

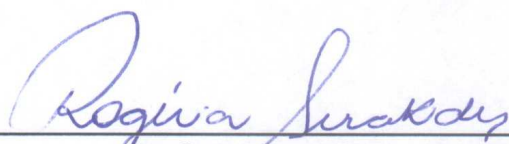
Natália de Melo Ocarino

**Células Tronco Mesenquimais: diferenciação osteogênica *in vitro* estimulada pela
atividade física *in vivo* com e sem bloqueio da óxido nítrico sintase
e sua aplicação no tratamento local da osteoporose de ratas**

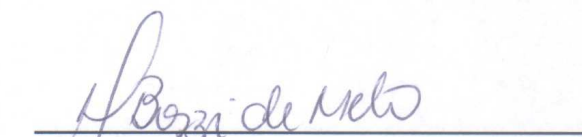
Tese apresentada à Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para a obtenção do
grau de Doutor em Ciência Animal
Área: Patologia Animal
Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides
Co-orientadores: Prof. Dr. Alfredo M. Góes
Prof^a. Dr. Umeko Marubayashi

**Belo Horizonte
UFMG – Escola de Veterinária
2008**

Tese defendida e aprovada em 07 de novembro de 2008, pela Comissão examinadora constituída por:



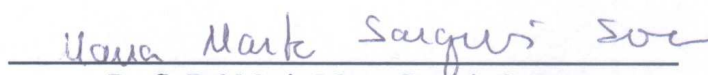
Prof.^a. Dr.^a. Rogéria Serakides
Presidente



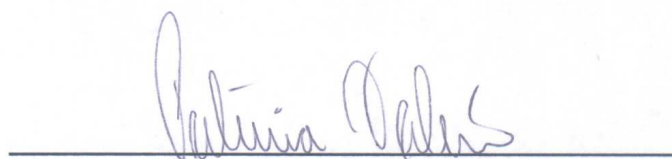
Prof.^a. Dr.^a Adriana Bozzi de Melo



Prof.^a. Dr.^a Eliane Gonçalves de Melo



Prof.^a. Dr.^a Maria Marta Sarquis Soares



Prof.^a. Dr.^a Patrícia Valério

Aos meus pais, Lêda e Beto pelo incentivo, amor, compreensão e apoio constantes, sem vocês nada teria sido possível. Com todo o meu amor!
Aos meus irmãos Xande, César e Ju pelo carinho
e aos meus sobrinhos, Maíra, Lucas, Giulia e Henrique pelos momentos de encanto.

“Que a felicidade não dependa do tempo ou do lugar, mas sim das atitudes que tomamos frente a realização de nossos sonhos”

AGRADECIMENTOS

À professora Rogéria Serakides, orientadora e amiga, por todos os ensinamentos, incentivo e apoio incondicionais. Por ter sido, durante estes nove anos de convivência, uma referência de profissionalismo, ética, perseverança e superação. Por ser um exemplo de que *“só aqueles que têm coragem de caminhar, podem viver todos os dias na certeza de chegar”*. À você, minha eterna gratidão e admiração.

Ao professor Alfredo Góes pelo apoio constante e incondicional e por ter nos ajudado a tornar possível a realização deste sonho. Ao senhor, o meu muito obrigado!

À professora Umeko Marubayashi pela parceria, amizade, e pelo carinho com que sempre se dispôs a nos ajudar.

À professora Eliane Gonçalves de Melo pelo incentivo constante e pela presteza em todos os momentos.

Aos membros da banca por contribuírem com a qualidade deste trabalho.

Aos bolsistas de iniciação científica e amigos Júneo Freitas, Renata Gomes, Fernanda Magalhães, Carolina Rocha, Renato Dornas e Lauana Santiago, pelo apoio, dedicação e carinho com que desempenharam as tarefas e pelos agradáveis momentos de convivência. Sem vocês tudo teria sido mais difícil! A vocês desejo muito sucesso e, com vocês, divido todas as vitórias.

À doutoranda Jankerle Boeloni pelo carinho e ajuda em todos os momentos da realização deste trabalho. Obrigada por tudo Jan!!!

À Cíntia Almeida pela convivência e por me mostrar que suínos são como os animais de laboratório o que muda é o peso do animal e o tamanho dos dentes!!!!

Aos professores da patologia, Ernane Nascimento, Renato Lima e Roberto Guedes pelos ensinamentos e pelo incentivo. Aos demais membros da Patologia, Profa. Roselene Ecco, Prof. Geovanni Cassali, Flávia, Ana Luiza, Fátima, Sílvia, Tatiane, Alcina, Aline, Aliny, Érica, Juliana, Mariana, Teane, Samanta, Fábio, Mel e as orientadas da Lili, Fátima e Fabíola pela convivência agradável.

Ao professor José Monteiro pelo exemplo de profissionalismo e pelo incentivo e, aos professores Álan Borges e Marília Martins Melo pelo apoio e incentivo.

À Paula Castanheira e Cristiana Corrêa pela ajuda nas análises de citometria e pela convivência e aos colegas do laboratório de Bioquímica e Imunologia do ICB, Nath, Vivi, Mário, Luiza, Vivi Gomide, Carine, Cíntia e Ana Paula pela convivência agradável.

Às técnicas Marilene e Betinha que, com todo o carinho, auxiliaram nas atividades laboratoriais.

Ao Adão pela ajuda e pela presteza com que sempre se dispôs a me ajudar.

As meninas da secretaria, Rosângela, Lourdes e Eliane por todo o carinho e amizade.

À Claudinha e à Profa. Vera dos Arquivos Brasileiros de medicina Veterinária e Zootecnia.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e ao apoio financeiro da Fapemig e da Capes (Pró-equipamentos n° 01/2007).

LISTA DE ABREVIACÕES

1,25(OH)₂D₃: 1,25 diidrocolicalciferol

AMPc : monofosfato cíclico de adenosina

BCIP/NBT: substrato para atividade da fosfatase alcalina [BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salt) e NBT (Nitro-Blue Tetrazolium Chloride)].

BMP: proteínas morfogenéticas do osso

c-NOS: óxido nítrico sintase constitutiva

CT: células tronco

CTM: célula tronco mesenquimal

CX: conexinas

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium

E2: estrógeno

EGF: fator de crescimento epidermal

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

EP1, EP2, EP3 e o EP4: receptores de prostaglandina E2

FA: fosfatase alcalina

FACS: fluorescence activated cell sorting

FGF-2: fator de crescimento fibroblástico-2

FGF-R1: receptor para fator de crescimento fibroblástico

GC: enzima guanilato ciclase

GDF: fatores de crescimento e diferenciação

GDFs 5 e 6: fatores de crescimento e diferenciação 5 e 6

GH: hormônio de crescimento

GMPc: monofosfato cíclico de guanosina

GnRH: hormônio gonadotrópico

GTP: trifosfato de guanosina

HE: hematoxilina e eosina

IFN- γ : interferon γ

IGF-1: fator de crescimento semelhante à insulina-1

IL-1: interleucina 1

i-NOS: óxido nítrico sintase induzida

L-NAME: N^G-nitro-L-arginina-metil-ester (inibidor de NOS)

L-NIO: N-imino-etil-L- ornitina (inibidor de NOS)
L-NMMA: N^G-monometil-L-arginina (inibidor de NOS)
MTT: (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5- brometo de difenil tetrazolium)
NMDA: receptor ionotrópico de glutamato
nNOS: óxido nítrico sintase neuronal
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintase
PBS: tampão salina
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGF-R α : receptor do fator de crescimento ativador plaquetário
PGE2: prostaglandina E2
PTH: paratormônio
PTH1R: receptor de paratormônio
PTHrP: PTH-proteína relacionada
RNAm: RNA mensageiro
SFB: soro fetal bovino
SNK: Student Newnam Keuls
T3: triiodotironina
T4: tiroxina
TGF β : fator de crescimento transformante β
TNF- α : fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| LISTA DE ABREVIACÕES..... | 8 |
| LISTA DE TABELAS..... | 12 |
| LISTA DE FIGURAS | 13 |
| RESUMO | 15 |
| ABSTRACT..... | 16 |
| INTRODUÇÃO..... | 17 |
| CAPÍTULO 1. Revisão de literatura..... | 21 |
| 1. Morfofisiologia óssea | 21 |
| 1.1. <i>O tecido ósseo normal.....</i> | 21 |
| 1.2. <i>O tecido ósseo e a osteoporose.....</i> | 22 |
| 2. Efeito da atividade física sobre o tecido ósseo..... | 25 |
| 3. Óxido Nítrico | 30 |
| 3.1 . <i>Óxido Nítrico produzido pela eNOS.....</i> | 32 |
| 3.2 . <i>Óxido Nítrico produzido pela nNOS.....</i> | 33 |
| 3.3 . <i>Óxido Nítrico produzido pela iNOS.....</i> | 34 |
| 4. Ação do óxido nítrico sobre o osso | 34 |
| 5. Células tronco mesenquimais e diferenciação osteogênica..... | 36 |
| 6. Tratamento de doenças ósseas com células tronco mesenquimais..... | 40 |
| CAPÍTULO 2: Efeito da atividade física na histomorfometria óssea de ratas com osteoporose com e sem inibição da oxido nítrico sintase | 43 |
| Introdução | 45 |
| Material e Métodos | 46 |
| Resultados | 49 |
| Discussão | 57 |
| CAPÍTULO 3: Diferenciação osteogênica <i>in vitro</i> de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da oxido nítrico sintase..... | 62 |
| Introdução | 64 |
| Material e Métodos | 65 |
| Resultados | 71 |

| | |
|--|------------|
| Discussão | 73 |
| CAPÍTULO 4: Injeção intra-óssea de células tronco mesenquimais diferenciadas <i>in vitro</i> no tratamento da osteoporose femoral de ratas..... | 78 |
| Introdução | 80 |
| Material e Métodos | 80 |
| Resultados | 87 |
| Discussão | 92 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 94 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 96 |
| ANEXOS | 108 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|----------|--|----|
| Tabela 1 | Média e desvio padrão da espessura (μm) do osso nasal de ratas adultas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da óxido nítrico sintase..... | 52 |
| Tabela 2 | Média e desvio padrão da porcentagem de osso trabecular nos ossos longos e vértebras de ratas adultas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da óxido nítrico sintase..... | 53 |
| Tabela 3 | Média e desvio padrão da espessura da cortical (μm) das vértebras de ratas adultas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da óxido nítrico sintase..... | 53 |
| Tabela 4 | Média e desvio da redução do MTT em cristais de formazan em culturas de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME em meio osteogênico..... | 71 |
| Tabela 5 | Média e desvio da atividade de fosfatase alcalina em culturas de células tronco mesenquimais diferenciadas da medula óssea de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME | 72 |
| Tabela 6 | Média e desvio da síntese de colágeno em culturas de células tronco mesenquimais diferenciadas da medula óssea de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME em meio osteogênico..... | 72 |
| Tabela 7 | Média e desvio do número de nódulos mineralizados/campo em culturas de células tronco mesenquimais da medula óssea diferenciadas de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem L-NAME em meio osteogênico..... | 73 |
| Tabela 8 | Média e desvio padrão da porcentagem de osso trabecular na metáfise distal, colo e cabeça femorais de ratas adultas controle, com osteoporose sem tratamento e com osteoporose tratadas com injeção intra-óssea de CTM diferenciadas | 90 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|----------|--|-----|
| Figura 1 | Vértebras lombares segmento 4/6, de ratas adultas ao final do experimento 12,5×. A) Grupo normal com trabéculas espessas e confluentes. (B) Grupo osteoporose sedentário com intensa redução do número de trabéculas com adelgaçamento e fragmentação das mesmas. C) Grupo osteoporose ativo com trabéculas mais numerosas em relação ao grupo osteoporose sedentário..... | 54 |
| Figura 2 | Vértebras lombares segmento 4/6, de ratas adultas ao final do experimento, Picro Sirius 12,5× A) Grupo normal tratado com L-NAME com trabéculas espessas e confluentes semelhante ao grupo normal. B) Grupo osteoporose sedentário tratado com L-NAME com trabéculas mais numerosas e confluentes quando comparado ao grupo osteoporose sedentário. C) Grupo osteoporose ativo com L-NAME com trabéculas espessas e confluentes semelhante ao grupo osteoporose ativo..... | 55 |
| Figura 3 | Vértebra lombar do segmento 4/6 de ratas adultas. HE 150×. A) Grupo normal com trabécula recoberta por osteoblastos ora cuboidais (seta cheia) ora achatados com núcleos fusiformes (seta vazia). B) Grupo sedentário apresentando cobertura osteoblástica praticamente inexistente e som alguns osteoblastos achatados com núcleos fusiformes (seta vazia). C) Grupo osteoporose ativo com trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos de permeio ao osteóide (seta cheia). D) Grupo normal tratado com L-NAME com cobertura osteoblástica formada por osteoblastos ora cuboidais (seta cheia) ora achatados com núcleos fusiformes semelhante ao grupo normal. E) Grupo sedentário tratado com L-NAME com trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos (seta cheia). E) Grupo osteoporose ativo tratado com L-NAME apresentando trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos de permeio ao osteóide (seta cheia)..... | 56 |
| Figura 4 | Foto da inoculação intra-óssea de células tronco mesenquimais diferenciadas no fêmur de ratas com osteoporose..... | 864 |
| Figura 5 | Expressão de CD73, CD54, CD90 e CD45 em células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas cultivadas em DMEM por citometria de fluxo após quatro repiques para caracterização fenotípica. | 88 |
| Figura 6 | Fotomicroscopia de imunofluorescência de células tronco mesenquimais indiferenciadas <i>in vitro</i> . A) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e ausência de fluorescência verde citoplasmática indicando ausência de expressão para anticorpo anti-CD45. B) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e com fluorescência verde citoplasmática indicando expressão para anticorpo anti-CD 54. C) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e com fluorescência verde citoplasmática indicando expressão para anticorpo anti-CD73. D) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com | 89 |

DAPI e com fluorescência verde citoplasmática indicando expressão para anticorpo anti-CD90.....

Figura 7 Células tronco mesenquimais de ratas com 21 dias em meio de diferenciação osteogênico. A) atividade de fosfatase alcalina pelo método de NBT/BCIP. B) Síntese de colágeno pelo método de Sirius red. C) Nódulos dmineralizados método de Von Kossa Bar = 62,2µm 89

Figura 8 Metáfise distal do fêmur de ratas. (A) Grupo controle com trabéculas metafisárias espessas e confluentes após a injeção intra-óssea de PBS. HE, 50× B) Grupo controle com trabécula apresentando cobertura osteoblástica cuboidal ativa após a injeção intra-óssea de PBS. HE, 150×. C) Grupo osteoporose com intensa redução do número de trabéculas metafisárias após a injeção intra-óssea de PBS HE, 50×. D) Grupo osteoporose com trabécula apresentando cobertura osteoblástica praticamente inexistente e com alguns osteoblastos achatados com núcleos fusiformes após a injeção intra-óssea de PBS HE, 150×. E) Grupo tratado com CTM diferenciadas com trabéculas metafisárias mais numerosas em relação ao grupo osteoporose HE, 50×. F) Grupo tratado com CTM diferenciadas com trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos de permeio ao osteóide HE, 150×..... 91

RESUMO

Foram realizados três experimentos. O experimento 1 avaliou o efeito da atividade física com e sem inibição da oxido nítrico sintase na histomorfometria óssea de ratas com osteoporose. O experimento 2 avaliou a diferenciação osteogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais (CTM) de ratas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da oxido nítrico sintase. O experimento 3 avaliou o efeito da injeção intra-óssea de CTM diferenciadas *in vitro* no tratamento da osteoporose femoral de ratas. Concluiu-se que o óxido nítrico atua como mediador dos efeitos da atividade física sobre o osso de ratas com osteoporose. As CTM das ratas com osteoporose apresentaram menor diferenciação osteogênica. A atividade física aumentou a diferenciação osteogênica de CTM de ratas com osteoporose. A inibição da óxido nítrico sintase teve efeito negativo na diferenciação osteogênica de CTM de ratas normais e com osteoporose submetidas à atividade física, mas aumentou a diferenciação osteogênica de CTM de ratas com osteoporose sedentárias. O tratamento da osteoporose femoral com CTM diferenciadas promoveu aumento da porcentagem de tecido trabecular igualando-o ao grupo controle em todo o fêmur.

Palavras chave: célula tronco, diferenciação osteogênica, osteoporose, atividade física, L-name

ABSTRACT

Three experiments were performed. The experiment 1 evaluated the effect of the physical activity with and without the nitric oxide synthase inhibition in the bone histomorfometry of rats with osteoporosis. The experiment 2 evaluated the osteogenic differentiation *in vitro* of mesenchymal stem cells (MSCs) of rats with osteoporosis submitted to the physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. The experiment 3 evaluated the effect of the intra-bone injection of differentiated MSCs *in vitro* in the treatment of the femoral osteoporosis of rats. It was conclude that the nitric oxide acts as mediator of the effects of the physical activity on the bone of rats with osteoporosis. MSCs of the rats with osteoporosis presented smaller osteogenic differentiation. The physical activity increased the osteogenic differentiation of MSCs of rats with osteoporosis. The nitric oxide synthase inhibition had negative effect in the osteogenic differentiation of MSCs of normal rats and with osteoporosis submitted to the physical activity, but it increased the osteogenic differentiation of MSCs of rats with sedentary osteoporosis. The treatment of the femoral osteoporosis with differentiated MSCs promoted increase the trabecular bone percentage for values similar to the control group in the whole femur.

Keywords: stem cells, osteogenic differentiation, osteoporosis, physical activity, L-Name

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose é uma doença cada vez mais diagnosticada em mulheres e homens de todo o mundo (Notomi et al., 2003). Estima-se que em 2002, aproximadamente 30 milhões de mulheres tiveram osteoporose ou osteopenia com uma projeção de aumento do número de casos para aproximadamente 41 milhões em 2020 (Kelley et al., 2004). A osteoporose é definida como uma doença caracterizada pela redução da massa óssea e deteriorização de sua microarquitetura o que induz a fragilidade do osso e aumento do risco de fraturas espontâneas (Tamaki et al., 1998). Estima-se que, por ano, ocorram cerca de 1,3 milhões de fraturas por osteoporose e que mais de 40% das mulheres na pós-menopausa já sofreram pelo menos, uma fratura devido a esta doença (Seeman, 2003) aumentando, cada vez mais os índices de morbidade e mortalidade dentro da população idosa mundial. Com isso, várias terapias vêm sendo instituídas com o objetivo de, pelo menos, minimizar a redução da massa óssea observada pelo avançar da idade (Leite, 1999). Muitas terapias já estão consolidadas na prática clínica, como o uso de fármacos antireabsortivos (Fitzpatrick, 2006; Lewiecki e Silvarman, 2006) e a prática de atividade física (Leite, 1999) e outras ainda

estão em caráter experimental em modelos animais como a terapia celular local (Wang et al., 2006).

A redução da massa óssea aumenta com o avançar da idade causada por desequilíbrios nutricionais, deficiência hormonal e inatividade física (Seeman, 2003). A atividade física apresenta efeito potente e complexo sobre o osso de indivíduos normais e com osteoporose, mas os resultados de pesquisa são contraditórios (Mosekilde, 1999). Uma das razões pelas quais os efeitos são variáveis deve-se ao período em que se inicia a atividade física, ou seja, o efeito do exercício físico no período que antecede a deficiência dos esteróides sexuais difere daquele iniciado após a deficiência desses esteróides (Ocarino et al., 2008a) e até mesmo após a instalação da osteoporose (Ocarino et al., 2007b). Pesquisas realizadas por nosso grupo demonstram que a atividade física diária aumenta a massa óssea em todo o esqueleto de ratas com osteoporose (Ocarino et al., 2007b). Entretanto, os mecanismos pelos quais estes efeitos benéficos ocorrem não estão totalmente esclarecidos.

Postula-se que a liberação sistêmica e local de óxido nítrico, observada durante a atividade física, possa estar envolvida nos efeitos do exercício físico sobre o

metabolismo ósseo. Nossa hipótese é que o óxido nítrico aja como mediador dos efeitos benéficos da atividade física sobre o metabolismo ósseo de ratas com osteoporose. Ocarino et al., (2007a) observaram que o ganho de massa óssea em ratas osteopênicas submetidas à atividade física estava associado à hiperplasia e hipertrofia osteoblásticas. Como os osteoblastos se originam de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea, outra hipótese é que a atividade física promova ganho de massa óssea em indivíduos osteopênicos por aumentar a diferenciação osteogênica das CTM tendo o óxido nítrico como um dos mediadores deste efeito. Não há, até o momento, evidências na literatura, sobre o efeito da atividade física *in vivo* na diferenciação osteogênica das CTM de ratas com osteoporose e nem sobre o envolvimento do óxido nítrico neste processo. Assim, um dos objetivos foi esclarecer a participação *in vivo* do óxido nítrico como mediador dos efeitos da atividade física no metabolismo ósseo e na diferenciação osteogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose.

Como citado anteriormente, a cada ano, o número de fraturas decorrentes da osteoporose, principalmente em fêmur e vértebras, vem aumentando e elevando as

taxas de mortalidade (Wallace et al., 2004). Como a osteoporose é uma doença generalizada, muitas vezes se faz necessária a associação de terapias que possam diminuir a reabsorção óssea e aumentar a aposição (Valverde, 2008). Frequentemente se observa a associação de drogas antirreabsortivas com a atividade física diária. Entretanto, mesmo com o uso da terapia sistêmica com os fármacos antirreabsortivos e anabólicos associada à prática de exercício físico, cerca de 50% da população tratada, continuam apresentando fraturas devido à osteoporose. Por isso, vislumbra-se a utilização de terapia local com células tronco (CT) em sítios ósseos com maior propensão às fraturas.

A utilização de células tronco no tratamento de diversas doenças é hoje, uma realidade em modelos animais e até em seres humanos. A diferenciação osteogênica de CTM *in vitro* e o uso dessas células associadas à biomateriais em defeitos ósseos têm sido realizados com sucesso em modelos experimentais (Anselme et al., 1999; Oreffo e Triffitt, 1999; Murphy et al., 2003; Tsushida et al., 2003; Tae et al., 2006). Mas, somente um estudo verificou o efeito do implante de hidrogel colonizado por CTM em defeito ósseo de coelhas com osteoporose, tendo demonstrado aumento da osteogênese somente na área do implante

(Wang et al., 2006). Entretanto, não há pesquisas que verificaram o efeito da injeção intra-óssea de CTM diferenciadas no tratamento local da osteoporose sem a

associação de biomateriais. Assim outro objetivo foi avaliar o efeito da injeção intra-óssea de CTM diferenciadas no tratamento local do fêmur de ratas com osteoporose.

OBJETIVOS GERAIS

- Esclarecer a participação *in vivo* do óxido nítrico como mediador dos efeitos da atividade física no metabolismo ósseo por meio da inibição da óxido nítrico sintase (capítulo 2).
- Esclarecer a participação do óxido nítrico *como* mediador dos efeitos

da atividade física na diferenciação osteogênica *in vitro* de CTM de ratas com osteoporose por meio do bloqueio da óxido nítrico sintase *in vivo* (capítulo 3).

- Avaliar o efeito da injeção intra-óssea de CTM diferenciadas no tratamento local do fêmur de ratas com osteoporose (capítulo 4).

Capítulo 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. Morfofisiologia óssea

1.1 *O tecido ósseo normal*

O osso é um tecido multifuncional constituído por três tipos celulares: os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. O primeiro tipo celular deriva-se das células osteoprogenitoras da medula óssea e se localiza na superfície das trabéculas e do canal de Havers do tecido osteônico e no perióstio, e tem a função principal de sintetizar matriz óssea não mineralizada (aposição óssea) (Mackie, 2003, Datta et al., 2008) constituída por colágeno I, por proteínas não colagênicas (fibronectina, tenascina e osteopontina), por proteínas α -carboxiladas (osteocalcina e proteína Gla) e por proteoglicanos (sulfato de condroitina), dentre outros (Robey, 1989). Cerca de 70% da matriz óssea é mineralizada logo após a sua síntese e o restante sofre posteriormente mineralização gradual (Nunes e Nunes, 1988). Outra função primordial dos osteoblastos é a regulação da atividade osteoclástica por meio da síntese de osteoprotegerina (OPG) e expressão do receptor ativador NF-kapa beta ligante (RANKL). A expressão do RANKL pelos osteoblastos coordena a reabsorção óssea

por osteoclasia e sua ativação é controlada por fatores que sabidamente estimulam a formação e a atividade osteoclásticas (Mackie, 2003). Já a osteoprotegerina bloqueia a ligação entre RANKL, expresso na superfície dos osteoblastos, e o seu receptor celular expresso nas células precursoras dos osteoclastos regulando negativamente a via de sinalização RANKL/RANK. A expressão de osteoprotegerina é controlada por agentes sabidamente anabólicos como o estrógeno, TGF- β e as proteínas morfogenéticas ósseas (Boyle et al., 2003; Boyce e Xing, 2007; Kearns et al., 2008).

À medida que a matriz óssea é sintetizada, os osteoblastos ficam envolvidos por ela e passam a ser chamados osteócitos (Datta et al., 2008). Essas células têm como função participar na remodelação óssea e manter a viabilidade do tecido ósseo (Tate et al., 2004) e reabsorver a matriz e os minerais do osso pela osteólise osteocítica, mecanismo de reabsorção profunda, essencial para manter constantes os níveis de cálcio extracelulares (Baud e Boivin, 1978). Os osteócitos se alojam em lacunas no interior do tecido ósseo mineralizado e se comunicam com outros osteócitos e

osteoblastos através de projeções intercanaliculares, através das junções *gap* (Tate et al., 2004, Civitelli, 2008). Essas junções são canais intramembranosos formados por proteínas conhecidas como conexinas (Cx) que promovem a comunicação entre o citoplasma de duas células vizinhas permitindo a passagem de metabólitos, íons e moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como o cálcio e o AMPc (Cherian et al., 2003, Civitelli, 2008). A Cx43 é a maior proteína juncional expressa na membrana dos osteócitos primários denominados MLO-Y4 (Cheng et al., 2001). Além disso, os osteócitos possuem cílios capazes de perceber as oscilações do fluido intracanalicular e têm capacidade de aumentar ou diminuir as interconexões dependendo da carga mecânica (Mann et al., 2006).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da fusão dos precursores das células mononucleares hematopoéticas com diferenciação dependente dos fatores liberados pelas células da linhagem osteoblástica (Datta et al., 2008). Os osteoclastos localizam-se na superfície das trabéculas e dos canais de Havers e no periosteio, alojados nas lacunas de *Howship*. Sua função principal, quando ativado, é promover a reabsorção óssea por osteoclastose (Boyle, 2003, Canalis, 2008).

Por ser um tecido multifuncional, o osso é responsivo a uma variedade de estímulos, dentre eles, os biológicos, bioquímicos e biomecânicos (Bakker et al., 2005; Bennel, et al., 2000).

1.2 O tecido ósseo e a osteoporose

O osso é um tecido metabolicamente dinâmico e sua higidez depende do equilíbrio entre os processos anabólicos (aposição) e catabólicos (reabsorção). Sabe-se que a constituição genética, a dieta e os estímulos físicos são fatores que influenciam o metabolismo ósseo (Rubin e Lanyon, 1987; Raisz, 1999; Bland, 2000) mas, o controle efetivo da aposição e da reabsorção ósseas é mediado por hormônios, produtos celulares e pelos constituintes da matriz óssea (Raisz, 1999; Bland, 2000).

O processo catabólico ou reabsorção óssea tem a função vital de manter constantes os níveis de cálcio extracelulares e para o processo de remodelação óssea. Já a aposição óssea (síntese e mineralização da matriz óssea) tem dois principais objetivos que são, repor o tecido ósseo perdido pelo processo catabólico e suprir as necessidades do órgão em se adaptar às condições funcionais. Ao longo da vida do animal ou do indivíduo, vão sendo acumulados desequilíbrios entre esses dois processos principalmente em função de manter a

isocalcemia (Ribeiro et al., 2003). Com a supremacia do processo catabólico, a perda óssea se instala principalmente se fatores inibidores da neoformação óssea como os inerentes à senescência estiverem associados. Assim, alterações no metabolismo, na absorção de cálcio e no perfil hormonal, principalmente em mulheres após a menopausa, associados à inatividade física, contribuem para um desequilíbrio entre a síntese e a reabsorção óssea (Sinaki, 1989), tendo a osteoporose como principal consequência (Raisz, 1999; Bland 2000).

A osteoporose é uma doença metabólica generalizada caracterizada por menor aposição óssea devido à insuficiência osteoblástica (Nunes e Nunes 1988), com redução da massa óssea por unidade de volume e de etiologia multifatorial (Sinaki, 1989). O Colégio Americano de Medicina Esportiva define a osteoporose como sendo uma doença caracterizada pela redução da massa óssea e deteriorização de sua microarquitetura o que causa fragilidade óssea e aumento do risco de fraturas. Estima-se que, por ano, ocorram cerca de 1,3 milhões de fraturas por osteoporose e que mais de 40% das mulheres na pós-menopausa já sofreram pelo menos uma fratura devido a esta doença (Seeman, 2003).

A deficiência dos hormônios sexuais é um dos principais fatores envolvidos na gênese da osteoporose da menopausa uma vez que, após, cessada a produção dos hormônios sexuais a massa óssea da mulher diminui rapidamente nos primeiros 10 anos e lentamente nos anos subsequentes (Ishida et al., 1996; Compston, 2001), havendo a cada ciclo de remodelação, menor quantidade de osso formado em relação ao volume de osso reabsorvido (Riggs, 1987; Hillard e Stevenson, 1991; Ishida et al., 1996). O estrógeno e a progesterona atuam na remodelação óssea (Hillard e Stevenson, 1991), porém alguns dos mecanismos ainda não estão totalmente elucidados (Raisz, 2005). A presença de receptores para estrógeno em osteoblastos e osteócitos sugere efeito direto desse hormônio sobre o tecido ósseo (Tomkinson et al., 1997; Tomkinson et al., 1998). Em relação aos osteoblastos, o estrógeno aumenta a diferenciação osteoblástica (Bland, 2000) e estimula a síntese e a mineralização da matriz óssea (Liel et al., 1999; Bland, 2000), regulando a expressão de genes que codificam o colágeno I e as proteínas não colagênicas como osteopontina, osteocalcina, osteonectina, etc. (Bland, 2000). Além disso, o estrógeno inibe indiretamente a reabsorção óssea ao regular tanto a síntese quanto a liberação de citocinas, prostaglandinas e de fatores de

crescimento (Hillard e Stevenson, 1991; Raisz, 1999; Chiu et al., 2000). A progesterona também participa do metabolismo ósseo, sobretudo da síntese de matriz óssea (Bilezikian et al., 1996; Bland 2000). Ela estimula a proliferação e diferenciação das células osteoprogenitoras (Ishida et al., 1996; Ishida e Heersche, 1997) e atua nos osteoblastos regulando a secreção de fatores de crescimento (Mac Namara e Loughrey, 1998) e estimulando a aposição e mineralização ósseas (Gaumet et al., 1996; Bland, 2000; Gaumet-Meunier et al., 2000). Assim, a osteopenia observada na deficiência de progesterona parece ser decorrente da diminuição da aposição óssea (Bilezikian et al., 1996; Bland, 2000; Serakides, 2001).

