



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA

Sarah Maria Barneze Costa

Efeito do estrógeno (E2) e da Triiodotironina (T3) na síntese proteica
de RANKL e TNF- α em células osteoblásticas derivadas do tecido
adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em
Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Adjunta Célia Regina Nogueira

Botucatu
2017

Sarah Maria Barneze Costa

Efeito do estrógeno (E2) e da Triiodotironina (T3) na síntese proteica de RANKL e TNF- α em células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Fisiopatologia em Clínica Médica

Orientadora: Profa. Adjunta *Célia Regina Nogueira*

Botucatu
2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Costa, Sarah Maria Barneze.

Efeito do estrógeno (E2) e da Triiodotironina (T3) na síntese proteica de RANKL e TNF- α em células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo / Sarah Maria Barneze Costa. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu
Orientador: Célia Regina Nogueira
Capes: 40101002

1. Estrogênios. 2. Fator de necrose tumoral alfa. 3. Osteoclastos. 4. Triiodotironina. 5. Células-tronco hematopoéticas. 6. Citocinas.

Palavras-chave: Células-tronco mesenquimais; Estrógeno; RANKL; TNF- α ; Triiodotironina.

Epígrafe

“Nós não vemos o que vemos, nós vemos o que somos. Só veem as
belezas do mundo, aqueles que têm belezas dentro de si.”

Rubem Alves

Agradecimientos

- Agradeço a **Deus** por ter me dado à vida, por suas bondades e misericórdias.

- Agradeço a minha **família** pela união e carinho de todos.

- Agradeço aos meus **amigos** pela ajuda, conselhos e companheirismo.

- Agradeço a minha **orientadora** por sua dedicação e incentivo a pesquisa científica, bem como apoio nas fases de execução do trabalho.

- Agradeço ao meu **grupo de pesquisa** pelos trabalhos realizados e apoio quando precisei.

- Agradeço a **UNESP, campus de Botucatu**, pelo apoio e centro especializado em formação do profissional de pós-graduação.

- Agradeço ao programa de **Fisiopatologia em Clínica Médica** pela disponibilidade em estudar e aprofundar meus conhecimentos.

- Agradeço ao **corpo docente da pós-graduação** pelos ensinamentos nas disciplinas/cursos.

- Agradeço a **UNIPEX** pelo suporte oferecido para a realização das técnicas e infraestrutura, seja pelo laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células.
- Agradeço aos **funcionários da UNIPEX** pela ajuda e companheirismo.
- Agradeço aos funcionários da **biblioteca** pelos serviços prestados.
- Agradeço ao **órgão de fomento FAPESP** pela disponibilidade da bolsa de mestrado (número do processo: 2014/15529-0) e realização da pesquisa científica no Estado de São Paulo.
- Agradeço ao **postinho da FAPESP** pelas informações fornecidas e aos seus funcionários.
- Agradeço ao **Hospital das Clínicas de Botucatu** pela instituição e coleta de dados dos pacientes para o desenvolvimento do projeto.
- Agradeço aos **pacientes do HC-FMB** que aceitaram a participação no projeto.
- Agradeço ao **Departamento de Patologia**, em que o utilizei para fins da

pesquisa, no laboratório de Cultura de Células.

- Agradeço aos **médicos, residentes e enfermeiros** da equipe de cirurgia bariátrica por serem ferramenta para a obtenção dos dados dos pacientes.

Sumário

Resumo	1
Abstract	4
1. INTRODUÇÃO	7
2. HIPÓTESE	14
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivos Geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. PACIENTES E MÉTODOS	18
4.1 Estudo in vitro.....	19
4.1.1 Obtenção de tecido adiposo	19
4.1.2 Processamento do tecido e estabelecimento da cultura de CTMs	20
4.1.3 Caracterização das CTMs pela citometria de fluxo.....	21
4.1.4 Diferenciação das CTMs em osteoblastos.....	22
4.1.5 Tratamento hormonal com diferentes doses de E2 e T3	22
4.1.6 Ensaio de FA e Osteocalcina	23
4.1.7 Análise da matriz mineralizada óssea em diferentes concentrações de E2 e T3.....	23
4.1.8 Western Blot.....	24
Análise estatística dos dados	25
5. RESULTADOS	26
5.1 Aspectos morfológicos das CTMs derivadas do tecido adiposo	27

5.2	Caracterização das CTMs pela citometria de fluxo.....	28
5.3	Coloração com vimentina em CTMs	29
5.4	Diferenciação osteogênica.....	30
5.5	Presença da FA e osteocalcina após diferenciação em osteoblastos	31
5.6	Matriz mineralizada óssea nos diferentes dias de osteoindução.....	33
5.7	Concentração infrafisiológica de E2 diminuiu a matriz mineralizada e aumentou em concentração fisiológica nos osteoblastos.....	35
5.8	Concentrações fisiológica e suprafisiológica de T3 diminuíram a quantidade de matriz mineralizada.....	36
5.9	Diferentes concentrações de E2 aumentaram a síntese proteica de RANKL e TNF- α nos osteoblastos derivados de CTMs.....	37
5.10	Concentração suprafisiológica de T3 aumentou os níveis proteicos de RANKL e diminuiu a síntese proteica de TNF- α nos osteoblastos derivados de CTMs	39
6.	DISCUSSÃO	41
7.	CONCLUSÃO	49
8.	REFERÊNCIAS	51
9.	APÊNDICE.....	63

Resumo

A regulação da remodelação óssea ocorre por meio de fatores locais e sistêmicos. Entre os fatores locais estão as citocinas: *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL), presente nos osteoblastos, e *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B* (RANK), presente nos osteoclastos, além de outras citocinas como o *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- α) que podem agir no processo de deposição e/ou reabsorção óssea *in vivo*. Entre os fatores sistêmicos que participam da remodelação óssea estão os hormônios estrógeno (E2) e triiodotironina (T3). O objetivo do trabalho foi verificar a ação do E2, infrafisiológico (simulando a menopausa) e T3, suprafisiológico (simulando hipertireoidismo) em osteoblastos humanos derivados de células troncos mesenquimais (CTMs) na síntese proteica de RANKL e TNF- α . Os osteoblastos foram incubados por 72 horas na presença de E2 em dose fisiológica (E2F/10⁻⁸M) e infrafisiológica (E2I/10⁻⁹M), e T3 em dose fisiológica (T3F/10⁻⁹M) e suprafisiológica (T3S/10⁻⁸M), e quantificada a matriz mineralizada óssea e a síntese proteica de RANKL e TNF- α por Western Blot. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste de variância ANOVA complementada pelo teste de Tukey, sendo o nível de significância considerado p<0,05. O tratamento de E2 em dose E2F (1,96±0,48; p<0,05) e E2I (3,18±0,31; p<0,001) elevou a síntese proteica de RANKL comparado ao controle (C) (1,00±0,32), e de TNF- α em dose de E2F (3,61±0,45; p<0,05) e E2I (2,45±0,07; p<0,05) também aumentou em relação ao C (1,13±0,19). Assim como o E2, o T3 elevou os níveis proteicos de RANKL em T3F (1,18±0,10; p<0,05) e T3S (1,14±0,004; p<0,05) comparado ao controle (1,00±0,02), porém, TNF- α diminuiu em dose de T3S (0,82±0,09; p<0,05) relacionado ao T3F (1,00±0,09) e C (0,99±0,04). Com isso, E2I diminuiu a matriz mineralizada óssea e aumentou a síntese de ambas as proteínas estudadas, o que nos leva a especulação de que a reabsorção óssea observada na menopausa seja via RANKL e TNF- α . Por outro lado, na mimetização de hipertireoidismo com o T3S, observamos diminuição da matriz mineralizada óssea, supressão da síntese proteica de TNF- α e aumento de RANKL, o que nos leva a inferir que o mecanismo de reabsorção óssea no hipertireoidismo seja via RANKL.

Palavra chave: Células-tronco mesenquimais; Triiodotironina; Estrógeno; RANKL; TNF- α e osteoblastos.

Abstract

The regulation of bone remodeling is intermediated by local and systemic factors. The cytokines are among the local factors: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand (RANKL), present in osteoblasts, and Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B (RANK), present in osteoclasts, in addition to other cytokines such as Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) that can act in the process of bone deposition and/or resorption in vivo. Hormones are among the systemic factors involved in bone remodeling, estrogen (E2) and triiodothyronine (T3). The aim of the study was to verify the action of E2, infraphysiological (simulating menopause) and T3, supraphysiological (simulating hyperthyroidism) in human osteoblasts derived from mesenchymal stem cells (CTMs) in the protein synthesis of RANKL and TNF- α . Osteoblasts were incubated during 72 hours in the presence of E2 at physiological dose (E2F/10⁻⁸M) and infraphysiological (E2I/10⁻⁹M), and T3 at physiological (T3F/10⁻⁹M) and supraphysiological (T3S/10⁻⁸M) and quantified the bone mineralized matrix and the protein synthesis of RANKL and TNF- α by Western Blot. Statistical analysis of the data was performed by the ANOVA variance test complemented by the Tukey test, and the significance level was considered p<0.05. The treatment of E2F in E2F dose (1.96 \pm 0.48, p<0.05) and E2I (3.18 \pm 0.31; p <0.001) increased RANKL protein synthesis compared to control (C) (1.00 \pm 0.32), and TNF- α in the dose of E2F (3.61 \pm 0.45; p<0.05) and E2I (2.45 \pm 0.07; p <0.05) also increased in relation to C (1.13 \pm 0.19). As with E2, T3 increased RANKL protein levels in T3F (1.18 \pm 0.10, p <0.05) and T3S (1.14 \pm 0.004; p <0.05) compared to control (1, 00 \pm 0.02), but TNF- α decreased in dose T3S (0.82 \pm 0.09; p <0.05) related to T3F (1.00 \pm 0.09) and C (0, 99 \pm 0.04). Thus, E2I decreased the bone mineralized matrix and increased the synthesis of both proteins studied which leads to speculation that bone resorption observed at menopause by RANKL and TNF- α pathway. On the other hand, in the mimicry of hyperthyroidism with T3S, we observed a reduction of the bone mineralized matrix, suppression of TNF- α protein synthesis and increase of RANKL, which leads us to infer that the mechanism of action for bone resorption in hyperthyroidism is by RANKL.

