celular no grupo tratado com a

dose de 10^{-2} nM de T3, postulou-se que a maior conversão do MTT em formazan possa ter ocorrido pelo aumento do número ou da atividade mitocondrial. Por isso, foram realizados os ensaios do MTG fluorescente para avaliar a massa mitocondrial. A dose de 10^{-2} nM de T3 foi eleita pelo fato de ter promovido maior conversão do MTT em cristais de formazan associada à redução da densidade celular em todos os períodos avaliados. Mas, tanto o grupo tratado com a dose de 10^{-2} nM de T3 quanto o grupo controle apresentaram massa mitocondrial semelhante. Resta ainda saber se a atividade mitocondrial seria maior nas células tratadas com T3. Além disso, outros estudos devem ser realizados para avaliar a ultra-estrutura da célula tratada com T3 principalmente com relação ao número de cristas mitocondriais (Menzies et al., 2002). Sabe-se que a succinato desidrogenase, enzima que converte o MTT em cristais de formazan, localiza-se na membrana interna das cristas mitocondriais, de modo que quanto maior o número de cristas mitocondriais, maior a quantidade dessa enzima (Banks, 1992). Além disso, estudar a taxa de proliferação celular e de apoptose poderia esclarecer sobre o porquê da redução da densidade celular associada ao aumento da viabilidade celular.

O efeito dose dependente da T3 sobre a diferenciação osteogênica *in vitro* das CTM foi claramente demonstrado neste estudo. Interessante é que as doses de T3 que estimulam a diferenciação de osteoblastos *in vitro* (Ohishi et al., 1994; Fratzl-Zelman et al., 1997; Varga et al., 1997) não foram as melhores doses para promover a diferenciação osteogênica das CTM da medula óssea de ratas. Esse resultado alerta para a necessidade de se realizar estudo semelhante em células tronco embrionárias, já que T3 tem sido adicionada em meios de

cultivo para promover a diferenciação osteogênica dessas células, sem nenhum estudo prévio da existência de dose dependência de T3 nas células tronco embrionárias (Kawaguchi et al., 2005).

6. CONCLUSÕES

6.1 A triiodotironina apresenta efeitos dose dependente sobre a diferenciação osteogênica de CTM da medula óssea de ratas.

6.1.1 A dose de 10^{-2} nM de T3 promove melhor diferenciação osteogênica, caracterizada por maior conversão do MTT em cristais de formazan, síntese precoce de fosfatase alcalina, maior síntese e maturação de colágeno e maior número e diâmetro médio dos nódulos de mineralização.

6.1.2 A dose de 10^{-3} nM de T3 estimula precocemente a atividade da fosfatase alcalina, aumenta o número dos nódulos de mineralização e a síntese de matriz colagênica, mas reduz a maturidade do colágeno.

6.1.3 A triiodotironina na dose de 10^{-2} nM apesar de reduzir a porcentagem de células/campo, aumenta a conversão de MTT em cristais de formazan sem alterar a massa mitocondrial.