A diminuição de massa óssea decorrente do hipogonadismo, também está relacionada com a redução da absorção intestinal de cálcio. O estrógeno tem ação direta sobre a mucosa intestinal e indireta, mediada pela vitamina D (Orimo et al., 1972; Chen e Kalu, 1998; Colin et al., 1999). Sendo assim, espera-se, na deficiência de estrógeno, diminuição do número de receptores para vitamina D no intestino e menor conversão renal da vitamina D inativa em sua forma ativa (Riggs, 1987; Liel et al., 1999). Então, no hipogonadismo, há menor formação da

proteína ligadora de cálcio diminuindo sua absorção intestinal (Schwartz et al., 2000).

Os hormônios tireoidianos triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) controlam o metabolismo ósseo e a homeostasia mineral de indivíduos adultos (Williams et al., 1998) e há muitos anos, a relação tireóide-osteoporose vem sendo estudada. Já é comprovado que o hipotireoidismo causa osteoporose e agrava a osteoporose decorrente da deficiência dos esteróides sexuais (Ribeiro et al., 2004). Os hormônios tireoidianos, assim como os hormônios sexuais, controlam a expressão de genes nos osteoblastos aumentando a atividade da fosfatase alcalina e a produção de colágeno I, das proteínas não colagênicas (Bilezikian et al., 1996; Bland, 2000) e de fatores de crescimento semelhantes à insulina (Bilezikian et al., 1996) aumentando subsequentemente a síntese e a mineralização da matriz óssea (Allain et al., 1992). Nas hipofunções tireoidianas, há redução do metabolismo geral o que afeta diretamente a diferenciação, a maturação e o metabolismo dos osteoblastos que são células responsáveis pela aposição e mineralização ósseas (Mosekilde e Melsen, 1978, Eriksen et al., 1985). Além disso, recentemente foi comprovado que a T3 aumenta a diferenciação osteogênica de CTM e que esse efeito é dose-dependente

(Boeloni et al., 2008). No hipotireoidismo, a diminuição da mineralização da matriz óssea parece ser devido à diminuição dos valores plasmáticos de cálcio e fósforo (Bijlsma et al., 1983; Cross et al., 1986), já que os hormônios tireoidianos são importantes no transporte intestinal do cálcio e do fósforo mediado pelo $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (Cross e Peterlik, 1988; Cross e Peterlik, 1991).

Não só fatores hormonais estão envolvidos na gênese da osteoporose como também a falta de atividade física é um fator de risco (Skerry, 2008), uma vez que inúmeros relatos vêm atribuindo redução da massa óssea à inatividade física (Krolner e Toft, 1983; Lane et al., 1996; Tuukkanen et al., 1991). Krolner e Toft (1983) demonstraram, em humanos, redução de 0,9%/semana de volume ósseo trabecular associado à diminuição de 1,3%/dia da força de contração muscular após imobilização prolongada. Resultado semelhante com redução de tecido ósseo trabecular e cortical foi observado em cães adultos jovens submetidos à imobilização (Lane et al., 1996) e em ursos durante o período de hibernação (McGee et al., 2008).

Devido à existência de forte relação entre atividade física, densidade óssea mineral e massa óssea, o exercício físico tem sido preconizado como estratégia para impedir a

redução da massa óssea e para manter a integridade esquelética (Mo et al., 2002). Contudo, os mecanismos pelo qual a atividade física exerce seu efeito no tecido ósseo e os mecanismos pelos quais a inatividade física promove perda óssea, ainda não foram totalmente esclarecidos.

2. Efeito da atividade física sobre o tecido ósseo

Há indícios de que a atividade física minimiza a osteopenia decorrente do avançar da idade e do declínio dos esteróides sexuais. Há ainda a comprovação de que exercícios físicos, realizados nas fases de crescimento e de desenvolvimento, determinam um ganho de 7 a 8% de massa óssea no indivíduo adulto, reduzindo substancialmente os riscos de fratura na idade avançada (Henderson et al., 1998; Bass, 2000, Alwis et al., 2008; Derman et al., 2008, Huang et al., 2008). A relação da atividade física com os esteróides sexuais no desencadeamento da osteoporose é bem estudada. Em ratas castradas, o tecido ósseo parece ser mais responsivo à atividade física (Peng et al., 1997; Flieger et al., 1998), mas há aumento da aposição óssea também em ratas com gônadas funcionais submetidas a exercício físico (Forwood e Parker, 1991, Honda, et al., 2008). Da mesma forma, mulheres jovens ou na pré-menopausa que

mantêm uma atividade física regular parecem ser menos susceptíveis à osteoporose (Sinaki, 1989; Teegarden et al., 1996; Uusi-Rasi et al., 1998, Karinkanta et al., 2008). Além disso, também é comprovado que os exercícios físicos ajudam na manutenção ou no ganho de massa óssea em mulheres na pós-menopausa (Shimegi et al., 1994; Berard et al., 1997). Mesmo assim, o efeito do exercício físico sobre o tecido ósseo, seja no período que antecede e precede a menopausa ou na juventude, fase de maior ganho de massa óssea, ainda é controverso (Sinaki, 1989; Warren e Chua, 2008).

Em ratas castradas senis e em mulheres na pós-menopausa, a atividade física quase sempre causa efeito anabólico sinérgico, quando associada a um tipo de tratamento convencional da osteoporose (Castelo-Branco, 1998; Oxlund et al., 1998; Tamaki et al., 1998; Mosekilde et al., 1999). É o caso do efeito anabólico conseqüente à associação da atividade física com a reposição estrogênica em mulheres na pós-menopausa (Kraemer et al., 1998).

A maioria dos pesquisadores concorda que a atividade física apresenta efeito potente e complexo sobre o osso, mas os resultados de pesquisa ainda são contraditórios. Nenhuma alteração, aumento e até mesmo redução da

massa óssea já foram descritos em ratas submetidas à atividade física (Matsuda et al., 1986; Tuukkanen et al., 1991; Bourrin et al., 1994, Umemura et al., 2008). É claro que, dependendo do tipo e da intensidade do exercício, os efeitos sobre o osso variam, podendo chegar a ser danosos (Wallace et al., 2000). Pesquisas já demonstraram que os efeitos da atividade física sobre o esqueleto são complexos e dependentes do momento que o exercício começa a ser realizado. Ocarino et al., 2008a relataram que a atividade física em ratas apresenta resultados mais satisfatórios se realizada antes e imediatamente após a ovariectomia quando comparados aos resultados do exercício realizado somente antes ou imediatamente após a deficiência dos esteróides sexuais. Entretanto, a atividade física diária seguindo o mesmo protocolo do estudo anterior, mas realizada três meses após a ovariectomia, ou seja, depois de instalada a osteoporose promoveu ganho de massa óssea em todo o esqueleto de ratas por estimular a atividade osteoblástica (Ocarino et al., 2007a).

A atividade esportiva intensa pode conduzir à osteoporose, ao comprometimento da pulsação do hormônio gonadotrópico (GnRH) e à disfunção gonadal no indivíduo jovem (Henderson et al., 1998; Warren e Perlroth, 2001, Warren e Chua, 2008) e não proteger a mulher contra a perda óssea

quando esta, atinge a menopausa (Sinaki, 1989). Ginastas pré-púberes submetidas a exercício intenso apresentam retardo do crescimento e maior frequência de distúrbios locomotores, além de redução do fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e dos hormônios tireoidianos e elevação do cortisol séricos (Jahreis et al., 1991). Sabe-se, por exemplo, que a magnitude da carga imposta ao osso é mais eficaz do que a frequência do exercício no aumento da densidade óssea. Com isso, atletas que realizam atividades físicas de alto impacto têm maior densidade óssea (Sinaki, 1989; Henderson et al., 1998).

Em medicina veterinária, fala-se do efeito do exercício físico sobre o esqueleto dos equinos. Gabriel et al. (1999) observaram que a atividade física intensa aumenta a porcentagem de tecido ósseo cortical no osso navicular, sugerindo aumento da aposição endosteal. O efeito benéfico do exercício é também observado no tecido ósseo trabecular que não diminui com a idade, ao contrário dos animais sedentários que apresentam redução da porcentagem desse osso com a idade. Mas em animais idosos, postula-se que a atividade física apresenta efeito benéfico para a manutenção da massa óssea (Gabriel et al., 1999, Tidswell, 2008).

Embora exista comprovação de que a atividade física promova alterações no metabolismo ósseo (Barry e Kohrt, 2008), ainda não se sabe se ela atua por efeito direto, via força mecânica, ou indireto, promovido por fatores hormonais (Brahm et al 1997; Henderson et al 1998). A força mecânica, quando aplicada sobre o tecido ósseo forma sinais endógenos que interferem com os processos de remodelação óssea. Esses sinais são captados por um sistema mecanossensorial no qual o osteócito é a principal célula responsável por traduzir a força mecânica em sinais bioquímicos que regulam o *turnover* ósseo (Nomura e Yamamoto, 2000; Cherian et al., 2003). Porém, não há demonstrações *in vivo* das alterações morfológicas e funcionais dos osteócitos, conseqüentes à força física imposta sobre eles (Lanyon et al., 1993). Acredita-se que a deformação celular causada pela força direta sobre a célula, o aumento da pressão intracanalicular causada pela força dinâmica e o aumento da velocidade do fluxo do fluido intersticial, sejam fatores que afetam diretamente o osteócito, sendo esse último o maior estímulo ao osteócito em resposta à carga mecânica. O fluxo de fluido intersticial pelos canalículos ao redor do osteócito parece ser responsável pela deformação da matriz extracelular e por alterações nas membranas celulares (Cherian et al., 2003).

É fato que a atividade física altera a expressão de genes mecanossensitivos nos osteócitos e estes genes vêm sendo pouco a pouco estudados. São genes responsáveis em codificar enzimas, citocinas, fatores de transcrição e proteínas da matriz óssea que alteram o metabolismo das células ósseas (Nomura e Yamamoto, 2008).

No que concerne ainda ao efeito da força mecânica sobre os osteócitos, muito se especula sobre a função autócrina da prostaglandina E2 (PGE2) na regulação da expressão das junções *gap* e na expressão da Cx43 na membrana dos osteócitos. Com a aplicação da força mecânica há, no osteócito, a conversão do ácido aracídico em prostaglandina E2 e, a sua liberação atuaria como fator autócrino (Cherian et al., 2003) uma vez que Thorsen et al., (1996) relataram aumento de prostaglandina liberada no osso imediatamente após a submissão de uma força mecânica imposta pelo levantamento de peso. A PGE2 se liga ao seu receptor expresso na membrana do osteócito elevando as concentrações de AMPc e estimulando a formação da proteína Cx43 e de novas junções *gap* (Cherian et al., 2003) elevando o número das conexões aumentando assim, a propagação do estímulo mecânico. Contudo, o efeito da prostaglandina sobre o esqueleto é controverso. Geralmente, ela atua como

agente anabólico já que a administração de prostaglandina em culturas de osteoblastos aumenta o número e a atividade dessas células, com conseqüente incremento da síntese de matriz óssea (Baylink et al., 1996). Porém, seu efeito catabólico estimulando a formação e a atividade dos osteoclastos também já foi descrito (Raisz, 1990; Raisz, 1993). Acredita-se que os efeitos distintos da PGE2 sobre o osso sejam devido aos seus vários subtipos de receptores dentre eles o EP1, EP2, EP3 e o EP4, acoplados as proteínas G específicas. A função exata desses receptores sobre a célula óssea, principalmente sobre o osteócito, ainda é desconhecida. Cherian et al. (2003) demonstraram que a expressão do receptor EP2 aumenta em resposta ao fluxo de fluido intersticial além disso, a prostaglandina induz a expressão de RANK-L e inibe a expressão de osteoprotegerina em osteoblastos e regula a expressão de RANK em osteoclastos (Durand et al., 2008). Embora Juliani et al. (1990) tenham relatado que a prostaglandina, *in vivo*, ativa a remodelação óssea, tanto em animais intactos quanto ovariectomizados, não se conhece qual seria a participação da prostaglandina como intermediária dos efeitos da atividade física no esqueleto de animais com osteoporose.

Sabe-se que o exercício físico não afeta o osso somente como tecido mas também o osso como órgão por sua ação nas cartilagens de crescimento. O estresse mecânico regula a homeostasia da cartilagem não somente durante o crescimento endocondral, mas também durante o reparo de fraturas (Kim et al., 1994). O processo de crescimento da cartilagem envolve basicamente três estádios: o primeiro consiste na ativação dos condrócitos em repouso e na produção de colágeno II e de agregan pelas células. O segundo estágio é marcado pela parada da proliferação celular, com maturação dos condrócitos e aumento da síntese de matriz cartilaginosa. O último caracteriza-se pela hipertrofia dos condrócitos e síntese de colágeno X. Ainda nesse estágio, os condrócitos entram em apoptose, a matriz óssea é sintetizada sobre o arcabouço cartilaginoso que posteriormente é removido (Wu e Cheng, 2000). O mecanismo pelo qual a força mecânica regula o crescimento da cartilagem, alterando a proliferação, maturação, hipertrofia e apoptose dos condrócitos ainda não foi totalmente esclarecido. Sah et al. (1990) relataram que a força mecânica promove, na cartilagem, deformações da matriz, efeitos eletrocinéticos, alterações da pressão hidrostática e aumento do fluxo de fluido intersticial. Segundo esses pesquisadores,

todos esses fatores seriam importantes no processo de mecanotransdução do sinal mecânico. Wu e Cheng (2000) relatam também que canais iônicos principalmente os de cálcio, seriam responsáveis em transmitir o sinal mecânico até a célula, estimulando a proliferação, maturação e hipertrofia dos condrócitos e que, o controle da abertura e fechamento desses canais iônicos seria feito pela deformação da matriz de colágeno causada pelo estresse mecânico.

O efeito indireto da atividade física sobre o osso realizado por fatores hormonais compreende a produção de citocinas e a liberação de fatores de crescimento pelas células ósseas, com conseqüente aumento da atividade osteoblástica (Henderson et al., 1998). Sabe-se que o exercício físico desencadeia uma série de respostas fisiológicas envolvendo o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e hipotálamo-hipófise-gônadas (Warren e Perloth, 2001). A atividade física estimula a secreção do hormônio de crescimento (GH) (Thompson Jr. et al., 1994; Brahm et al., 1997; Kraemer et al., 1998; Wallace et al., 2000; Kanaley et al., 2001) que tem efeito anabólico direto ou indireto, via fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (Brahm et al., 1997). O IGF-1 é um fator de crescimento que estimula a síntese de DNA e conseqüentemente promove a síntese de

colágeno pelas células osteogênicas, aumentando a formação de matriz óssea *in vivo* (Nomura e Yamamoto, 2000). Len et al. (1995) relatam que seis horas após o exercício há aumento dos níveis de RNAm de IGF-1 contudo, há controvérsia sobre a liberação de IGF-1 na atividade física (Brahm et al., 1997; Oxlund et al., 1998; Wallace et al., 2000; Bravenboer et al., 2001). Postula-se que, mesmo não havendo elevação plasmática, a liberação local de IGF-1 é a responsável pelo efeito anabólico do exercício sobre o osso (Yeh et al., 1994; Brahm et al., 1997; Oxlund et al., 1998).

Os hormônios tireoidianos circulantes (Refsum e Strømme, 1979; Lee et al., 1998; Bigbee et al., 2000) e a secreção de cortisol (Kanaley et al., 2001) também se elevam durante a atividade física. Entretanto, nenhuma menção é feita sobre a participação deles como intermediários do efeito da atividade física no metabolismo ósseo. O mesmo se diz do paratormônio (PTH), cujas concentrações não se alteram ou se elevam durante ou após a atividade física (Brahm et al., 1997). Já os esteróides sexuais podem ter sua secreção inibida pela atividade física, com retardo da maturidade sexual (Pellerin-Massicotte et al., 1987) e, se a atividade for realizada com intensidade inadequada, pode causar hipoestrogenismo e

hipoprogesteronismo (Henderson et al., 1998; Warren e Perlroth, 2001).

Outro fator liberado durante a prática de atividade física e que vem ganhando destaque como molécula sinalizadora do estímulo mecânico para o metabolismo ósseo é o óxido nítrico (Van't Hof e Ralton, 2001).

3. Óxido nítrico (geral)

O óxido nítrico (NO) é um radical livre envolvido em um grande número de processos fisiológicos atuando como mediador de diversas funções celulares em uma variedade de tipos celulares (Moncada, et al., 1991). Suas principais funções incluem o controle do tônus vascular normal (Ignarro et al., 1987), inibição da ativação e agregação plaquetárias, regulação da pressão sanguínea, transmissão neuronal (Moncada e Higgs, 1993) além de ser considerada a mais importante molécula reguladora do sistema imune (Marletta, 1993).

O NO é produzido por diversos tipos celulares e é sintetizado através da oxidação de 1 ou 2 nitrogênios guanidino da L-arginina (Marletta, 1993). A L-arginina é um aminoácido semi-essencial produzido pelo organismo em decorrência da degradação protéica. Após este evento, a arginina pode ser absorvida e utilizada no ciclo da uréia ou

transformada no epitélio intestinal em ornitina que juntamente com o glutamato serão convertidos em citrulina. A citrulina por sua vez, é convertida em arginina no ciclo renal ou transformada em L-arginina no citoplasma de inúmeras células como as endoteliais, neurônios, macrófagos (Mollace et al., 2005) e também as células ósseas (Fox e Chow, 1998) servindo como substrato para a produção de óxido nítrico por intermédio da enzima óxido nítrico sintase (Moncada et al., 1991; Wiesinger, 2001).

A óxido nítrico sintase (NOS) é uma hemoproteína da família da citocromo P450-like dependente de oxigênio, NADPH, flavinas e biopterinas para desempenhar suas funções (Moncada et al., 1991). Três isoformas da NOS (tipo I, II e III) foram identificadas em diferentes tipos celulares de mamíferos e essas isoformas são produtos de três genes distintos localizados nos cromossomos 7 (tipo I), 12 (tipo II) e 17 (tipo III) (Wang et al., 1995). As três isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias distintas: as NOS constitutivas (c-NOS) e a NOS induzida (i-NOS) (Mollace et al., 2005).

As c-NOS são enzimas citossólicas cálcio-calmodulina dependentes, ou seja, são ativadas pela mudança de concentração intracelular de cálcio livre em combinação

com moléculas de calmodulina (Moncada e Higgs, 1993) As c-NOS são produzidas em condições normais e constitutivamente expressas em baixos níveis em vários tipos celulares estando envolvidas em diversos processos fisiológicos (Kroncke et al., 1997). Quando ativadas combinam o oxigênio molecular com o átomo de nitrogênio da L-arginina produzindo o óxido nítrico (Moncada, et al., 1991). Neste caso, o NO é produzido em baixas concentrações e por períodos curtos e sua produção é estimulada por estímulos físicos ou devido à ativação de receptores (Kroncke et al., 1997).

As óxido nítrico sintases constitutivas são representadas pela óxido nítrico sintase neuronal (nNOS ou tipo I) e pela óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou tipo III). A nNOS é encontrada principalmente em neurônios sendo responsável pela regulação da transmissão sináptica no sistema nervoso central (Forstermann et al., 1994). Já a eNOS encontrada principalmente em células endoteliais e em plaquetas (Radomski, et al., 1990; Moncada, et al., 1991), atua na regulação da pressão sangüínea, na contratilidade do músculo cardíaco além de inibir a ativação e agregação plaquetárias e leucocitárias (Murrel et al., 1996).

A óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou tipo II) se localiza no citoplasma de células principalmente das linhagens inflamatórias e, ao contrário da nNOS e da eNOS, não é expressa constitutivamente pelas células e não é ativada por sinais de cálcio. Ela é expressa após a ativação de macrófagos e células imunitárias por citocinas proinflamatórias como interleucina 1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ) em resposta a processos patológicos inflamatórios localizados ou difusos (Lourenstein et al., 1992). Por este motivo, acredita-se que esta enzima tenha papel fundamental em processos inflamatórios e esteja envolvida em uma variedade de efeitos patofisiológicos atribuídos ao óxido nítrico (Morris e Billiar, 1994).

Ao contrário das NOS constitutivas que necessitam apenas de sua ativação para a produção de óxido nítrico, a produção deste radical livre pela iNOS requer várias horas. Este tempo reflete desde a ativação da célula até a produção do RNA mensageiro e a síntese protéica que corresponde então a expressão da óxido nítrico sintase induzida. Nestes casos, ocorre a produção de altas concentrações de NO (Morris e Billiar, 1994).

Uma vez sintetizado o NO difunde-se, agindo na própria célula que o produziu ou em células vizinhas (Garthwaite e Boulton, 1995). Sabe-se que, seus efeitos são complexos e antagônicos já que sua atuação é bifásica, ou seja, seus efeitos podem ser benéficos ou nocivos dependendo da sua concentração (Morris e Billiar, 1994).

3.1 Óxido nítrico produzido pela eNOS

Em condições fisiológicas, o NO produzido pelas células endoteliais é responsável pelo controle da contração vascular. O controle da síntese de NO por estas células é realizado por estímulos mecânicos (aumento do fluxo sanguíneo normal levando ao aumento do atrito das células circulantes sobre a membrana da célula endotelial) e pela estimulação dos receptores localizados nas células endoteliais por substâncias vasodilatadoras como bradicinina, histamina, acetilcolina, substância P, etc (Kroncke et al., 1997).

Quando esse fatores ativam a eNOS que está presente na membrana da célula endotelial, ela passa para o citossol onde combinará o oxigênio molecular com o nitrogênio da L-arginina formando o óxido nítrico (Moncada, et al., 1991). O NO produzido difunde-se tanto para a célula muscular quanto para o lúmen vascular. Sua difusão só é possível devido ao seu pequeno

tamanho molecular e por suas características lipofílicas (Moncada, et al., 1991).

Na célula muscular, o NO liga-se ao grupamento heme da enzima guanilato ciclase (GC), responsável pela conversão do trifosfato de guanosina (GTP) em GMPc. A elevação dos níveis citossólicos de GMPc provoca redução dos níveis intracelulares de cálcio devido a redução da entrada de cálcio para dentro da célula, inibição da liberação de cálcio do retículo endoplasmático e aumento do seqüestro de cálcio para dentro desta organela. A redução dos níveis de cálcio intracelular ocasiona redução da força de contração e relaxamento da musculatura com conseqüente vasodilatação e queda da pressão arterial (Gewaltig e Kojda, 2002). O mecanismo pelo qual o NO é desligado da guanilato ciclase não é conhecido.

O óxido nítrico que atinge o lúmen vascular pode penetrar nas plaquetas e hemácias. Nas plaquetas ele promove aumento de GMPc com conseqüente diminuição dos níveis de cálcio intracelular semelhante ao que ocorre na célula muscular. Como o cálcio é importante para que ocorra agregação plaquetária, esse processo é inibido (Morris e Billiar, 1994). Nas hemácias, o NO é eliminado por meio de sua reação com o ferro da hemoglobina (Wolin, 2000).

Como a ativação da eNOS é cálcio-calmodulina dependente, com a queda das concentrações intracelulares de cálcio, o complexo cálcio-calmodulina é desfeito e a atividade enzimática é desativada (Kavia et al., 2006).

3.2 Óxido nítrico produzido pela nNOS

A nNOS é expressa por neurônios em várias regiões tanto do sistema nervoso central quanto periférico (Kavia et al., 2006). Ela pode se localizar tanto na membrana pré-sináptica quanto na pós-sináptica; contudo sua distribuição é heterogênia nas diversas regiões do sistema nervoso. Sua colocação com diferentes neurotransmissores indica sua participação, quando ativada, na sinalização neuronal, na modulação de diversas vias neuronais e na neurotoxicidade (Esplugues, 2002).

Após o estímulo do neurônio, na sinapse neuronal, ocorre liberação de glutamato que se liga aos receptores NMDA (receptor ionotrópico de glutamato). Enquanto ocorre a ligação glutamato/NMDA há entrada de íons cálcio no citoplasma neuronal e quando as concentrações citossólicas de cálcio ultrapassam 400nm ocorre interação do cálcio com a calmodulina. Este complexo se liga à enzima nNOS ativando-a com conseqüente produção de NO (Esplugues, 2002). Uma vez sintetizado, o NO difunde-

se podendo agir na própria célula que o produziu ou em células vizinhas. Ele atua estimulando a liberação de outros neurotransmissores/neuromoduladores nos terminais de células adjacentes ou atua na ativação/modulação de vias intracelulares de sinalização do próprio neurônio (Dias, et al., 2006).

3.3 Óxido nítrico produzido pela iNOS

Uma vez expressa, a iNOS produz continuamente, altas concentrações de óxido nítrico por longos períodos e sua atividade é controlada pelos níveis de transcrição e pela estabilidade de seus RNA mensageiros (Coleman, 2001). A indução da expressão da iNOS pode ocasionar efeitos tóxicos ou protetores. Isso porque, os efeitos do NO produzido pela iNOS são complexos e dependentes do tipo de tecido, tipo de insulto, do nível e da duração da expressão da enzima e, principalmente do estado oxidativo do tecido (Wink et al.,1996). Em geral, quando a resposta inflamatória é adaptativa, ou seja, é controlada, as altas concentrações de NO são produzidas por períodos curtos. Como nestes casos, o estresse oxidativo do tecido é menor, ocorre a reação do óxido nítrico produzido, com moléculas de oxigênio e água formando assim compostos não tóxicos de nitrato e nitrito (Stamler, 1994). Assim, a expressão

da enzima é benéfica, pois ocorrerá inibição do crescimento de patógenos, inibição da formação de microtrombos e de danos causados por radicais livres (Wink et al.,1996). Contudo, quando as condições patológicas são severas e prolongadas há um grande estresse oxidativo no tecido. Nestes casos, altas concentrações de NO são produzidas por longos períodos e ocorre interação deste, com outros radicais livres principalmente superóxidos formando compostos de peroxinitritos (Butler et al., 1995). Estes compostos demonstram caráter tóxico que além de amplificarem as respostas inflamatórias, induzem necrose e apoptose das células imunes e por causarem fragmentação de DNA, lesam células vizinhas saudáveis (Kroncke et al., 1997)

4. Ação do óxido nítrico no osso

Atualmente, sabe-se que o óxido nítrico também atua como um importante fator que influencia o metabolismo ósseo (Van't Hof e Ralston, 2001) uma vez que todas as isoformas da óxido nítrico sintase (eNOS, nNOS e iNOS) já foram identificadas nos três tipos celulares que compõem este tecido (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) (Fox e Chow, 1998). Embora o papel do óxido nítrico no metabolismo ósseo ainda seja pouco conhecido, estudos demonstraram que ele tem efeito bifásico tanto na atividade

osteoblástica quanto na osteoclasia. *In vitro*, estudos indicam que baixas concentrações de NO podem agir como um estimulador autócrino na proliferação osteoblástica (Riancho et al., 1995, Lin et al., 2008) e que altas concentrações inibem tanto a proliferação quanto a atividade destas células (Aguirre et al., 2001). Estes mesmos efeitos são descritos para a atividade osteoclástica (MacIntyre et al., 1991).

Com o objetivo de desvendar cada vez mais o papel do NO como importante mediador envolvido nos processos fisiológicos e patológicos do osso, os pesquisadores têm usado inibidores análogos da L-arginina e compostos que servem como fonte de óxido nítrico tanto em estudos *in vivo* quanto *in vitro* (Turner et al., 1994, Samuels et al., 2001, Hao et al., 2005). Os principais inibidores sintéticos utilizados são N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO) e o N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME) que competem com a L-arginina e inibem os receptores esteroespecíficos das NOS (Rees et al., 1990). A animoguanidina é o único análogo que inibe especificamente a NOS induzida e a principal substância utilizada como fonte de óxido nítrico é a nitroglicerina (Moncada et al., 1991).

Por meio do uso dessas substâncias, várias informações vêm sendo divulgadas apontando o óxido nítrico como importante agente anabólico no osso. Turner et al. (1994) demonstraram pela inibição das NOS que a diminuição da produção de óxido nítrico reduz a taxa de formação óssea na epífise tibial de ratas (Turner, et al., 1994), além de aumentar a perda óssea em ratas ovariectomizadas (Kasten et al., 1994). Além disso, outros pesquisadores mostraram que a administração de nitroglicerina reverte a perda óssea provocada pela deficiência dos esteróides sexuais (Turner, et al., 1996, Wimalawansa et al., 1996; Wimalawansa et al., 1997; Fox e Chow, 1998), comprovando assim o efeito anabólico do NO no metabolismo ósseo. Entretanto, o exato mecanismo pelo qual o NO induz este efeito benéfico não está claro. Postula-se que esse efeito anabólico seja devido à interação entre óxido nítrico e estrógeno (Turner et al., 1994; Samuels et al., 2001; Bakker et al., 2005).

Estudos têm demonstrado que os efeitos anabólicos do estrógeno no osso parecem ser mediados pelo óxido nítrico (Bakker et al., 2005), uma vez que o efeito protetor do estrógeno na perda óssea de ratas ovariectomizadas é inibido pela administração concomitante do inibidor da NOS, o L-NAME (Wimalawansa et al.,

1996). Além disso, os níveis séricos de NO são maiores em animais intactos quando comparados à animais ovariectomizados, e estes quando tratados com estrógeno apresentam elevação significativa dos níveis séricos de NO, sugerindo que o estrógeno tem efeito benéfico no osso destes animais por aumentar a produção de NO (Hao et al., 2005). Entretanto, o mecanismo pelo qual o estrógeno aumenta a expressão das NOS no osso não é claro. Assim, o NO estaria envolvido em intermediar o estímulo da formação óssea induzida pelo estrógeno, tendo um papel importante na regulação da função osteoblástica tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Samuels et al., 2001).

Além do envolvimento do óxido nítrico em processos fisiológicos do osso, estudos recentes mostram que ele tem papel importante como mediador dos efeitos das citocinas pro-inflamatórias durante processos patológicos. Descobriu-se que essas citocinas como interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interferon (INF) induzem a expressão de iNOS pelos osteoblastos *in vitro* e que as altas concentrações de NO produzidas, nestas circunstâncias, inibem a proliferação e a diferenciação osteoblásticas, estando relacionado com a perda óssea observada em processos inflamatórios do osso (Hukkanen et al., 1995).

5. Células tronco mesenquimais e diferenciação osteogênica

O osso como órgão, é composto por várias células mesenquimais dentre elas estão os osteoblastos, os condrócitos, os fibroblastos e, as células do estroma da medula, incluindo os adipócitos (Yamaguchi et al., 2000). Acredita-se que todas estas linhagens celulares sejam originadas de células precursoras comuns chamadas, de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea (Uccelli et al., 2008). As CTM são células multipotentes, encontradas entre as células diferenciadas do osso e possuem a função de se auto-renovarem e de se diferenciarem, originando os tipos celulares que compõem este órgão (Presnell et al., 2002; Grove et al., 2004). As CTM podem ser encontradas em vários outros órgãos, contudo em quantidades variadas. Dentre eles, tem-se: sistema nervoso central, pele (Gurevitch et al., 2003), sangue periférico, fígado, trato gastrointestinal (Presnell et al., 2002), sistema nervoso periférico, pâncreas (Mayhall et al., 2004), vasos sanguíneos, coração, córnea, retina (Grove et al., 2004), músculo esquelético (Jiang et al., 2002), tecido adiposo (Murphy et al., 2003), membrana sinovial (Luyten, 2004), pulmão (Cancedda et al., 2003), líquido amniótico, sangue do cordão umbilical e placenta (Bobis et al., 2006). Mas, a medula

óssea é considerada um dos principais sítios de CTM devido à maior quantidade e facilidade de obtenção dessas células (Payushina et al., 2006). No entanto, uma em 100.000 células do estroma da medula óssea pode ser considerada realmente célula tronco mesenquimal (Heng et al., 2004).