Keywords: Mesenchymal stem cells; Triiodothyronine; Estrogen; RANKL; TNF- α and osteoblasts.

1. Introdução

O tecido ósseo apresenta uma considerável atividade metabólica que mantém sua contínua remodelação, envolvendo a remoção de osso mineralizado pelos osteoclastos, seguido pela formação de matriz óssea pelos osteoblastos [1]. Os osteoblastos são derivados de células-tronco mesenquimais (CTMs) e os osteoclastos têm origem da diferenciação de seus precursores a partir de progenitores hematopoiéticos, continuando sua evolução até osteoclastos maduros, processo conhecido como osteoclastogênese [2]. Após o processo de diferenciação, os osteoblastos desempenham papel na formação e na manutenção do sistema esquelético, não apenas por sintetizar a matriz óssea, mas por exercer importante controle na atividade dos osteoclastos [3]. A regulação da remodelação óssea ocorre por meio de fatores locais e sistêmicos, que exercem seus efeitos sobre a replicação de células indiferenciadas, no recrutamento e na função das células ósseas [4]. Os principais reguladores sistêmicos envolvidos na regulação da remodelação óssea incluem o hormônio da paratireoide (PTH), calcitriol, hormônio do crescimento, glicocorticoides, hormônios tireoidianos (HTs) e hormônios sexuais [5]. Fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), prostaglandinas, fator de transformação do crescimento beta (TGF- β), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e citocinas também estão envolvidos neste processo [6]. A associação entre o *status* tireoidiano e o risco de desenvolver osteoporose é comprovada demonstrando que o hipertireoidismo não tratado diminui a densidade mineral óssea [7, 8] e aumenta o risco de fraturas [9], uma consequência provável do efeito estimulatório dos HTs e do *turnover* mineral nesse tecido [10]. Além disso, é comprovado que os baixos níveis de estrógeno (E2) da menopausa induzem a

osteoporose [11]. Entre os fatores locais que participam dessa regulação estão as citocinas do sistema *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B* (RANK) e *Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa B Ligand* (RANKL) que mostram o processo de reabsorção e formação acoplados, tendo como objetivo manter a integridade esquelética [1]. Esses receptores, RANK/RANKL, mudam a expressão dos genes e têm auxiliado a esclarecer o padrão de sinalização entre células estromais e osteoclastos, sendo a interação entre eles tem um papel importante na promoção da diferenciação e ativação osteoclástica [12]. O RANKL é produzido por precursores de osteoblastos e liberado na matriz óssea ou permanecendo na membrana dessas células [13]. Já o RANK é um receptor presente em precursores osteoclásticos que, ao se ligar com RANKL, ativa a diferenciação dos precursores à osteoclastos maduros e estimula a osteoclastogênese [14], assim, esta interação propicia a reabsorção óssea. Por outro lado, a deficiência do RANKL leva a osteoporose [15] (Figura 1).

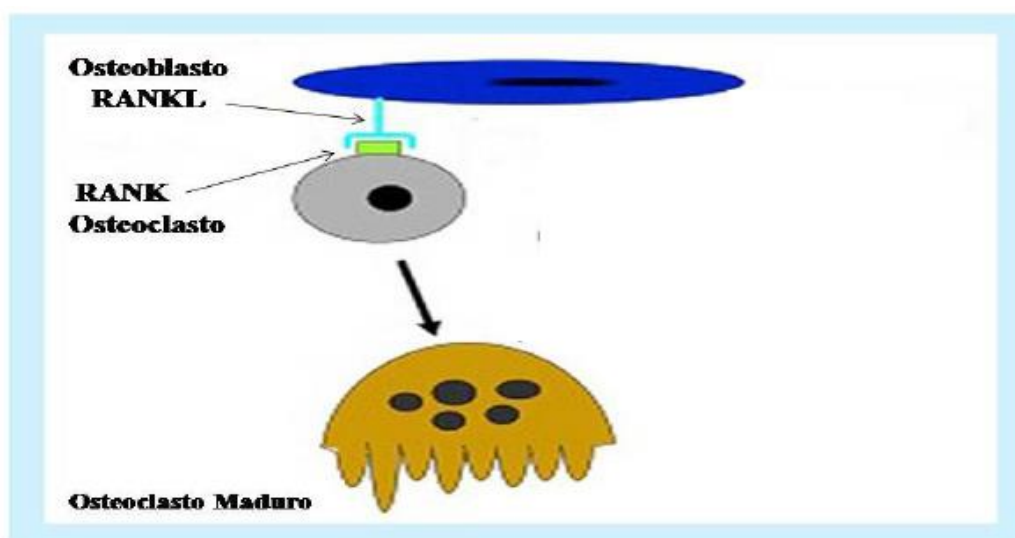


Figura 1. Esquema geral do sistema RANK/RANKL. RANKL presente no osteoblasto; RANK presente no osteoclasto. A ligação entre RANKL e RANK permite a formação de osteoclasto maduro [16].

Ainda existe outra citocina, *Tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) que pode agir na diferenciação dos osteoclastos, realizando sua função nas células osteoblásticas [17]. Essa citocina participa ativamente dos processos pró-inflamatórios e está presente nas doenças ósseas como a osteoporose [18].

A citocina TNF- α é produzida por diversos tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos e osteoblastos, estando relacionada à reabsorção óssea [19-21]. De acordo com alguns estudos, o TNF- α aumenta a atividade osteoclastogênica, promovendo uma maior reabsorção óssea [19, 22, 23]. De acordo com Kitamura *et al.* [24], o TNF- α age em sinergismo com RANKL na indução da osteoclastogênese. Os HTs triiodotironina (T3) e tiroxina (T4) possuem efeito tanto sobre a reabsorção como sobre a formação óssea sendo, portanto, importantes para a manutenção da integridade do esqueleto [25]. Em casos de hipertireoidismo não há anormalidades nos níveis de cálcio, porém superfícies de reabsorção trabecular e perda aumentada da cortical óssea estão presentes. Além disso, o T3 exerce ação nos osteoblastos via receptores nucleares para estimular a reabsorção óssea [26]. Estudos mostram que a reabsorção óssea osteoclástica estimulada pelo T3 ocorre na presença de osteoblastos, mas não em sua ausência, o que demonstra a dependência de RANKL para que o processo de diferenciação induzido pelo hormônio ocorra [27, 28]. Várias proteínas osteoblásticas são estimuladas pelo HT, tais como a fosfatase alcalina (FA) e a osteocalcina [29]. Embora o HT aumente a atividade de osteoblastos e osteoclastos *in vivo* e em *in vitro*, pouco é

conhecido sobre seus efeitos na transcrição de genes alvo nestas células [30]. Além disso, pouco se conhece sobre quais fatores moleculares são essenciais para a regulação da função do osteoblasto [31]. Entretanto, são conhecidos alguns fatores controladores e mediadores fisiológicos da diferenciação desta célula, entre eles o TGF- β , as BMPs, o PTH e o E2 [32]. A presença de níveis adequados de E2 no organismo garante a supressão de certas citocinas que induzem a proliferação e a diferenciação de osteoclastos [33]. O aumento no número de osteoclastos está associado às citocinas responsáveis pela sua gênese: RANK, RANKL, osteoprotegerina, TNF- α , interleucina 1 (IL-1), 6 (IL-6) e 11 (IL-11), fator estimulante de colônias de macrófagos, que são direta ou indiretamente suprimidas ou reguladas pelo E2 [34]. Nos osteoblastos, o E2 regula a expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I, a FA, osteopontina, osteocalcina e osteonectina. Da mesma forma que os esteroides sexuais, os HTs também estimulam a expressão de genes nos osteoblastos para a produção de colágeno, osteocalcina e IGFs que são importantes para a aposição óssea [34, 35]. A deficiência de E2 conforme D'amelio *et.al.* [36] demonstrou em ratos o estímulo da formação de osteoclastos por duas vias: aumento na produção de TNF- α e RANKL e elevação no número de células precursoras de osteoclastos favorecendo o processo de reabsorção óssea. Muitos estudos são realizados com o objetivo de verificar a ação hormonal sobre o metabolismo do tecido ósseo. Essas pesquisas são desenvolvidas pelo cultivo de células, animais ou humanas com características cancerígenas. Para o cultivo dessas células sem fenótipos cancerígenos é possível utilizar uma cultura primária de células humanas ou animais. Entretanto é um procedimento

complexo, uma vez que envolve a obtenção de tecido sadio para que a cultura possa ser realizada [11]. Alguns estudos mostram que o tecido adiposo contém uma população de células que se diferenciam em vários tipos, incluindo adipócitos, osteoblastos, mioblastos e condroblastos [37]. Mais recentemente, células-tronco com potencial de múltipla linhagem foram isoladas do tecido adiposo humano. Estas células, chamadas de células-tronco multipotentes derivadas de adipócitos, foram estabelecidas em cultura e mantiveram suas características ao longo de várias passagens [38]. As células progenitoras dos osteoblastos, assim como: os fibroblastos, as células reticulares, as células dos vasos sanguíneos e os adipócitos são originados a partir de CTMs [39]. Nosso grupo vem realizando a técnica de extração e cultivo de CTMs derivadas do tecido adiposo humano e a implantação dessa técnica possibilitou a diferenciação osteogênica servindo como um modelo de estudo para analisar o mecanismo de ação do HT e E2 em células osteoblásticas. Baseado nisso, gerou a dissertação de mestrado intitulado “Implantação da técnica para diferenciação osteoblástica a partir de CTMs humanas derivadas do tecido adiposo”. Em trabalho prévio, mostramos que o T3 não aumentou a expressão de RANKL em células de linhagem osteoblástica osteosarcoma de rato ROS 17/2.8 e em células humanas MG-63, a associação de T3 e E2 promoveu o aumento da expressão da FA e diminuiu a expressão de RANKL [11]. Poucos estudos foram realizados verificando se o T3 altera a expressão de RANKL e há controvérsia em seus resultados, o trabalho de Miura *et al.* [40] mostra que o T3 aumenta a expressão de RANKL enquanto Kanatani *et al.* [41] mostra que o T3 não altera a expressão do RANKL. Desse modo, o emprego de osteoblastos

humanos, originados a partir de CTMs de tecido adiposo, é um modelo de estudo que produz resultados para compreensão do que ocorre *in vivo*, podendo trazer benefícios para a clínica médica [42]. Com isso, a cultura de osteoblasto permitirá avaliar a influência dos hormônios T3 e E2 e entender melhor o mecanismo de ativação osteoclástica, sendo as células não neoplásicas.