6.1.4 A dose de 100nM de T3 demonstra efeito negativo sobre a diferenciação osteogênica por reduzir a síntese de colágeno e por promover a formação de incontáveis cristais a partir dos 15 dias de cultivo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLAIN, T.J.; CHAMBERS, T.J.; FLANAGAN, A.M. et al. Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J. Endocrinol.*, v.133, p.327-331, 1992.
- 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.
- 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, n.4, p.357-365, 2005.
- ARONOW, M.A.; GERTENFELD, L.C.; OWEN, T.A. et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell. Physiol.*, v.143, p.213-221, 1990.
- BALLOCK, R.T.; O'KEEFE, R.J. The biology of the growth plate. *J. Bone Joint Surg.*, v.85, p.715-726, 2003.
- BANKS, W.J. Células: estrutura e função. In: _____. *Histologia Veterinária Aplicada*. São Paulo: Manole, 1992. Cap. 4, p.26-57.
- BELLIDO, T.; GIRASOLE, G.; PASSERI, G. et al. Demonstration of estrogen and vitamin D receptors in bone marrow-derived stromal cells: up-regulation of the estrogen receptor by 1,25-dihydroxyvitamin-D₃. *Endocrinology*, v.133, n.2, p.553-562, 1993.
- BELLOWS, C.G.; CIACCIA, A.; HEERSCHE, J.N.M. Osteoprogenitor cells in cell populations derived from mouse and rat calvaria differ in their response to corticosterone, cortisol, and cortisone. *Bone*, v.23, n.2, p.119-125, 1998.
- BELLOWS, C.G.; REIMERS, S.M.; HEERSCHE, 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, n.6, p.763-776, 2003.
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, S.G.; ROBEY, P.G. Bone Marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*, v.19, p.180-192, 2001.
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin. Sci.*, v.98, p.217-240, 2000.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.*, v.44, n.4, p.215-30, 2006.
- BODEN, S.D.; HAIR, G.; TITUS, L. et al. Glucocorticoid-induced differentiation of fetal rat calvarial osteoblasts is mediated by bone morphogenetic protein-6. *Endocrinology*, v.138, n.7, p.2820-2828, 1997.
- BRITTO, O.M.; FENTON, A.J.; HOLLOWAY, W.R. et al. Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology*, v.134, n.1, p.169-176, 1994.
- BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N.S. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, n.355S, p.S247-S256, 1998.

- CANALIS, E.; RYDZIEL, S.; DELANY, A.M. et al. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology*, v.136, p.1348-1354, 1995.
- CASAS, F.; ROCHARD, P.; RODIER, A. et al. A variant form of the nuclear triiodothyronine receptor c-ErbA α 1 plays a direct role in regulation of mitochondrial RNA synthesis. *Mol. Cell. Biol.*, v.19, n.12, p.7913-7924, 1999.
- 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.
- CHIU, K.M.; ARNAUD, C.D.; JU, J. et al. Correlation of estradiol, parathyroid hormone, interleukin-6 receptor during the normal menstrual cycle. *Bone*, v.26, n.1, p.79-85, 2000.
- COLTER, D.C.; CLASS, R.; DIGIROLAMO, C.M. et al. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v.97, n.7, p.3213-3218, 2000.
- CONGET, P.A.; MINGUELL, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.*, v.181, n.1, p.67-73, 1999.
- 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.
- COVAS, D.T.; SIUFI, J.L.C.; SILVA, A.R.L. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.36, 1179-1183, 2003.
- COWLES, E.A.; DEROME, M.E.; PASTIZZO, G. et al. Mineralization and the expression of matrix proteins during *in vivo* bone development. *Calcif. Tissue Int.*, v.62, p.74-82, 1998.
- 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.
- 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, n.2, p.269-275, 2002.
- 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, n.1, p.59-78, 2007.
- ERNST, M.; FROESCH, E.R. Triiodothyronine stimulates proliferation of osteoblastic-like cells in serum-free culture. *FEBS J.*, v.220, n.1, p.163-166, 1987.
- ERNST, M.; SCHMID, Ch.; 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.
- 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, n.3, p.225-236, 1997.
- FROMIGUE, O.; MARIE, P.J.; LOMRI, A. Differential effects of transforming growth factor β 2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells. *Cytokine*, v.9, n.8, p.613-623, 1997.
- GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. *Science*, v.287, p.1433-1438, 2000.
- GAUTHIER, K.; CHASSANDE, O.; PLATEROTI, M. et al. Different functions for the thyroid hormone receptors TR α and TR β in the control of thyroid hormone production and post-natal development. *EMBO J.*, v.18, n.3, p.623-631, 1999.
- 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.
- GREEN, E.; TODD, B.; HEATH, D. Mechanism of glucocorticoid regulation of alkaline phosphatase gene expression in osteoblast-like cells. *Eur. J. Biochem.*, v.188, p.147-153, 1990.
- GREENSPAN, S.L.; GREENSPAN, M.D. The effect of thyroid hormone on skeletal integrity. *Ann. Intern. Med.*, v.130, p.750-758, 1999.
- 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 α - and β -isoforms, and of the androgen receptor in cultures of native mouse bone marrow and of stromal/osteoblastic cells. *Bone*, v.24, n.5, p.465-473, 1999.
- 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.
- 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.
- 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.
- HOFBAUER, L.C.; KHOSLA, S. Androgen effects on bone metabolism: recent progress and controversies. *Eur. J. Endocrinol.*, v.140, p.271-286, 1999.
- HUGHES, F.J.; TURNER, W.; BELIBASAKIS, G. et al. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol.* 2000, v.41, p.48-72, 2006.
- 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, n.2, p.188-197, 2000.
- INCERPI, S.; SCAPIN, S.; D'AREZZO, S. et al. Short-term effects of thyroid hormone in prenatal development and cell differentiation. *Steroids*, v.70, p.434-443, 2005.
- 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, n.5, p.545-549, 1995.
- ISHIDA, Y.; TERTINEGG, I.; HEERSCHKE, J.N.M. Progesterone and dexamethasone stimulate proliferation and differentiation of osteoprogenitors and progenitors for adipocytes and macrophages in cell populations derived from adult rat vertebrae. *J. Bone Miner. Res.*, v.11, n.7, p.921-930, 1996.
- ISHIDA, Y.; BELLOWS, C.G.; TERTINEGG, I. et al. Progesterone-mediated stimulation of osteoprogenitor proliferation and differentiation in cell populations derived from adult or fetal rat bone tissue depends on the serum component of the culture media. *Osteoporos Int.*, v.7, p.323-330, 1997.
- ISHIDA, Y.; HEERSCHKE, 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, n.1, p.17-25, 1997.
- JAISSWAL, R.K.; JAISSWAL, N.; BRUDER, S.P. et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.*, v.275, n.13, p.9645-9652, 2000.
- JIA, D.; HEERSCHKE, 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.
- JUNQUEIRA, L.C.U.; BIGNOLAS, G.; BRENTANI, R.R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.*, v.11, p.447-455, 1979.
- KARSPERK, C.H.; WAKLEY, G.K.; HIERL, T. et al. Gonadal and adrenal androgens are potent regulators of human bone cell metabolism *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, n.3, p.464-471, 1997.
- KASSEM, M.; BLUM, W.; RISTELLI, J. et al. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells *in vitro*. *Calcif. Tissue Int.*, v.52, p.222-226, 1993.
- KASSEM, M.; BRIKEN, K.; MOSEKILDE, L. et al. Human marrow stromal osteoblast-like cells do not show reduced responsiveness to *in vitro* stimulation with growth hormones in patients with postmenopausal osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.*, v.54, p.1-6, 1994.
- 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, n.1, p.111-120, 1991.
- KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and