O tecido ósseo está em constante renovação durante a vida de um indivíduo e, este processo requer o recrutamento e a proliferação de células tronco com capacidade para se diferenciar em osteoblastos os quais, irão sintetizar e mineralizar a matriz óssea. Sabe-se que as CTM fornecem células osteoprogenitoras e há na literatura comprovação de que transplantes de células da medula na epífise de ossos longos de camundongos irradiados promoveram repopulação de células com capacidade para se diferenciarem em osteoblastos funcionais (Olmsted-Davis et al., 2003) o que reafirma a importância destas células na diferenciação osteoblástica.

Os principais fatores que estimulam a diferenciação de CTM da medula óssea em células osteoprogenitoras têm sido alvo de pesquisas. Hoje, sabe-se que a proliferação e a diferenciação tanto *in vitro* quanto *in vivo* das CTM em células especializadas estão sob o comando de vários fatores que vêm sendo cada vez mais investigados (Lindblad,

2001). Esses fatores são sinais celulares internos e externos representados por genes, substâncias secretadas por outras células, pelo contato físico com as células vizinhas, pelo microambiente (Iglézias, 2004) e pelo estímulo mecânico (Bobis et al., 2006; Payushina et al., 2006).

Sabe-se que os fatores de crescimento representados pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), pelo fator de crescimento transformante β (TGF β), pelo fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) (Bianco et al., 2001) e pelo fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2) (Gronthos e Simmons, 1995) têm papéis importantes na proliferação dessas células (Hughes et al., 2000).

É fato que a diferenciação de CTM em células osteoprogenitoras *in vitro* é dependente das condições do meio de cultura. Pesquisas já demonstraram que as CTM necessitam de meio básico representado por *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) enriquecido com antibióticos, antifúngicos e 10% de soro fetal bovino (SFB) para sua proliferação. Com a adição de substâncias como o ácido ascórbico, a dexametasona e o β -glicerofosfato ao meio de cultivo, que são fatores importantes para a síntese de colágeno, expressão das proteínas não

colagênicas e para a mineralização da matriz, respectivamente, o processo de diferenciação osteogênica se inicia e as CTM adquirem morfologia semelhante a osteoblastos maduros (Bruder et al., 1998). Hoje, um modelo de demonstração da relação entre a proliferação e a diferenciação tem sido dividido em três processos: 1) proliferação, 2) maturação da matriz extracelular e 3) mineralização.

Durante o processo de diferenciação das células osteoprogenitoras, são identificados genes associados ao estágio proliferativo como *c-fos*, *c-myc* (Liu et al., 2003) e *c-jun* (Stein et al., 1993), caracterizando a primeira fase da diferenciação, enquanto na diferenciação propriamente dita há expressão de genes como colágeno I, fosfatase alcalina, osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea (Liu et al., 2003). No entanto, existem inúmeros outros genes que podem ser expressos durante a diferenciação das células osteoprogenitoras como genes sinalizadores (*Igf1*, *Bmp*, *Wnt*), e outros genes como *Ank3*, *Asns*, *Cd24a*, *Cln3*, *Cox6a2*, *Cpe*, *Fabp3* (Kalajzic et al., 2005), PTH-proteína relacionada (PTHrP), receptor de PTH (PTH1R), receptor para FGF (FGF-R1), receptor do fator de crescimento ativador plaquetário (PDGF-R α) (Liu et al., 2003), *Stro-1*, *Msx-2*, *TAZ*, *Runx-2*, *Dix-5*, *AP-1*, *osterix*, *Rab24*, *calponin*, *calciclin*,

MSY-1, *SH3P2* e *fibronectina* (Hughes et al., 2006). O perfil gênico das CTM humanas tem sido estudado e alguns genes já foram identificados: colágeno I, osteonectina, TGF- β , cofilina, galectina-1, receptor 1 laminina, ciclofilina A e metaloproteinase 2 (Silva et al., 2003). Durante a diferenciação osteogênica das CTM humanas também já foram identificados genes como *ID4*, *CRYAB*, *SORT1*, *MSX2*, *VDR*, *OCN* e *RUNX2* (Kulterer et al., 2007). Sabe-se que 10% da matriz óssea orgânica consiste de proteínas não colagênicas produzidas por osteoblastos; dentre elas tem-se a osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea (Roach, 1994). Por estarem presentes nas periferias das regiões de matriz óssea neoformada, acredita-se que a osteopontina e a sialoproteína óssea sejam importantes iniciadoras do processo de mineralização óssea sendo, portanto, marcadores precocemente encontrados durante a diferenciação osteogênica (Roach, 1994). A sialoproteína óssea age como nucleadora dos cristais de hidroxiapatita e a osteopontina previne a precipitação prematura dos cristais de fosfato de cálcio na matriz colagênica (Doi et al., 1992). Já osteocalcina e a osteonectina se encontram dispersas no osteóide sendo consideradas importantes no processo de progressão da mineralização sendo encontradas mais tardiamente no

processo de diferenciação (Roach, 1994). Boivin et al. (1990) demonstraram que ratas em crescimento tratadas com inibidor da síntese de osteocalcina apresentaram excessiva mineralização nas placas de crescimento demonstrando a importância da osteocalcina na regulação da formação e do tamanho dos cristais de hidroxiapatita. O mesmo efeito foi observado para a osteonectina (Doi, et al., 1992).

Embora nem todos os fatores que estimulam o recrutamento e a diferenciação das CTM em células osteoprogenitoras sejam conhecidos, muitos deles já foram descobertos por meio de cultivo de CTM em meio de diferenciação osteogênico. Sabe-se que a prostaglandina E2 (Keila et al., 2001; Mo et al., 2002; Weinreb et al., 2001; Shamir et al., 2004), o hormônio do crescimento, o IGF1 (Jia e Heersche, 2000; Jia e Heersche, 2002; Sakata et al., 2003) e as proteínas morfogenéticas do osso (BMP) são fatores importantes para o recrutamento de células osteoprogenitoras da medula óssea (Yamaguchi et al., 2000; Katagiri e Takahashi, 2002; Chaudhary et al., 2004). Além disso, o FGF (Hughes et al., 2006), a fibronectina, o fator de crescimento epidermal (EGF) (Cancedda et al., 2003) e o TGF β_1 também têm sido considerados fatores importantes na diferenciação osteogênica *in vitro* (Cancedda et al., 2003).

Entretanto, os mecanismos pelos quais estes fatores interferem com a diferenciação osteogênica não estão totalmente elucidados. *In vivo*, sabe-se que o TGF- β interage com receptores transmembrana serina/treonina quinase recrutando e estimulando a proliferação das células osteoprogenitoras durante os estágios iniciais da formação óssea. Já o PDGF é secretado por plaquetas durante as fases iniciais da injúria óssea podendo atuar recrutando CTM durante a remodelação óssea (Hughes et al., 2006).

As BMP são moléculas de glicoproteínas pleiotrópicas pertencentes à superfamília das TGF- β (Tae et al., 2006), que estão 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). Sabe-se que elas induzem a diferenciação de CTM em osteoblastos e, conseqüentemente, favorecem a síntese de osso (Tsushida et al., 2003). Estudos têm demonstrado que, além da BMP-2, a BMP-3 (osteogenina), BMP-4, BMP-6, BMP-7 e BMP-9, são importantes no reparo de danos ósseos (Oreffo e Trifitt, 1999; He, 2005). Dentre elas, tem-se demonstrado *in vitro*, que as BMP 2, 6 e 9 podem ser capazes de estimular a diferenciação osteoblástica das CTM (He, 2005).

Outro fator importante que tem sido implicado como participante na diferenciação osteogênica é o estímulo mecânico (Van't Hof e Ralston, 2001). Sabe-se que culturas de CTM submetidas a vibrações mecânicas exibem maior grau de diferenciação osteogênica quando comparadas às células que não receberam vibração (Mauney, et al., 2004). Experimentos *in vitro* envolvendo a presença e ausência de carga mecânica, demonstraram a supressão de dois genes, osteoglicina e proteinase C procologênica. Além disso, experimento *in vivo* com carga mecânica demonstrou estimulação do gene que codifica a proteína receptora do fator de crescimento derivado de plaqueta (Zang et al., 2008). Entretanto, a via de sinalização para a regulação destes três genes e seus específicos papéis na resposta do osso à presença e ausência de carga mecânica ainda precisam ser identificados. Um fato importante é que culturas de osteoblastos e osteócitos submetidas a vibrações mecânicas produzem moléculas sinalizadoras importantes para o metabolismo ósseo, dentre elas, o óxido nítrico (Johnson et al., 1996; Klein-Nulend et al., 1998; Zaman et al., 1999). A produção de óxido nítrico em resposta a vibração mecânica é rápida e intensidade-dependente. Isso resultaria em uma base da estimulação dinâmica para a resposta adaptativa da formação óssea

predispondo assim, a perda óssea observada em casos de imobilizações prolongadas e em ambiente de microgravidade (Bacabac et al., 2004). Por isso, o NO tem sido determinado como um parâmetro de responsividade das células ósseas como molécula sinalizadora da resposta anabólica do osso à sobrecarga mecânica (Turner et al., 1996). A partir disso, acredita-se então que a resposta do osso ao estímulo mecânico é dependente da produção de óxido nítrico, que tem papel importante na transdução da estimulação mecânica com conseqüente formação da matriz (Fox e Chow, 1998). Entretanto os efeitos da atividade física sobre a diferenciação osteogênica de CTM *in vivo* não são totalmente conhecidos.

6. Tratamento de doenças ósseas com células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais representam um tipo de células tronco adulta que podem ser facilmente isoladas e expandida *in vitro* (Wolfgang e Ho, 2007). Devido a sua multipotencialidade, ou seja, devido à capacidade de se diferenciarem em linhagens celulares mesodermis diferentes, sua aplicação clínica no reparo de várias doenças tem se tornado alvo de pesquisas (Oreffo e Triffitt, 1999; Gurevitch et al., 2003). A medicina regenerativa vem sendo definida como substituição ou regeneração

de células, tecidos ou órgãos para restabelecer uma função prejudicada (Bajada et al., 2008). A terapia celular faz parte da terapia regenerativa e vem se tornando uma alternativa no tratamento de doenças cujas terapias atuais são inadequadas ou insatisfatórias.

Em condições fisiológicas, o tecido ósseo é renovado continuamente durante a vida, e esse processo de formação e renovação óssea é complexo e requer uma seqüência de eventos que se inicia com o recrutamento das células tronco mesenquimais; passando pela proliferação e diferenciação das CT em osteoblastos com subsequente formação de osteóide e mineralização do mesmo (Bruder et al., 1998; Oreffo e Triffitt, 1999). Para a formação óssea é necessária a participação de moléculas bioativas com ênfase às BMP, como as BMP 2, 4 e 7, e fatores de crescimento e diferenciação (GDF) como os GDFs 5 e 6 (Schultz et al., 2000). Por ocasião de uma fratura, o reparo ósseo se dá também pela participação das CTM. Inicialmente, no foco da fratura óssea ocorre necrose, desintegração da matriz e hemorragia. Citocinas originadas da matriz desintegrada e a degranulação das plaquetas durante a coagulação sangüínea formam um grupo de proteínas biologicamente ativas, algumas das quais são quimiotáticas para as CTM. Conseqüentemente, estas células

migram para a área lesada, proliferam-se e diferenciam-se em osteoblastos, condroblastos ou fibroblastos, formando o calo ósseo (Kraus e Kirker-Head, 2006).

Quando os processos naturais de reparo ósseo não são suficientes para restaurar a integridade óssea, fazem-se necessárias intervenções cirúrgicas (Kraus e Kirker-Head, 2006) ou até mesmo o uso de terapias alternativas como o uso de biomateriais e a terapia com as células tronco (CT). Mas, é importante ressaltar, que a terapia celular muitas vezes necessita estar associada aos tratamentos convencionais sistêmicos, principalmente no caso de doenças ósseas generalizadas (Voltarelli et al., 2005).

Diante disso, é enorme a expectativa da aplicação clínica das CT no tratamento de doenças com perda extensa do tecido ósseo como fraturas, osteítes, neoplasias, osteoporose e com perda da cartilagem como artrites, artroses, dentre outras patologias que não respondem aos tratamentos convencionais (Oreffo e Triffitt, 1999; Gurevitch et al., 2003).

As CT podem ser aplicadas no local lesado ou sistemicamente, no sangue periférico. Na ortopedia a maioria das aplicações de CT é local e ainda está sob caráter experimental (Tae et al., 2006). Os resultados do tratamento de doenças ósseas com CT têm

sido obtidos em modelos animais como caprinos (Murphy et al., 2003), coelhos (Anselme et al., 1999; Oreffo e Triffitt, 1999), cães, ratos e camundongos. As CT têm sido utilizadas no tratamento de osteoartrite (Murphy et al., 2003; Luyten, 2004), de fraturas, não uniões ósseas (Oreffo e Triffitt, 1999), osteonecrose (Lee et al., 2003), osteoporose (Wang et al., 2006) e de lesões focais da cartilagem articular, tendão, ligamento e do disco intervertebral (Tae et al., 2006). A maioria das pesquisas, associando ou não biomateriais às CT, obteve resultados satisfatórios no tratamento experimental de doenças ósseas, como osteoporose, osteoartrite, osteonecrose, fratura e degeneração de disco intervertebral (Gurevitch et al., 2003; Lee et al., 2003; Murphy et al., 2003; Sakai et al., 2003; Tsushida et al., 2003; Wang et al., 2006).

Estudos em seres humanos para o tratamento de doenças osteoarticulares ainda são muito limitados (Oreffo e Triffitt, 1999). Uma potencial dificuldade do uso clínico das CT em pacientes humanos, é que as mesmas devem ser capazes de proliferar extensivamente e originar quantidades suficientes de células; diferenciar-se nos tipos celulares desejados; sobreviver no

receptor após o transplante; integrar-se no tecido adjacente após o transplante; atuar de maneira apropriada durante toda a vida do receptor; e evitar, de qualquer forma, danos ao receptor (Lee et al., 2003). Além disso, é fundamental se certificar que não há contaminação da cultura celular por patógenos ou por outras substâncias antigênicas.

A bioengenharia tem obtido bons resultados com a associação de biomateriais porosos e CTM, onde as propriedades intrínsecas dos biomateriais são associadas às propriedades das CT, propiciando uma reconstituição óssea mais adequada (Cancedda et al., 2003). Para tanto, o biomaterial deve ser biocompatível e deve ser preferencialmente, mas não necessariamente biodegradável. A adesão, proliferação e diferenciação osteogênica das CT dependem da composição química, da carga eletrostática, da superfície e da configuração geométrica do biomaterial. No entanto existem algumas falhas que podem ocorrer na associação do biomaterial com as CT em procedimentos ortopédicos, como por exemplo, fraturas ósseas extensas, desgaste do biomaterial e a não interação do biomaterial com as CT (Oreffo e Triffitt, 1999).

Capítulo 2

Efeito da atividade física na histomorfometria óssea de ratas com osteoporose com e sem inibição da oxido nítrico sintase

RESUMO

O objetivo deste estudo foi verificar a participação do óxido nítrico como mediador dos efeitos da atividade física no tratamento de ratas com osteoporose por meio da inibição da óxido-nítrico sintase. Foram utilizadas 30 ratas Wistar divididas em seis grupos: 1) normal (controle), 2) osteoporose sedentário, 3) osteoporose ativo, 4) normal com L-NAME, 5) osteoporose sedentário com L-NAME, 6) osteoporose ativo com L-NAME. A osteoporose foi induzida por meio da ovariectomia bilateral. Três meses após a ovariectomia, tempo suficiente para induzir uma osteoporose de grau moderado, os grupos ativos realizaram atividade física diária em esteira automática, cinco dias/semana com velocidade de 15m/minuto e 0° de inclinação durante três meses. Os animais tratados com L-NAME receberam, por sonda orogástrica, 10mg/dia do medicamento diluídos em água destilada 40 minutos antes do início da atividade física. Os demais grupos receberam água como placebo. Três meses após o início da atividade física e do tratamento com L-NAME, os animais foram eutanasiados. Todos os segmentos vertebrais, fêmur, tíbia e úmero foram fixados em formalina 10%, descalcificados, processados em parafina e corados por hematoxilina e eosina para avaliação morfométrica. Foram mensuradas: a porcentagem de osso trabecular em todos os ossos e a espessura da cortical dos segmentos vertebrais. As médias foram comparadas pelo teste SNK. A inibição da óxido nítrico sintase promoveu redução da espessura da cortical das vértebras cervicais e torácicas das ratas normais. O grupo com osteoporose sedentário apresentou redução da porcentagem de tecido ósseo trabecular em todo o esqueleto. Interessantemente, a administração de L-NAME no grupo com osteoporose sedentário causou efeito antagônico, aumentando a porcentagem de tecido ósseo trabecular nos ossos longos, vértebras torácicas e lombares e reduzindo a espessura da cortical dos corpos vertebrais. O exercício físico promoveu ganho tanto de tecido ósseo trabecular quanto de tecido cortical nas ratas com osteoporose. Mas o L-NAME impediu o ganho de osso trabecular e cortical promovido pela atividade física na tíbia e nas primeiras vértebras torácicas das ratas com osteoporose. Conclui-se que o óxido nítrico atua como um dos mediadores dos efeitos benéficos da atividade física sobre o metabolismo ósseo de ratas com osteoporose e que

o efeito da inibição da óxido nítrico sintase foi danosa para o tecido ósseo cortical independentemente do grupo experimental, mas benéfica no osso trabecular em animais com osteoporose sedentários.

Palavra chave: exercício, osso, óxido nítrico, L-NAME

ABSTRACT

The objective of this study was to verify the participation of the nitric oxide as mediator of the effects of physical activity in the osteoporotic female rats treatment through the nitric oxide synthase inhibition. 30 Wistar female rats divided into six groups were used: Group 1, sham-operated (control); Group 2, osteoporotic sedentary; Group 3, osteoporotic active; Group 4, sham-operated with L-NAME; Group 5, osteoporotic sedentary with L-NAME; and Group 6, osteoporotic active with L-NAME. Osteoporosis was induced for bilateral ovariectomy. After the osteoporosis induction, the active groups performed controlled physical activity on a motor-driven treadmill at 15m/min speed and 0° inclination once a day, five days a week for three months. The rats were treated with the NOS inhibitor L-NAME by oralgastric probe (10 mg/animal/day) 40 minutes before being subjected to physical activity. Three months after the beginning of the physical activity and of the treatment with L-NAME, the animals were euthanased. All of the vertebral segments, femur, tibia and humerus were fixed in 10% buffered formalin and demineralised in 10% formic acid solution at pH 4.5. Paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by optical light microscopy. The trabecular bone percentage in all of the bones and the cortical thickness of the vertebral segments were measured. The means were compared by SNK. The nitric oxide synthase inhibition promoted reduction of the cortical thickness in cervical and thoracic vertebrae of the normal rats. The osteoporotic sedentary group showed reduction of the trabecular bone percentage in the whole skeleton. Interestingly, the administration of L-NAME in the osteoporotic group caused antagonic effect: increased the trabecular bone percentage in the long bones, thoracic and lumbar vertebrae and reduced the cortical thickness of the vertebrae. The physical exercise promoted increase the bone mass of the cortical and trabecular bone in osteoporotics rats. But L-NAME impeded the increase of trabecular and cortical bone promoted by the physical activity in the tibia, in the first thoracic vertebrae of the osteoporotics rats. In conclusion, the nitric oxide is a mediator of the beneficial effects of physical activity upon bone mass in osteoporotic rats and the nitric oxide synthase inhibition has negative effect under cortical bone tissue

independently of the experimental group and positive effect under trabecular bone tissue in osteoporotic sedentary animals.

Key words: bone, exercise, nitric oxide, L-NAME

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose é uma doença cada vez mais diagnosticada em mulheres e homens de todo o mundo (Notomi et al., 2003). Estima-se que em 2002, aproximadamente 30 milhões de mulheres tiveram osteoporose ou osteopenia com uma expectativa de aumentar para aproximadamente 41 milhões em 2020 (Kelley e Kelley, 2004). Várias terapias vêm sendo instituídas com o intuito de, pelo menos, minimizar a perda óssea observada pelo avançar da idade dentre elas, tem-se a prática de atividade física (Turner e Robling, 2004).

A atividade física apresenta efeito potente e complexo sobre o osso de indivíduos normais e com osteoporose, mas os resultados de pesquisa são contraditórios (Mosekilde, 1999). Já foi demonstrado que os efeitos da atividade física sobre o esqueleto são complexos e dependentes do momento que o exercício começa a ser realizado. Ocarino et al., 2008a relataram que a atividade física em ratas apresenta resultados mais satisfatórios se realizada

antes e imediatamente após a ovariectomia quando comparados aos resultados do exercício realizado somente antes ou somente imediatamente após a castração. Entretanto, a atividade física diária seguindo o mesmo protocolo do estudo anterior, mas realizada três meses após a ovariectomia, ou seja, depois de instalada a osteoporose promoveu ganho de massa óssea em todo o esqueleto de ratas por estimular a atividade osteoblástica (Ocarino et al., 2007a).

Por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, o exercício físico diário promove ganho de massa óssea em todo o esqueleto de ratas com osteoporose revertendo a osteopenia ocasionada pela deficiência dos esteróides sexuais (Ocarino et al., 2007a). Acredita-se que a liberação sistêmica e local de óxido nítrico, observada durante a prática de atividade física, possa estar envolvida nos efeitos benéficos do exercício sobre o metabolismo ósseo. Estudos realizados por Turner et al. (1996), demonstraram redução de 66% do ganho de massa óssea tibial em ratas normais submetidas a sobrecarga de força imposta

sobre a tíbia com inibição da oxido nítrico sintase.

Entretanto, este é o primeiro estudo que avaliou a participação do óxido nítrico como mediador dos efeitos do exercício no tratamento da osteoporose tanto no tecido ósseo trabecular quanto no tecido cortical em todo o esqueleto.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura dos Laboratórios de Experimentação Animal e de Histopatologia do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG.

As ratas foram provenientes do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG e foram pré-selecionadas pela ausência de resistência ao desenvolvimento de atividade física em esteira automática¹.

Foram utilizadas 40 ratas Wistar com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (cinco ratas/caixa) e recebendo ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. Foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a uma temperatura de 25°C.

Indução e confirmação da osteoporose

¹ Treadmill LE8706, LSI Letica Scientific Inst., USA

Os animais foram separados em dois grupos, um ovariectomizado (n=25) e um normal (n=15). As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral, sendo anestesiadas com pentobarbital sódico (30 mg/Kg) por via intraperitoneal. A extirpação dos ovários foi feita por duas incisões, látero-dorsais de aproximadamente 1cm de extensão com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e pele (procedimento padronizado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da UFMG - protocolo: 53/2006). Após os três meses da cirurgia cinco ratas ovariectomizadas e cinco ratas não ovariectomizadas foram eutanasiadas para a confirmação da osteoporose. A osteoporose foi confirmada por análise morfométrica da porcentagem de tecido ósseo trabecular (dados não demonstrados). As ratas ovariectomizadas apresentaram redução significativa da porcentagem de osso trabecular em todo o esqueleto quando comparadas aos animais não ovariectomizados. Além disso, Ocarino et al (2007a) já havia demonstrado que três meses é tempo suficiente para a indução de osteoporose de grau moderado.

Ensaio experimental

Após a confirmação da osteoporose, o restante dos animais foram separados em

seis grupos experimentais: 1) normal (n=5), 2) osteoporose sedentário (n=5), 3) osteoporose ativo (n=5), 4) normal com L-NAME (n=5), 5) osteoporose sedentário com L-NAME (n=5) e 6) osteoporose ativo com L-NAME (n=5).

As ratas tratadas com L-NAME² (inibidor da NOS) receberam por sonda orogástrica 10mg/animal/dia do medicamento diluído em 2mL de água, 40 minutos antes do início da atividade física. A dose de L-NAME utilizada foi determinada com base em estudos prévios que comprovaram a influência desta dose no metabolismo músculo esquelético (Turner et al., 1996; Samuels et al., 2001). Os grupos restantes receberam água destilada como placebo no mesmo esquema posológico.

Os grupos ativos foram submetidos a exercício físico em esteira automática, cinco dias/semana, durante três meses. A esteira era regulada para uma velocidade de 15m/min, sem inclinação. Com o objetivo de adaptar os animais à atividade física, na primeira semana, o exercício teve a duração de 15min/dia, passando para 30min/dia a partir da segunda semana até o final do período experimental conferindo uma atividade física de grau moderado (Sonne e Galbo, 1980). Os grupos normais e sedentários não realizaram atividade física

em esteira automática sendo limitados apenas aos movimentos dentro das caixas.

Seis meses após a ovariectomia e três meses após o início da atividade física e da administração do bloqueador L-NAME, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestesia.

À necropsia, as carcaças foram seccionadas em duas metades, pelo seu eixo longitudinal. Após pré-fixação em formalina a 10%, neutra e tamponada, por 96 horas, de uma hemiparte da carcaça, foram dissecados os ossos longos (úmero, fêmur e tíbia), a maxila (osso nasal) e vértebras cervicais, torácicas (segmentos torácicos 1-7 e 8-13) e lombares (1-3 e 4-6) para posterior descalcificação. A descalcificação foi realizada em EDTA a 10%. Após completa descalcificação controlada por raio-X, todos os segmentos vertebrais e os ossos longos direitos foram seccionados longitudinalmente e a maxila foi seccionada transversalmente na altura dos molares para avaliação da espessura do osso nasal. Em seguida, os ossos foram processados pela técnica de inclusão em parafina, e secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina (H&E) para avaliação histomorfométrica e pelo método do picro sírius para a realização de fotografias. Em secções histológicas da

² Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

maxila coradas por H&E, foi determinada, com objetiva de 40× e ocular micrométrica³, a espessura do osso nasal sendo o número de campos determinado pela técnica de estudo da variação da instabilidade de valores médios em relação à amostra que os originou. Em uma lâmina representativa da maxila do grupo-controle foi determinada a espessura do osso nasal em 100 pontos. A seguir, a amostra de 100 dados foi dividida em 10 com valores sorteados ao acaso. Foram determinados a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação da variável estudada em 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 pontos. Após verificar que o desvio padrão e o coeficiente de variação se estabilizavam em torno de 50 pontos, este valor foi adotado para se determinar a espessura média do osso nasal. Ao final, foi aplicado um fator de correção obtido pela escala de uma lâmina micrométrica (Ocarino, et al., 2007).

Para a determinação da porcentagem de osso trabecular, realizou-se a morfometria em secções histológicas dos ossos longos (epífise e metáfise proximais do úmero e tibia, cabeça, epífise e metáfise distais do fêmur) e das vértebras. Nos ossos longos, numa área tecidual média de 8mm² iniciada 1mm abaixo da placa epifisária e da cartilagem articular, foi determinado, com

objetiva de 40×, o volume de osso trabecular com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma gráticula com 25 pontos. A variável foi determinada em um total de 10 campos na região da epífise e 10 campos na metáfise totalizando 250 pontos cada. Nos segmentos vertebrais, com objetiva de 40× a mesma variável, foi determinada em um total de nove campos/vértebra sendo três campos iniciados a 1mm abaixo de cada placa epifisária e os três campos restantes, tomados na região média do corpo vertebral totalizando assim, 225 pontos por vértebra (Ocarino, et al., 2007).

Para avaliação do tecido ósseo compacto, foi mensurada a espessura da cortical das vértebras com objetiva de 10× e régua micrométrica, através de seis medidas equidistantes ao longo do corpo vertebral sendo três na cortical superior e três na inferior. Ao final foi aplicado às médias da espessura da cortical um fator de correção obtido pela escala de uma lâmina micrométrica (Ocarino, et al., 2007).

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso. Para cada variável, a média e o desvio padrão foram determinados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e as médias foram comparadas pelo teste Student-Newman Keuls (SNK) (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad

³ Carl Zeiss, KLP-W 10x

Software San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

Grupo Normal (controle)

Os animais do grupo controle apresentaram morfologia óssea compatível com a normalidade. A placa epifisária das vértebras e dos ossos longos mostrava-se estreita, pouco diferenciada, com a zona de proliferação pouco evidente e observavam-se áreas desprovidas de células e fibrilação da matriz cartilaginosa, sinais de redução da sua atividade. Porém, a invasão vascular com erosão da cartilagem e formação da esponjosa primária estava presente em todos os sítios ósseos.

Nos ossos da face, o osso nasal encontrava-se delgado, porém apresentava-se contínuo e revestido por osteoblastos ativos. As trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos e vértebras apresentavam-se em grande quantidade, espessas, confluentes (Fig. 1A) e com retenção de matriz cartilaginosa (coração condróide). A cobertura osteoblástica era de células ora cubóides com núcleos grandes e ora achatados com núcleos fusiformes (Fig. 3A). Os osteócitos mostravam-se ora ativos, com núcleos grandes alojados em lacunas

alargadas e ora inativos com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas e, pouco basofílicas.

Grupo osteoporose sedentário

As ratas deste grupo apresentaram osteoporose marcante principalmente no tecido ósseo trabecular. A placa epifisária das vértebras e dos ossos longos mostrava-se pouco diferenciada, hipocelularizada e praticamente sem erosão vascular da cartilagem. A esponjosa primária era inexistente e a placa epifisária estava quase totalmente selada pela placa óssea terminal distal.

O osso nasal apresentava-se descontínuo e delgado, porém não havia diferença significativa em comparação ao grupo normal (Tab. 1). A cobertura osteoblástica era quase inexistente e, as células presentes eram inativas, ou seja, achatadas e com núcleos fusiformes (Fig. 3B). As trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos e vértebras estavam em número significativamente reduzido quando comparado ao normal (Tab. 2). As trabéculas eram delgadas, acinturadas e fragmentadas (Fig. 1B). Os osteócitos profundos se mostravam ativos, ou seja, com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas e bordas basofílicas.

Grupo osteoporose ativo

A placa epifisária dos ossos longos e vértebras era pouco diferenciada, com grandes áreas acelulares, com discreta invasão vascular. A placa óssea terminal distal selava em alguns pontos a placa epifisária, mas havia formação da esponjosa primária.