2. Hipótese

Visto que na literatura as doses suprafisiológica de T3, simulando o hipertireoidismo, e infrafisiológica de E2, simulando a menopausa, tem ação deletéria sobre o tecido ósseo humano, a hipótese do trabalho é que essas doses modulam a síntese proteica de RANKL e TNF- α em osteoblastos durante 72 horas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Para tanto, o objetivo geral é analisar a síntese proteica de RANKL e TNF- α na presença de dose infrafisiológica de E2 e dose suprafisiológica de T3 em células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo humano.

3.2 Objetivos específicos

- λ Obter CTMs a partir do tecido adiposo de pacientes submetidas à abdominoplastia ou cirurgia bariátrica.
- λ Caracterizar as CTMs por expressão de marcadores do estado indiferenciado por meio de citometria de fluxo com anticorpos específicos para cada marcador e promover a diferenciação das CTMs em osteoblastos.
- λ Caracterizar os osteoblastos por análise quantitativa morfométrica e qualitativa colorimétrica utilizando a matriz mineralizada, FA e osteocalcina.
- λ Tratar as culturas de osteoblastos com os hormônios (dose fisiológica e suprafisiológica de E2, e dose fisiológica e infrafisiológica de T3).
- λ Verificar a quantidade de matriz mineralizada óssea e a síntese proteica de marcadores da estimulação osteoclástica: RANKL e TNF- α .

4. Pacientes e Métodos

4.1 Estudo in vitro

4.1.1 Obtenção de tecido adiposo

O tecido adiposo foi obtido a partir de procedimento cirúrgico, de 03 pacientes do sexo feminino, submetidas à cirurgia de abdominoplastia ou cirurgia bariátrica realizada no Hospital das Clínicas de Botucatu. As pacientes que concordaram em participar da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice I). Como critérios de inclusão, participaram do estudo mulheres menores de 50 anos de idade que comprovaram um *status* hormonal normal para os exames de hormônio estimulante da tireoide (TSH) e T4 livre. Na tabela 01 estão representados os exames hormonais e a idade de cada paciente.

Tabela 1. Status hormonal e idade das pacientes incluídas na pesquisa.

Pacientes	Idade	TSH (μ IU/mL)	T4 livre (ng/dL)
P01	27a	1,12	0,890
P02	37a	1,24	1,18
P03	42a	1,75	0,93

Valores de Referência TSH: (0,4 a 4,5 μ IU/mL) / T4 livre: (0,7 a 1,8ng/dl).

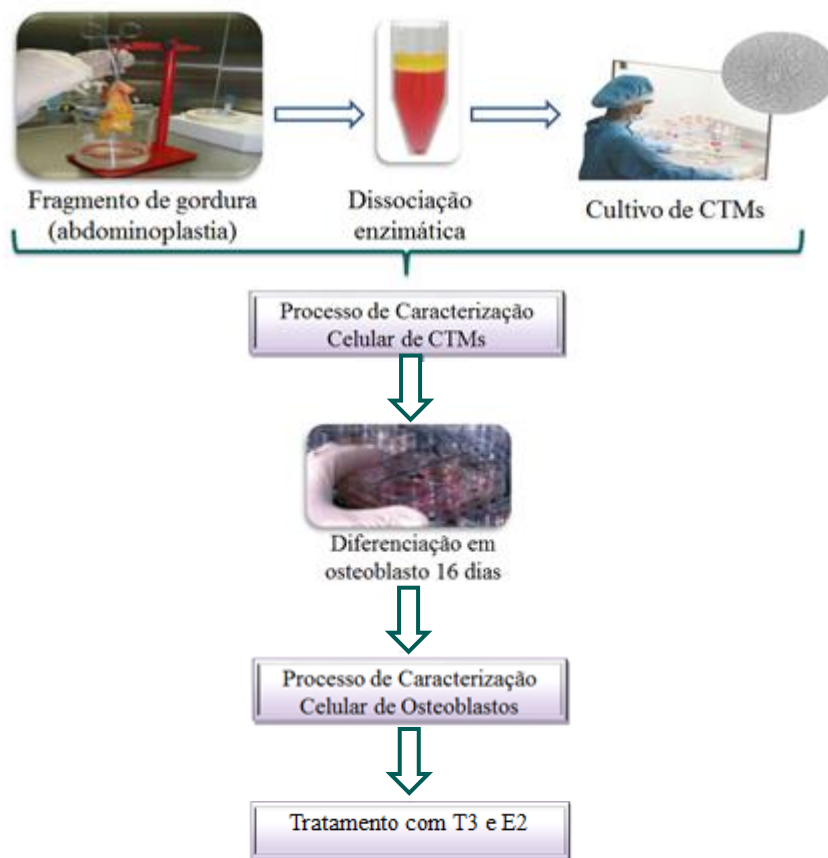


Figura 2. Delineamento do estudo

4.1.2 Processamento do tecido adiposo e estabelecimento da cultura de CTMs

Foi coletado 2 gramas de tecido adiposo de cada paciente, e esse tecido foi transportado ao laboratório em meio *Dulbecco's Modified Essential Medium* (DMEM) (Gibco®), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco®), 50µg/mL de gentamicina (Gibco®) e 0,3µg/mL fungizona (Gibco®). Após transporte ao laboratório, foi realizada a lavagem do tecido em PBS estéril para remoção de todo sangue visível. Esse tecido foi pesado e picotado em fragmentos menores com auxílio de pinça e tesoura estéreis, sendo submetido ao processo de

dissociação enzimática. As células foram semeadas em concentrações constantes de 1.10^4 células/mL em meio DMEM com antibiótico-antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina) (Gibco®) e L-glutamina, em placas de 06 poços (Falcon®). As placas foram incubadas a 37°C, com umidade atmosférica controlada a 5% de CO₂. As culturas foram monitoradas diariamente por microscopia invertida (Zeiss, Oberkochen, Germany) e o meio trocado a cada 48 horas.

4.1.3 Caracterização das CTMs pela citometria de fluxo

Atingida a confluência de 80% das células, estas foram submetidas à caracterização celular pela citometria de fluxo para comprovação do cultivo de CTMs e concomitantemente, outras CTMs permaneceram em cultura para a diferenciação em osteoblastos. Os marcadores positivos de superfície celular utilizados na caracterização das CTMs foram CD90, CD105, Stro-1, Nanog e Sox-2, bem como os marcadores negativos CD45RO e CD117 [43]. Cada anticorpo foi incubado com as CTMs e ressuspensas na concentração entre 5.10^5 e 5.10^6 células/mL, sendo o volume aspirado de 100µL com taxa de fluxo de 5µL/min, detectado com o programa de leitura *Cell Quest®* (Becton Dickinson). As CTMs também foram coradas com vimentina, em que foram cultivadas em lamelas redondas (12 x 0,11mm) para isso. Primeiro, as amostras foram fixadas com acetona durante 10 minutos, e depois lavadas com PBS em gelo e incubadas durante 30 minutos em solução de BSA a 1%. Após este período, as células foram incubadas com anticorpos específicos

durante 1 hora. Para marcação de CTMs, utilizou-se anti-vimentina (Ratinho Monoclonal - Clone Vim 3B4-Dako Dinamarca). Após 1 hora, as células foram lavadas novamente com PBS e incubadas com um anticorpo secundário (DyLight) durante 1 hora. Por fim, as células foram incubadas durante 1 minuto com DAPI para coloração nuclear e a imunofluorescência foi visualizada utilizando um microscópio Olympus (UTV063XC / SNJ41986).

4.1.4 Diferenciação das CTMs em osteoblastos

Para a indução da diferenciação das CTMs em osteoblastos humanos foi utilizado meio DMEM completo com 10% de SFB acrescido de $0,1\mu\text{M}$ de dexametasona (Sigma®), $50\mu\text{M}$ de ácido ascórbico (Gibco®) e 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma®) durante 7, 16 e 21 dias [44].

4.1.5 Tratamento hormonal com diferentes doses de E2 e T3

Após o período de diferenciação, os osteoblastos foram submetidos a uma depleção hormonal durante 12 horas e mantidos em meio DMEM suplementado com SFB *Charcoal Stripped* (Sigma®). As células foram divididas em grupos tratados com doses de E2 (dose fisiológica: $\text{E2F}/10^{-8}\text{M}$ e dose infra-fisiológica: $\text{E2I}/10^{-9}\text{M}$) e T3 (dose fisiológica: $\text{T3F}/10^{-9}\text{M}$ e dose supra-fisiológica: $\text{T3S}/10^{-8}\text{M}$), além de osteoblastos na ausência de tratamento como controle (C). Os

tratamentos foram realizados em triplicata no tempo de 72 horas, sendo o meio de cultivo substituído a cada 24 horas.

4.1.6 Ensaio de FA e Osteocalcina

Após 16 dias da osteoindução, foi coletado 2 mL do meio de cultura e realizou-se o ensaio de FA e osteocalcina pelo método de ensaio imunométrico, de acordo com as instruções do fabricante (Cat. No. KAQ1381, LincoResearch Inc., EUA). A FA também foi corada com a pastilha Sigmafast BCIP®/NBT e como controle negativo da osteoindução foi utilizado o meio de cultura das CTMs indiferenciadas.

4.1.7 Análise da matriz mineralizada óssea em diferentes concentrações de E2 e T3

Após 16 dias de osteoindução e tratamento com diferentes concentrações de E2 e T3, os osteoblastos foram lavados com PBS 1X e sua monocamada de células foi fixada com paraformaldeído durante 20 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas com água destilada e coradas com *Alizarin S Red* (Sigma®) durante 5 minutos à temperatura ambiente para coloração da matriz mineralizada. Posteriormente, as células foram lavadas 5X com água destilada para remover o corante. A diferenciação celular foi avaliada pela presença de matriz mineralizada óssea e o efeito das diferentes doses de E2 e T3 sobre sua formação. Quinze campos aleatórios de cada poço foram

fotografados com microscópio de contraste de fase e as imagens foram analisadas usando o programa *Image J*. As imagens foram convertidas em imagens de fundo branco a alto contraste para visualizar a matriz mineralizada e marcar com área percentual do campo.