- osteoclast differentiation. *Oral Dis.*, v.8, p.147-159, 2002.
- KAWAGUCHI, J.; MEE, P.J.; SMITH, A.G. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone*, v.36, p.758-769, 2005.
- 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.
- 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.
- KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v.35, p.232-242, 2006.
- 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, n.4, p.657-669, 2002.
- KUHN, L.T.; WU, Y.; REY, C. et al. Structure, composition, and maturation of newly deposited calcium-phosphate crystals in chicken osteoblast cell cultures. *J. Bone Miner. Res.*, v.15, n.7, p. 1301-1309, 2000.
- LANGDAHL, B.L.; KASSEM, M.; MOLLER, M.K. et al. The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur. J. Clin. Invest.*, v. 28, p.176-183, 1998.
- 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.
- LINDBLAD, W.J. Stem cells in mammalian repair and regeneration. *Wound Repair Regen.*, p.423-424, 2001.
- LIEL, Y.; SHANY, S.; SMIRNOFF, P. et al. Estrogen increases 1,25-dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinology*, v.140, n.1, p.280-285, 1999.
- LIAN, J.B.; COUTTS, M.; CANALIS, E. Studies of hormonal regulation of osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *J. Biol. Chem.*, v.260, n.15, p.8706-8710, 1985.
- LIU, G.; HU, Y.Y.; ZHAO, J.N. et al. Effect of type I collagen on the adhesion, proliferation, and osteoblastic gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Chin. J. Traumatol.*, v.7, n.6, p.358-362, 2004.
- LUEGMAYR, E.; VARGA, F.; FRANK, T. et al. Effects of triiodothyronine on morphology, growth behavior, and the actin cytoskeleton in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Bone*, v.18, n.6, p.591-599, 1996.
- MARSH, M.E.; MUNNE, A.M.; VOGEL, J.J. et al. Mineralization of bone-like extracellular matrix in the absence of functional osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.*, v.10, n.11, p.1635-1643, 1995.