A atividade física promoveu não só parada da perda óssea promovida pela ovariectomia, mas também, ganho de massa óssea tanto de tecido trabecular quanto de tecido cortical. A atividade física não somente promoveu ganho de massa óssea nas ratas com osteoporose em relação ao grupo osteoporose sedentário, como também fez com que a porcentagem de osso trabecular e cortical em alguns sítios do esqueleto desses animais se igualasse ou até mesmo superasse a do grupo normal. O osso nasal era significativamente mais espesso quando comparado ao grupo ovariectomizado sedentário e até mesmo ao grupo normal (Tab. 1). A sua cobertura osteoblástica era abundante e com áreas aparentes de hiperplasia e hipertrofia osteoblástica onde as células apresentavam-se ativas cuboidais e com núcleos grandes (Fig. 3C).

As ratas com osteoporose antes da atividade física não mais apresentavam sinais de

osteoporose ao final do experimento, ou seja, após três meses de atividade. A porcentagem de trabéculas ósseas nos ossos longos e vértebras era significativamente maior nas ratas osteoporóticas ativas quando comparadas às ratas com osteoporose sedentárias (Tab. 2). Havia trabéculas espessas e confluentes (Fig. 1C) com cobertura osteoblástica evidente, formada por mais de uma fileira de osteoblastos aparentemente imaturos, volumosos de permeio a grande quantidade de osteóide, ao contrário do que foi observado no grupo sedentário. Nesse grupo, a cobertura osteoblástica era praticamente inexistente e os osteoblastos, quando presentes, eram achatados e com núcleos fusiformes. Os animais com osteoporose ativos apresentaram, nas vértebras lombares, não somente ganho de tecido ósseo trabecular, mas também de tecido cortical como demonstrado pela maior espessura da cortical desses animais em relação ao grupo normal (Tab. 3). Nesses animais, os osteócitos apresentavam-se ativos, com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas.

Grupo normal com L-NAME

Os animais do grupo normal com L-NAME apresentaram parâmetros morfológicos semelhantes ao grupo normal sem o inibidor

da óxido nítrico sintase. A placa epifisária das vértebras e dos ossos longos mostrava-se estreita, pouco diferenciada, com a zona de proliferação pouco evidente e observavam-se áreas desprovidas de células e fibrilação da matriz cartilaginosa, sinais de redução da sua atividade. Porém, a invasão vascular com erosão da cartilagem e formação da esponjosa primária estavam presentes em todos os sítios ósseos. O osso nasal encontrava-se delgado, revestido por osteoblastos ativos semelhantemente ao observado no grupo normal (Tab. 1). As trabéculas epifisárias e metafisárias dos ossos longos e vértebras apresentavam-se em grande quantidade, espessas, confluentes não havendo diferença significativa na porcentagem de osso trabecular em comparação ao grupo normal (Tab. 2) (Fig. 2A). A cobertura osteoblástica era de células ora cubóides com núcleos grandes e ora achatados com núcleos fusiformes (Fig. 3D). Os osteócitos mostravam-se ora ativos, com núcleos grandes alojados em lacunas alargadas e ora inativos com núcleos pequenos alojados em lacunas estreitas e, pouco basofílicas. Entretanto, a administração de L-NAME reduziu significativamente, a espessura da cortical das vértebras cervicais e torácicas em relação ao grupo normal (Tab. 3).

Grupo osteoporose sedentário com L-NAME

A administração de L-NAME em animais com osteoporose sedentário apresentou efeito antagônico dependente do tipo de tecido ósseo, aumentando significativamente a porcentagem de tecido ósseo trabecular no úmero, tíbia, epífise distal do fêmur, cabeça do fêmur, vértebras torácicas e últimas lombares quando comparado ao grupo osteoporose sedentário sem L-NAME (Tab. 1 e 2) (Fig. 2B) e reduzindo a espessura do tecido ósseo cortical das vértebras (Tab. 3). As trabéculas epifisárias e metafisárias estavam mais conectadas apresentavam cobertura osteoblástica mais evidente, com osteoblastos ora cuboidais (ativos) e ora fusiformes (inativos), diferentemente do que foi observado no grupo osteoporose sem L-NAME (Fig. 3E). Neste último, praticamente não se observava cobertura osteoblástica que quando presente demonstrava características de inatividade. Entretanto, efeito inverso foi observado na cortical. A cortical das vértebras cervicais, primeiras torácicas e últimas lombares foi significativamente mais delgada quando comparada ao grupo osteoporose sedentário sem a inibição da óxido nítrico sintase (Tab. 3). Nenhuma alteração, entre os dois grupos, foi evidenciada na morfologia dos osteócitos.

Grupo osteoporose ativo com L-NAME

A administração de L-NAME no grupo com osteoporose submetido à atividade física, reduziu significativamente a porcentagem de osso trabecular na metáfise proximal da tíbia e nas vértebras torácicas 1-7 (Tab. 2) (Fig 2C) e na espessura do osso nasal quando comparado ao grupo osteoporose ativo sem L-NAME (Tab. 1). Efeito semelhante foi percebido no tecido ósseo cortical onde se observou redução significativa da espessura

da cortical em todos os segmentos vertebrais (Tab. 3). Nesses sítios foram observados focos de osteoblastos reduzidos de tamanho. Entretanto, nenhuma alteração marcante na morfologia dos osteócitos foi observada em comparação ao grupo osteoporose ativo sem L-NAME (Fig. 3F). No restante dos sítios, não houve diferença significativa na porcentagem de osso trabecular quando comparado ao grupo com osteoporose ativo sem L-NAME (Fig.2C)

Tabela 1. Média e desvio padrão da espessura (μm) do osso nasal de ratas adultas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da óxido nítrico sintase

| Variável | Grupos | | | | | |
|------------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | Normal (controle) | Osteoporose Sedentário | Osteoporose ativo | Normal L-Name | Osteoporose sedentário L-Name | Osteoporose ativo L-Name |
| osso nasal (μm) | 6,2 \pm 1,7B | 17,5 \pm 3,2B | 23,3 \pm 1,9 A | 17,9 \pm 1,8 B | 14,6 \pm 2,0B | 17,6 \pm 1,6B |

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

Tabela 2: Média e desvio padrão da porcentagem de osso trabecular nos ossos longos e vértebras de ratas adultas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da oxido nítrico sintase.

| Variável | Grupos | | | | | |
|---------------------------|-----------------|------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | Normal | Osteoporose Sedentário | Osteoporose ativo | Normal L-Name | Osteoporose sedentário L-Name | Osteoporose ativo L-Name |
| Úmero proximal (epífise) | 42,3 \pm 5,8A | 12,4 \pm 2,5C | 26,0 \pm 13,1B | 36,7 \pm 2,7AB | 34,5 \pm 9,4AB | 26,8 \pm 2,5B |
| Úmero proximal (metáfise) | 36,3 \pm 5,9A | 5,1 \pm 4,1D | 24,4 \pm 7,8B | 4,9 \pm 7,0A | 3,0 \pm 7,2C | 20,4 \pm 3,9BC |

| | | | | | | |
|---------------------------|-----------|------------|------------|------------|------------|-------------|
| Tíbia proximal (epífise) | 44,2±9,2A | 15,1±6,4D | 34,4±6,9BC | 7,7±3,7AB | 27,7±4,0BC | 23,0±5,1CD |
| Tíbia proximal (metáfise) | 43,3±6,8A | 7,3±4,5C | 34,8±7,1B | 33,7±8,6B | 24,2±5,2B | 12,7±5,0C |
| Fêmur distal (epífise) | 41,0±7,8A | 17,4±7,6B | 32,7±5,8A | 33,5±5,5A | 31,3±4,8A | 36,0±7,6A |
| Fêmur distal (metáfise) | 41,9±7,5A | 9,4±8,5C | 26,9±7,9BC | 8,6±8,9A | 12,9±3,7C | 18,6±7,4C |
| Cabeça do fêmur | 53,8±9,7A | 17,2±3,6C | 41,2±7,6B | 45,3±7,6AB | 34,6±4,7B | 36,4±9,3B |
| Vértebras cervicais | 37,4±5,4A | 20,7±6,7B | 34,4±5,9A | 2,9±6,7A | 21,1±1,0B | 29,6±4,6A |
| Vértebras torácicas 1-7 | 34,7±5,3A | 18,2±5,6C | 36,1±3,7A | 3,4±5,8A | 28,7±3,8AB | 26,2±3,3B |
| Vértebras torácicas 8-13 | 36,6±7,2A | 19,8±4,6B | 37,4±4,5A | 9,0±6,6A | 31,2±2,3A | 29,6±4,6A |
| Vértebras lombares 1-3 | 39,9±3,3A | 19,0±10,7C | 4,5±12,8AB | 35,8±9,1AB | 23,9±1,1BC | 26,7±3,8ABC |
| Vértebras lombares 4-6 | 31,4±3,6A | 15,9±5,0C | 29,4±6,6A | 35,0±5,3A | 21,1±1,6B | 24,2±6,2AB |

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

Tabela 3. Média e desvio padrão da espessura da cortical (μm) das vértebras de ratas adultas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da oxido nítrico sintase

| Variável | Grupos | | | | | |
|--------------------------|------------------|------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|--------------------------|
| | Normal | Osteoporose Sedentário | Osteoporose ativo | Normal L-Name | Osteoporose sedentário L-Name | Osteoporose ativo L-Name |
| Vértebras cervicais | 141,2±25,7A | 123,9±3,3AB | 153,9±13,3A | 86,6±25,6C | 82,0±11,7C | 108,1±13,2B C |
| Vértebras torácicas 1-7 | 121,1±13,3A B | 110,6±14,3B | 137,7±18,9A | 82,6±16,4C | 83,6±7,3C | 104,4±19,6B C |
| Vértebras torácicas 8-13 | 141,1±15,3A | 120,5±17,6B | 153,8±33,0A | 95,0±23,1B | 77,9±11,7B | 86,6±14,9B |
| Vértebras lombares 1-3 | 145,7±18,3B | 134,2±14,3B | 193,6±20,6A | 113,4±15,3B | 124,9±11,3B | 117,5±20,6B |
| Vértebras lombares 4-6 | 140,1±18,8B | 128,3±18,6B | 168,3±34,5A | 107,6±17,3B C | 88,9±8,7C | 123,1±9,4B |

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

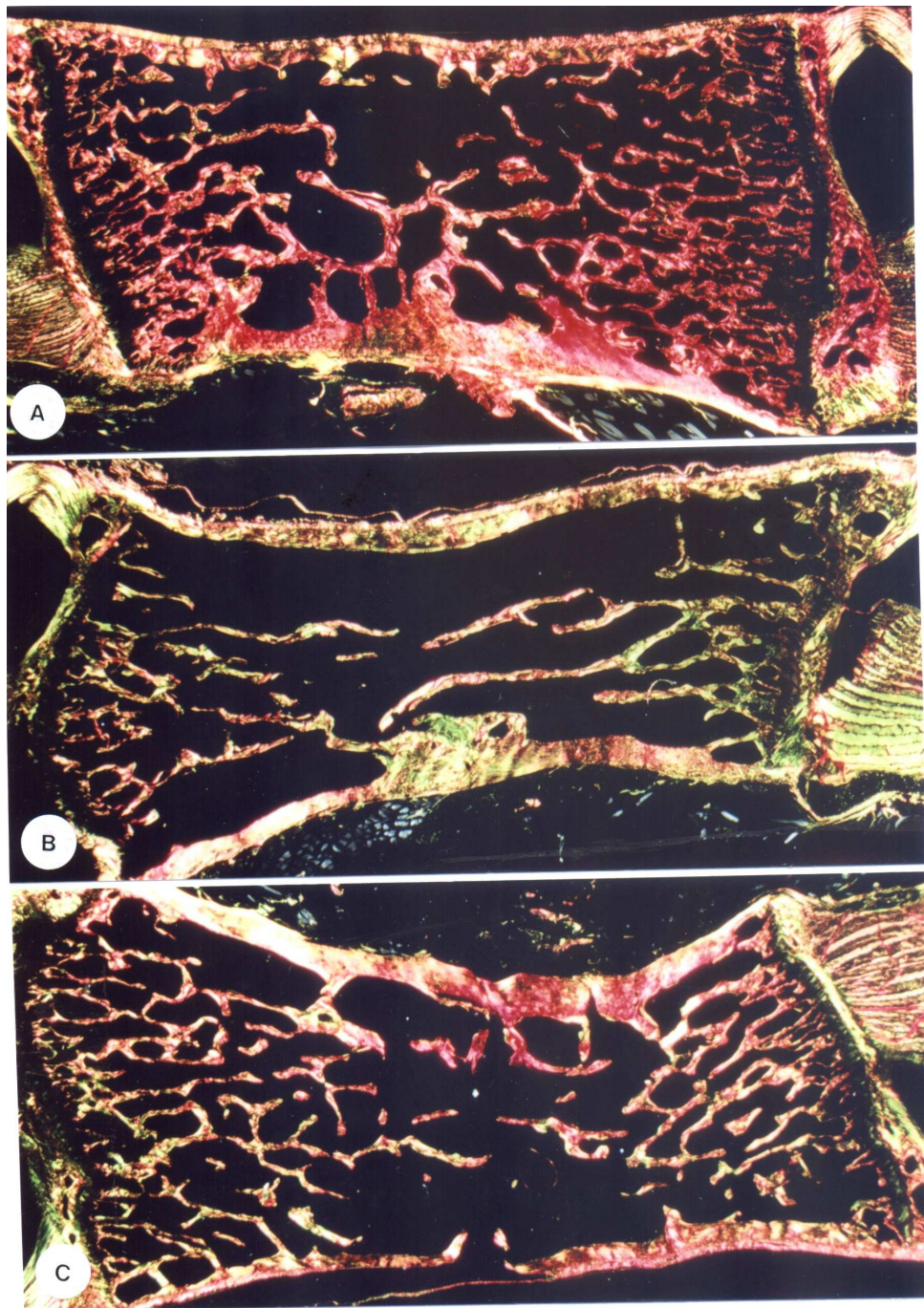


Figura 1. Vértex lombares do segmento 4/6, de ratas adultas ao final do experimento. Picro Sirius 12,5 \times . A) Grupo normal com trabéculas espessas e confluentes. (B) Grupo osteoporose sedentário com intensa redução do número de trabéculas com adelgaçamento e fragmentação das mesmas. C) Grupo osteoporose ativo com trabéculas mais numerosas em relação ao grupo osteoporose sedentário.

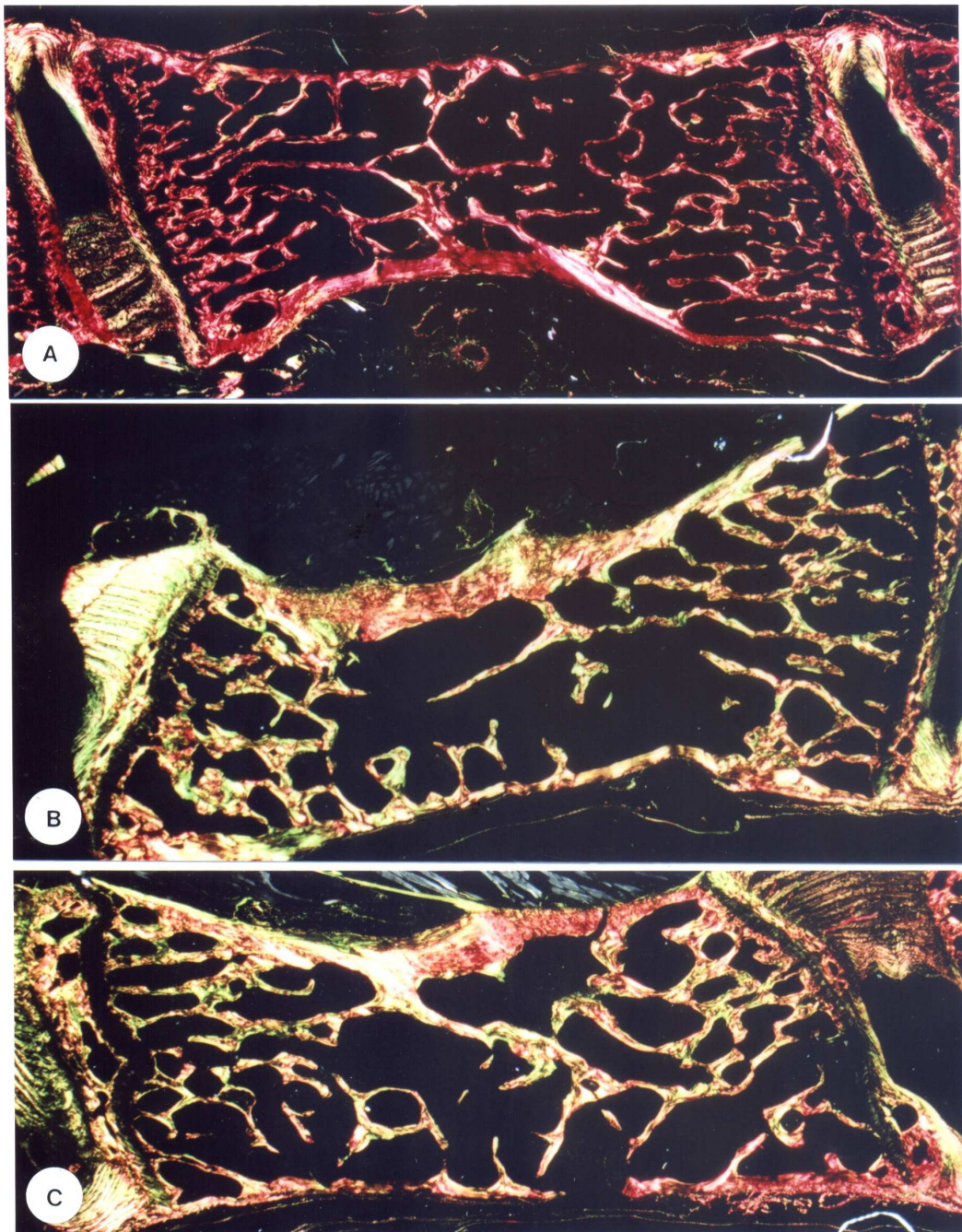


Figura 2. Vértex lombares do segmento 4/6, de ratas adultas ao final do experimento. Picro Sirius 12,5 \times . A) Grupo normal tratado com L-NAME com trabéculas espessas enfluentes semelhante ao grupo normal. B) Grupo osteoporose sedentário tratado com L-NAME com trabéculas mais numerosas e confluentes quando comparado ao grupo osteoporose sedentário. C) Grupo osteoporose ativo com L-NAME com trabéculas espessas e confluentes semelhante ao grupo osteoporose ativo.

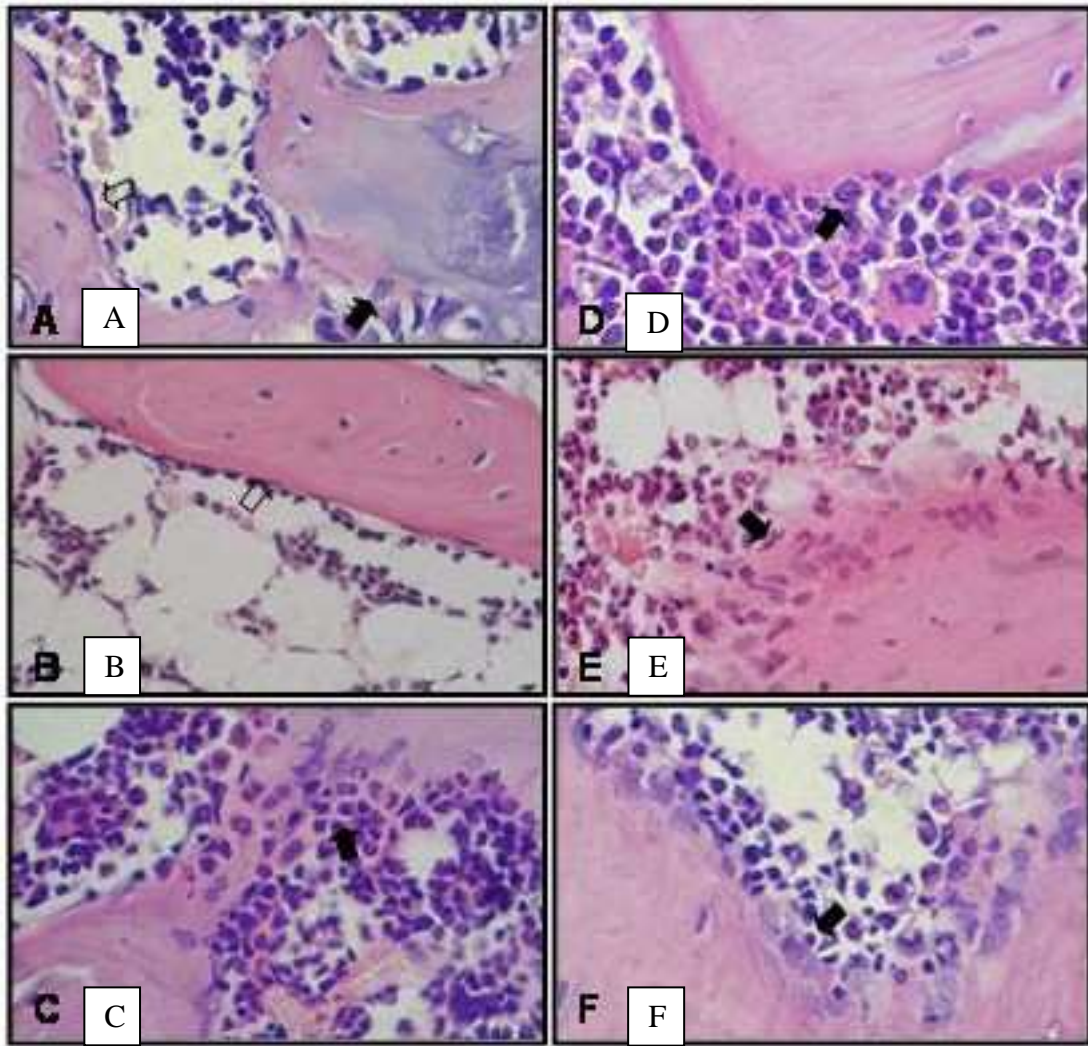


Figura 3 . Vértebra lombar do segmento 4/6 de ratas adultas. HE 150×. A) Grupo normal com trabécula recoberta por osteoblastos ora cuboidais (seta cheia) ora achatados com núcleos fusiformes (seta vazia). B) Grupo sedentário apresentando cobertura osteoblástica praticamente inexistente e com alguns osteoblastos achatados com núcleos fusiformes (seta vazia). C) Grupo osteoporose ativo com trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos de permeio ao osteóide (seta cheia). D) Grupo normal tratado com L-NAME com cobertura osteoblástica formada por osteoblastos ora cuboidais (seta cheia) ora achatados com núcleos fusiformes semelhante ao grupo normal. E) Grupo sedentário tratado com L-NAME com trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos (seta cheia). F) Grupo osteoporose ativo tratado com L-NAME apresentando trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos de permeio ao osteóide (seta cheia).

DISCUSSÃO

A osteoporose do grupo ovariectomizado sedentário já era esperada uma vez que havia hipoplasia e hipotrofia de osteoblastos, células responsáveis pela síntese de matriz óssea. Como citado anteriormente, os hormônios sexuais são importantes na diferenciação osteoblástica e na síntese de matriz óssea (Bilezikian et al., 1996; Bland, 2000) sendo a deficiência dos esteróides sexuais responsável pela diminuição da aposição óssea (Bland, 2000). Contudo, alguns dos mecanismos pelos quais os hormônios sexuais atuam na remodelação óssea ainda são pouco conhecidos (Raisz, 1999). A presença de receptores para estrógenos em osteoblastos e osteoclastos sugere efeito direto desse hormônio sobre o tecido ósseo (Tomkinson et al., 1997; Gaumet-Meunier et al., 2000). O estrógeno aumenta a diferenciação osteoblástica aumentando assim a síntese de matriz óssea (Liel et al., 1999; Bland, 2000), inibe a apoptose dos osteoclastos (Tomkinson et al., 1997) e mantém, vivos, os osteócitos (Tomkinson et al., 1998; Bland, 2000). Outro fator que agrava a osteopenia do hipogonadismo é a redução da absorção intestinal de cálcio (Colin et al., 1999). Além disso, a redução da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais em células osteoprogenitoras

como demonstrado no próximo capítulo, é outro fator que pode estar envolvido na gênese da osteoporose pós ovariectomia.

A atividade física não somente promoveu ganho de massa óssea nas ratas com osteoporose em relação ao grupo osteoporose sedentário, como também fez com que a porcentagem de osso trabecular e cortical em alguns sítios do esqueleto desses animais se igualasse ou até mesmo superasse a do grupo normal. Isso foi observado em ossos submetidos ao impacto mecânico direto e indireto. Sabe-se que a atividade física apresenta efeito potente e complexo sobre o osso de indivíduos normais e com osteoporose, mas os resultados de pesquisa são contraditórios (Mosekilde, 1999). Ocarino et al. (2008a) demonstraram que o efeito benéfico da atividade física sobre o osso é dependente do período que o exercício é realizado em relação a deficiência dos hormônios sexuais. Por mecanismos ainda não totalmente compreendidos, o exercício físico diário promove ganho de massa óssea em todo o esqueleto de ratas com osteoporose já instalada revertendo a osteoporose decorrente da deficiência dos esteróides sexuais (Ocarino et al., 2007a). Sabe-se que alguns dos mecanismos pelos quais a atividade física melhora a massa óssea são através de efeitos diretos mediados pela ação

das forças mecânicas (Brahm et al 1997; Henderson et al 1998) e indiretos mediados por hormônios, fatores de crescimento e citocinas (Henderson et al., 1998). A liberação de hormônio de crescimento (GH) (Thompson Jr. et al., 1994; Brahm et al., 1997; Kraemer et al., 1998; Wallace et al., 2000; Kanaley et al., 2001) atua como fator anabólico direto ou indireto via fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) estimulando a síntese de DNA e conseqüentemente de colágeno pelas células osteogênicas, aumentando a síntese de matriz óssea *in vivo* (Nomura e Yamamoto, 2000). Além disso, uma força mecânica, quando aplicada sobre o tecido ósseo, forma sinais endógenos que interferem com a remodelação óssea. No que concerne ao efeito da força mecânica sobre os osteócitos, muito se especula sobre a função autócrina da prostaglandina (PGE₂) na regulação da expressão das junções *gap* e na expressão da Cx43 na membrana dos osteócitos. Com a aplicação da força mecânica há, no osteócito, a conversão do ácido aracídico em prostaglandina E₂ e a sua liberação atuaria como fator autócrino, estimulando a formação da proteína Cx43 e de novas junções *gap* aumentando a rede de conexões, elevando a propagação do estímulo mecânico (Cherian et al., 2003). Antes, acreditava-se que a ausência de estrógeno durante a menopausa diminuía a

sensibilidade do tecido ósseo à carga mecânica contribuindo assim, para a rápida perda óssea pós-menopausa (Frost, 1987). Entretanto, trabalhos recentes *in vitro* e *in vivo*, têm demonstrado que a deficiência dos esteróides sexuais, principalmente de estrógeno, não altera a responsividade das células ósseas e do tecido ósseo ao estímulo mecânico (Bakker et al., 2005; Ocarino et al., 2007a; Ocarino et al., 2008a). Bakker et al. (2005) mostraram que culturas de células advindas da medula óssea de mulheres com osteoporose, sob vibrações mecânicas sintetizaram altos níveis de prostaglandina e óxido nítrico comprovando que a ausência de estrógeno não limita a resposta das células ósseas ao estímulo mecânico no que diz respeito à produção de substâncias com potenciais efeitos anabólicos no osso. Além disso, estudos *in vitro* apontam o óxido nítrico (NO) como importante fator na diferenciação de osteoblastos de calvária de rato (Lin et al., 2008) o que levanta a hipótese de que o NO participaria como mediador da resposta *in vivo* do osso ao estímulo mecânico uma vez que, durante a prática de atividade física, ocorre liberação local e sistêmica deste radical livre (Van't Hof e Ralston, 2001; Bacabac, et al., 2004).

Interessantemente, os resultados apresentados aqui demonstraram que a inibição da óxido nítrico sintase com o uso

do L-NAME, alterou, de forma diferenciada, o tecido ósseo trabecular e o tecido ósseo cortical; informação esta, ainda não disponível na literatura. Os trabalhos que avaliaram os efeitos do óxido nítrico no metabolismo ósseo, utilizando inibidores das óxido nítrico sintases ou substâncias fontes de NO, o fizeram apenas no tecido ósseo trabecular (Turner et al., 1996, Turner et al., 1997; Samuels et al., 2001, Hao et al., 2005). Não há menção dos efeitos do NO sobre o tecido ósseo osteônico. Existem informações na literatura indicando que o óxido nítrico intermedia, em parte, os efeitos anabólicos do estrógeno no metabolismo ósseo (Bakker et al., 2005), uma vez que o efeito protetor do estrógeno na perda óssea trabecular ocasionada pela ovariectomia é inibido pela administração concomitante de L-NAME (Wimalawansa et al., 1996). Entretanto, no presente estudo, ratas normais tratadas com L-NAME não apresentaram alterações na porcentagem de osso trabecular em nenhum sítio ósseo analisado nem tão pouco na morfologia das células ósseas quando comparado ao grupo normal sem o L-NAME corroborando os achados de Turner et al., 1997 e Samuels et al., 2001. Contudo, como demonstrado anteriormente, as ratas normais com inibição das NOS mostraram redução significativa da espessura da cortical em vários segmentos vertebrais levantando a suspeita de que o

óxido nítrico direta ou indiretamente, é um importante fator no controle do *turnover* do tecido ósseo compacto.

Outro resultado intrigante foi que a administração de L-NAME em ratas com osteoporose sedentárias, atenuou a perda óssea no tecido trabecular tanto em ossos longos quanto em vértebras quando comparadas as ratas ovariectomizadas sedentárias sem L-NAME. Mas, assim como no grupo normal L-NAME, houve redução significativa da espessura da cortical em vários segmentos vertebrais. Embora Wimalawansa et al. (1996) tenham demonstrado que a administração de L-NAME imediatamente após a ovariectomia, ou seja, antes do desencadeamento da osteoporose, por 18 dias, não agrava a perda óssea decorrente da deficiência de estrógeno nenhuma menção é feita aos seus efeitos no tecido cortical.

A inibição da óxido nítrico sintase no grupo osteoporose ativo impediu a reversão da osteoporose induzida pela atividade física no tecido ósseo trabecular do osso nasal, na metáfise proximal da tíbia e nas primeiras vértebras torácicas quando comparada ao grupo ovariectomizado ativo sem L-NAME. Isso indica que o óxido nítrico participa como um dos mediadores dos efeitos benéficos da atividade física no tratamento

da osteoporose. Mas o NO não é o único intermediador da formação óssea induzida pelo exercício, havendo também a participação de outras substâncias como prostaglandina E2, citocinas e fatores de crescimento liberadas durante o estresse mecânico com potencial efeito anabólico sobre o osso (Hughes et al., 1999). Como nos demais grupos que receberam L-NAME, a espessura da cortical de todos os segmentos vertebrais foi significativamente mais delgada no grupo osteoporose ativo com L-Name, quando comparada ao grupo ovariectomizado ativo sem L-NAME.