4.1.8 Western Blot

A síntese proteica de RANKL e TNF- α foi analisada por Western Blot. As proteínas foram lisadas com tampão Ripa (Radioimmunoprecipitation assay: 150 mM cloreto de sódio, 1% NP-40 ou Triton X-100, 0,5% deoxicolato de sódio, 0,1% SDS e 50 mM Tris, pH 8,0) e o homogeneizado centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 12000 rpm. A quantificação foi realizada segundo o método BRADFORD, de acordo com o protocolo padronizado em nosso laboratório, e utilizaram-se as amostras contendo 25ng de proteína. A corrida foi realizada em gel de poliacrilamida na concentração de 12% de acordo com o peso molecular das proteínas analisadas. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini Trans-Blot utilizando-se tampão de transferência. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de bloqueio (leite em pó desnatado 0,5% diluído em solução basal: Tris-HCl 1M pH 8,0, NaCl 2,5M e Tween 20) à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário nas concentrações: anti-RANKL 1:5000 e TNF- α 1:1000 sob agitação constante em temperatura de 2 a 8°C *overnight*. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi

incubada com o anticorpo secundário, conjugados a peroxidase (IgG Anti-Mouse ou anti-rabbit) utilizados na titulação de 1:1000 e 1:10000, respectivamente. Por fim, a imunodeteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (EnhancerChemi-Luminescence, AmershamBiosciences, NJ-USA). As análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo software Carestream Molecular Imaging 5.0 (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

4.1.9 Análise Estatística dos dados

Os dados foram expressos em média ($n=3$) \pm desvio padrão. Foi utilizada a análise de variância ANOVA, complementada com o teste de *Tukey*. As análises foram feitas pelo programa *GraphPad Prism 7*. O nível de significância considerado foi de $p<0,05$.

5. Resultados

5.1 Aspectos morfológicos das CTMs derivadas do tecido adiposo

A Figura 3A demonstra as CTMs após a fixação das células e antes da primeira troca de meio de cultura, podendo observar os depósitos de gordura após a dissociação enzimática. A Figura 3B apresenta as células na segunda passagem e na ausência dos depósitos de gordura, apresentando morfologia fibroblástica, característica das CTMs.

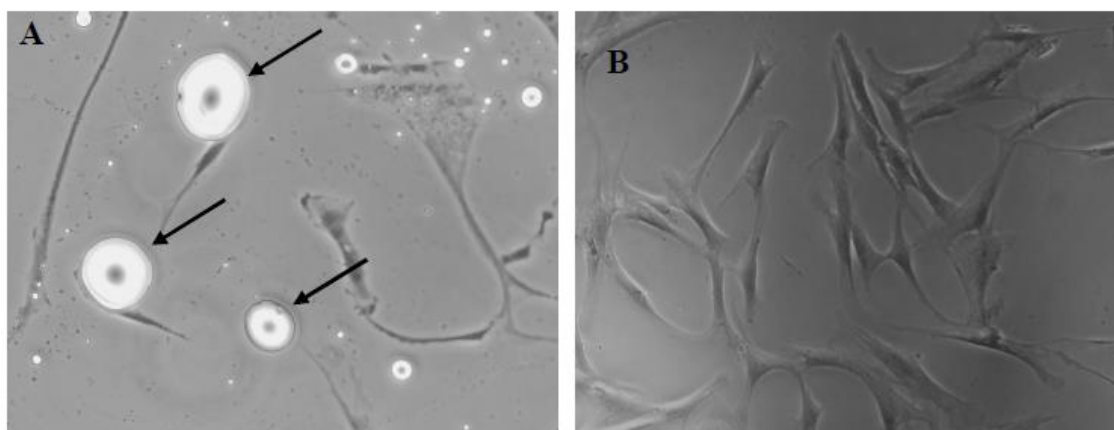
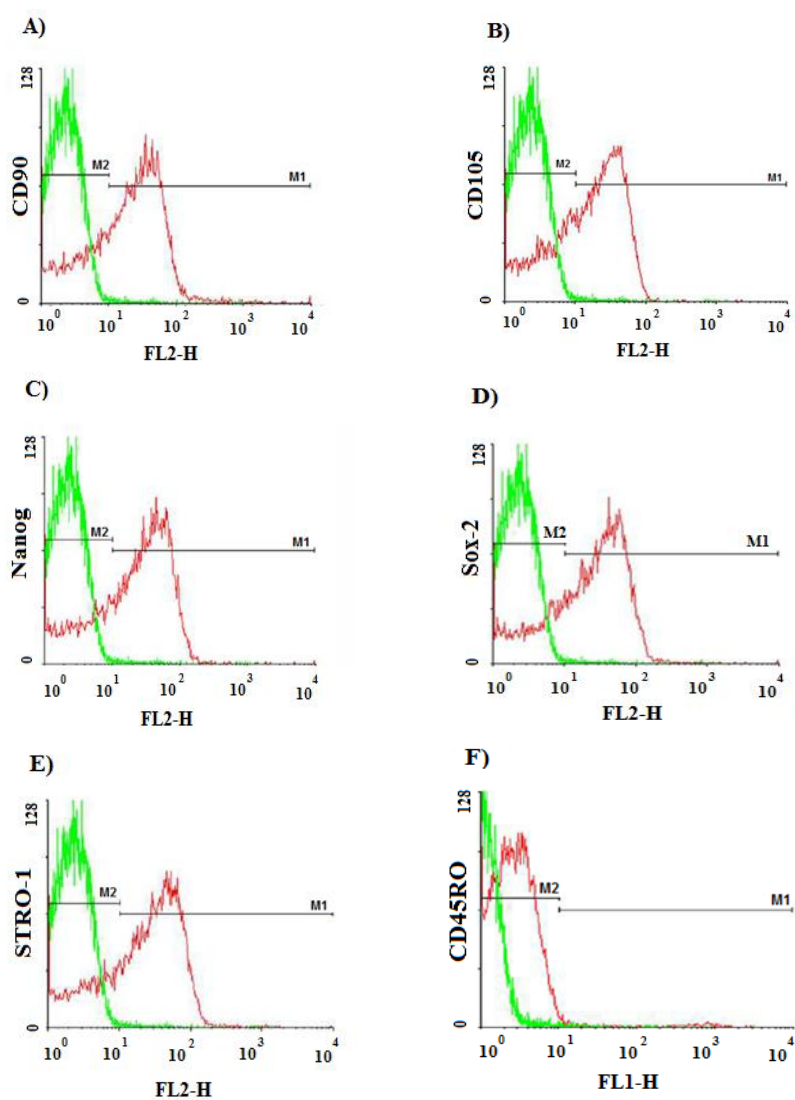


Figura 3. Mostram as CTMs obtidas a partir do tecido adiposo de pacientes mulheres, observadas e tiradas as fotos em microscópio óptico (lente de aumento de 10x). A) Nesta figura as flechas apontam para as gotículas de gordura após dois dias da dissociação enzimática. As gotículas de gordura permaneceram associadas as CTMs, sendo estas aderidas à superfície do plástico em formato alongado, cultivadas em meio DMEM completo suplementado com SFB, antibiótico/antimicótico e armazenadas a temperatura de 37°C e 5% de CO₂. B) Nesta outra figura, foi observado o mesmo cultivo celular da Figura A, com as CTMs em segunda passagem, com maior número, multiplicidade, crescimento exponencial e linear, e ausência das gotículas de gordura.

5.2 Caracterização das CTMs pela citometria de fluxo

A Figura 4 mostra a expressão dos marcadores positivos CD90, CD105, Nanog, Sox-2 e Stro-1 (Figuras 4A, B, C, D e E) característicos das CTMs, e os marcadores negativos CD45RO e CD117 (Figuras 4F e G) que são marcadores hematopoiéticos. A expressão em verde do gráfico representou o controle isotópico e em vermelho os marcadores; sendo que a expressão do marcador dentro da linha de M1 foi considerado positivo e dentro da M2 foi considerado negativo. Com a expressão desses marcadores positivos e negativos podemos comprovar o cultivo de CTMs.



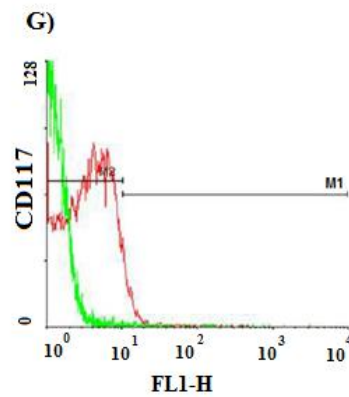


Figura 4. Caracterização das CTMs por meio da citometria de fluxo com marcadores positivos e negativos. A expressão em verde do gráfico representou o controle isotípico e em vermelho os marcadores; sendo que a expressão do marcador dentro da linha de M1 foi considerado positivo e dentro da M2 foi considerado negativo. FL1-H e FL2-H representaram a intensidade da fluorescência. As Figuras A, B, C, D e E representaram os marcadores positivos para CTMs: CD 90, CD105, Nanog, Sox-2 e STRO-1, e as Figuras F e G representaram os marcadores negativos: CD45RO e CD117, marcadores estes de células hematopoiéticas.

5.3 Coloração com vimentina em CTMs

A Figura 5 mostra a imuno-marcação positiva das CTMs com vimentina, sendo a expressão deste marcador frequentemente usada para caracterizar células e tecidos derivados da mesoderma.

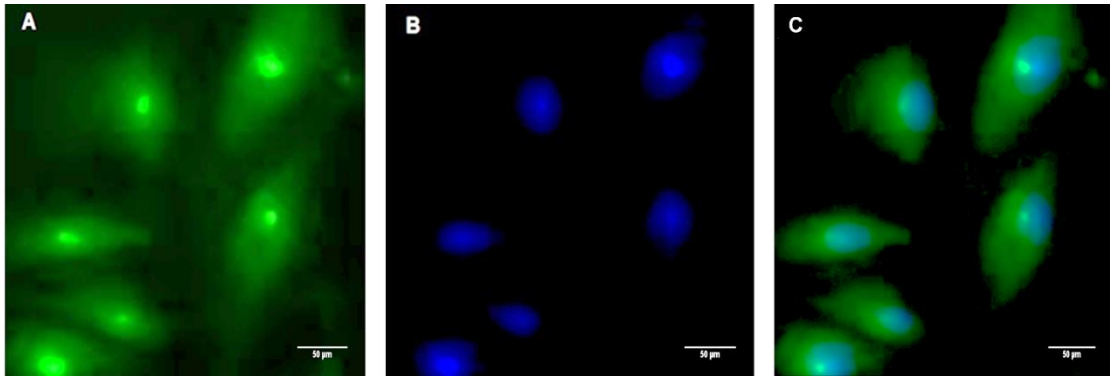


Figura 5. Presença de vimentina em CTMs derivadas do tecido adiposo humano na coloração imunohistoquímica. A) Presença da proteína vimentina, em verde, no citoplasma das CTMs que determinou o perfil fenotípico mesenquimal das células. B) Imagem da coloração nuclear das CTMs realizada com marcador DAPI fluorescente em azul. C) Sobreposição do citoplasma e do núcleo das CTMs pela junção das imagens A e B.