- MASUYAMA, A.; OUCHI, Y.; SATO, F. et al. Characteristics of steroid hormone receptors in cultured MC3T3-E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. *Calcif. Tissue Int.*, v.51, p.376-381, 1992.
- MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potencial of stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.16, n.6, p.713-720, 2004.
- McLAREN, A. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, v.414, p.129-131, 2001.
- MENZIES, F.M.; COOKSON, M.R.; TAYLOR, R.W. et al. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, v.125, p.1522-1533, 2002.
- MEYER, D.J. Exame microscópico do sedimento urinário. In: RASKIN, R.E.; MEYER, D.J. *Atlas de Citologia de Cães e Gatos*. São Paulo: Roca, 2003. Cap. 10, p.219-231.
- 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, n.5, p.2527-2534, 1998.
- MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; GONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med.*, v.226, n.6, p.507-520, 2001.
- 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, n.2, p.936-943, 2005.
- MOIOLI, E.K.; HONG, L.; MAO, J.J. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen.*, v.15, n.3, p.413-421, 2007.
- 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.
- 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, n.12, p.3464-3474, 2003.
- MURPHY, E.; WILLIAMS, G.R. The thyroid and the skeleton. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)*, v.61, n.3, p.285-298, 2004.
- 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, n. 4, p. 493-503, 1997.
- NOTELOVITZ, M. Androgen effects on bone and muscle. *Fertil. Steril.*, v.77, n.4, p.S34-S41, 2002.
- NUNES, I.J., NUNES, V.A. Doenças metabólicas do osso. *Cad Tec 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, n.6, p.639-643, 2003.

- OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Efeito da atividade física no osso normal e na prevenção e tratamento da osteoporose. *Rev. Bras. Med. Esporte*, v.12, n.3, p.164-168, 2006.
- OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; BOZZI, A. et al. Actividad física aumenta la diferenciación osteogênica de células troncales mesenquimáticas de ratas com osteoporosis. In: CONGRESO SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE OSTEOLOGIA Y METABOLISMO MINERAL, 7, 2007, Santiago. *Anais...* Santiago: S.I.B.O.M.M., 2007. p.11.
- 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.
- OWEN, T.A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J. Cell. Physiol.*, v.143, p.420-430, 1990.
- 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, n.2, p.307-316, 2005.
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol.*, v.33, n.1, p.2-18, 2006.
- PENDERGRASS, W.; WOLF, N.; POOT, M. Efficacy of MitoTracker GreenTM and CMXRosamine to measure changes in mitochondrial membrane potentials in living cells and tissues. *Cytometry A*, v.61A, p.162-169, 2004.
- 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, n.6, p.540-546, 2001.
- 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.
- POTIER, E.; PETITE, H. Therapeutic application of mesenchymal stem cells in orthopaedics. *Pathol. Biol.*, v.53, p.142-148, 2005.
- PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v.13, n.5, p.369-376, 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. et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. *Bone*, v.22, n.3, p.201-209, 1998.
- RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem.*, v.45, p.1353-1358, 1999.
- RAMALHO, A.C.; JULLIENNE, A.; COUTTET, Ph. et al. Effect of oestradiol on cytokine production in immortalized human marrow stromal cell lines. *Cytokine*, v.16, n.4, p.126-130, 2001.