Com base nas informações disponíveis na literatura, esse estudo foi o primeiro a demonstrar que o efeito da inibição da produção de óxido nítrico é diferenciado entre o tecido trabecular e o tecido cortical. É importante ressaltar que, para quaisquer conclusões a serem firmadas quanto aos efeitos de qualquer tratamento no metabolismo ósseo, é extremamente necessário estudar o comportamento tanto do tecido trabecular quanto do tecido cortical. Diante de nossos resultados, ficou evidente que independentemente do grupo experimental, a inibição da óxido nítrico sintase atuou como importante fator na perda óssea de tecido cortical. Sabe-se que o metabolismo ósseo trabecular é mais acelerado quando comparado ao

metabolismo do tecido cortical. Sendo assim, os resultados de quaisquer tratamentos que influenciam o metabolismo ósseo, é visto primeiramente sobre o tecido trabecular e mais tardiamente no tecido cortical. Como a inibição da óxido nítrico sintase promoveu resultados diferenciados entre o tecido trabecular e o tecido cortical, a diferença entre o metabolismo destes dois sítios, parece não ser a causa da diferença de resposta encontrada entre o tecido trabecular e o cortical quando da inibição da óxido nítrico sintase pelo uso do L-NAME. Seria o óxido nítrico um dos principais fatores controladores direta ou indiretamente do *turnover* ósseo cortical? O óxido nítrico atua no controle da expressão de proteínas não colagênicas da matriz óssea cuja distribuição é diferenciada no tecido ósseo cortical quando comparado ao tecido ósseo trabecular? Estudo realizado em tecido ósseo humano demonstrou que o osso cortical apresenta 10× mais osteocalcina que o tecido trabecular e que este, apresenta 7× mais osteonectina quando comparado ao tecido cortical (Roach, 1994). Para tentar responder estes questionamentos, estudos futuros precisam ser realizados.

CONCLUSÃO

O óxido nítrico atua como um dos mediadores dos efeitos benéficos da

atividade física sobre o metabolismo ósseo de ratas com osteoporose e o efeito da inibição da óxido nítrico sintase foi danoso para o tecido ósseo cortical independente do

grupo experimental, mas foi benéfica no tecido ósseo trabecular de ratas com osteoporose sedentárias.

Capítulo 3

Diferenciação osteogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da óxido nítrico sintase⁴

RESUMO

A atividade física apresenta efeito potente e complexo sobre o osso. Uma das hipóteses a ser testada é que o exercício tem efeito positivo sobre o esqueleto de ratas com osteoporose por estimular a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea. Outra hipótese é que as concentrações locais de óxido nítrico intermediariam os efeitos da atividade física no tratamento da osteoporose. O objetivo deste estudo foi investigar a diferenciação osteogênica *in vitro* de CTM de ratas osteopênicas submetidas ou não à atividade física com e sem a inibição da óxido nítrico sintase. Foram usadas células tronco mesenquimais de ratas Wistar divididas em seis grupos: Grupo 1: normal; Grupo 2: ratas com osteoporose sedentárias; Grupo 3: ratas com osteoporose ativas; Grupo 4: ratas normais com L-NAME; Grupo 5: ratas com osteoporose sedentárias com L-NAME; Grupo 6: ratas com osteoporose ativas com L-NAME. As células foram cultivadas em DMEM com 10% de soro fetal bovino acrescido de antibióticos e antimicóticos a 37°C e 5% de CO₂. As células foram fenotipicamente caracterizadas com anti-CD45, anti-CD90, anti-CD73 e anti-CD54 por citometria de fluxo. Posteriormente, 1x10⁵ CTM foram cultivadas em triplicata, em meio de diferenciação osteogênico (DMEM com ácido ascórbico, β-glicerofosfato e dexametasona), por 7, 14 e 21 dias. Foram avaliadas a atividade da fosfatase alcalina pelo ensaio BCIP-NBT e a capacidade de conversão do substrato dimetiltiazol (MTT) em cristais de formazan. Os resultados dos ensaios de MTT e da fosfatase alcalina foram obtidos em espectrofotômetro (595nm). O colágeno foi corado pelo método do *sirius red* e dosado em espectrofotômetro (540nm). Os nódulos de mineralização foram corados pelo método de Von Kossa e o número de nódulos/campo foi avaliado. As médias foram comparadas pelo teste SNK. Das células indiferenciadas em cultivo, 96,94% não apresentaram positividade para CD45, contudo, 93,99%, 95,10% e 86,77% das células foram positivas para CD73, CD54 e CD90, respectivamente. As CTM das ratas com osteoporose apresentaram menor diferenciação osteogênica. Surpreendentemente, a atividade física aumentou a diferenciação osteogênica de CTM de ratas com osteoporose. A inibição da

⁴ Aceito para publicação na *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 2008

óxido nítrico sintase teve um efeito negativo na diferenciação osteogênica de CTM de ratas normais e com osteoporose submetidas à atividade física mas efeito positivo na diferenciação de CTM de animais com osteoporose sedentários. Os resultados sugerem que o óxido nítrico estimula a diferenciação osteogênica de CTM e que o óxido nítrico intermedia os efeitos benéficos da atividade física no osso por aumentar a diferenciação osteogênica das CTM.

Palavras chave: células tronco mesenquimais; diferenciação osteogênica; L-NAME; óxido nítrico

ABSTRACT

Physical activity has potent and complex effects on bones. We hypothesized that physical activity has a positive effect upon osteopenic rat bones since it stimulates osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells (MSCs). We also postulated that local nitric oxide concentrations mediate the effects of physical activity on osteoporosis treatment. The objective of this study was to investigate the osteogenic differentiation *in vitro* of MSCs from osteopenic female rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. We used MSCs from the femurs of Wistar female rats divided into six groups: Group 1, sham-operated (control); Group 2, sedentary osteoporotic; Group 3, active osteoporotic; Group 4, sham-operated with L-NAME; Group 5, sedentary osteoporotic with L-NAME; and Group 6, active osteoporotic with L-NAME. The cells were cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum plus antibiotics/antimicrobials at 37°C and 5% CO₂. Cells were phenotypically characterized with anti-CD45, anti-CD90, anti-CD73, and anti-CD54 using a FACScan cytometer. MSCs (1x10⁵ cells/well) were cultured in osteogenic medium for 7, 14 and 21 days. Alkaline phosphatase activity, the capacity of dimethylthiazol conversion in formazan crystals, collagen synthesis and the number of mineralized nodules were analyzed. The means of all of the variables were compared using the SNK test. MSCs did not express CD45 in 96.94% of the cells, but there was expression of CD73, CD54 and CD90 in 93.99%, 95.10% and 86.77% of the cells, respectively. MSCs from osteoporotic rats showed less osteogenic differentiation. Surprisingly, physical activity increased the osteogenic differentiation of MSCs in osteoporotic rats. Inhibition of nitric oxide synthase *in vivo* had a negative effect upon the osteogenic potential of MSCs from normal rats and osteoporotic rats subjected to physical activity. Our results suggest that the nitric oxide stimulates MSCs osteogenic differentiation and that nitric oxide mediates the beneficial effects of physical activity upon MSCs osteogenic differentiation.

Keywords: mesenchymal stem cell; osteogenic differentiation; L-NAME; nitric oxide

INTRODUÇÃO

Com o aumento da expectativa de vida, a osteoporose tem sido cada vez mais diagnosticada em homem e mulheres de todo mundo (Braidan et al., 2000; Notomi et al., 2003). Apesar de várias pesquisas a etiopatogenia e o tratamento da osteoporose não estão totalmente elucidados. O efeito da deficiência dos esteróides sexuais (Kraemer et al., 1998) e da inatividade física na gênese da osteoporose pós-menopausa é bastante conhecido (Krolner e Toft, 1983; Lane et al., 1996, Bennell et al., 2000). A atividade física apresenta efeito potente e complexo sobre o osso e seus efeitos são causados diretamente pela força mecânica e indiretamente por hormônios, fatores de crescimento, citocinas e pelo óxido nítrico (Brahm et al., 1997; Henderson et al., 1998; Kraemer et al., 1998; Wallace et al., 2000; Kanaley et al., 2001; Cherian et al., 2003; Bacabac et al., 2005). Pesquisadores demonstraram que atividade física diária em esteira automática promoveu aumento da massa óssea em todo o esqueleto de ratas osteopênicas por causar alterações morfológicas e funcionais nas células ósseas (Ocarino et al., 2007a). Estes pesquisadores descreveram aumento do número de

conexões entre osteoblastos-osteócitos e entre osteócitos-osteócitos e aumento do número e da atividade osteoblásticas. Os osteoblastos são células que originam da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea (Mackie, 2003). É conhecido que culturas de células tronco mesenquimais submetidas a vibrações apresentam maior capacidade de diferenciação osteogênica (Mauney et al., 2004). Entretanto, os efeitos da atividade física *in vivo* na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais *in vitro* não são conhecidos. Uma das hipóteses desse estudo é que a atividade física tem efeito benéfico no osso de ratas com osteoporose, por estimular a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea.

Fatores que estimulam a diferenciação *in vitro* de células tronco mesenquimais da medula óssea em células osteoprogenitoras têm sido pesquisados; como por exemplo o óxido nítrico (Pan et al., 2005). Pesquisas demonstraram que a atividade física estimula a produção local e sistêmica de óxido nítrico o qual tem ação autócrina estimulando a síntese de matriz óssea (Cherian et al., 2003; Bacabac et al., 2005).

Portanto, a segunda hipótese do presente estudo é que o óxido nítrico local atua como mediador dos efeitos da atividade física na diferenciação de células tronco mesenquimais da medula óssea em células osteoprogenitoras. Assim o objetivo foi estudar a diferenciação osteogênica *in vitro* de células tronco mesenquimais de ratas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem a inibição da óxido nítrico sintase.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura do Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG e do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG.

Ensaio experimental

Foram utilizadas 40 ratas Wistar com dois meses de idade, divididas em dois grupos, um ovariectomizado (n=25) e um não ovariectomizado (normal) (n=15). As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral para indução da osteoporose, sendo anestesiadas com pentobarbital sódico (30 mg/Kg) por via intraperitoneal. A extirpação dos ovários foi feita por duas incisões,

lâtero-dorsais de aproximadamente 1cm de extensão com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e pele (procedimento padronizado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da UFMG protocolo: 53/2006). Para a confirmação da osteoporose, três meses após a ovariectomia, cinco ratas não ovariectomizadas e cinco ovariectomizadas foram eutanasiadas. A osteoporose foi confirmada por análise morfométrica da porcentagem de tecido ósseo trabecular (dados não demonstrados). As ratas ovariectomizadas apresentaram redução significativa da porcentagem de osso trabecular em todo o esqueleto quando comparadas aos animais não ovariectomizados. Além disso, Ocarino et al (2007a) demonstraram que três meses é tempo suficiente para a indução de osteoporose de grau moderado.

Após os três meses da cirurgia, os animais foram separados em seis grupos experimentais de cinco animais cada: 1) normal, 2) osteoporose sedentário, 3) osteoporose ativo, 4) normal com L-NAME, 5) osteoporose sedentário com L-NAME e 6) osteoporose ativo com L-NAME.

As ratas foram alojadas em caixas plásticas (cinco ratas/caixa), recebendo ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo

e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a uma temperatura de 25°C .

As ratas tratadas com L-NAME (inibidor da NOS) receberam por sonda orogástrica 10mg/animal/dia do medicamento diluídos em 2mL de água, 40 minutos antes do início da atividade física. A dose de L-NAME utilizada foi determinada com base em estudos prévios que comprovaram a influência desta dose, no metabolismo músculo esquelético (Turner et al., 1996; Samuels et al., 2001). Os grupos restantes receberam água destilada como placebo no mesmo esquema posológico.

Os grupos ativos foram submetidos a exercício físico em esteira automática, cinco dias/semana, durante três meses. A esteira era regulada para uma velocidade de 15m/min, sem inclinação. Com o objetivo de adaptar os animais à atividade física, na primeira semana, o exercício teve a duração de 15min/dia, passando para 30min/dia a partir da segunda semana até o final do período experimental conferindo uma atividade física de grau moderado (Sonne e Galbo, 1980). Os grupos normais e sedentários não realizaram atividade física em esteira automática sendo limitados apenas aos movimentos dentro das caixas.

Seis meses após a ovariectomia e três meses após o início da atividade física e da administração do bloqueador L-NAME, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestesia.

Cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea

Para isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea, foram colhidos, imediatamente após a eutanásia, os fêmures esquerdos de todos os animais dos seis grupos experimentais. Sob condições assépticas, os fêmures foram dissecados de todos os tecidos muscular e conectivo. Posteriormente, suas epífises foram removidas e um *pool* de medula óssea das ratas de cada grupo foi retirada por meio de injeção, sob pressão, de meio de cultura DMEM⁵ (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido com gentamicina (60µg), penicilina (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e anfotericina (25µg/mL)⁶. Após centrifugação por 10 min a 1400rpm, as células foram cultivadas em garrafas de 75cm⁷ contendo 10 mL de DMEM enriquecido com antibiótico e antimicótico já descritos e 10%

⁵ Gibco, Grand Island, NY, USA

⁶ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

⁷ TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

de soro fetal bovino⁸ em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A cultura de CTM foi purificada em relação à presença das células hematopoéticas (células não aderentes) através da troca do meio de cultivo que foi realizado duas vezes por semana. No momento em que as CTM recobriam cerca de 90% do espaço da garrafa, a cultura foi lavada com tampão salina (PBS) 0,15 N. Em seguida, as células foram tripsinizadas por 10 minutos em estufa de CO₂ determinado assim o primeiro repique. Este procedimento foi repetido até o quarto repique onde foi procedida a caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo (análise dos dados do FACS) e os ensaios. As análises compreenderam a avaliação quanto à capacidade de metabolização do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) em cristais de formazan, a atividade de fosfatase alcalina e quantificação de colágeno e do número de nódulos de mineralização. Estes ensaios foram realizados em triplicata, após 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênica em todos os grupos experimentais.

Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea por citometria de fluxo (Análise dos dados do FACS)

⁸ Sorali, Campo Grande, MS, Brasil

Após o cultivo em garrafas T75 das células tronco mesenquimais em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços⁹ (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

⁹ TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen), Switzerland, Germany

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*)¹⁰ empregando o *software Cell Quest*¹¹, com aquisição de 20.000 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*. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 camundongo), anti-CD90 (clone OX-7 camundongo), anti-CD73 (clone 5F/B9 camundongo) e anti-CD54 (clone 1A29 camundongo)¹².

Ensaio de metabolização de MTT

O ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide*) é um método colorimétrico quantitativo e qualitativo que mensura a viabilidade, a proliferação e o estado de ativação celular.

As células viáveis convertem o dimetiltiazol (MTT) em cristais de formazan (insolúveis em água), através de enzimas presentes nas mitocôndrias. Portanto, a quantidade de formazan é diretamente proporcional ao número de células viáveis (Mosmann, 1983).

Em placas de cultivo de 24 poços¹³, a concentração de 1×10^5 CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 7, 14 e 21 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio osteogênico era composto de DMEM enriquecido com gentamicina (60 µg), penicilina (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e anfotericina (25µg/mL) acrescido de 50 µg/ml de ácido ascórbico, 10 nM dexametasona¹⁴ e β glicerofosfato¹⁵. Após 7, 14 e 21 dias, as células diferenciadas, foram incubadas com 210µL de meio osteogênico acrescido de 170µL da solução de MTT (5mg/ml)¹⁶. Após duas horas de incubação em estufa 37°C e 5% de CO₂ a formação dos cristais de formazan foi visualizada em microscópio óptico. Em seguida, os cristais foram solubilizados com 210µL de solução solvente de HCl-10% SDS. Após 12 horas de solubilização, 100µL da solução foram

¹⁰ FACScan, Becton Dicknson

Immunocytometry, San Jose, CA, USA

¹¹ The Cell Quest™ Sftware, Becton Dickinson
Dicknson Immunocytometry Systems, San Jose,
CA, USA

¹² BD Biosciences, San Jose, CA USA

¹³ TPP (Techno Plastic Products in Trasadingen),
Switzerland, Germany

¹⁴ Aché, Guarulhos, SP, Brasil

¹⁵ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

¹⁶ Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

transferidas para placas de 96 poços. O controle (branco) foi feito com 210 µL do meio osteogênico acrescido de 170 µL de solução de MTT e 210 µL de HCl-10% SDS. Foram transferidos 100µL da solução controle para placas de 96 poços e a leitura da absorbância do controle e das amostras foi realizada em espectrofotômetro¹⁷ a 595 nm (Berridge et al., 1999).

Ensaio da atividade da fosfatase alcalina (BCIP/NBT)

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

Em placas de cultivo de 24 poços, a concentração de 1×10^5 CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 7, 14 e 21 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em cada tempo experimental, as células foram lavadas com PBS 0,15N e incubadas com 200µL da

solução NBT/BCIP¹⁸. Após duas horas de incubação em estufa 37°C e 5% de CO₂ a redução do NBT foi observada ao microscópio óptico. Em seguida, a cultura foi solubilizada com 200µL de solução solvente HCl-10% SDS. Após 12 horas de solubilização, 100µL da solução foram transferidos para placas de 96 poços. O controle (branco) foi feito com 300 µL do meio osteogênico acrescido de 100 µL de solução de NBT/BCIP. Foram transferidos 100µL da solução controle para placas de 96 poços e a leitura da absorbância do controle e das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm.

Ensaio da produção de colágeno (*Sircol Red*)

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

¹⁷ ELx 800, Bio-tek instruments, INC.

¹⁸ Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Em placas de cultivo de seis poços, a concentração de 1×10^5 CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 7, 14 e 21 dias em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Em cada tempo experimental, as células foram lavadas com PBS 0,15N e fixadas em 2mL de solução de Bouin por 2 horas em estufa 37°C . Em seguida as células foram lavadas em água corrente por 15 minutos e incubadas com 2mL/poço da solução de Sircol Red (0,6 mg de Sircol Red em 1 mL de ácido pícrico) a 37°C sob agitação. Após a incubação, as células foram lavadas com solução de HCl 0,01N para a remoção do corante não ligado e a marcação para colágeno foi visualizada em microscópio óptico. Em seguida, o colágeno foi dissolvido com 300 μL de solução de NaOH 0,5 N por 30 minutos sob agitação e a dosagem do colágeno foi realizada em espectrofotômetro a 540nm (Valério et al., 2004).

Ensaio da produção de nódulos de mineralização

Em placas de cultivo de 6 poços contendo lamínula de vidro de 22x22mm, a concentração de 1×10^5 CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 7, 14 e 21 dias em estufa a

37°C e 5% de CO_2 . Após cada período experimental, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas em solução de etanol 70% por 24 horas. Após a fixação, as células foram hidratadas em água destilada por 5 minutos e incubadas com solução de nitrato de prata 50% por 1 hora sob luz artificial. Em seguida, as células foram lavadas em água destilada por 5 minutos e imersas em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos. Posteriormente, as células foram desidratadas em solução de etanol 90% e etanol absoluto realizando assim a montagem da lamínula em lâminas histológicas com uso do bálsamo do Canadá.

A determinação do número de nódulos de mineralização por campo foi realizada em microscópio óptico com objetiva de 20x. Foram quantificados 50 campos por lamínula.

O delineamento foi inteiramente casualizado com fatorial 6x3 (seis grupos e três períodos). Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls Test (SNK) (Instat, versão 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

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

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

padronização do número de células cultivadas em todos os grupos experimentais, o grupo com osteoporose sedentário mostrou redução significativa da absorbância espectrofotométrica de formazan aos sete dias de cultivo, mas os valores de absorbância, neste grupo, aumentaram progressivamente até os 21 dias de cultura. Aos 14 dias de cultivo, todos os grupos tratados com L-NAME apresentaram redução significativa da absorbância espectrofotométrica de formazan (Tab. 4).

Tabela 4. Média e desvio da redução do MTT em cristais de formazan em culturas de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME em meio osteogênico

| Grupo | Dias de observação | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 7 d de diferenciação | 14 d de diferenciação | 21 d de diferenciação |
| Normal | 0,7161±0,01Aba | 0,8871±0,08Aa | 0,8200±0,05BCa |
| Osteoporose sedentário | 0,4000±0,11Cb | 0,9490±0,092Aa | 0,9696±0,11Aba |
| Osteoporose ativo | 0,7737±0,01Ac | 0,8033±0,03Abc | 1,0400±0,01Aa |
| Normal L-Name | 0,5550±0,05BCb | 0,6200±0,07Bb | 0,8121±0,10BCa |
| Osteoporose sedentário L-Name | 0,6590±0,13Aba | 0,5500±0,05Ba | 0,7355±0,01Ca |
| Osteoporose ativo L-Name | 0,5761±0,02Bab | 0,4600±0,05Bb | 0,6595±0,05Ca |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si (p>0,05).

Interessantemente, aos 7 dias, o grupo com osteoporose submetido a atividade física demonstrou aumento significativo da atividade de fosfatase alcalina quando comparado aos grupos normal e com osteoporose sedentário. Entretanto, aos 14 e 21 dias, não houve diferença significativa

entre grupos. Os grupos submetidos à inibição da óxido nítrico sintase mostraram redução significativa da atividade de fosfatase alcalina das CTM aos 7, 14 e 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênico (Tab. 5).

Tabela 5. Média e desvio da atividade de fosfatase alcalina em culturas de células tronco mesenquimais diferenciadas da medula óssea de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME

| Grupo | Dias de observação | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 7 d de diferenciação | 14 d de diferenciação | 21 d de diferenciação |
| Normal | 0,3355±0,01Ba | 0,4625±0,04Aa | 0,4970±0,03Aa |
| Osteoporose sedentário | 0,2978±0,23Bca | 0,3891±0,07Aba | 0,4728±0,05Aa |
| Osteoporose ativo | 0,6539±0,16Aa | 0,3071±0,09ABCb | 0,4817±0,06Ab |
| Normal L-Name | 0,1331±0,03Ca | 0,1100±0,01Ca | 0,2326±0,03Ba |
| Osteoporose sedentário L-Name | 0,1020±0,02Ca | 0,2300±0,03BCa | 0,2210±0,02Ba |
| Osteoporose ativo L-Name | 0,1065±0,02Ca | 0,1400±0,03Ca | 0,1850±0,003Ba |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si (p>0,05).

Os grupos não tratados com L-NAME, ou seja, os grupos normal, osteoporose sedentário e osteoporose ativo apresentaram aumento progressivo e significativo na síntese de colágeno até os 21 dias. Entretanto, aos 7 e 14 dias, a síntese de

colágeno foi significativamente menor quando comparada aos grupos tratados com L-NAME; mas aos 21 dias, não houve diferença significativa entre grupos submetidos ou não a inibição da óxido nítrico sintase (Tab. 6).

Tabela 6. Média e desvio da síntese de colágeno em culturas de células tronco mesenquimais diferenciadas da medula óssea de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME em meio osteogênico.

| Grupo | Dias de observação | | |
|-------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 7 d de diferenciação | 14 d de diferenciação | 21 d de diferenciação |
| Normal | 0,1555±0,005Cb | 0,1765±0,008Bb | 0,2243±0,001Aa |
| Osteoporose sedentário | 0,1863±0,013Cb | 0,1913±0,009Bb | 0,2286±0,013Aa |
| Osteoporose ativo | 0,1647±0,007Cc | 0,1918±0,007Bb | 0,2305±0,006Aa |
| Normal L-Name | 0,2425±0,001Aa | 0,2500±0,001Aa | 0,2326±0,03Ab |
| Osteoporose sedentário L-Name | 0,2173±0,002Ba | 0,2300±0,04Aa | 0,2210±0,02Aa |
| Osteoporose ativo L-Name | 0,2080±0,004Bb | 0,2400±0,03Aa | 0,1850±0,003Ac |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si (p>0,05).

As células do grupo normal apresentaram a maior produção de nódulos de mineralização em todos os períodos estudados quando comparados aos demais grupos experimentais. A ovariectomia promoveu

redução significativa do número de nódulos de mineralização. Surpreendentemente, a atividade física aumentou de forma significativa a capacidade, *in vitro*, das CTM de ratas com osteoporose de produzirem

nódulos de mineralização (Tab. 7). A inibição da óxido nítrico sintase, *in vivo*, teve efeito negativo, *in vitro*, na produção de nódulos mineralizados exceto, no grupo com osteoporose sedentário. O tratamento com L-NAME reduziu significativamente a produção de nódulos de mineralização pelas CTM de ratas normais. Notavelmente, o L-NAME impediu o efeito benéfico da

atividade física sobre a produção de nódulos mineralizados nas ratas com osteoporose. Entretanto, no grupo com osteoporose sedentário tratado com L-NAME o número de nódulos mineralizados foi significativamente maior, quando comparado ao grupo com osteoporose sedentário sem L-NAME aos 14 e 21 dias (Tab. 7).

Tabela 7. Média e desvio do número de nódulos mineralizados/campo em culturas de células tronco mesenquimais da medula óssea diferenciadas de ratas normais e com osteoporose sedentárias e ativas com e sem o uso de L-NAME em meio osteogênico.

| Grupo | Dias de observação | | |
|--------------------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | 7 d de diferenciação | 14 d de diferenciação | 21 d de diferenciação |
| Normal | 11,17±1,2Aa | 12,57±0,9Aa | 9,07±1,0Ab |
| Osteoporose sedentário | 0,510±0,1Ca | 1,70±0,1Da | 0,02±0,03Da |
| Osteoporose ativo | 8,850±0,9Ba | 8,27±2,7Ba | 6,47±0,3Bb |
| Normal L-Name | 0,000±0,00Cb | 2,47±0,6Da | 3,8±0,2Ca |
| Osteoporose sedentário L- Name | 0,570±0,03Cc | 4,37±0,5Cb | 5,97±0,7Ba |
| Osteoporose ativo L-Name | 0,040±0,02Ca | 0,65±0,04Da | 1,17±0,5Da |

Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas e mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si (p>0,05).

DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das células antes da diferenciação celular é fundamental para demonstrar o grau de pureza da cultura, pois a medula óssea pode apresentar CTM, células hematopoéticas (Bianco et al., 2001; Bobis et al., 2006) e fibroblastos (Ishii et al., 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 não são expressas em fibroblastos e células hematopoéticas. 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).

O ensaio de dimetiltiazol (MTT) é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mede o estado de ativação das mesmas. Ele é baseado na habilidade de enzimas succinato desidrogenases presentes nas mitocôndrias em células viáveis para converter o MTT em cristais de formazan (Mossmann, 1983). Considerando que o ensaio de MTT é dependente do metabolismo mitocondrial (Mossmann, 1983), podem haver duas explicações para a interferência observada do tratamento de L-NAME com o ensaio de MTT: 1) as CTM dos animais tratados com L-NAME têm sua viabilidade diminuída quando cultivadas em meio de diferenciação osteogênico ou 2) as CTM dos animais tratados com L-NAME apresentam diminuição da atividade enzimática mitocondrial.

Para caracterizar e comparar o potencial da diferenciação osteogênica das CTM dos grupos estudados vários parâmetros foram avaliados, como a atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno e síntese e mineralização da matriz extracelular (Ishida et al., 1996; Moiola et al., 2007).

Nossa hipótese inicial era a de que a osteoporose decorrente da deficiência de estrógeno poderia ser causada por inibição da diferenciação osteogênica das CTM. Essa hipótese foi comprovada pelo fato da

deficiência de estrógeno causada pela ovariectomia associada à inatividade física ter promovido redução significativa na produção dos nódulos de mineralização pelas CTM. Estudos sobre os efeitos do estrógeno na produção de proteínas da matriz óssea demonstram resultados contraditórios. Isso provavelmente se deve a diferenças nos sistemas *in vitro* utilizados neste vários estudos e particularmente, no estágio de diferenciação dos osteoblastos utilizados (Oursler, 1998). Muitos estudos *in vivo* têm demonstrado que a deficiência de estrógeno é o principal fator etiológico da perda óssea associada à menopausa (Ribeiro et al., 2003). Se há diminuição na produção dos esteróides sexuais, ocorre diminuição na produção de colágeno I, de proteínas não colagênicas e de fosfatase alcalina pelos osteoblastos reduzindo assim a síntese e a mineralização da matriz (Bland, 2000). Além disso, pesquisas demonstraram a existência de receptores para estrógeno em células osteoprogenitoras da medula óssea (Gaumet-Meunier et al., 2000). Quando culturas de CTM foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico suplementado com diferentes concentrações de estrógeno (E2), houve aumento da expressão de osteocalcina e deposição de cálcio (Hong et al., 2006). Outros estudos, *in vitro*, demonstraram que culturas primárias de CTM isoladas de camundongos

ovariectomizados apresentaram aumento significativo da expressão de proteínas, da atividade de fosfatase alcalina e da expressão de colágeno I, após o tratamento com E2 (Zhou et al., 2001).

Foi demonstrado que a inibição da NOS reduz a diferenciação osteogênica das CTM de ratas normais, indicando que o óxido nítrico é um importante fator na indução da diferenciação das CTM em células osteoprogenitoras. Existem evidências de que o óxido nítrico apresenta importante papel no metabolismo ósseo (Van't Hof e Ralston, 2001). Estudos, *in vitro*, indicam que o NO tem efeito bifásico tanto na atividade osteoblástica quanto na atividade osteoclástica: baixas concentrações de NO podem agir como fator estimulador da função osteoblástica (Riancho et al., 1995) e que altas concentrações tem efeito inibitório no desenvolvimento osteoblástico (Aguirre et al., 2001). Estes mesmos efeitos foram descritos para a atividade osteoclástica (MacIntyre et al., 1991).

O número de nódulos mineralizados foi maior no grupo sedentário osteopênico tratado com L-NAME quando comparado ao grupo sedentário osteopênico sem a inibição da óxido nítrico sintase. O aumento da capacidade osteogênica das CTM observado no grupo sedentário osteopênico tratado com

L-NAME quando comparado ao grupo sedentário osteopênico corroborou os resultados da análise morfométrica dos ossos descrito no capítulo 2. Estes achados demonstram que, estudos futuros são necessários para compreender as causas das diferenças observadas entre os grupos normais e sedentários osteopênicos quando da inibição da óxido nítrico sintase.

Estudos têm demonstrado que os efeitos anabólicos do estrógeno no metabolismo ósseo são intermediados pelo óxido nítrico (Turner et al., 1994; Samuels et al., 2001; Bakker et al., 2005) uma vez que o efeito protetor do estrógeno na perda óssea de ratas induzida pela ovariectomia é inibido pela administração concomitante do inibidor da NOS, o L-NAME (Wimalawansa et al., 1996). Assim, postula-se que o NO seja mediador do efeito estimulador induzido pelo estrógeno na formação óssea além de ter papel importante na regulação da função osteoblástica *in vivo* e *in vitro* (Samuels, et al., 2001). Acredita-se que o estrógeno estimula a síntese e a liberação de NO por meio do estímulo da expressão do gene da óxido nítrico sintase endotelial (Kleinert et al., 1998).