5.4 Diferenciação osteogênica

As células indiferenciadas foram expostas ao meio osteogênico durante 7, 16 e 21 dias e suas respectivas morfologias durante a diferenciação osteogênica foram observadas (Figuras 6A, B e C) e notou-se que as células possuíam aspecto fibrótico, morfologia cúbica, em todos os pontos de tempo demonstraram boa adesão ao plástico e crescimento linear durante o ambiente de cultura.

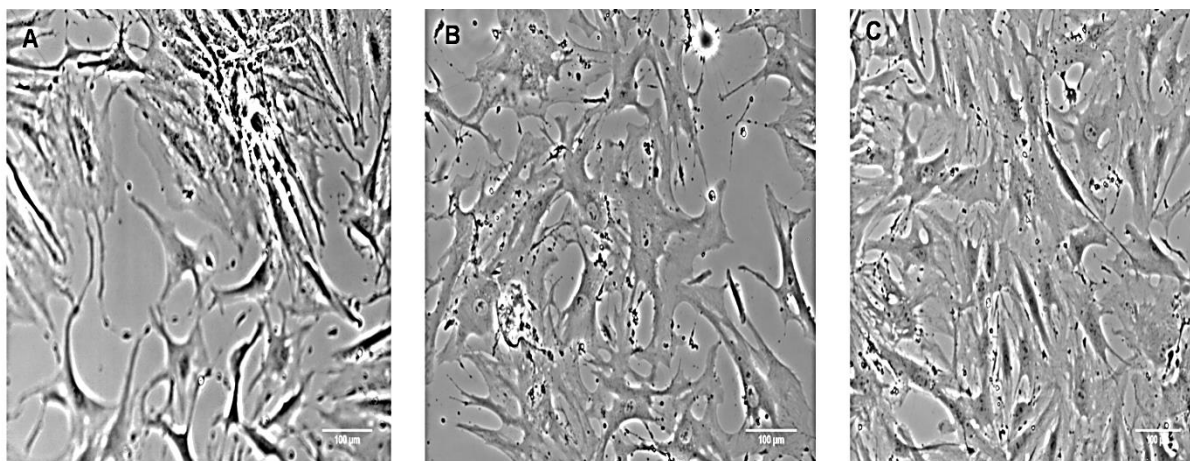


Figura 6. CTMs cultivadas em diferentes dias (7, 16 e 21) em meio osteogênico composto de dexametasona, β -glicerofosfato e ácido ascórbico, sendo observadas em microscópio invertido com aumento de 10x, nos dias 7, 16 e 21, respectivamente (Figuras A, B, C). No final da fase de osteoindução, as células possuíam aspecto epitelial em forma cúbica, e seu crescimento celular permaneceu constante em todos os momentos, revelando que a osteoindução não afetou a confluência dos osteoblastos maduros.

5.5 Presença da FA e osteocalcina após diferenciação em osteoblastos

Como marcador ósseo dos osteoblastos, a FA e a osteocalcina foram quantificadas após 16 dias de osteoindução. Os resultados apresentados na Figura 7 mostraram que ambas as proteínas, FA (Figura 7A) e osteocalcina (Figura 7B), elevaram significativamente seus níveis nos osteoblastos humanos comparados as CTMs não diferenciadas, sendo formadores ósseos e comprovando a caracterização dos osteoblastos após sua diferenciação celular. Também, a FA foi

corada com a pastilha Sigmafast BCIP®/NBT (Figura 8) que evidenciou, em roxo, a presença da proteína em 16 dias de diferenciação.

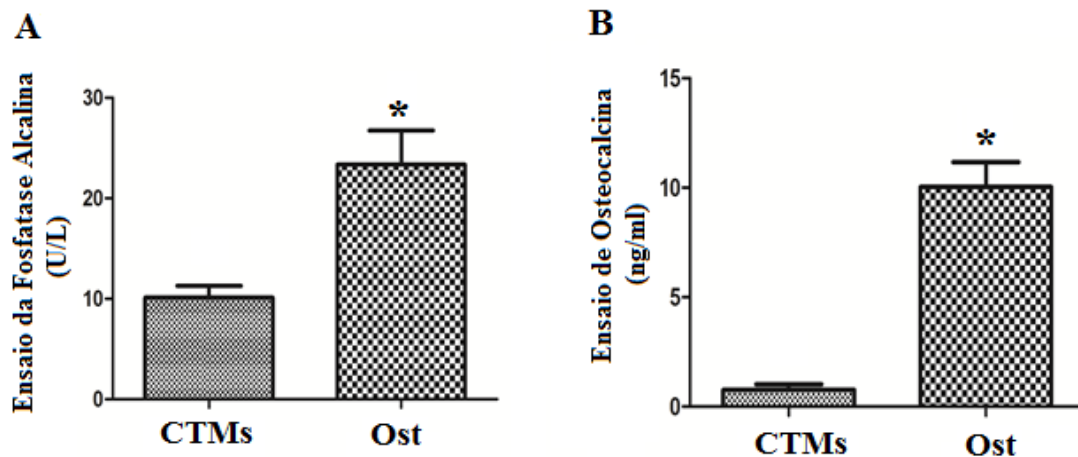


Figura 7. Presença da FA e osteocalcina nos osteoblastos (Ost) humanos após sua diferenciação em 16 dias. As Figuras A e B mostram aumento significativo da FA (valores dados em U/L) e osteocalcina (valores dados ng/ml) nos osteoblastos humanos em relação as CTMs (controle). Os dados foram expressos em média ($n=3$) \pm desvio padrão, sendo utilizado o teste t ($p<0,0001^*$) com nível de significância considerado $p<0,05$.

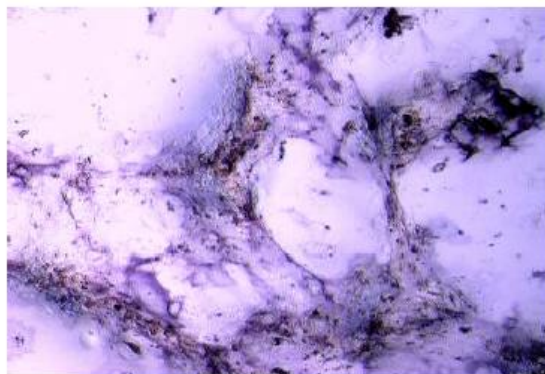


Figura 8. Imagem da FA em células diferenciadas em 16 dias. A imagem foi observada em microscópio invertido em aumento de 10x. A coloração da FA foi realizada pela pastilha Sigmafast BCIP®/NBT seguindo as instruções do fabricante e evidenciou-se, em roxo a presença da FA.

5.6 Matriz mineralizada óssea nos diferentes dias de osteoindução

Após 7 dias em meio osteogênico, o início da mineralização da matriz foi claro em comparação com o das CTMs não tratadas no mesmo ponto de tempo (Figuras 9B e 9A, respectivamente). No entanto, não foram visíveis nódulos de cálcio no dia 7. As células cultivadas em meio osteogênico durante 16 dias apresentaram nódulos de cálcio quando comparadas com as CTMs não tratadas (Figuras 9D e 9C, respectivamente). Após 21 dias, alguns nódulos de cálcio permaneceram ainda e a matriz mineralizada foi mais prevalente do que em pontos de tempo prévios. Todos os controlos negativos das CTMs não tratadas não apresentaram deposição mineral, matriz mineralizada ou nódulos de cálcio (Figuras 9A, 9C e 9E). Foi demonstrado que as células cultivadas em meio osteogênico durante um período maior, dão origem a osteoblastos maduros. Estes osteoblastos maduros apresentaram deposição de matriz mineralizada, formando nódulos de cálcio e foram considerados constantemente ativos devido a esta presença.