- RAO, M.S. Stem sense: a proposal for the classification of stem cells. *Stem Cells Dev.*, v.13, p.452-455, 2004.
- RICARDO, S.D.; DEANE, J.A. Adult stem cells in renal injury and repair. *Nephrology*, v.10, n.3, 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, n.6, p.671-678, 1995.
- ROBEY, P.G. The biochemistry of bone. *Biol. Metab. Clin. North Am.*, v.18, p.859-902, 1989.
- ROBINSON, J.A.; HARRIS, S.A.; RIGGS, B.L. et al. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology*, v.138, n.7, p.2919-2927, 1997.
- ROBINSON, R.A.; WATSON, M.L. Collagen-crystal relationships in bone as seen in the electron microscope. *Anat. Rec.*, v.114, n.3, p.383-409, 1952.
- ROWE, D.W.; KREAM, B.E. Regulation of collagen synthesis in fetal rat calvaria by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Biol. Chem.*, v.257, n.14, p.8009-8015, 1982.
- RUMPLER, M.; WOESZ, A.; VARGA, F. et al. Three-dimensional growth behavior of osteoblasts on biomimetic hydroxylapatite scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, v.81, n.1, p.40-50, 2007.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP/MVZ, 1998, 211 p.
- SANTOS, A.P. dos; MIRANDA, C.D. O.; ALVES, M.T.S. et al. O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop. Bras.*, v.13, n.4, p.194-195, 2005.
- 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, n.2, p.756-763, 2005.
- 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, n.6, p.579-585, 2000.
- SERAKIDES, R.; NUNES, V.A.; OCARINO, N.M. et al. Efeito da associação hipertireoidismo-castração no osso de ratas adultas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, v.48, n.6, p.875-884, 2004.
- SHALHOUB, V.; ASLAM, F.; BREEN, E. et al. Multiple levels of steroid hormone-dependent control of osteocalcin during osteoblast differentiation: glucocorticoid regulation of basal and vitamin D stimulated gene expression. *J. Cell. Biochem.*, v.69, p.154-168, 1998.
- SHENFIELD, F.; PENNING, G.; SUREAU, C. et al. Stem cells. *Hum. Reprod.*, v.17, n.5, p.1409-1410, 2002.
- SHIH, Y-R.V.; CHEN, C-N.; TSAI, S-W. et al. Growth of mesenchymal stem cells on electrospun type I collagen nanofibers. *Stem Cells*, v.24, p.2391-2397, 2006.
- 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 osteoblastic-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 osteoblastic-like cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.87, n.2, p.906-914, 2002.
- SMEJKAL, G.B.; KAUL, C.A. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J. Histochem. Cytochem.*, v.49, n.9, p.1189-1190, 2001.
- 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.
- THOMSON, J.A.; ITSKOVITZ-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, n.9, p.778-784, 2001.
- TOMKINSON, A.; GEVERS, E.S.; WIT, J.M. et al. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, n.8, p.1243-1250, 1998.
- 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.
- VANDERSCHUEREN, 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 Letters*, 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 (1,25D₃) inversely regulate OPG gene expression in dependence of the osteoblastic phenotype. *Calcif. Tissue Int.*, v.74, p.382-387, 2004.
- WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v.116, n.5, 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.
- 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, 2006.
- WRUTNIAK-CABELLO, C.; CASAS, F.; CABELLO, G. Thyroid hormone action in mitochondria. *J. Mol. Endocrinol.*, v.26, p.67-77, 2001.

ZALLONE, A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1068, p.173-179, 2006.

ZHANG, S.; CHAN, M.; AUBIN, J.E. Pleiotropic effects of the steroid hormone 1,25-dihydroxyvitamin D₃ on the recruitment of mesenchymal lineage progenitors in fetal rat calvaria cell populations. *J. Mol. Endocrinol.*, v.36, p.425-433, 2006.

ZHOU, S.; ZILBERMAN, Y.; WASSERMANN, K. et al. Estrogen modulates estrogen receptor α e β expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSC) of osteoporotic mice. *J. Cell. Biochem. Suppl.*, Suppl. 36, p.144-155, 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.

8. ANEXOS

8.1. Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 3/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos in vitro da triiodotironina (T3) na proliferação, diferenciação e no potencial osteogênico das células tronco mesenquimais adultas da medula óssea de ratas**", que tem como responsável **Rogéria Serakides**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **18/ 04/ 2007**.