Surpreendentemente a atividade física aumentou significativamente a diferenciação osteogênica das CTM mesmo nos animais

com osteoporose. Embora, não tenha havido diferença significativa na síntese de colágeno, entre os grupos ativo e sedentário o número de nódulos mineralizados foi significativamente maior no grupo ativo com osteoporose quando comparado ao sedentário com osteoporose. O efeito da inatividade física na gênese da osteoporose posmenopausal é bem conhecido (Krolner et al., 1983; Lane et al., 1996; Bennel et al., 2000), mas os efeitos da atividade física sobre a diferenciação osteogênica das CTM *in vivo* não o são conhecidos. Até o presente momento, somente foi demonstrado que culturas de CTM submetidas a vibrações demonstraram maior grau de diferenciação osteogênica quando comparadas a células sem vibração (Mauney et al., 2004). Estudos prévios, *in vivo*, demonstraram que a atividade física diária em esteira automática promove aumento de massa óssea em todo o esqueleto de ratas osteopênicas (Ocarino et al., 2007a). Os efeitos da atividade física podem ser diretos, devido à força mecânica, ou podem ser indiretos mediados por hormônios, fatores de crescimento e por citocinas (Brahm et al., 1997; Henderson et al., 1998; Kraemer et al., 1998; Wallace et al., 2000; Cherian et al., 2003) Pela primeira vez, os resultados do presente estudo demonstram que a atividade física melhora significativamente a diferenciação osteogênica de CTM de ratas com

osteoporose. O aumento na capacidade osteogênica de CTM de ratas com osteoporose pode ser incorporado na lista de mecanismos envolvidos na melhoria ou no ganho de massa óssea de ratas com deficiência de esteróides sexuais submetidas à atividade física diária.

Alguns estudos já demonstraram que a atividade física estimula a produção local e sistêmica de óxido nítrico e que a ação autócrina do NO estimularia a síntese de matriz óssea (Van't Hof e Ralston, 2001; Bacabac et al., 2004;). A síntese de NO pode ser induzida por osteoblastos e osteócitos submetidos à vibração mecânica (Johnson e McAllister, 1996; Klein-Nulend et al., 1998; Zaman et al., 1999;), sendo esta síntese de NO rápida e dependente da intensidade dessas vibrações. A partir desses resultados *in vitro* postulou-se que a perda óssea em indivíduos submetidos a ambientes de baixa gravidade e a imobilizações prolongadas pode ser decorrente da deficiência de NO (Bacabac et a., 2004). Baseando-se em todos esses resultados, o óxido nítrico vem sendo cada vez mais considerado como uma molécula sinalizadora essencial para a resposta anabólica do osso ao estímulo mecânico (Turner et al., 2004).

Ocarino et al. (2007a), demonstraram que a atividade física diária em esteira automática

promove ganho de massa óssea em todo o esqueleto de ratas osteoporóticas devido à hiperplasia osteoblástica. Uma das hipóteses do presente estudo era a de que o óxido nítrico local intermedia os efeitos benéficos da atividade física na massa óssea por promover aumento da capacidade osteogênica das CTM em células osteoprogenitoras. Os resultados apresentados comprovam esta hipótese, pois o aumento da diferenciação osteogênica das CTM de ratas com osteoporose submetidas a atividade física não foi evidenciado nas células dos animais com osteoporose ativos com a inibição da óxido nítrico sintase.

Os resultados sugerem que os efeitos do óxido nítrico no metabolismo ósseo também podem ser devido ao aumento da diferenciação das CTM em células osteoprogenitoras e que o NO é um mediador dos efeitos benéficos da atividade física sobre a massa óssea de ratas com osteoporose. Sendo assim, estudos futuros que avaliem a expressão de genes

envolvidos na diferenciação osteogênica de CTM de ratas com osteoporose submetidas à atividade física com e sem inibição da óxido nítrico sintase são pertinentes. A partir desses estudos, terapias gênicas poderiam ser aplicadas a CTM de ratas com osteoporose na tentativa de melhorar seu potencial osteogênico e evitar a progressão da doença ou até mesmo curá-la.

CONCLUSÃO

- 1) CTM de ratas com osteoporose sedentárias apresentam menor diferenciação osteogênica *in vitro*;
- 2) a atividade física diária em esteira automática aumenta o potencial osteogênico das CTM da medula óssea de ratas com osteoporose;
- 3) a inibição da óxido nítrico sintase *in vivo* bloqueia o efeito positivo da atividade física sob o potencial osteogênico das CTM de ratas com osteoporose;
- 4) a inibição da óxido nítrico sintase *in vivo* inibe o potencial osteogênico das CTM de ratas normais e aumenta o potencial osteogênico das CTM de ratas com osteoporose sedentárias.

Capítulo 4

Injeção intra-óssea de células tronco mesenquimais diferenciadas *in vitro* no tratamento da osteoporose femoral de ratas

RESUMO

Foram utilizadas 25 ratas Wistar adultas, sendo 15 delas induzidas à osteoporose por meio de ovariectomia bilateral. Após este período, cinco ratas ovariectomizadas e cinco não ovariectomizadas foram eutanaziadas para a confirmação da indução da osteoporose. O restante dos animais foi dividido em três grupos experimentais: 1) controle; 2) osteoporose sem tratamento e 3) osteoporose tratado com CTM diferenciadas. Os animais dos três grupos experimentais eram limitados apenas aos movimentos dentro das caixas. Células da medula óssea de ratas doadoras com um mês de idade foram extraídas e cultivadas em DMEM com antibiótico-antimicótico e 10% de soro fetal bovino a 37° e 5% de CO₂. Após quatro repiques, a caracterização fenotípica das células por citometria de fluxo, demonstrou a expressão de CD73, CD54 e CD90 em mais de 93% das células e ausência de CD45 em 96% das células. Em seguida, as CTM foram diferenciadas em meio osteogênico por 21 dias. Sob anestesia, uma alíquota de $7,5 \times 10^5$ CTM diferenciadas suspensas em 270µL de tampão salina fosfato foi inoculada no canal medular dos fêmures direito e esquerdo de cada animal do grupo com osteoporose tratado com CTM diferenciadas. Os animais dos outros dois grupos receberam injeção contendo apenas 270µL de tampão salina fosfato. Dois meses após a inoculação os animais foram eutanasiados e os fêmures foram colhidos, dissecados, descalcificados e incluídos em parafina. Os cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina foram submetidos à análise histomorfométrica. Foi determinada a porcentagem de tecido ósseo trabecular na metáfise femoral distal e na cabeça e colo femural. As médias de cada grupo foram comparadas pelo teste SNK. A indução da osteoporose nos grupos ovariectomizados foi confirmada em todos os sítios examinados antes da inoculação das CTM. Dois meses após a inoculação das CTM, o grupo tratado com CTM diferenciadas apresentou porcentagem de tecido ósseo trabecular significativamente superior ao grupo com osteoporose sem tratamento e semelhante ao grupo controle em todo o fêmur. Conclui-se que o tratamento da osteoporose femoral com injeção intra-óssea de CTM diferenciadas *in vitro* promove a reversão das alterações ósseas e aumenta a porcentagem de tecido ósseo trabecular para valores semelhantes aos do grupo normal.

Palavras chave: células tronco, diferenciação osteogênica, osso, tratamento

ABSTRACT

Effect of intra-bone inoculation of differentiated mesenchymal stem cells (MSCs), *in vitro*, in the femoral osteoporosis treatment of the rats was studied by bone histomorphometry. 25 Wistar female rats were used. 15 rats were induced of osteoporosis by bilateral ovariectomy during three months. After this period, five ovariectomized rats and five non-ovariectomized rats were sacrificed to osteoporosis confirmation. The other rats were divided into three groups: 1) control, 2) osteoporosis without treatment and 3) osteoporosis with intra-bone injection of differentiated MSCs. Cells of the female rats donors' bone marrow with a month of age were extracted and cultured in DMEM with 10% fetal bovine serum plus antibiotics/antimicrobics at 37°C and 5% CO₂. After four passages the phenotypic characterization of the cells using flow cytometry demonstrated the expression of CD73, CD54 and CD90 in more than 93% of the cells and absence of CD45 expression in 96% of the cells. MSCs were differentiated in osteogenic medium for 21 days. Under anesthesia, 7,5x10⁵ differentiated MSC suspended in 270µL of saline phosphate solution was inoculated in the medular cavity of the right and left femurs of each animal of the osteoporotic group treated with differentiated MSC. The animals of the other two groups received injection of 270µL of saline phosphate solution only. Two months after the inoculation the animals were sacrificed and the femurs were fixed, demineralised and paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin and analyzed by optical light microscopy. The trabecular bone percentage in femoral distal metaphysis and femoral neck and head were measured. The mean and standard deviation were calculated, and the means were compared by SNK. The osteoporosis induction was confirmed by osteopenia observed in ovariectomized group before MSC treatment in all examined sites. Two months after the treatment of MSC the osteoporotic group presented significantly higher trabecular bone percentage in distal metaphysis, neck and head of femurs when compared to the osteoporosis group without treatment and similar to the control group. In conclusion, the treatment of the femoral osteoporosis with intra-bone injection of differentiated MSC *in vitro* promotes the reversion of the bone alterations and increase the trabecular bone percentage to values similar to the normal group.

Keywords: bone, osteogenic differentiation, stem cells, treatment

INTRODUÇÃO

A expectativa de vida da população humana tem aumentado e, com isso, a osteoporose tem sido uma doença cada vez mais diagnosticada em homens e mulheres de todo o mundo (Notomi et al., 2003). Foi calculado, em 2002, que cerca de 30 milhões de mulheres apresentaram osteoporose ou osteopenia com aumento estimado do número de casos para aproximadamente 41 milhões até 2020 (Kelley e Kelley, 2004). A osteoporose é caracterizada por perda de massa óssea e deteriorização da microarquitetura do tecido ósseo acarretando aumento da fragidade óssea e do risco de fraturas (Korkia, 2002). A osteoporose afeta todo o esqueleto de um indivíduo, porém, em intensidades diferentes (Ocarino et al., 2007a). O fêmur e as vértebras são mais intensamente afetados e freqüentemente, as fraturas nestes sítios estão associadas com alta morbidade e mortalidade (Wallace et al., 2004). Estratégias preventivas que visam aumentar a força e a qualidade ósseas têm sido alvo de pesquisas incluindo o uso de agentes farmacológicos. Entretanto, muitos destes fármacos, somente, previnem a progressão da doença. Isso ocorre porque eles estimulam simultaneamente a síntese e a reabsorção da matriz ou porque eles diminuem a reabsorção sem, no entanto, estimular a síntese da matriz óssea

(Valverde, 2008). A terapia celular local, em associação com terapia sistêmica farmacológica, poderia ser uma alternativa para tratar os ossos com osteoporose particularmente mais vulneráveis às fraturas. Células tronco mesenquimais (CTM) podem ser obtidas de vários sítios, incluindo a medula óssea (Payushina et al., 2006). A diferenciação osteogênica de CTM *in vitro* tem sido estudada e a aplicação destas células em defeitos ósseos em modelos experimentais tem sido realizada com sucesso (Wang et al., 2006). Na osteoporose de coelhas, a associação entre CTM diferenciadas e hidrogel estimulou a osteogênese somente na área do implante (Wang et al., 2006). Porém, a utilização de CTM indiferenciadas não associadas com biomateriais não teve nenhum efeito no tratamento local da osteoporose (Gasser, 2003). Não há estudos, que verificaram os efeitos da injeção intra-medular de CTM diferenciadas no tratamento local da osteoporose. Este estudo teve o objetivo de estudar o efeito da injeção intra-óssea de CTM diferenciadas em todo o fêmur de ratas com osteoporose.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se as bases físicas e a infraestrutura do Laboratório de Experimentação Animal e de Histopatologia do

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG e do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB da UFMG.

Colheita, isolamento e cultivo da CTM

Foram utilizadas, ratas Wistar adultas jovens de aproximadamente 130-140g. Para isolamento e cultivo das células tronco mesenquimais (CTM) da medula óssea, foram colhidos, imediatamente após a eutanásia com sobredose de tiopental sódico a 2,5%, os fêmures e as tíbias. Sob condições assépticas, os ossos foram dissecados des todos os tecidos muscular e conectivo. Posteriormente, suas epífises foram removidas e a medula óssea foi retirada por meio de injeção, sob pressão, de meio de cultura DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) enriquecido com gentamicina (60 µg), penicilina (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e anfotericina (25µg/mL). Após centrifugação por 10 min a 1400rpm, as células foram cultivadas em garrafas de 75cm² contendo 10 mL de DMEM enriquecido com antibiótico e antimicótico já descritos e 10% de soro fetal bovino em estufa a 37°C e 5% de CO₂. A cultura das CTM foi purificada em relação à presença das células hematopoéticas (células não aderentes)

através da troca do meio de cultivo que foi realizada duas vezes por semana. No momento em que as CTM recobriam cerca de 90% do espaço da garrafa, a cultura foi lavada com tampão salina (PBS) 0,15 N. Em seguida, as células foram liberadas das garrafas de cultivo através de exposição a 2 mL de tripsina/EDTA (etilenodiaminotetraacético) a 1% por 10 minutos em estufa de CO₂ determinando assim o primeiro repique. Este procedimento foi repetido até o quarto repique onde foi procedida a caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo (análise dos dados do FACS) e os ensaios para caracterização da diferenciação osteogênica. Esses ensaios compreenderam a capacidade de metabolização do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) em cristais de formazan, a atividade de fosfatase alcalina, a síntese de colágeno e o número de nódulos de mineralização. Estes ensaios foram realizados em triplicata, após 21 dias de cultivo em meio de diferenciação osteogênica.

Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea por citometria de fluxo (Análise dos dados do FACS)

Após o cultivo em garrafas T75 das células tronco mesenquimais em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços (fundo redondo) com concentração de 1×10^6 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 (anticorpo de cabra anti IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488 - Molecular Probes) 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*) empregando o *software Cell Quest*, com aquisição de 20.000 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*. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 camundongo), anti-CD90 (clone OX-7 camundongo), anti-CD73 (clone 5F/B9 camundongo) e anti-CD54 (clone 1A29 camundongo)¹⁹.

Caracterização fenotípica das células tronco mesenquimais da medula óssea por imunocitoquímica

Após o cultivo em garrafas T75 das células tronco mesenquimais em DMEM por quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90% das células, as células foram tripsinizadas, contadas em câmara de

¹⁹ BD Biosciences, San Jose, CA USA

Neubauer e distribuídas em placas de 6 poços com lamínula 22x22 mm com concentração de 1×10^4 células/poço sendo um poço para cada anticorpo e um poço para o controle sem marcação e um poço para o conjugado (anticorpo secundário fluorescente). Após 24 horas do cultivo nas lamínulas, o meio de cultura foi retirado e as lamínulas foram lavadas em PBS 0,15M por duas vezes. Em seguida, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 20 minutos, lavadas novamente com PBS 0,15M por duas vezes e permeabilizadas através da incubação com 0.25% de TritonX-100 (Roche, Alemanha) em PBS por 10 minutos. Após a permeabilização as células foram lavadas 3X em PBS, 5 minutos cada lavagem e bloqueadas, à temperatura ambiente, com 3% de BSA em PBS-Tween 0.05% por 2 horas. Mais uma vez as células foram lavadas 2X em PBS, 5 minutos cada e, posteriormente, incubadas com anticorpos primários por 1 hora a temperatura ambiente. Após o período de incubação, as células foram lavadas 3X com PBS, 5 minutos cada, e incubadas com os anticorpos secundários. Os anticorpos secundários foram diluídos na mesma solução dos primários. Os anticorpos secundários usados, na diluição de 1:500, foram: anticorpo de cabra anti IgG de camundongo conjugado ao fluorocromo Alexa 488(Molecular Probes) e cabra anti

IgG de Coelho conjugado ao fluorocromo Alexa 568 (Molecular Probes). Novamente as células foram incubadas por 1 hora, temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após o período de incubação, as células foram novamente lavadas, 3X em PBS, 5 minutos cada, ao abrigo da luz. As células foram incubadas em DAPI, na diluição de 1:200, por 1 minuto e lavadas 1X em PBS por 5 minutos. Para prevenir a perda da fluorescência e o ressecamento do material, as lamínulas receberam Hidramount e foram montadas sobre uma lâmina. As lâminas foram analisadas usando um microscópio de fluorescência (Olympus®, Optical sectioning microscope attached to an Axioplan imaging Apotome® apparatus, Zeiss®, Germany). Colocalização das imagens com dupla marcação foi feita pela sobreposição de imagens digitais separadas de cada fluorocromo. Os anticorpos primários utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 camundongo), anti-CD90 (clone OX-7 camundongo), anti-CD73 (clone 5F/B9 camundongo) e anti-CD54 (clone 1A29 camundongo)²⁰.

Ensaio de metabolização de MTT

Em placas de cultivo de 24 poços, a concentração de 1×10^5 CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi

²⁰ BD Biosciences, San Jose, CA USA

cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio osteogênico era composto de DMEM enriquecido com gentamicina (60µg), penicilina (10.000 U/mL), estreptomicina (10.000 µg/mL) e anfotericina (25µg/mL) acrescido de 50 µg/ml de ácido ascórbico, 10 nM dexametasona e β glicerofosfato. Após 7, 14 e 21 dias, as células diferenciadas, foram incubadas com 210µL de meio osteogênico acrescido de 170µL da solução de MTT (5mg/ml). Após duas horas de incubação em estufa 37°C e 5% de CO₂ a formação dos cristais de formazan foi visualizada em microscópio óptico. Em seguida, os cristais foram solubilizados com 210µL de solução solvente de HCl-10% SDS. Após 12 horas de solubilização, 100µL da solução foram transferidas para placas de 96 poços. O controle (branco) foi feito com 210 µL do meio osteogênico acrescido de 170 µL de solução de MTT e 210 µL de HCl-10% SDS. Foram transferidos 100µL da solução controle para placas de 96 poços e a leitura da absorbância do controle e das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm (Berridge et al., 1999).

Ensaio da atividade da fosfatase alcalina (NBT/BCIP)

Em placas de cultivo de 24 poços, a concentração de 1x10⁵ CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em cada tempo experimental, as células foram lavadas com PBS 0,15N e incubadas com 200µL da solução NBT/BCIP. Após duas horas de incubação em estufa 37°C e 5% de CO₂ a redução do NBT foi observada ao microscópio óptico. Em seguida, a cultura foi solubilizada com 200µL de solução solvente HCl-10% SDS. Após 12 horas de solubilização, 100µL da solução foram transferidas para placas de 96 poços. O controle (branco) foi feito com 300 µL do meio osteogênico acrescido de 100 µL de solução de NBT/BCIP. Foram transferidos 100µL da solução controle para placas de 96 poços e a leitura da absorbância do controle e das amostras foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm (Berridge et al., 1999).

Ensaio da síntese de colágeno (*Sircol Red*)

A dosagem do colágeno foi realizada através de marcação com *SIRCOL Collagen Assay* (Biocolor) (Valerio et al., 2004). Em placas de cultivo de 6 poços, a concentração de 1x10⁵ CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias em

estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em cada tempo experimental, as células foram lavadas com PBS 0,15N e fixadas em 2mL de solução de Bouin por 2 horas em estufa 37°C. Em seguida as células foram lavadas em água corrente por 15 minutos e incubadas com 2mL/poço da solução de Sircol Red (0,6 mg de Sircol Red em 1 mL de ácido pícrico) a 37°C sob agitação. Após a incubação, as células foram lavadas com solução de HCl 0,01N para a remoção do corante não ligado e a marcação para colágeno foi visualizada em microscópio óptico. Em seguida, o colágeno foi dissolvido com 300µL de solução de NaOH 0,5 N por 30 minutos sob agitação e a dosagem do colágeno foi realizada em espectrofotômetro a 540nm (Valério et al, 2004).

Ensaio da produção de nódulos de mineralização

Em placas de cultivo de 6 poços contendo lamínula de vidro de 22x22mm, a concentração de 1x10⁵ CTM/poço (contagem em câmara de Neubauer), foi cultivada em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas em solução de etanol 70% por 24 horas. Após a fixação, as células foram hidratadas em água destilada por 5 minutos e incubadas com

solução de nitrato de prata 50% por 1 hora sob luz artificial. Em seguida, as células foram lavadas em água destilada por 5 minutos e imersas em solução de tiosulfato de sódio a 5% por 5 minutos. Posteriormente, as células foram desidratadas em solução de etanol 90% e etanol absoluto realizando assim a montagem da lamínula em lâminas histológicas com uso do bálsamo do Canadá.

Preparação e inoculação das CTM diferenciadas

Foram utilizadas 25 ratas Wistar com dois meses de idade, alojadas em caixas plásticas (cinco ratas/caixa) e recebendo ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, a uma temperatura de 25°C e foram separadas em dois grupos, um ovariectomizado (n=15) e um normal (n=10). As ratas foram submetidas à ovariectomia bilateral, sendo anestesiadas com pentobarbital sódico (30 mg/Kg) por via intraperitoneal. A extirpação dos ovários foi feita por duas incisões, látero-dorsais de aproximadamente 1cm de extensão com exteriorização das gônadas, ligadura dos cornos uterinos e posterior sutura da parede abdominal e pele (procedimento padronizado e aprovado pelo

Comitê de Ética em Experimentação animal da UFMG 53/2006).

Após três meses da cirurgia, cinco ratas normais e 5 ovariectomizadas foram eutanazidas para comprovar a indução e o grau da osteoporose. O restante dos animais foi separado aleatoriamente em três grupos experimentais 1) grupo controle (n=5), 2) grupo com osteoporose sem tratamento (n=5) e 3) grupo com osteoporose tratado com injeção intra-óssea de CTM diferenciadas (n=5).

Para inoculação, as ratas foram anestesiadas com ketamina (50 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg). A pele da região fêmuro-tíbio-patelar de ambos os lados foi depilada e a articulação posicionada em 90° de flexão. Uma agulha de calibre 22 gauge foi

acoplada a uma seringa de 1mL e introduzida entre os côndilos femurais, tendo acesso a cavidade medular que foi suavemente aspirada. Os animais do grupo 3, receberam $7,5 \times 10^5$ células tronco mesenquimais diferenciadas suspensas em 270 μ L salina tampão fosfato (PBS) na cavidade medular dos fêmures direito e esquerdo. Antes de serem inoculadas, as células foram lavadas, quatro vezes, com PBS 0,15M para a retirada de resquícios de soro fetal bovino para evitar a indução de reações de rejeição nas ratas com osteoporose tratadas com CTM diferenciadas. Os grupos controle (grupo 1) e com osteoporose sem tratamento (grupo 2) receberam, pelo mesmo protocolo, somente 270 μ L de PBS (Figura 4).

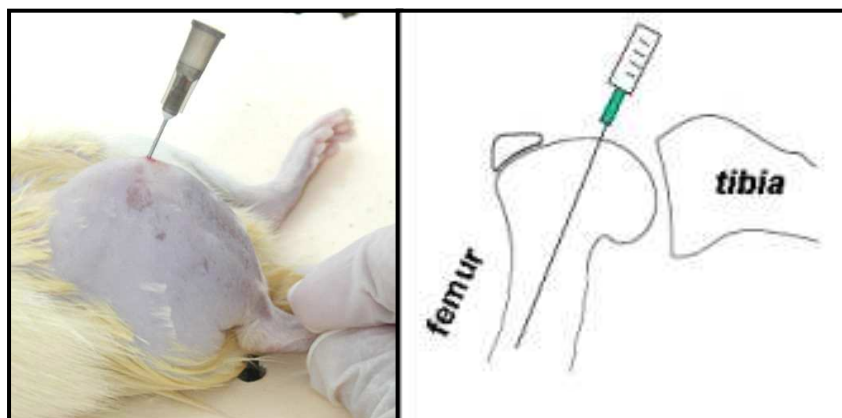


Figura 4. A) Inoculação intra-óssea de CTM diferenciadas no fêmur de ratas com osteoporose. B) desenho esquemático da inoculação intra-óssea

Dois meses após a inoculação os animais foram eutanasiados com sobre-dose de anestesia. Os fêmures após pré-fixação em formalina a 10%, neutra e tamponada foram descalcificados em solução de ácido fórmico a 10% em pH 4,5. Após completa descalcificação os fêmures foram seccionados longitudinalmente, processados pela técnica de inclusão em parafina, e secções histológicas de 4µm foram coradas pelas técnicas da hematoxilina-eosina para avaliação histomorfométrica. Para a determinação da porcentagem de osso trabecular, realizou-se a morfometria na metáfise distal, na cabeça e colo do fêmur direito e esquerdo a fim de obter uma média de cada animal. Numa área tecidual média de 8mm² iniciada a 1mm abaixo da placa epifisária ou da cartilagem articular foi determinada, com objetiva de 40x, a porcentagem de osso trabecular com o auxílio de uma ocular micrométrica (Zeiss KPL 10x), contendo uma gráticula com 25 pontos.

O delineamento utilizado foi inteiramente ao acaso. Para cada variável, a média e o desvio padrão foram determinados. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e

as médias foram comparadas pelo teste Student-Newman Keuls (SNK) (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

RESULTADOS

A caracterização fenotípica das CTM da medula óssea indicaram que 96,94% das células não apresentaram expressão para CD45. Entretanto houve expressão para CD73, CD54, e CD90 em 93,99%, 95,10%, e 86,77% das células, respectivamente (figura 5).

À imunofluorescência foram observadas células com ausência de expressão para o anticorpo anti CD45 e expressão para os anticorpos anti CD54, CD73 e CD 90 (Fig. 6).

A diferenciação osteogênica *in vitro* foi confirmada pela demonstração da atividade de fosfatase alcalina, pela síntese de colágeno e principalmente pela síntese e mineralização da matriz extracelular (nódulos de mineralização) (Figura 7).

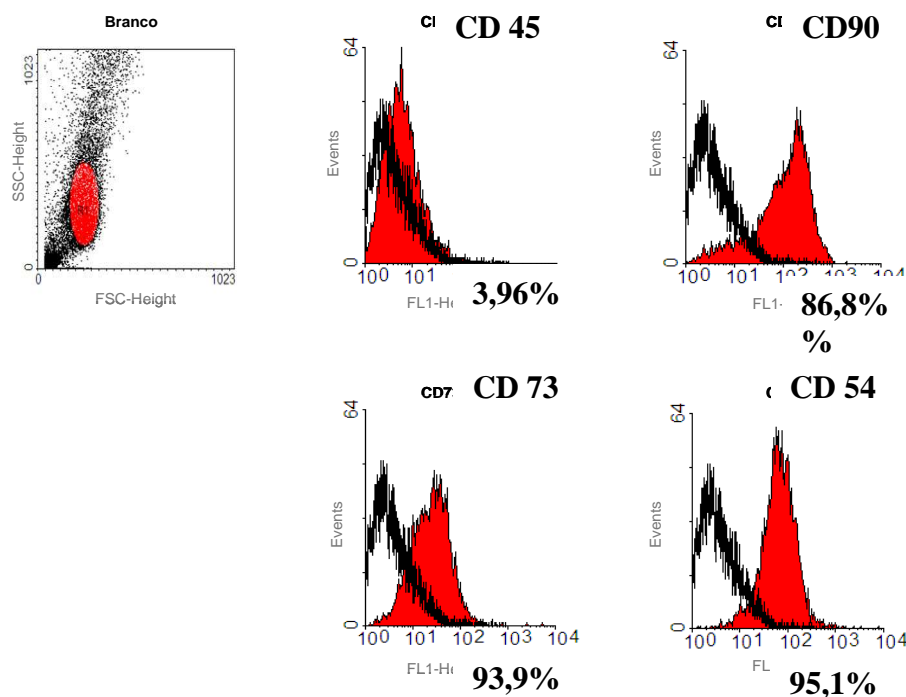


Figura 5. Histograma da expressão de CD73, CD54, CD90 e CD45 em células tronco mesenquimais da medula óssea de ratas cultivadas em DMEM por citometria de fluxo após quatro repiques para caracterização fenotípica.

A indução da osteoporose foi confirmada pela redução significativa da porcentagem de osso trabecular dos animais ovariectomizados quando comparada às ratas não ovariectomizadas após três meses da cirurgia, ou seja, imediatamente antes da injeção intra-óssea das CTM diferenciadas (dados não demonstrados).

Dois meses após o procedimento de injeção intra-óssea de PBS, as ratas do grupo controle apresentaram trabéculas metafisárias em grande quantidade, espessas, confluentes e com retenção de matriz cartilaginosa (coração condróide)

(Fig.8A). A cobertura osteoblástica era de células ora cubóides com núcleos grandes e ora achatados com núcleos fusiformes (Fig. 8B). Os animais do grupo osteoporose sem tratamento apresentaram marcada osteopenia (Tab. 8). A porcentagem de osso trabecular da metáfise distal, da cabeça e do colo femoral era significativamente menor comparada ao grupo controle (Tab. 8). As trabéculas eram delgadas, acinturadas, fragmentadas (Figura 8C). A cobertura osteoblástica era quase inexistente e, as células presentes eram inativas, ou seja, achatadas e com núcleos fusiformes (Figura 8D).

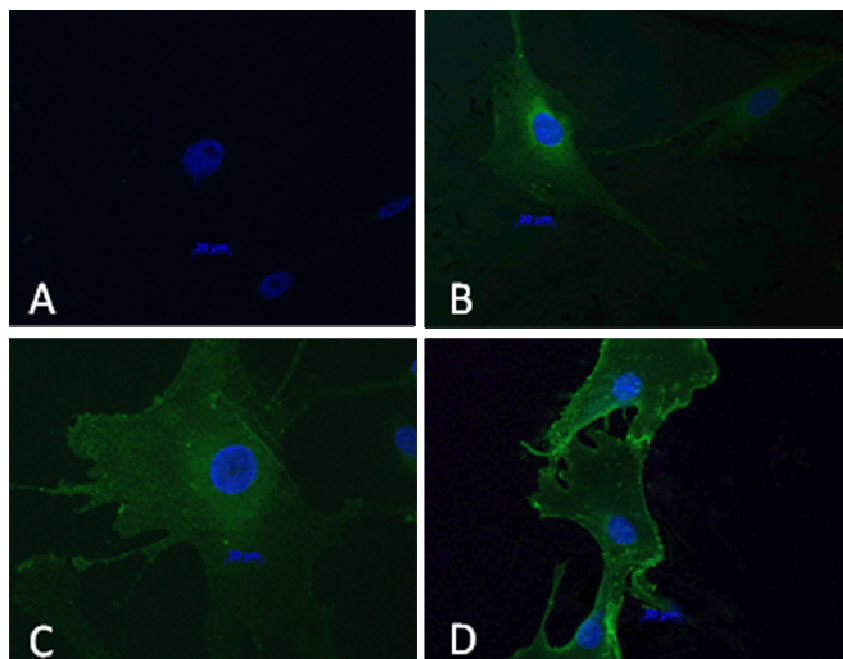


Figura 6. Fotomicroscopia de imunofluorescência de células tronco mesenquimais indiferenciadas *in vitro*. A) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e ausência de fluorescência verde citoplasmática indicando ausência de expressão para anticorpo anti-CD45. B) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e com fluorescência verde citoplasmática indicando expressão para anticorpo anti-CD 54. C) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e com fluorescência verde citoplasmática indicando expressão para anticorpo anti-CD73. D) Célula com fluorescência nuclear azul pela marcação com DAPI e com fluorescência verde citoplasmática indicando expressão para anticorpo anti-CD90.