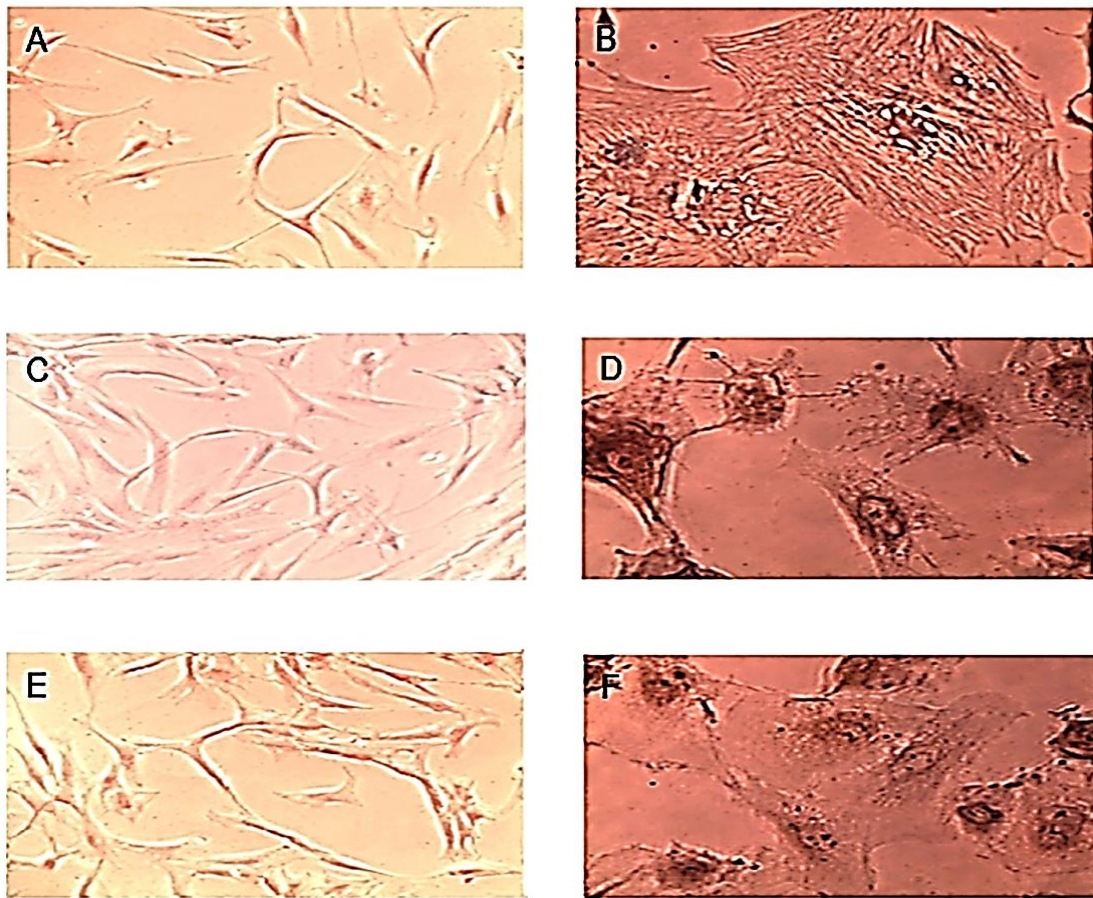


Figura 9. Presença de matriz mineralizada óssea em osteoblastos maduros. Macroscopicamente, as células cultivadas durante 7 dias exibiram coloração menos intensa (B). As imagens das células cultivadas durante 16 dias são mostradas em D, onde foi observada a cor mais intensa e a presença de uma matriz mineralizada óssea com acumulação de nódulos de cálcio. F) A matriz e os nódulos de cálcio permaneceram durante 21 dias após a osteoindução. As Figuras A, C e E mostram os CTMs que foram utilizadas como controle negativo e não mostraram depósito de matriz mineralizada óssea.

5.7 Concentração infrafisiológica de E2 diminuiu a matriz mineralizada e aumentou em concentração fisiológica

A matriz mineralizada óssea dos osteoblastos foi quantificada a fim de verificar o efeito do E2 durante 72 horas de tratamento hormonal (Figura 10). Entre as diferentes concentrações de E2I e E2F, foi observado diminuição significativa de E2I em relação ao C e E2F, e aumento significativo da quantidade de matriz mineralizada óssea na dose de E2F comparado a E2I e ao C, sendo as CTMs utilizadas como controle negativo.

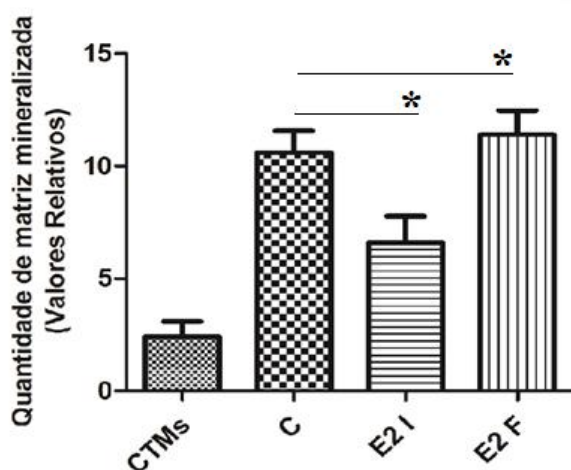


Figura 10. Efeitos de diferentes doses de E2 na quantidade de matriz mineralizada óssea produzida nos osteoblastos humanos durante 72 horas de tratamento hormonal. Houve diminuição significativa de E2I em relação ao C e E2F, e aumento significativo da quantidade de matriz mineralizada em E2F comparado a E2I e ao C. As CTMs foram utilizadas como controle negativo. Os valores relativos da quantidade de matriz mineralizada foram obtidos determinando quinze campos aleatórios de cada poço, fotografados com microscópio de contraste de fase e as imagens foram analisados usando o programa *Image J*. As imagens foram convertidas em imagens de fundo

branco a alto contraste para visualizar a matriz mineralizada óssea e marcar com área percentual do campo. Os dados foram expressos em média ($n=3$) \pm desvio padrão e foi feita análise de variância ANOVA complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p<0,05^*$.

5.8 Concentrações fisiológica e suprafisiológica de T3 diminuíram a quantidade de matriz mineralizada

A Figura 11 representa a quantidade de matriz mineralizada óssea nos osteoblastos humanos afim de verificar o efeito do T3 em doses fisiológica e suprafisiológica durante 72 horas de tratamento hormonal. Os resultados mostraram que a quantidade de matriz mineralizada diminuiu significativamente nas doses de T3F e T3S em relação ao C, sendo as CTMs utilizadas como controle negativo.

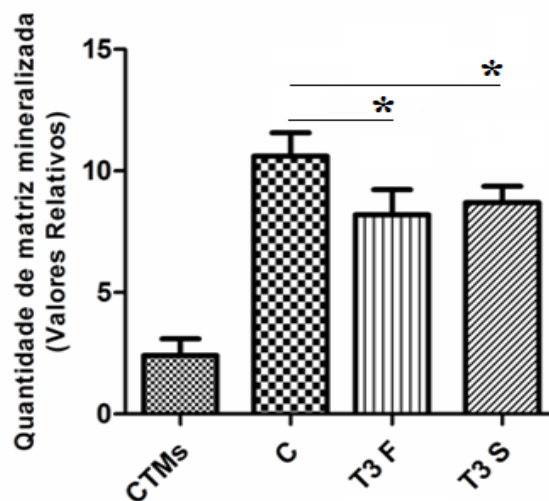


Figura 11. Coloração da matriz mineralizada óssea dos osteoblastos e efeito do T3. As CTMs foram utilizadas como controle negativo. Nas doses de T3F e T3S houve diminuição significativa em comparação ao C. Os valores relativos da quantidade de matriz mineralizada foram obtidos

determinando quinze campos aleatórios de cada poço, fotografados com microscópio de contraste de fase e as imagens foram analisados usando o programa *Image J*. As imagens foram convertidas em imagens de fundo branco a alto contraste para visualizar a matriz mineralizada e marcar com área percentual do campo. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão e para análise de variância foi utilizado ANOVA complementado pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi $p < 0,05^*$.

5.9 Diferentes concentrações de E2 aumentaram a síntese proteica de RANKL e TNF- α nos osteoblastos derivados de CTMs

A Figura 12 mostra os níveis proteicos de RANKL (Figura 12A) e TNF- α (Figura 12B) no C e em diferentes doses de E2 nos osteoblastos humanos durante 72 horas de tratamento. Desta forma, nossos dados revelaram aumento significativo dos níveis proteicos de ambas as proteínas nas doses de E2I e E2F em relação ao C. Abaixo das Figuras 13A e B estão representadas as bandas da proteína RANKL e β -actina, TNF- α e β -actina, respectivamente. A β -actina foi utilizada como controle interno da técnica de Western Blot. Os dados foram expressos em média ($n=3$) \pm desvio padrão e submetido análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05^*$.

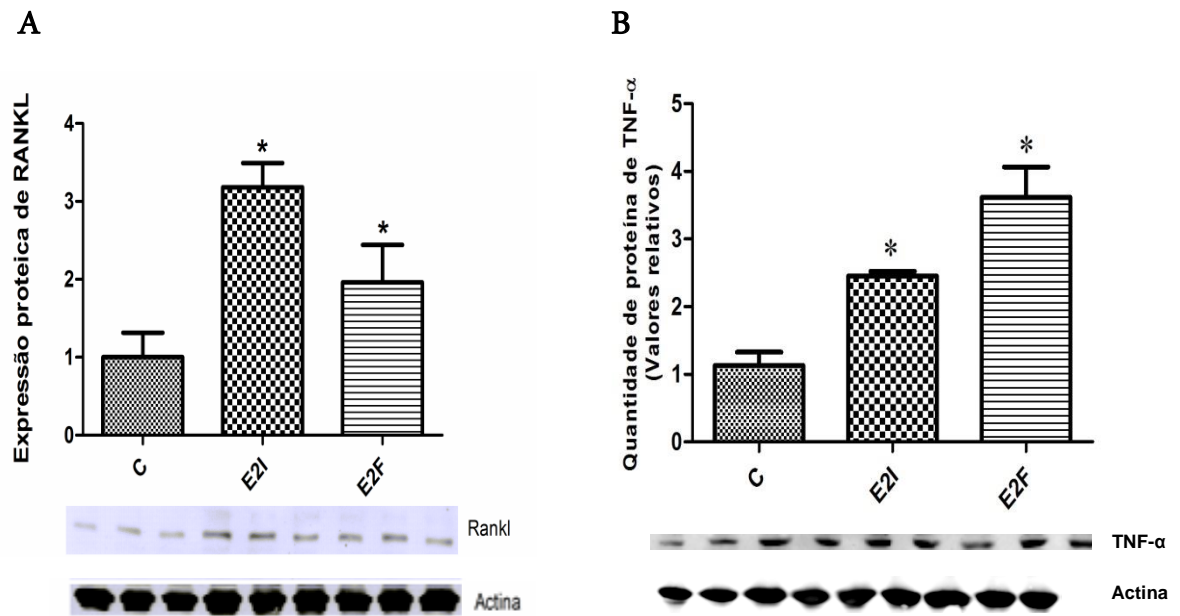


Figura 12. Efeito de diferentes doses de E2 em relação à síntese proteica de RANKL. A) O eixo horizontal do gráfico 12A apresenta a legenda do C (Controle), E2I (dose infrafsiológica) e E2F (dose fisiológica) em comparação a expressão proteica de RANKL. Houve aumento significativo em ambas as doses de E2 em comparação ao C nos osteoblastos humanos durante 72 horas de tratamento. Abaixo dos gráficos estão representadas as bandas da proteína RANKL e da β -actina (Figura 12A), respectivamente, sendo a β -actina utilizada como controle interno. B) Idem a legenda do Gráfico A. Em comparação a síntese proteica de TNF- α em ambas doses de E2 houve aumento significativo em relação ao C em osteoblastos humanos durante 72 horas. Abaixo dos gráficos estão representadas as bandas da proteína TNF- α e da β -actina (Figura 12B), respectivamente, sendo a β -actina utilizada como controle interno. Os dados foram expressos em média (n=3) \pm desvio padrão e submetido análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05^*$.