Este certificado expira-se em **18/ 04 / 2012**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 3/2007**, related to the project entitled "**Effects in vitro of the tri-iodothyronine (T3) in the proliferation, differentiation and osteogenic potential of adult mesenchymal stem cells of the bone marrow in female rats**", under the supervision of **Rogéria Serakides**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **April 18, 2007**.

This certificate expires in **April 18, 2012**.

Belo Horizonte, 31 de Abril de 2007.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@er19.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Anexo 8.2. Tripsinização para repique em placas e contagem de células

Inicialmente verifica-se a cobertura de 80 a 90% das células, em seguida retira-se o meio e lava-se com 5mL de PBS 0,15M. Retira-se o PBS, adiciona-se 2mL de tripsina 1% na garrafa T75 e incuba-se por 10 minutos em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente acrescenta-se 6mL de DMEM + 10% SFB e recolhe todo o conteúdo da garrafa em tubo falcon de 50mL. Centrifuga-se por 10 minutos a 1400rpm, despreze o sobrenadante e ressuspende-se o *pellet* com 2mL de DMEM + 10% SFB. Em seguida transfere-se 2μL dessa solução para um eppendorf, acrescenta-se 98μL de reagente de Turck, retira-se 10μL e transfere-se para cada quadrante da câmara de Neubauer para contagem das células. Posteriormente utiliza-se a fórmula a seguir para encontrar a concentração de células por mL:

Número de células = média dos quadrantes/4 X 50 (fator de diluição) X 10⁴

Transfere-se então o número de células desejado para cada poço da placa e adiciona-se DMEM + 10% SFB.

Anexo 8.3. Coloração de Hematoxilina e Eosina (HE)

Inicialmente coloca-se 4mL de água destilada por poço em placas de 6 poços durante cinco minutos, em seguida cora-se as células pela hematoxilina por cinco minutos e lava-se em água corrente por quinze minutos. Posteriormente coram-se as células com eosina por cinco minutos, passa-se para álcool absoluto por um minuto, para xilol por um minuto e monta-se as lamínulas sobre lâminas com bálsamo.

Anexo 8.4. Coloração de Von Kossa

Passa-se as placas em água corrente por 10 minutos, em seguida em água bidestilada e em solução de prata a 5% por uma hora e 30 minutos. Posteriormente passa-se as placas em água bidestilada, em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos, água corrente por 2 minutos, em eosina por 40 segundos, novamente em água corrente por 2 minutos, álcool 95% por 2 minutos, álcool absoluto por 2 minutos e em xilol por 2 minutos.

Soluções:

A) Solução de prata 5%

- Nitrato de prata.....5g

- Água destilada.....100mL

A) Tiosulfato de sódio 5%

- Tiosulfato de sódio.....5g

- Água destilada.....100mL]

Anexo 8.5. Média e desvio padrão da conversão do MTT em cristais de formazan aos 7, 14 e 21 dias nos grupos controle e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3

Dias	Grupo				
	Controle	100 nM	1 nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM
7	0,2927±0,0236 ^{Da}	0,3915±0,0336 ^{Ca}	0,4488±0,0206 ^{Cc}	0,6947±0,0142 ^{Bb}	0,766±0,064 ^{Aa}
14	0,3195±0,2753 ^{Ba}	0,2313±0,0396 ^{Bb}	0,7402±0,0332 ^{Aa}	0,7983±0,0137 ^{Aa}	0,1392±0,0068 ^{Bc}
21	0,3018±0,0553 ^{Ba}	0,3455±0,0095 ^{Ba}	0,54±0,0435 ^{Ab}	0,5043±0,036 ^{Ac}	0,3263±0,0819 ^{Bb}

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Anexo 8.6. Média e desvio padrão da atividade da fosfatase alcalina aos 7, 14 e 21 dias nos grupos controle e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3