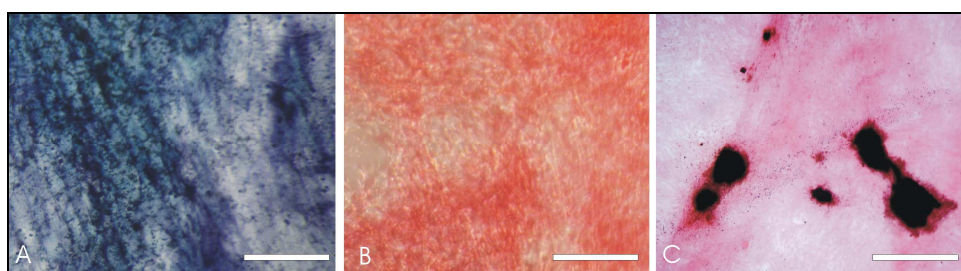


Figura 7. Células tronco mesenquimais de ratas com 21 dias em meio de diferenciação osteogênico. A) atividade de fosfatase alcalina pelo método de NBT/BCIP. B) Síntese de colágeno pelo método de Sirius red. C) Nódulos de mineralização pelo método de Von Kossa. Bar = 62,2µm

Notavelmente, as ratas com osteoporose que receberam injeção intra-óssea de CTM diferenciadas apresentaram porcentagem de tecido ósseo trabecular em todo o fêmur significativamente maior em comparação ao grupo com osteoporose sem tratamento e similar ao grupo controle (Tab. 8). As

trabéculas eram espessas e confluentes (Figura 8E). Em algumas trabéculas, a cobertura osteoblástica era abundante e com áreas aparentes de hiperplasia e hipertrofia osteoblástica onde as células apresentavam-se ativas cuboidais e com núcleos grandes (Figura 8F).

Tabela 8: Média e desvio padrão da porcentagem de osso trabecular no fêmur de ratas adultas controle, com osteoporose sem tratamento e com osteoporose tratadas com injeção intra-óssea de células tronco mesenquimais submetidas a diferenciação osteogênica *in vitro*

| Variável | Grupos | | |
|-----------------|------------|----------------------------|---|
| | Controle | Osteoporose sem tratamento | Osteoporose tratado com CTM diferenciadas |
| Metáfise distal | 30,4±8,9A | 15,1±6,0B | 24,8±9,6A |
| Colo do fêmur | 38,7±9,3A | 21,1±8,2B | 34,1±6,8A |
| Cabeça do fêmur | 59,1±7,4 A | 38,1±13,3B | 53,7±9,7A |

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

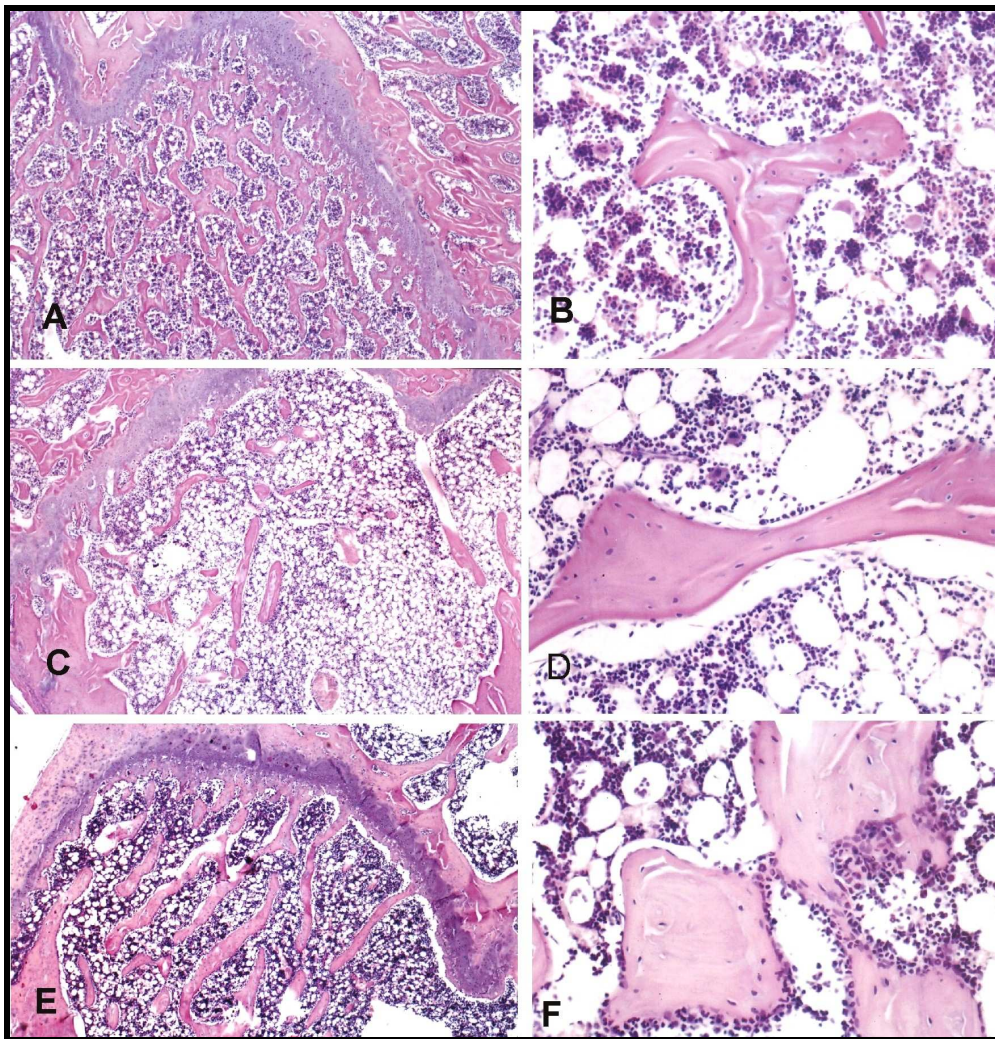


Figura 8: Metáfise distal do fêmur de ratas. (A) Grupo controle com trabéculas metafisárias espessas e confluentes após a injeção intra-óssea de PBS, HE, 50×. B) Grupo controle com trabécula apresentando cobertura osteoblástica cuboidal ativa após a injeção intra-óssea de PBS HE, 150×. C) Grupo osteoporose com intensa redução do número de trabéculas metafisárias após a injeção intra-óssea de PBS, HE, 50×.D) Grupo osteoporose com trabécula apresentando cobertura osteoblástica praticamente inexistente e com alguns osteoblastos achatados com núcleos fusiformes após a injeção intra-óssea de PBS HE, 150×.E) Grupo tratado com CTM diferenciadas com trabéculas metafisárias mais numerosas em relação ao grupo osteoporose, HE, 50× F) Grupo tratado com CTM diferenciadas com trabécula recoberta por mais de uma fileira de osteoblastos grandes e imaturos de permeio ao osteóide HE, 150×

DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das células antes da diferenciação celular é fundamental para demonstrar o grau de pureza da cultura, pois a medula óssea pode apresentar CTM, células hematopoéticas (Bianco et al., 2001; Bobis et al., 2006) e fibroblastos (Ishii et al., 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 não são expressas em fibroblastos e células hematopoéticas. 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).

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; Moiola et al., 2007).

Nas ratas ovariectomizadas, quase nenhuma cobertura osteoblástica foi observada. As células apresentaram núcleos inativos e fusiformes e segundo a literatura há menor expressão de genes que codificam o colágeno I, as proteínas não-colagênicas e a fosfatase alcalina nos osteoblastos. Como consequência, há redução da síntese e da mineralização da matriz (Bland, 2000).

Surpreendentemente, as ratas que receberam injeção intra-óssea de CTM diferenciadas apresentaram reversão da osteoporose femoral tanto no local próximo a inoculação, metáfise femoral distal, como também no colo e na cabeça femoral. As CTM diferenciadas exibiram capacidade de produção de matriz óssea, a qual aumentou a massa óssea femoral mesmo na ausência dos hormônios sexuais. Embora as células injetadas tenham sido extraídas de um animal doador, não houve, à histologia, reação celular compatível com rejeição. Em estudos prévios utilizando CTM indiferenciadas no tratamento da osteoporose, nós não obtivemos resultados positivos como os descritos por Gasser (2003). Nossa hipótese para isso é que o estrógeno é um importante estimulador da diferenciação de CTM em células osteoprogenitoras. Vimos no capítulo 3 que CTM de ratas ovariectomizadas apresentam menor diferenciação osteogênica *in vitro*.

Estudos prévios têm demonstrado o efeito positivo do uso de CTM diferenciadas associadas a biomaterias no tratamento local de doenças ósseas (Wang, et al., 2006). A terapia celular associada à biomaterias para o tratamento local de doenças ósseas requer intervenção cirurgica mais invasiva. Entretanto o uso de injeção intra-óssea de CTM diferenciadas é um procedimento simples e oferece uma nova perspectiva para a engenharia de tecido ósseo.

Embora seja visível o efeito benéfico da aplicação intra-óssea de CTM diferenciadas no tratamento da osteoporose, não é possível saber se os resultados apresentados se devem ao fato das células tronco mesenquimais diferenciadas terem sintetizado matriz óssea *in vivo* ou se devem ao fato das mesmas terem estimulado os osteoblastos pré-existentes a produzirem matriz óssea. Sabe-se que as CTM injetadas não somente podem regenerar o tecido alvo como também através da liberação de citocinas (Yin e Li et al., 2006) podem estimular as células do próprio tecido sob tratamento a regenerarem. O ideal seria traçar a rota das CTM injetadas no osso de ratas com osteoporose para desvendar essa questão. Uma das limitações para isso tem sido o fato de que alguns dos marcadores

fluorescentes mais utilizados nessas células tais como o *4,6'-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) e a *green fluorescent protein* (GFP) desaparecem com o processo de descalcificação como foi constatado em experimentos pilotos realizados anteriormente. A célula tronco mesenquimal marcada pelo DAPI, por exemplo, não mantém a fluorescência durante o processo de diferenciação osteogênica *in vitro* (Ocarino et al., 2008b). Mas estudos futuros estão sendo realizados a fim de verificar se a inoculação intra-óssea de células tronco com expressão da GFP pode permitir a localização dessas células no tecido ósseo descalcificado ou calcificado através das técnicas de ligação ao anticorpo anti-GFP.

Outra questão que merece estudo futuro é saber por quanto tempo o fêmur tratado com CTM diferenciadas poderia manter o aumento da porcentagem de tecido ósseo trabecular, na tentativa de verificar se há a necessidade de múltiplas aplicações e qual seria o intervalo entre essas aplicações.

CONCLUSÃO

A injeção intra-óssea de CTM submetidas à diferenciação osteogênica *in vitro* reverte a osteoporose em todo o fêmur de ratas ovariectomizadas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O osso é um tecido dinâmico e complexo cuja resposta biológica é dependente dos vários estímulos que influenciam a aposição e a reabsorção ósseas. O controle do turnover ósseo se dá pela ação direta e indireta destes estímulos na função e atividade osteoblásticas, osteocíticas e osteoclásticas, mas também sobre a diferenciação das células tronco mesenquimiais da medula óssea em células osteoprogenitoras. Os esteróides sexuais e o estímulo mecânico são fatores importantes no controle do metabolismo ósseo por influenciarem direta ou indiretamente os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos, mas também por agirem na diferenciação das CTM da medula óssea como comprovado neste estudo.

Já é conhecido que a deficiência dos esteróides sexuais promove redução da massa óssea em todo o esqueleto de ratas devido à hipotrofia e hipoplasia osteoblásticas, o que caracteriza o quadro de osteoporose. A osteopenia advinda da deficiência dos hormônios sexuais ocorre devido à diminuição da síntese de matriz óssea pelos osteoblastos, ao aumento da apoptose de osteócitos e a redução da absorção intestinal de cálcio. Além disso, como demonstrado no capítulo 3 a redução

do potencial osteogênico das CTM da medula óssea de ratas com osteoporose pode ser considerado um fator adicional na etiopatogenia da osteopenia por deficiência dos esteróides sexuais.

A atividade física seja por ação direta via força mecânica ou indireta via citocinas, fatores de crescimento ou hormônios, reverte o quadro de osteoporose aumentando a massa óssea em todo o esqueleto de ratas mesmo na deficiência dos esteróides sexuais. Suas ações não são exclusivas sobre as células ósseas e pela primeira vez foi demonstrado que ratas com osteoporose ativas apresentam maior potencial osteogênico das CTM. Essa informação é importante porque adiciona à lista de mecanismos pelo qual a atividade física induz osteogênese, mais um mecanismo que é o de estimular a diferenciação osteogênica das células tronco da medula óssea. Apesar do efeito da atividade física ser bastante estudado, esse mecanismo era totalmente desconhecido.

O óxido nítrico se agrega a inúmeros outros fatores considerados importantes para o metabolismo ósseo uma vez que age como um dos mediadores dos efeitos benéficos da atividade física sobre o osso. Mas, adicionalmente aos resultados existentes na literatura, este estudo demonstrou que a

inibição da óxido nítrico sintase com uso de L-NAME apresenta efeito antagônico dependendo das condições do indivíduo. Em ratas normais, não altera a massa óssea trabecular, mas impede a reversão da osteoporose em alguns sítios do esqueleto de ratas ativas e surpreendentemente impede a perda óssea trabecular causada pela ovariectomia em ratas sedentárias. Mas o efeito dessa inibição é também variável de acordo com o tipo de tecido ósseo, já que a inibição da óxido nítrico sintase reduziu a espessura do osso cortical independentemente do grupo experimental. Outro resultado original é o de que CTM de ratas com osteoporose ativas com bloqueio da óxido nítrico sintase apresentam menor diferenciação osteogênica *in vitro*, o que sugere que o óxido nítrico seja um dos fatores intermediários no aumento da diferenciação osteogênica de CTM promovido pela atividade física.

A maioria dos resultados evidenciados *in vitro* é compatível com os resultados *in vivo*. Exemplo disso é a redução da porcentagem de tecido ósseo aliada à redução da diferenciação osteogênica das CTM de ratas com osteoporose sedentárias e exatamente o resultado inverso nas ratas com osteoporose submetidas à atividade física. Mas, resultados diferentes *in vivo* e *in vitro* dentro do mesmo grupo de animais também foram

evidenciados. Embora não tenha havido diferença no tecido ósseo do fêmur de ratas dos grupos normal e com osteoporose ativo tratados com L-NAME em relação aos seus controles, o potencial osteogênico das CTM extraídas dos fêmures destes animais diferiu entre grupos. Duas hipóteses são aventadas para explicar as diferenças entre os resultados *in vivo* e *in vitro*: a) que o tratamento com L-NAME promove inicialmente alterações na atividade das CTM para posteriormente alterar a morfologia óssea; b) que o tratamento com L-NAME *in vivo* reduz o potencial osteogênico das CTM quando estas são diferenciadas em ambiente pouco complexo como o meio de cultura.

De acordo com os resultados do capítulo 4, a aplicação intra-óssea de CTM diferenciadas pode ser considerada uma alternativa para o tratamento local da osteoporose particularmente em sítios mais susceptíveis às fraturas espontâneas. No entanto, esse procedimento não deve ter a pretensão de substituir terapias sistêmicas que visam o tratamento da doença em todo o esqueleto. Antes de testar a injeção intra-óssea de CTM em pacientes humanos, mais estudos devem ser realizados. Como perspectivas futuras, pretende-se verificar por quanto tempo o fêmur com osteoporose tratado com CTM é capaz de manter o ganho de massa

óssea e qual seria a resposta do esqueleto com osteoporose associando-se terapia sistêmica e local com CTM. Apesar das CTM ter como vantagem frente às células tronco embrionárias a possibilidade de se utilizar as células tronco do próprio paciente sob tratamento, CTM de ratas com osteoporose não devem ser usadas para tratamento dessa doença, uma vez que o

potencial osteogênico das CTM das ratas com osteoporose nesse estudo se reduziu significativamente. Por isso, mais uma das perspectivas geradas a partir do presente estudo é a de conhecer a expressão gênica de CTM de ratas e estudar se terapias gênicas poderiam melhorar o potencial osteogênico das CTM de indivíduos com osteoporose.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIRRE, J.; BUTTERY, L.; O'SHARGHNESSY, M.; et al. Endothelial nitric oxide synthase gene-deficient mice demonstrate marked retardation in postnatal bone formation reduced bone volume, defects in osteoblast maturation activity. *Am. J. Pathol* v.158, p. 247-257, 2001

ALLAIN, T.J.; CHAMBERS, T.J.; FLANAGAN, A.M. et al. Triiodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *J. Endocr.*, v.133, p. 327-331, 1992.

ALWIS, G.; LINDEN, C.; AHLBORG, H.G. et al. A 2-year school-based exercise programme in pre-pubertal boys induces skeletal benefits in lumbar spine. *Acta. Paediatr.*, 2008, (no prelo).

ANSELME, K.; NOËL, B.; FLAUTRE, B.; et al. Association of porous hydroxyapatite and bone marrow cells for bone regeneration. *Bone* v.25, p.51S-54S, 1999.

BACABAC, R.G.; SMIT, T.H.; MULLENDER, M.G. et al. Nitric Oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* v.315, p.823-829, 2004

BAJADA, S.; MAZAKOVA, I.; RICHARDSON, J.B. et al., Updates on stem cells and their applications in regenerative

medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* v.2, p.169-83, 2008.

BAKKER, A.D.; KLEIN-NULED, J.; TANCK, E. et al. Additive effects of estrogen and mechanical stress on nitric oxide and prostaglandin E2 production by bone cells from osteoporotic donors. *Osteoporos. Int.*, v.16, p.983-989, 2005.

BASS, S.L. The prepubertal years: a uniquely opportune stage of growth when the skeleton is most responsive to exercise? *Sports Med.*, v.30, p.73-78, 2000.

BARRY, D.W.; KOHRT, W.M. Exercise and prevention of bone health. *J. Cardiopulm.Rehabil. Prev.*, v.28, p.153-162, 2008.

BAUD, C.A., BOIVIN, G. Effects of hormones on osteocyte function and perilacunar wall structure. *Clin. Orthop.Rel. Res.*, n.136, p.270-281, 1978.

BAYLINK, T.M., MOHAN, S. FITZSIMMONS, R.J. et al. Evaluation of signal transduction mechanisms for the mitogenic effects of prostaglandin E2 in normal human bone cells in vitro. *J Bone Miner Res.* n.11, v.10, p.1413-1418, 1996.

BENNELL, K., PAGE, C., KHAN, K. et al. Effects of resistance training on bone

- parameters in young and mature rats. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol.* v.27, p.88-94, 2000.
- BERARD, A, BRAVO, G., GAUTHIER, P. Meta-analysis of the effectiveness of physical activity for the prevention of bone loss in postmenopausal women. *Osteoporos Int.*, v.7, p.331-337, 1997.
- BERRIDGE, M.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. Calcium signalling. *Curr. Biol.*, v.9, p.157-159, 1999.
- BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* v.19, p.180-92, 2001;
- BIGBEE, A.J., GOSSELINK, K.L., ROY, R.R. et al. Bioassayable growth hormone release in rats in response to a single bout of treadmill exercise. *J. Appl. Physiol.*, v.89, p.2174-2178, 2000.
- BIJLSMA, J.W.J.; DUURSMA, S.A.; ROELOFS, J.M.M. et al. Thyroid function and bone turnover, *Acta Endocrinol.*, v.104, n. 1, p.42-49, 1983.
- BILEZIKIAN, J.P.; RAIZS, L.G.; RODAN, G.A. *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press, 1398p, 1996
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin. Sci.*, v.98, p.217-240, 2000.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.* v.44, p.215-30, 2006
- BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; MELO, A.B. et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on the osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Hormone Res.* 2008 (inpress)
- BOIVIN, G.; MOREL, G.; LIAN, J.B.; ANTHOINE-TERRIER, C.; DUBOIS, P.M.; MEUNIER, P.J. Localization of endogenous osteocalcin in neonatal rat bone and its absence in articular cartilage: effect of warfarin treatment. *Virchows Archiv. Path. Anat.* V.417, p.505-512, 1990.
- BOURRIN, S., GENTY, C., PALLE, S. et al. Adverse effects of strenuous exercise: A densitometric and histomorphometric study in the rat. *J. Appl. Physiol.*, v.76, p.1999-2005, 1994.
- BOYCE, B.F.; XING, L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Therapy.*, v.9, p.1-7, 2007.
- BOYLE, W.J., SIMONET, W.S., LACEY, D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* v.423, p.337-342, 2003.
- BRAHM, H., PIEHL-AULIN, K., LJUNGHALL, S. Net fluxes working thigh of hormones, growth factors and biomarkers of bone metabolism during short lasting. *Calcif. Tissue Int.*, v.60, p.175-180, 1997.
- BRAIDAN, I.; BARIS, C., WOOD, L. et al. Preliminary evidence for impaired estrogen receptor- α protein expression in osteoblasts and osteocytes from men with idiopathic osteoporosis. *Bone*, v.26, p.423-427, 2000.
- BRAVENBOER, N., ENGELBREGT, M.J., VISSER, N.A. et al. The effect of exercise on systemic and bone concentrations of growth factors in rats. *J. Orthop. Res.*, v.19, p.945-949, 2001.
- BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N.S. et al. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop.* v.355S, p.S247-S256, 1998.
- BUTLER, A.R.; FLITNEY, F.W.; WILLIAMS, D.L. NO, nitrosonium ions, nitroxide ions, nitrosothions and iron-nitrosyls in biology: a chemist's perspective. *Trends. Pharmacol. Sci.* v, 16, p.18-22, 1995.
- CANALIS, E. Notch signaling in osteoblasts. *Bone Formation*, v.13, p. 1-4, 2008.

- CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P.; et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*; v.22, p.81-91, 2003.
- CASTELO-BRANCO, C. Management of osteoporosis. An overview. *Drugs Aging*. v.12, p.25-33, 1998.
- CHAUDHARY, L.R., HOFMEISTER, A.M., HRUSKA, K.A. Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*, v.34, p.402-411, 2004.
- CHEN, C.; KALU, D.N. Modulation of intestinal estrogen receptor by ovariectomy, estrogen and growth hormone. *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics*, v. 286, n.1, p.328-333, 1998.
- CHENG, B., ZHAO, S., LUO, J. et al. Expression of functional gap junctions and regulation by fluid flow in osteocyte-like MLO-Y4 cells. *J. Bone Miner. Res.* v. 16, p. 249-259, 2001.
- CHERIAN, P.P., CHENG, B., GU, S. et al. Effects of mechanical strain on the function of gap junctions in osteocytes are mediated through the prostaglandin EP2 receptor. *J. Biol. Chem.*, v. 278, n.44, p. 43146-43156, 2003.
- CHIU, K.M.; ARNAUD, C.D.; JU, J. et al. Correlation of estradiol, parathyroid hormone, interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor during the normal menstrual cycle. *Bone*, v.26, n.1, p.79-85, 2000.
- CIVITELLI, R. Cell-cell communication in the osteoblast/osteocyte lineage. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 473, p.188-192. 2008
- COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int. Immunopharmacol.*, v.1, p.1397-1406, 2001.
- COLIN, E.M.; VAN DEN BEMD, G.H.; VAN AKEN, M. Et al. Evidence for involvement of 17 beta-estradiol in intestinal calcium absorption independent of 1,25-dihydroxyvitamin D3 level in the rat. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, n.1, p.57-64, 1999.
- COMPSTON, J.E. SEX STEROIDS AND BONE. *Physiol. Rev.*, v.81, n.1, p.419-447, 2001.
- COVAS, D.T.; SIUFI, J.L.C.; SILVA, A.R.L. et al. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.36, p.1179-1183, 2003
- CROSS, H.S.; PÖLZLEITNER, D.; PETERLIK, M. Intestinal phosphate and calcium absorption: joint regulation by thyroid hormones and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, v.113, p. 96-103, 1986.
- CROSS, H.S.; PETERLIK, M. Calcium and inorganic phosphate transport in embryonic chick intestine: triiodothyronine enhances the genomic action of 1,25-dihydroxycholecalciferol. *J. Nutrition*, v.118, n.18, p. 1529-1534, 1988.
- CROSS, H.S.; PETERLIK, M. Differentiation-dependent expression of calcitriol actions of absorptive processes in cultured chick intestine: modulation by triiodothyronine. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, v.124, p.679-684, 1991.
- DATTA, H.K. WALKER, J.A.; TUCK, S.P. et al. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.*, v.61, p.577-587. 2008
- DERMAN, O.; CINEMRE, A.; KANBUR, N. et al. Effect of swimming on bone metabolism in adolescents. *Turk. J. Pediatr.* v.50, p.149-154, 2008.
- DIAS, A.C.R., SILVA, L.G.; COLOMBARI, E. O óxido nítrico (NO) no controle neuronal da pressão arterial: modulação da transmissão glutamatérgica no NST. *Med. V.* 39, p.51-64, 2006.
- DOI, Y.; Horigushi, T.; Kim, S.H.; et al. Effects of non-collagenous proteins of the formation of apatite in Ca-β-glycerophosphate solution. *Arch. Oral. Biol.*, v.37, p.15-21, 1992

- DURAND, M.; GALLANT, M.A.; de BRUM-FERNANDES A.J. Prostaglandin D2 receptors control osteoclastogenesis and the activity of human osteoclasts. *J. Bone Miner. Res.* V.23; p.1097-1105.
- ERIKSEN, E.F.; MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Trabecular bone remodeling and bone balance in hiperthyroidism. *Bone*, v.6, p.421-428, 1985.
- ESPLUGUES, J.V. NO as a signaling molecule in the nervous system. *Br. J. Pharmacol.*, v.135, p.1079-1095, 2002.
- FITZPATRUCKE, L.A. Estrogen therapy for posmenopausal osteoporosis. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.50, p.705-719, 2006.
- FLIEGER, J., KARACHALIOS, Th., KHALDI, L. et al. Mechanical stimulation in the form of vibration prevents postmenopausal bone loss in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.63, p.510-514, 1998.
- FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S. et al. Nitric oxide synthase isozymes: characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension*, v.23 (parte2), p.1121-1131, 1994.
- FORWOOD, M.R., PARKER, A.W. Respective loading, in vivo, of the tibiae and femora of rats: effects of repeated bouts of treadmill-running. *Bone Miner.*, v.13, p.35-46, 1991.
- FOX, S.W.; CHOW, J.W.M. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone*, v.23, p. 1-6, 1998
- FROST, H.M. The mechanostat: A proposed pathogenic mechanism of osteoporoses and bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents. *Bone Miner.*, v.2, p.73-85, 1987.
- GABRIEL, A., DETILLEUX, J. JOLLY, S. et al Morphometric study of equine navicular bone age related vhanges and influence of exercise. *Vet. Res. Comm.*,v.23, p.15-40, 1999.
- GARTHWAITE, J.; BOULTON, C.L. Nitric oxide signaling in the central nervous system. *Ann. Rev Physiol.*, v.57, p.683-706, 1995.
- GASSER, J.A. Stem cells in the treatment of osteoporosis. *Eur. Cells Materials* v.6, p.21 suppl, 2003.
- GAUMET, N.; SEIBEL, M.J.; BRAILLON, P. et al. Influence of ovariectomy on bone metabolism in very old rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.58, p.256-262, 1996.
- GAUMET-MEUNIER, N.; COXAM, V.; ROBINS, S. et al. Gonadal steroids and bone metabolism in young castrated male rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.66, p.470-475, 2000.
- GEWALTIG, M.T.; KOJDA, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. *Cardiovasc. Res.*, v. 55, p. 250-260, 2002.
- GRONTHOS, S.; SIMMONS, P.J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions *in vitro*. *Blood* v.85, p.929-49, 1995.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* v.22, p.487-500, 2004.
- GUREVITCH, O.; KURKALLI, B.G.S.; PRIGOZHINA, T.; et al. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells* v. 21, p.588-97, 2003.
- HAO, Y.J.; TANG, Y. CHEN, F.B. Differents doses of nitric oxide donor prevent osteoporosis in ovariectomized rats. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, v. 435, p. 226-231, 2005.
- HE T.C. Distinct osteogenic activity of BMP and their orthopaedic applications. *J Musculoskelet Neuronal Ineract* v.5, p.363-6, 2005

- HENDERSON, N.K., WHITE, C.P., EISMAN, J.A. The roles of exercise and fall risk reduction in the prevention of osteoporosis. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.*, v.27, n.2, p.369-387, 1998.
- HENG, B.C.; CAO, T.; LEE, E.H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage *in vitro*. *Stem Cells* v. 22, p.1152-67, 2004
- HILLARD, T.C.; STEVENSON, J.C. Role of estrogen in the development of osteoporosis. *Calcif. Tissue Int.*, v. 49 (Suppl), p.S55-S59, 1991.
- HONDA, A.; SOGO, N.; NAGASAWA, S. et al. Bones benefits gained by jump-training are preserved after detraining in young and adult rats. *J. Appl. Physiol.* v.3, 2008, (no prelo).
- HONG, L.; COLPAN, A.; PEPTAN, I.A. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng.* v.12, p.2747-2753, 2006.
- HUANG, T.H.; CHANG, F.L.; KIN, S.C. et al. Endurance treadmill running training benefits the biomaterial quality of bone in growing male wistar rats. *J. Bone Miner. Res.*, v.26, p.350-357, 2008.
- HUGHES, F.J.; TURNER, W.; BELIBASAKIS, G. et al. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol* v.41, p.48-72, 2000
- HUKKANEN, M.; HUGHES, F.J.; BUTTERRY, et al. Cytokine-stimulated expression of inducible nitric oxide synthase by mouse, rat, and human osteoblast-like cells and its functional role in osteoblast metabolic activity. *Endocrinol.*v.136, p.5445-5453, 1995.
- IGLÉZIAS, J.C.R. Célula-tronco. *Rev Fac Cien Med Sorocaba* v.6, p.39, 2004
- IGNARRO, L.J.; BUGA, G.M. WOOD, K.S. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.84, p. 9265-9269, 1987.
- ISHIDA, Y.; TERTINEGG, I.; HEERSCHE, 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.; HEERSCHE, J.N.M. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitors cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. *Bone*, v.20, n.1, p.17-25, 1997.
- 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
- JAHREIS, G., KAUF, E., FROHNER, G. et al. Influence of intensive exercise on insulin-like growth factor 1, thyroid and steroid hormones in female gymnasts. *Growth Regul.*, v.1, p.95-99, 1991.
- JIA, D., HEERSCHE, N.M. Insulin-like growth factor-1 and -2 stimulate osteoprogenitor proliferation and differentiation and adipocyte formation in cell populations derived from adult rat bone. *Bone*, v.27, n.6, p.785-794, 2000.
- JIA, D., HEERSCHE, 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.41-9, 2002

- JOHNSON, D.L.; MCALLISTER, T.N.; FRANGOS, J.A. Fluid flow stimulates rapid and continuous release of nitric oxide in osteoblasts. *Am. J. Physiol.* v.271, p.E250-E208, 1996.
- JULIANI, M.H., SOUZA, G.M., KLEIN, C. cAMP stimulation of Dictyostelium discoideum destabilizes the mRNA for 117 antigen. *J. Biol. Chem.* v. 265, n.16, p. 9077-82,1990.
- KALAJZIC, I.; STAAL, A.; YANG, W-P. et al. Expression profile of osteoblast lineage at defined stages of differentiation. *J. Biol. Chem.*, v.280, n.26, p.24618-24626, 2005.
- KANALEY, J.A., WELTMAN, J.Y., PIEPER, K.S. et al. Cortisol and growth hormone responses to exercise at different times of day. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p.2881-2889, 2001.
- KARINKANTA, S.; HEINONEN, A.; SIEVAÄNEN, H. et al. Maintenance of exercise-induced benefits in physical functioning and bone among elderly women. *Osteoporos. Int*, 2008 (no prelo).
- KASTEN, T.P.; COLLIN-OSDOBY, P., PATEL, N. et al. Potentiation of osteoclast bone-resorption activity by inhibition of nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.91, p.3569-3573, 1994.
- KATAGIRI, T., TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Disease*, v.8, p.147-159, 2002.
- KAVIA, R.; SALUJA, R.; SINGH S. et al. Nitric oxide synthase regulation and diversity: implications in Parkinson's disease. *Nitric Oxide*, v.15, p.280-294, 2006.
- KEARNS, A.E.; KHOSLA, S.; KOSTENUK, P.J. Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr. Rev.* , v.29, p.155-192.
- 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.
- KELLEY, G.A.; KELLEY, K.S. Efficacy of resistance exercise on lumbar spine and femoral neck bone mineral density in premenopausal women: a meta-analysis of individual patient data. *J. Womens. Health.* v.13, p.293-300, 2004.
- KIM, Y.J., SAH, R.L., GRODZINSKY, A.J. et al. Mechanical regulation of cartilage biosynthetic behavior: Physical stimuli. *Arch. Biochem. Biophys.* v.31, p.1-12, 1994.
- KLEIN-NULEND, J.; HELFRICH, M.H.; STERCK, J.G.H et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* v. 250, p.108-14, 1998.
- KLEINERT, H.; WALLERATH, T.; EUCHENHORFER, C. et al. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO synthase gene: analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*, v.31, p.582-588, 1998.
- KORKIA, P. Osteoporosis: process, prevention and treatment. *J. Bodywork. Movement. Therap.* v.6, p.156-169, 2002.
- KRAEMER, R.R., JOHNSON L.G., HALTON, G.R. et al. Effects of hormone replacement on growth hormone and prolactin exercise responses in postmenopausal women. *J. Appl. Physiol.*, v.84, p.703-708, 1998.
- KRAUS, K.H.; KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg* v.35, p.232-42, 2006.
- KROLNER, B., TOFT, B. Vertebral bone loss: unheeded side effect therapeutic bed rest. *Clin Sci.* v.64, p.537-540, 1983.
- KRONCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection--how, why, when, and where? *Nitric Oxide*, v.1, p.107-20, 1997.