5.10 Concentração suprafisiológica de T3 aumentou os níveis proteicos de RANKL e diminuiu a síntese proteica de TNF- α nos osteoblastos derivados de CTMs

A Figura 13 mostra os níveis proteicos de RANKL (Figura 13A) e de TNF- α (Figura 13B) nos diferentes tratamentos com T3 em osteoblastos humanos durante 72 horas de tratamento. As concentrações utilizadas nos grupos T3F e T3S elevaram os níveis proteicos de RANKL em relação ao controle e houve diminuição significativa da síntese proteica de TNF- α em dose de T3S comparada ao C e T3F. Abaixo das Figuras 13A e B estão representadas as bandas da proteína RANKL e β -actina, TNF- α e β -actina, respectivamente. A β -actina foi utilizada como controle interno da técnica de Western Blot. Os dados foram expressos em média ($n=3$) \pm desvio padrão e submetido análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p<0,05^*$.

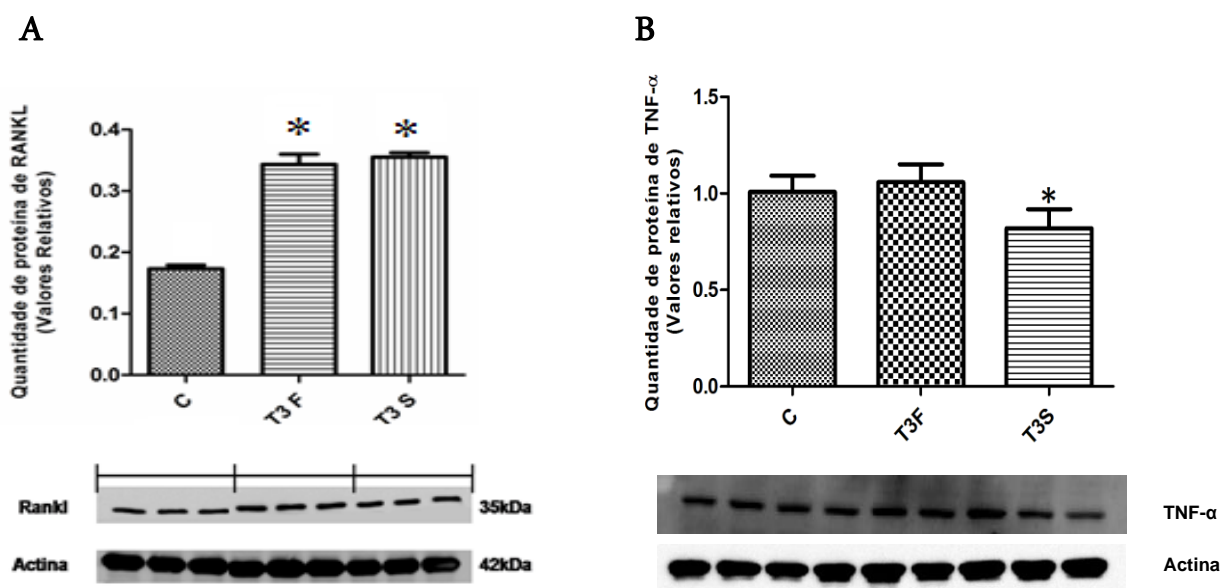


Figura 13. Efeito de diferentes doses de T3 sobre a expressão proteica de RANKL e TNF- α em osteoblastos humanos derivados de CTMs do tecido adiposo. A) O eixo horizontal do gráfico representa o controle (C), T3F (dose fisiológica) e T3S (dose suprafisiológica) em relação à expressão proteica de RANKL. Visto isso, T3 aumentou significativamente a expressão de RANKL em comparação ao C em ambas doses de T3F e T3S. B) O eixo horizontal do gráfico representa o controle (C), T3F (dose fisiológica) e T3S (dose suprafisiológica) em relação à expressão proteica de TNF- α . Em relação à síntese proteica de TNF- α , T3S diminuiu sua expressão em comparação ao C e a dose T3F. Abaixo estão representadas as bandas da proteína RANKL e da β -actina, respectivamente. A β -actina foi utilizada como controle interno. Os dados foram expressos em média (n=3) \pm desvio padrão e submetido análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Tukey. O nível de significância considerado foi de $p < 0,05^*$.

6. Discussão

No presente estudo, analisamos a síntese proteica de RANKL e TNF- α nas células osteoblásticas derivadas das CTMs humanas, reguladas pelos hormônios E2 e T3, a fim de compreender os mecanismos envolvidos na remodelação óssea.

Em nossos experimentos iniciais, o tecido adiposo da paciente foi fragmentado e submetido à ação da enzima colagenase para a extração das CTMs, sendo essas cultivadas em meio DMEM completo para sua multiplicação. Todas as culturas apresentaram semelhanças biológicas entre si, com boa viabilidade e cultivadas até a quarta passagem. Segundo Gimble [45], as CTMs são obtidas, simplesmente, a partir do tecido adiposo humano por meio das cirurgias de lipoaspiração e/ou bariátrica. Esses procedimentos cirúrgicos são minimamente invasivos para a saúde do indivíduo, e estimam-se que sejam coletados, dependendo da localização anatômica, $2-6 \cdot 10^8$ células em 300ml de tecido adiposo humano durante a cirurgia de lipoaspiração [45-47]. A ação da colagenase é fundamental para digerir o colágeno do tecido adiposo e suspender as CTMs, fazendo o completo isolamento dessas células [48]. Segundo revisado em Wagner [49], as CTMs são usadas na terapia celular moderna, pois possuem inúmeras características, entre elas, múltiplas passagens, expansão regular, manutenção de seus aspectos morfológicos durante todas as culturas, imunossupressor na co-cultura com os linfócitos T, regenera tecidos lesados e tem capacidade de diferenciar-se em várias linhagens celulares (condrócitos, miócitos, adipócitos e osteoblastos) estimulados por hormônios e fatores de crescimento [50-53]. Além disso, no ambiente de cultura

dessas células não são notadas diferenças em relação à viabilidade [54], podendo ser suplementados antioxidantes e poucas quantidades de cálcio no meio para melhorar esse estado [55]. Também, as células podem permanecer com o mesmo fenótipo até vinte e cinco passagens [56].

Com o sucesso do isolamento e posterior cultivo das CTMs, mostramos a caracterização das células pela citometria de fluxo a fim de determinar seu perfil imunofenótipo, sendo os marcadores positivos: Stro-1, CD90, CD105, Nanog e Sox2, e os marcadores negativos: CD45RO e CD117 (Figura 4). Conforme a “Sociedade Internacional de Terapia Celular”, as CTMs são caracterizadas pela aderência à superfície plástica, diferenciação em outras células e capacidade em expressar pelo menos um dos anticorpos: CD105, CD73 e CD90, e não expressar marcadores hematopoiéticos: CD45, CD34, CD14 ou CD11b. [43, 49, 57-60]. Os marcadores positivos, Stro-1, CD90 e Nanog, são encontrados amplamente na superfície celular de todo o tecido adiposo e são utilizados para reconhecer células não diferenciadas [61]. Segundo Maleki *et al.* [62], o CD90 possui papel na morfologia e proliferação das CTMs, enquanto o CD105 (endoglina) está envolvido na diferenciação e migração celular, sendo componente do TGF- β , e o Sox2 atua em sua auto-renovação e pluripotência. Contudo, os marcadores negativos, CD45RO e CD117, são apenas encontrados na superfície das células hematopoiéticas e em menor quantidade nos linfócitos T [54], estando ausentes nas CTMs.

Após o reconhecimento das células, essas foram diferenciadas em osteoblastos humanos (Figura 6) utilizando agentes específicos tais como ácido ascórbico, dexametasona e

β -glicerofosfato durante 16 dias, bem como dosadas a FA e osteocalcina (Figura 7), e corada a matriz mineralizada óssea pelo *Alizarin Red* (Figura 9). Houve aumento significativo dos marcadores ósseos, FA e osteocalcina, e formação da matriz extracelular com deposição dos nódulos de cálcio. Segundo Weizhuo *et al.* [63], o desenvolvimento das CTMs em pré-osteoblastos a osteoblastos maduros e funcionais é realizado por uma cascata de eventos intracelulares estimulados por substâncias osteoindutoras. O ácido ascórbico é um potente antioxidante protetor dos pré-osteoblastos, pois combate os radicais livres, é co-fator do colágeno tipo I e sua deficiência prejudica a diferenciação dos osteoblastos, causando diminuição na massa óssea [64-65]. Assim, as concentrações de 30 a 90 μ M, mais especificamente 50 μ M, são mais utilizadas na indução da diferenciação [65]. A dexametasona, por sua vez, é um glicocorticoide sintético que induz esse estado, porém seus mecanismos exatos são desconhecidos [66], o β -glicerofosfato, o último agente osteoindutor, liga-se aos sais de fosfato para formar a hidroxiapatita no processo de mineralização dos osteoblastos maduros [67], e após 16 dias de diferenciação celular, os níveis da FA e osteocalcina aumentam, simultaneamente, à deposição de cálcio. A respeito da FA, este é um marcador bioquímico, presente na membrana dos osteoblastos e tem ação máxima na maturação dos mesmos [68], e prontamente, a osteocalcina é uma proteína não colágena com função estrutural e funcional que alcança seus níveis máximos na mineralização óssea, atuando semelhante ao β -glicerofosfato na formação da hidroxiapatita, bem como regulando o crescimento ósseo [69,70].

Ainda segundo Kim *et al.* [23], a liberação de cálcio na superfície da matriz extracelular marca o

final da diferenciação osteoblástica durante a fase de mineralização pelo rompimento da membrana vesicular, rica em cálcio em seu interior, produzida pelos osteoblastos e liberadas no meio extracelular.