Dias	Grupo				
	Controle	100 nM	1 nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM
7	0,1502±0,0386 ^{Bb}	0,1443±0,0063 ^{Ba}	0,2452±0,0175 ^{Bb}	0,44±0,037 ^{Aa}	0,4507±0,086 ^{Aa}
14	0,3262±0,038 ^{Ba}	0,3085±0,0908 ^{Ba}	0,2745±0,0139 ^{Bb}	0,4580±0,0115 ^{Aa}	0,2998±0,05 ^{Ba}
21	0,3937±0,0416 ^{Aa}	0,3628±0,1235 ^{Aa}	0,4310±0,0477 ^{Aa}	0,4777±0,022 ^{Aa}	0,4707±0,2108 ^{Aa}

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Anexo 8.7. Média e desvio padrão da síntese de colágeno aos 7, 14 e 21 dias nos grupos controle e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3

Dias	Grupo				
	Controle	100 nM	1 nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM
7	0,2073±0,0084 ^{Da}	0,2123±0,0031 ^{CDb}	0,2375±0,0036 ^{Bb}	0,2197±0,0032 ^{Cc}	0,2540±0,0023 ^{Ab}
14	0,2328±0,001 ^{BCa}	0,2375±0,0013 ^{Ba}	0,2335±0,0013 ^{BCb}	0,2292±0,0023 ^{Cb}	0,2653±0,0067 ^{Aa}
21	0,1560±0,0225 ^{Bb}	0,1187±0,0206 ^{Cc}	0,2557±0,0051 ^{Aa}	0,2660±0,0051 ^{Aa}	0,2575±0,0023 ^{Aa}

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Anexo 8.8. Média e desvio padrão do número de nódulos de mineralização aos 7, 14 e 21 dias nos grupos controle e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3

Dias	Grupo				
	Controle	100 nM	1 nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM
7	1,34±0,4854 ^{BCc}	2,5133±0,3828 ^{Bb}	4,4767±1,4564 ^{Aa}	2,22±0,3035 ^{Bb}	0,58±0,1709 ^{Cc}
14	1,342±0,258 ^{Cb}	4,93±0,717 ^{Ba}	6,307±0,781 ^{Aa}	2,17±0,178 ^{Cb}	2,2730±0,257 ^{Cb}
21	3,74±0,425 ^{Ba}	5,447±1,15 ^{ABa}	5,857±1,299 ^{ABa}	6,18±0,634 ^{Aa}	5,37±0,187 ^{ABa}

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Anexo 8.9. Média e desvio padrão do diâmetro médio dos nódulos de mineralização aos 7, 14 e 21 dias nos grupos controle e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3

Dias	Grupo				
	Controle	100 nM	1 nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM
7	79,09±5,99 ^{Aa}	81,71±4,56 ^{Aa}	82,88±1,59 ^{Ab}	77,46±5,26 ^{Ac}	89,59±4,36 ^{Ab}
14	79,23±4,52 ^{Cb}	65,15±3,39 ^{Db}	91,56±1,06 ^{Ba}	107,12±8,75 ^{Ab}	89,00±3,49 ^{Bb}
21	85,63±2,88 ^{Ca}	82,01±8,6 ^{Ca}	78,08±2,53 ^{Cc}	138,73±9,75 ^{Aa}	112,30±4,46 ^{Ba}

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).

Anexo 8.10. Média e desvio padrão da porcentagem de células/campo aos 7, 14 e 21 dias nos grupos controle e tratados com 100, 1, 10^{-2} e 10^{-3} nM de T3

Dias	Grupo				
	Controle	100 nM	1 nM	10^{-2} nM	10^{-3} nM
7	54,78±7,48 ^{Aa}	35,92±3,67 ^{Ba}	30,40±1,94 ^{Bc}	28,87±10,03 ^{Ba}	55,22±6,28 ^{Aa}
14	37,76±1,16 ^{Bb}	43,77±3,26 ^{Ba}	38,00±2,52 ^{Bb}	21,57±3,37 ^{Ca}	51,59±3,99 ^{Aa}
21	49,89±6,70 ^{Aa}	41,79±4,95 ^{Ba}	56,05±3,03 ^{Aa}	35,85±5,89 ^{Ba}	51,72±6,37 ^{Aa}

Médias com letras maiúsculas iguais na linha e letras minúsculas iguais na coluna não diferem entre si ($p>0,05$).