- KULTERER, B.; FRIEDL, G.; JANDROSITZ, A. et al. Gene expression profiling of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow during expansion and osteoblast differentiation. *BMC Genomics*, v.8, p.1-15, 2007.
- LANE, N.E., KANEPS, A.J., STOVER, S.M. et al. Bone mineral density and turnover following forelimb immobilization and recovery in young adult dogs. *Calcif. Tissue. Int.* v.59, p.401-406, 1996.
- LANYON, L.E. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcif. Tissue. Int.* v.53(suppl1), p.S102-S107, 1993.
- LEE, M.S., KANG, C.W., SHIN, YS. et al. Acute effects of chundosunbup qi'training on blood concentrations of TSH, calcitonin, PTH and thyroid hormones in elderly subjects. *Am. J. Chin. Med.*, v.26, p.275-281, 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.
- LEITE, M.O.R. Tratamento da osteoporose pós-menopausa. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* v 43, p.442-445, 1999.
- LEWIECK, E.M.; SILVERMAN, S.L. Redesigning osteoporosis treatment: who to treat and how long to treat. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* v. 40, p.694-704, 2006.
- LIEL, Y.; SHANY, S.; SMIRNOFF, P. Et al. Estrogen increases 1,25-Dihydroxyvitamin D receptors expression and bioresponse in the rat duodenal mucosa. *Endocrinol.*, v. 140, n.1, p. 280-284, 1999.
- LIN, I.C.; SMARTT, J.M.; NAH, H.D. et al. Nitric oxide stimulates proliferation and differentiation of fetal calvarial osteoblasts and dural cells. *Plast. Reconstr.Surg.* v. 212, p. 1554-66, 2008
- LINDBLAD, W.J. Stem cells in mammalian repair and regeneration. *Wound. Repair. Degener.* v.9,p.423-4, 2001.
- LIU, F.; MALAVAL, L.; AUBIN, E.J. Global amplification polymerase chain reaction reveals novel transitional stages during osteoprogenitor differentiation. *J. Cell Sci.*, v.116, n.9, p.1787-1796, 2003.
- LOURENSTEIN, C.J.; GLATT, C.S.; BREDT, D.S. et al. Cloned and expressed macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.89, p.6711, 1992.
- LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* v.16, p.599-603, 2004
- MACINTYRE, M.; ZAIDAI, M.; TOWHIDUL ALAM, H.K. et al. Osteoclast inhibition: an action of nitric oxide A.S.M.not mediated by cyclic GMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.88, p.2936-2940, 1991.
- MAC NAMARA, P.; LOUGHREY, H.C. Progesterone receptor A and B isoform expression in human osteoblasts. *Calcif. Tissue Int.*,v.63, p.39-46, 1998.
- MACKIE, E.J. Osteoblast: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.35, p.1301-1305, 2003.
- MANN, V.; HUBER, C.; KOGIANE, G.; et al. The influence of mechanical stimulation on osteocyte apoptosis and bone viability in human trabecular bone. *J. Musculoskeletal neuron Int.*v. 6, p.408-417, 2006.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: function and mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.*, v.338, p.281-4, 1993.
- MATSUDA, J.J., ZERNICKE, R.F., VAILAS, A.C. et al. Structural and mechanical adaptation of immature bone to strenuous exercise. *J. Appl. Physiol.*, v.60, p.2028-2034, 1986.

- MAUNEY, J.R., SJOSTORM, S., BLUMBERG, J. et al. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds *in vitro*. *Calcif. Tissue Int.*, v.74, p.458-468, 2004.
- MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* v. 16, p.713-20, 2004.
- MCGEE, M.E.; MAKI, A.J.; JOHSON, S.E. et al. Decreased bone turnover with balanced resorption and formation prevent cortical bone loss during disuse (Hibernation) in grizzly bears (*Ursus arctos horribilis*). *Bone*, v.42, p.396-404, 2008.
- MO, A., YAO, W., LI, C. et al. Bipedal stance exercise and prostaglandin E2 (PGE2) and its synergistic effect in increased bone mass and in lowering the PGE2 dose required to prevent ovariectomized-induced cancellous bone loss in aged rats. *Bone*, v.31, n.3, p.402-406, 2002.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, v.43, p. 109-132, 1991.
- MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.*, v.329, p.2002-2013, 1993
- MOIOLI, E.K.; HONG, L.; MAO, J.J. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound. Repair. Regen.* v.15, p.413-421, 2007.
- MOLLACE, V.; MUSCOLI, C., MASINI, E., et al. Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors. *Pharmacol. Rev.*, v.57, p.217-244, 2005.
- MORRIS, S.M.; BILLIAR, T.R. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, v.266, p.E829-39, 1994.
- MOSEKILDE, L.; MELSEN, F. Morphometric and dynamic studies of bone changes in hypothyroidism. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, v.86, p.56-62, 1978.
- MOSEKILDE, L., THOMSEN, J.S., ORHIL, P.B. et al. Additive effect of voluntary exercise and growth hormone treatment on bone strength assessed at four different skeletal sites in a aged rat model. *Bone*, v.24, p.71-80, 1999.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* v.65, p.55-63, 1983.
- MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B. et al. Stem cell therapy a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* v.48, p.3464-74, 2003.
- MURREL, G.A.C.; DOLAN, M.M.; JANG, D. et al. Nitric oxide: an important articular free radical. *J. Bone Joint Surg.*, v.78A, p.265-274, 1996.
- NOMURA, S., YAMAMOTO, T.T. Molecular event caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol.* V.19, p.91-96, 2000.
- NOMURA, S., YAMAMOTO, T.T. Molecular events caused by mechanical stress in bone. *Matrix Biol*, v.19, p.91-96, 2008.
- NOTOMI, T., OKIMOTO, N., OKAZAKI, Y., et al. Tower climbing exercise started 3 months after ovariectomy recovers bone strength of the femur and lumbar vertebrae in aged osteopenic rats. *J. Bone Miner. Res.*, v.18, n.1, p.140-149, 2003.
- NUNES, I.J., NUNES, V.A. Doenças metabólicas do osso. *Cad Tec Esc Vet UFMG*. n.3, p.1-66, 1988.
- OCARINO, N.M.; MARUBAYASHI, U.; CARDOSO, T.G.S. et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly or indirectly submitted to mechanical impact. *J. Musculoskeletal. Neuronal. Int.* v.7, p.84-93, 2007a.

- OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; BOZZI, A. et al. Actividad física aumenta la diferenciación osteogénica de células troncales mesenquimáticas de ratas con osteoporosis. 7 Congreso de la Sociedad iberoamericana de osteología y metabolismo mineral p.11. (2007b)
- OCARINO, N.M.; SILVA, J.F.; SANTIAGO, L.B. et al. Treadmill training before and/or after ovariectomy is more effective in preventing osteopenia in adult female rats. *Sci.Sport*, 2008a (*in press*).
- OCARINO, N.M.; BOZZI, A.; PEREIRA, R.D.O. et al. Behavior of mesenchymal stem cells stained with 4'6- diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) in osteogenic and non osteogenic cultures. *Biocell.*, v.32, p.175-183, 2008b.
- OLMSTED-DAVIS, E.A., GUGALA, Z., CAMARGO, F. et al. Primitive adult hematopoietic stem cells can function as osteoblast precursors. *Medical Sci.*, v. 100, n. 26, p.15877-15882, 2003.
- OREFFO, R.O.C.; TRIFFITT, J.T. Future potentials for using osteogenic stem cells and biomaterials in orthopedics. *Bone* v. 25, p.5S-9S,1999
- ORIMO, H.; FUJITA, T.; YOSHIKAWA, M. Increased sensitivity of bone to parathyroid hormone in ovariectomized rats. *Endocrinol.*, v. 90, n. 3, p.760-763, 1972.
- OURSLEER, M. Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression* v.8, p.125-140, 1998.
- OXLUND, H., ANDERSEN, N.B., TOFT, G. et al. Growth hormone and mild exercise in combination markedly enhance cortical bone formation and strength in old rats. *Endocrinol.*, v.139, p.1899-1904, 1998
- 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*(2005).
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell. Biol.* v.33, p.6-25, 2006.
- PELLERIN-MASSICOTTE, J., BRISSON, G.R., ST-PIERRE, C. et al. Effect of exercise on the onset of puberty, gonadotropins, and ovarian inhibin. *J. Appl. Physiol.* v.63, p.1165-1173, 1987.
- PENG, Z.Q., VÄÄNÄNEN, H.K., TUUKKANEN, J. Ovariectomy-induced bone loss can be affected by different intensities of treadmill running exercise in rats. *Calcif. Tissue Int*, v.60, p.441-448, 1997.
- 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.
- PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell Dev. Biol.* v. 13, p.369-76, 2002.
- RADOMSKI, M.W. ET AL. An L arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.87, p.5193-5197, 1190.
- RAISZ, L.G. The role of prostaglandins in the local regulation of bone metabolism. *Prog Clin Biol Res.* v. 332, p.195-203, 1990.
- RAISZ, L.G. Bone cell biology: new approaches and unanswered questions. *J Bone Miner Res.* v. 2, n.8, p.457-465, 1993.
- RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem.*, v.45, p.1353-1358, 1999.
- RAISZ, L.G. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. *J. Clin. Invest.* V. 115, p.3318-3325, 2005.
- REES, D.D.; PALMER, R.M.J.; SCHULTER, R. et al. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, v.101, p.746-752, 1990.

- REFSUM, H.E., STRÖMME, S.B. Serum thyroxine, triiodothyronine, and thyroid stimulating hormone after prolonged heavy exercise. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v.39, p.455-459, 1979.
- RIANCHO, J.A.; SALAS, E.; ZARRABEITIA, M.T.; et al. Expression and functional role of nitric oxide synthase in osteoblast-like cells. *J. Bone Miner. Res.* v.10, p. 439-446, 1995.
- RIBEIRO, M.L.; CELLA, M.; FARINA, A. et al. Crosstalk between nitric oxide synthase and cyclooxygenase metabolites in the estrogenized rat uterus. *Prostaglandin, Leukot. Essent. Fatty Acids.* v.68, p. 285-290, 2003.
- RIBEIRO, A.F.C., SERAKIDES, R., NUNES, V.A. et al. A osteoporose e os distúrbios endócrinos da tireóide e das gônadas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* V.47, n.3, p.228-236, 2003.
- RIBEIRO, A.F.C., SERAKIDES, R., OCARINO, N.M. et al. Efeito da associação hipotireoidismo-castração no osso e nas paratireóides de ratas adultas. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.48, n.8, p.525-534, 2004.
- RIGGS, B.L. Pathogenesis of osteoporosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 156, n.5, p.1342-1346, 1987
- ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous protein? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralization and reabsorption. *Cell. Biol. Int.*, v.18, n.6, p.617-628, 1994.
- ROBEY, P.G. The Biochemistry of bone. *Biol. Metab. Clin. North Am.*, v.18, n.4, p.859-902, 1989.
- RUBIN, C.T., LANYON, L.E. Osteoregulation nature of mechanical stimuli: junction as a determinat for adaptive remodelig in bone. *J. Orthop. Res.*, v.5, p.300-310, 1987
- SAH, R.L., GRODZINSKY, A.J., PLASS, A.H. et al. Effects of tissue compression on the hyaluronate-binding properties of newly synthesized proteoglycans in cartilage explants. *Biochem J.* v.267, p.803-808, 1990
- SAKAI, D.; MOCHIDA, J.; YAMAMOTO, Y.; et al. Transplantation of mesenchymal stem cells embedded in atelocollagen® gel to the intervertebral disc: a potential therapeutic model for disc degeneration. *Biomaterials* v.24, p.3531-41, 2003
- SAKATA, T., HALLORAN, B.P., ELALIEH, H.Z. et al. Skeletal unloading induces resistance to insulin-like growth factor I on bone formation. *Bone*, v.32, p.669-680, 2003.
- SAMUELS, A. ; PERRY, M.I. ; GIBSON, R.L. et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in estrogen-induced osteogenesis. *Bone* v.29, p. 24-29, 2001.
- SANTOS, A.A.; 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, p.194-5, 2005.
- SCHULTZ, O.; SITTINGER, M.; HAEUPL, T.; et al. Emerging strategies of bone and joint repair. *Arthritis Res* v.2, p.433-6, 2000
- SCHWARTZ, B.; SMIRNOFF, P.; SHANY, S. et al. Estrogen controls expression and bioresponse of 1,25-dihydroxyvitamin D receptors in the rat colon. *Mol. Cell. Biochem.*, v. 203, p. 87-93, 2000.
- SEEMAN, E. Physiology of aging invited review: Pathogenesis of osteoporosis. *J. Appl. Physiol.*, v.95, p.2142-2151, 2003.
- SERAKIDES, R. *Relação tireóide, gônadas e metabolismo ósseo em ratas adultas hipertireóideas e eutireóideas.* Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG, 2001. 90p. (Tese, Doutor em Ciência Animal).
- SHAMIR, D., KEILA, S., WEINREB, M. A selevtive EP4 receptor antagonist abrogates

- the stimulation of osteoblast recruitment from bone marrow stromal cells by prostaglandin E2 in vivo and in vitro. *Bone*, v.34, p.157-162, 2004.
- SHIMEGI, S., YANAGITA, M., OKANO, H. et al. Physical exercise increases bone mineral density in postmenopausal women. *Endocr. J.*, v.41, p.49-56, 1994.
- SILVA, W.A.; COVAS, D.T.; PANEPUCCHI, R.A. et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v.21, p.661-669, 2003.
- SINAKI, M. Exercise and osteoporosis. *Arch. Phys. Med. Rehabil.*, v.70, p.220-229, 1989.
- SKERRY, T.M. The response of bone to mechanical loading and disuse: fundamental principles and influences on osteoblast/osteocyte homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.* v. 473, p.117-123, 2008
- SONNE, B., GALBO, H. Simultaneous determinations of metabolic and hormonal responses, heart rate, temperature and oxygen uptake in running rats. *Acta. Physiol. Scand.*, v.109, p.201-209, 1980.
- STAMLER, J.S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell*, v.78, p.931-936, 1994.
- STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.*, v.14, n.4, p.424-442, 1993.
- 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.
- TAMAKI, H., AKAMINE, T., GOSHI, N. et al. Effects of exercise training and etidronate treatment on bone mineral density and trabecular bone in ovariectomized rats. *Bone*, v.23, p.147-153, 1998.
- TATE, M.L.K., ADAMSON, J.R., TAMI, A.E. et al. The osteocytes. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* v.36, p.1-8, 2004.
- TEEGARDEN, D., PROULX, W.R., KERN, M. et al. Previous physical activity relates to bone mineral measures in young women. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.28, p.105-113, 1996.
- THOMPSON Jr., D.L., DePEW, C.L., ORTIZ, A. et al. Growth hormone and prolactin concentrations in plasma of horses: Sex differences and the effects of acute exercise and administration of growth hormone-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, v.72, p.2911-2918, 1994
- THORSEN, K., KRISTOFFERSSON, A.O., LERNER, H. et al. In situ microdialysis in bone tissue- stimulation of prostaglandin E2 release by weight-bearing mechanical loading. *J. Clin. Invest.*, v.98, n.11, p.2446-2449, 1996.
- TIDSWELL, H.K.; INNES, J.F.; AVERY, N.C. et al. High-intensity exercise induces structural, compositional and metabolic changes in cuboidal bones-findings from an equine athlete model. *Bone*, v.19, 2008 (no prelo).
- TOCCI, A.; FORTE, L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. *Hematol. J.*, v.4, p.92-96, 2003.
- TOMKINSON, A.; REEVE, J.; SHAW, R.W. et al. The death of osteocytes via apoptosis accompanies estrogen withdrawal in human bone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.82, n.9, p.3128-3135, 1997.
- TOMKINSON, A.; GEVERS, E.F.; WIT, J.M. et al. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, p.1243-1250, 1998.
- TSUSHIDA, H.; HASHIMOTO, J.; CRAWFORD, E.; et al. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defect in rats. *J. Orthop. Res.* v.21, p.44-53, 2003.

- TURNER, C.H.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Skeletal effects of estrogen. *Endocr. Rev.*; v.15, p. 275-300, 1994.
- TURNER, C.H.; TAKANO, Y.; OWAN, I. et al. Nitric oxide inhibitor L-NAME suppresses mechanically induced bone formation in rats. *Am. J. Physiol.* v.270, p.E634-639, 1996.
- TURNER, C.H.; OWAN, I.; JACOB, D.S. et al. Effects of nitric oxide synthase inhibitors on bone formation in rats. *Bone*, v.21, p.487-490.
- TURNER, C.H.; ROBLING, A.G. Exercise as an anabolic stimulus for bone. *Curr. Pharmaceut. Design.*, v.10, p.2629-2641, 2004.
- TUUKKANEN, J., PENG, Z., VÄÄNÄNEN, H.K. Effect of exercise on osteoporosis induced by ovariectomy in rats. *Calcif. Tissue Int.*, v.49, p.80, 1991.
- UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Rev. Immunol.*, v. 18, p.1-11, 2008.
- UMEMURA, Y.; NAGASAWA S.; HONDA, A. et al. High-impact exercise frequency per week or day for osteogenic response in rats. *J. Bone Miner. Metab.* v.26, p.456-460, 2008.
- UUSI-RASI, K., SIEVÄNEN, H., VUORI, I. et al. Associations of physical activity and calcium intake with bone mass and size in healthy women at different ages. *J. Bone Miner. Res.*, v.13, p.133-142, 1998.
- VALERIO, P.; PEREIRA, M.M.; GOES, A.M.; et al. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials.*; v.25, p.2941-2948, 2004.
- VALVERDE, P. Pharmacotherapies to Manage Bone Loss-Associated Diseases: A Quest for the Perfect Benefit-to-Risk Ratio. *Curr. Med. Chem.* v.15, p.284-304, 2008.
- VAN'T HOF, R.J.; RALSTON, S.H. Nitric oxide and bone, *Immunol.* v.103, p.255-261, 2001
- VOLTARELLI, J.C.; STRACIERI, A.B.P.L.; OLIVEIRA, M.C.B.; et al. Transplante de células-tronco hematopoéticas em doenças reumáticas – Parte 2: Experiência brasileira e perspectivas futuras. *Ver Bras Reumatol* v.45, p.301-12, 2005
- WALLACE, J. D., CUNEO, R.S., LUNDBERG, P.A. et al. Responses of markers of bone and collagen turnover to exercise, growth hormone (GH) administration, and GH withdrawal in trained adult male. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.85, p.124-133, 2000.
- WALLACE, L.; BOXALL, M.; RIDDICK, N. Influencing exercise and diet to prevent osteoporosis: lessons from three studies. *Br. J. Commun. Nurs.* v.9, p.544-549, 2004
- WANG, Y.; MARSDEN, P.A. Nitric oxide synthesis: biochemical and molecular regulation. *Curr. Opinion Nephrol. Hypert.*, v.4, p.12-22, 1995.
- WANG, Z.; GOH, J.; DE, S.D.; GE, Z. et al. Efficacy of bone marrow-derived stem cells in strengthening osteoporotic bone in a rabbit model. *Tissue Eng.* v.12, p.1753-61, 2006.
- WARREN, M.P., PERLROTH, N.E. The effects of intense exercise on the female reproductive system. *J. Endocrinol.*, v.170, p.3-11, 2001.
- WARREN, M.P., GHUA, A.T. Exercise-induced amenorrhea and bone health in the adolescent athlete. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* v. 1135, p.244-252, 2008.
- WEINREB, M., MACHWATE, M., SHIR, N. Et al. Expression of the prostaglandin E2 (PGE2) receptor subtype EP4 and its regulation by PGE2 in osteoblastic cell lines and adult rat bone tissue. *Bone*, v.28, p.275-281, 2001.

- WIESINGER, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system. *Prog. Neurobiol.*, v.64, p.365-391, 2001.
- WILLIAMS, G.R.; ROBSON, H.; SHALET, S.M. Thyroid hormone actions on cartilage and bone: interactions with other hormones at the epiphyseal plate and effects on linear growth. *J.Endocrinol.*, v. 157, p.391-403, 1998.
- WIMALAWANSA, S.J.; DE MARCO, G.; YALLAMPALLI, C. Nitric oxide donor alleviates ovariectomy-induced bone loss. *Bone*, v.18, p. 301-304, 1996.
- WIMALAWANSA, S.J.;CHAPA, M.T.; YALLAMPALLI, C. et al. Prevention of corticosteroid-induced bone loss with nitric oxide donor nitroglycerin in male rats. *Bone*, v.21, p.275-280, 1997.
- WINK, D.A.; HANBAUER, I., GRISHAM, M.B. et al. Chemical biology of nitric oxide: regulation e protective and toxic mechanisms. *Curr. Top. Cell Regull.*, v.34, p.159-187, 1996.
- WOLFGANG, W.; HO, A.D. Mesenchymal stem cell preparations – Comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev.* , v.3, p.239-248, 2007.
- WOLIN, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.*, v.0, p.1430-1442, 2000.
- WU, Q.Q., CHEN,Q. Mechanoregulation of chondrocyte proliferation, maturation and hypertrophy: Ion-channel dependent transduction of matrix deformation signals. *Exp. Cell Res.*, v. 256, p.383-391, 2000.
- YIN, T.; LI, L. The stem cell niches in bone. *J. Clin. Invest.* V, 116, p.1195-1200, 2006.
- YAMAGUCHI, A., KOMORI,T.,SUDA, T. Regulation os osteoblasts differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1.*Endocr. Rev.*, v.21, n.4, p.393-411, 2000.
- YEH, J.K., ALOIA, J.F., CHEN, M. et al. Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-1 in rats. *Am. J. Physiol.*, v.266, p.129-135, 1994.
- ZAMAN, G.; PITSILLIDES, A.A.; RAWLINSON, S.C. et al. Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.1123-31, 1999.
- ZANG, P.; HAMAMURA, K.; YOKOYA, H. A brief review of bone adaptation to unloading. *Geno. Prot. Bioinfo.*, v.6, p.4-7, 2008.
- ZHOU, S.; ZILBERMAN, Y.; WASSERMANN, K.; et al. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. *J. Cell Biochem. Suppl* v.36, p. 144-155, 2001.

ANEXOS DO CAPÍTULO 2

Anexo 1. Resultado da análise bromatológica da ração comercial, segundo o fabricante, consumida pelas ratas durante o período experimental.

| Componente | % |
|-----------------|-------|
| Cálcio | 1,40 |
| Extrato etéreo | 3,0 |
| Fósforo | 0,60 |
| Matéria fibrosa | 9,0 |
| Matéria mineral | 10,0 |
| Proteína bruta | 22,0 |
| Umidade | 12,50 |

Anexo 2. Composição mineral e vitamínica por kilo da ração comercial, segundo o fabricante, consumida pelas ratas durante o período experimental.

| Componente | Quantidade |
|-------------------|------------|
| Vitamina A | 25.200 UI |
| Vitamina D | 2.100 UI |
| Vitamina E | 60 mg |
| Vitamina K3 | 12,50 mg |
| Vitamina B1 | 14,40 mg |
| Vitamina B6 | 12 mg |
| Vitamina B12 | 126 µcg |
| Ácido nicotínico | 52,5 mg |
| Ácido pantotênico | 112 mg |
| Ácido fólico | 6 mg |
| Biotina | 0,26 mg |
| Colina | 1.100 mg |
| Ferro | 50 mg |
| Zinco | 60 mg |
| Cobre | 10 mg |
| Iodo | 2 mg |
| Manganês | 60 mg |
| Selênio | 0,05 mg |
| Cobalto | 1,50 mg |
| Metionina | 300 mg |
| Lisina | 100 mg |

Anexo 3. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise do úmero

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | |
| Grupo | 5 | 549,73 | 10,05 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 54,69 | - | |

Anexo 4. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise do úmero

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 744,01 | 18,89 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 39,37 | - | |

Anexo 5. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise da tíbia

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 547,55 | 13,48 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 40,62 | - | |

Anexo 6. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise da tíbia

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 925,19 | 23,04 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 40,27 | - | |

Anexo 7. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da epífise do fêmur

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 312,9 | 7,09 | 0,0003 |
| Erro | 23 | 44,12 | - | |

Anexo 8. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise do fêmur

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 908,47 | 15,98 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 56,85 | - | |

Anexo 9. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da cabeça do fêmur

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 698,74 | 13,07 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 53,44 | - | |

Anexo 10. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular das vértebras cervicais

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 231,11 | 7,48 | 0,0003 |
| Erro | 23 | 30,90 | - | |

Anexo 11. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular das vértebras torácicas 1-7

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 223,93 | 10,08 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 22,21 | - | |

Anexo 12. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular das vértebras torácicas 8-13

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 250,45 | 8,77 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 28,53 | - | |

Anexo 13. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular das vértebras lombares 1-3

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 320,42 | 4,94 | 0,0003 |
| Erro | 23 | 64,88 | - | |

Anexo 14. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular das vértebras lombares 4-6

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 249,06 | 9,85 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 25,26 | - | |

Anexo 15. Análise de variância da espessura da cortical das vértebras cervicais

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 3728,2 | 11,7 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 318,39 | - | |

Anexo 16. Análise de variância da espessura da cortical das vértebras torácicas 1/7

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 2194,5 | 9,12 | 0,0001 |
| Erro | 23 | 240,44 | - | |

Anexo 17. Análise de variância da espessura da cortical das vértebras torácicas 8/13

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 4355,4 | 9,8 | 0,0001 |
| Erro | 33 | 443,53 | - | |

Anexo 18. Análise de variância da espessura da cortical das vértebras lombares 1/3

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 4372,3 | 14,95 | 0,0001 |
| Erro | 33 | 292,32 | - | |

Anexo 19. Análise de variância da espessura da cortical das vértebras lombares 4/6

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 3710,5 | 9,44 | 0,0001 |
| Erro | 33 | 393,08 | - | |

Anexo 20. Análise de variância da espessura (□m) do osso nasal

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 28 | - | - | - |
| Grupo | 5 | | | 0,0001 |
| Erro | 33 | | - | |

ANEXOS DO CAPÍTULO 3

Anexo 21. Análise de variância do MTT aos 7d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,05255 | 9,52 | 0,0007 |
| Erro | 12 | 0,005522 | - | |

Anexo 22. Análise de variância do MTT aos 14d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,1153 | 25,6 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,004503 | - | |

Anexo 23. Análise de variância do MTT aos 21d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,06105 | 11,88 | 0,0003 |
| Erro | 12 | 0,005137 | - | |

Anexo 24. Análise de variância do FA aos 7d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,1317 | 10,09 | 0,0006 |
| Erro | 12 | 0,01360 | - | |

Anexo 25. Análise de variância do FA aos 14d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,05872 | 19,24 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,003051 | - | |

Anexo 26. Análise de variância do FA aos 21d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,06807 | 47,45 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,001435 | - | |

Anexo 27. Análise de variância do Colágeno aos 7d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,002520 | 53,81 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,0000468 | - | |

Anexo 28. Análise de variância do Colágeno aos 14d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,002721 | 58,95 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,0000461 | - | |

Anexo 29. Análise de variância do Colágeno aos 21d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 0,0001829 | 1,16 | 0,3831 |
| Erro | 12 | 0,0001577 | - | |

Anexo 30. Análise de variância do número de nódulos de mineralização aos 7d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 77,496 | 213,72 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,3626 | - | |

Anexo 31. Análise de variância do número de nódulos de mineralização aos 14d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 62,717 | 41,69 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 1,504 | - | |

Anexo 32. Análise de variância do número de nódulos de mineralização aos 21d de diferenciação

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 17 | - | - | - |
| Grupo | 5 | 35,101 | 112,95 | 0,0001 |
| Erro | 12 | 0,3108 | - | |

ANEXOS DO CAPÍTULO 4

Anexo 33. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da cabeça do fêmur

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 21 | - | - | |
| Grupo | 3 | 907.81 | 8.0 | 0,0001 |
| Erro | 18 | 112.88 | - | |

Anexo 34. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular do colo femoral

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 21 | - | - | |
| Grupo | 3 | 634.26 | 9.46 | 0,001 |
| Erro | 18 | 67.06 | - | |

Anexo 35. Análise de variância da porcentagem de osso trabecular da metáfise distal do femor

| Fontes de variação | Graus de liberdade | Quadrado médio | Teste F | Significância |
|--------------------|--------------------|----------------|---------|---------------|
| Total | 21 | - | - | |
| Grupo | 3 | 540.48 | 7.6 | 0,001 |
| Erro | 18 | 70.71 | - | |