Durante as últimas 72 horas de diferenciação, os hormônios E2 e T3 foram colocados no meio de cultura, e analisada a síntese proteica de RANKL e TNF- α . Com isso, verificamos que em nosso estudo, a dose E2F (10^{-9} M) aumentou a quantidade de matriz mineralizada, enquanto que diminuiu na dose E2I (10^{-10} M) (Figura 10), e paralelamente a isso, ambas doses elevaram os níveis proteicos de RANKL (Figura 12A) e TNF- α (Figura 12B), mimetizando o que poderia ocorrer em mulheres na menopausa em idade avançada. De acordo com Zaidi [71], as células ósseas estão sob controle rigoroso do hormônio E2, e em níveis normais no organismo humano, reduz as citocinas IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β e osteoprotegerina [72]. Entretanto, o mecanismo de ação do E2 em relação à remodelação óssea é desconhecido. Conforme Tanaka *et al.* [73], a deficiência estrogênica pode desequilibrar a remodelação óssea e levar ao quadro de osteopenia e posterior osteoporose. No estudo de Bord *et al.* [74], observaram o aumento da expressão de mRNA de RANKL no tratamento E2I (10^{-10} M) em osteoblastos humanos durante 24 horas, porém em 48 horas essa condição não foi observada. No estudo de Zallone [75] *in vivo*, essa mesma deficiência levou ao aumento da expressão de RANKL e foi capaz de causar perda da massa óssea, que vem de encontro com nossos resultados a respeito da mineralização óssea na presença de E2I, e contrários ao estudo de Brennan *et al.* [76] que na concentração E2I (10^{-10} M)

elevou significativamente a matriz mineralizada de células semelhantes aos osteoblastos, MC3T3-E1 diferenciadas em 14 dias, em comparação as não tratadas. No mesmo estudo ainda, a dose E2F (10^{-8} M), aumentou a matriz, similar ao nosso resultado, entretanto em 24 horas de tratamento com E2.

De acordo com Steeve *et al.* [77], o TNF- α age nas células ósseas pelo *Tumor Necrosis Factor Receptor I* (TNFRI/p55) e entra em uma cascata de eventos moleculares até à ativação da enzima caspase que promove a apoptose, e pode agir também por meio do TNFRI e/ou *Tumor Necrosis Factor Receptor II* (TNFRII/p75) na interação com o *TNF Receptor Associated Factor 2* (TRAF 2) que ativa o *Factor Nuclear Kappa B* (NF- κ B), estimulando a osteoclastogênese. Já o RANKL atua nas células ósseas na ligação com RANK, presente nos osteoclastos, e é mediado pelo TRAF 2, TRAF 5 e/ou TRAF 6 na ativação da reabsorção óssea, sendo no TRAF 2 intensificado junto a TNF- α . Assim, baseado em nossos resultados de que a dose E2I diminuiu a matriz mineralizada nos osteoblastos humanos, e inversamente aumentou a síntese proteica das citocinas, podemos especular que a reabsorção óssea elevada observada na menopausa seja via RANKL e TNF- α , já que em Tanaka *et al.* [73], relacionaram a deficiência dos níveis de E2 com o aumento da expressão de RANKL e *turnover* ósseo acelerado, trazendo como consequência a perda da massa óssea no septo inter-radicular de molares de ratas ovariectomizadas.

Estudos anteriores mostraram que os HTs, em níveis normais, possuem ação de diminuir citocinas como IL-6, prostaglandina E2 e RANKL [78].

O RANKL é produzido por precursores de osteoblastos e pode ser liberado na matriz óssea ou permanecer na membrana dessas células. A reabsorção óssea osteoclástica, estimulada pelo T3, ocorre na presença dos osteoblastos, mas não em sua ausência [79, 80]. Nossos resultados mostram que doses de T3F e T3S aumentam os níveis proteicos de RANKL presente nos osteoblastos (Figura 13A), concomitantemente com a diminuição da matriz mineralizada (Figura 11).

O hipertireoidismo promove a reabsorção óssea no organismo [78]. Assim, o tratamento da dose T3S pode indicar aumento da atividade óssea devido ao aumento dos níveis proteicos de RANKL nessas células, que por sua vez é responsável por agir na maturação dos osteoclastos favorecendo a reabsorção óssea. Miura *et al.* [40], observaram que o T3 nas diferentes concentrações suprafisiológicas (10^{-8} M e 10^{-5} M) induziu o aumento da expressão de mRNA de RANKL em cultura primária de células osteoblásticas de rato. O tratamento de T3S diminuiu a síntese proteica de TNF- α em osteoblastos humanos (Figura 13B). À vista disso, pelo tratamento T3S diminuir a síntese proteica de TNF- α e aumentar RANKL, podemos inferir que o mecanismo de reabsorção óssea no hipertireoidismo seja via RANKL, podendo ser demonstrado mais detalhadamente esse mecanismo pela co-cultura com os osteoclastos, logo, nossa limitação do estudo.

Mesmo assim, nossos resultados trouxeram conhecimentos promissores para a patogênese da remodelação óssea na condição clínica de desequilíbrio hormonal ocorrido

principalmente em mulheres com hipertireoidismo e deficiência estrogênica na menopausa, fatores etiológicos no desencadeamento das doenças ósseas.

7. Conclusão

As CTMs foram obtidas a partir do tecido adiposo e diferenciadas em osteoblastos humanos.

Em relação ao tratamento hormonal dessas células, as doses de T3F e T3S, diminuíram a matriz mineralizada em relação ao C, e aumentaram a síntese proteica de RANKL, diminuindo TNF- α .

Na dose de E2F houve aumento da matriz mineralizada comparada a dose E2I e ao C, e ambas concentrações aumentaram a síntese proteica de RANKL e TNF- α .

8. Referências

1. Hadjidakis DJ, Androulakis, II. Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006;1092:385-96.
2. Ferrer CJ, Tovar I, Martines P. Osteoprotegerina y Sistema RANL/RANK: ¿el futuro del metabolismo óseo?. *An Med Interna.* 2002;19:385-8.
3. Ducey P, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science.* 2000;289:1501-4.
4. Hill PA. Bone remodeling. *Br J Orthod.* 1998;25:101-7.
5. Stein GS, Lian JB, Stein JL, Van Wijnen AJ, Montecino M. Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol Rev.* 1996;76:593-629.
6. Saggese G, Baroncelli GI, Federico G, Bertelloni S. Effects of growth hormone on phosphocalcium homeostasis and bone metabolism. *Horm Res.* 1995;44:55-63.
7. Lee MS, Kim SY, Lee MC, Cho BY, Lee HK. Negative correlation between the change in bone mineral density and serum osteocalcin in patients with hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab.* 1990;70:766-70.
8. Tsai KS, Lai SM, Huang KM, Chieng PU, Su CT. Decreased bone mineral density in patients with prolonged thyrotoxicosis before and after treatment. *J Formos Med Assoc.* 1991;90:250-5.

9. Wejda B, Hintze G, Katschinski B, Olbricht T, Benker G. Hip fractures and the thyroid: a case-control study. *J Intern Med.* 1995;237:241-7.
10. Mosekilde L, Eriksen EF, Charles P. Effects of thyroid hormones on bone and mineral metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1990;19:35-63.
11. Saraiva PP, Teixeira SS, Conde SJ, Nogueira CR. The importance of hormone receptor analysis in osteosarcoma cells growth submitted to treatment with estrogen in association with thyroid hormone. *Cell Biochem.* 2008;1:10710.
12. Wittrand Y, Théoleyre S, Chipoy C, Padrines M, Blanchard F, Heymann D, et al. RANKL/RANK/OPG: new therapeutic targets in bone tumors and associated osteolysis. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1704:49-57.
13. Lacey DL. Osteoprotegerin ligand is cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 1998;93:165-76.
14. Miyamoto T, Suda T. Differentiation and function osteoclasts. *Keio J Med.* 2003;52:1-17.
15. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999;13:3037-51.
16. Ingunn H, Claire S. Role of osteoprotegerin (OPG) in cancer. *Clin Sci.* 2006;110:279-91.
17. Pereira IA, Pereira RMR. Osteoporose e erosões ósseas focais na artrite reumatóide: da patogênese ao tratamento. *Rev Bras Reumatol.* 2004;44:34754.

18. Klefstrom J, Arighi E, Littlewood T, Jäättelä M, Saksela E, Evan GI, et al. Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-Myc involves p53 and impaired NF-kappaB activation. *EMBO J.* 1997;16:7382-92.
19. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000;191:275-86.
20. Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the OPG/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000;191:275-86.
21. Bu R et al. Expression and function of TNF-family proteins and receptors in human osteoblasts. *Bone* 2003;33:760-70.
22. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest.* 2000;106:1481-8.
23. Kim HJ, Kim UJ, Kim HS, Li C, Wada M, Leisk GG, et al. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. *Bone.* 2008;42:1226-34.
24. Kitamura K, Takahira K, Inari M, Satoh Y, Hayakawa K, Tabuchi Y, et al. Zebrafish scales respond differently to in vitro dynamic and static acceleration: Analysis of interaction

between osteoblasts and osteoclasts. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2013;166:74-80.

25. Kvistad PH, Lovas K, Boman H, Myking OL. Retarded bone growth in thyroid hormone resistance: a clinical study of a large family with a novel thyroid hormone receptor mutation. *Eur J Endocrinol.* 2004;150:425-30.
26. Kisakol G, Kaya A, Gonen S, Tunc R. Bone and calcium metabolism in subclinical autoimmune hyperthyroidism and hypothyroidism. *Endocr J.* 2003;50:657-61.
27. Allain TJ, McGregor AM. Thyroid hormones and bone. *J Endocrinol.* 1993;139:9-18.
28. Britto JM, Fenton AJ, Holloway WR, Nicholson GC. Osteoblasts mediate thyroid hormone stimulation of osteoclastic bone resorption. *Endocrinology.* 1994;134:169-76.
29. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001;81:1097-142.
30. Pepene CE, Kasperk CH, Pfeilschifter J, Bórcsók I, Gozariu L, Ziegler R, et al. Effects of triiodothyronine on the insulin-like growth factor system in primary human osteoblastic cells in vitro. *Bone.* 2001;29:540-6.
31. Boyce BF, Hughes DE, Wright KR, Xing L, Dai A. Recent advances in bone biology provide insight into the pathogenesis of bone diseases. *Lab Invest.* 1999;79:83-94.

32. Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas*. 2008;60:65-9.
33. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*. 2000;289:1508-14.
34. Calvo MS, Eyre DR, Gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr Rev*. 1996;17:333-68.
35. Huang BK, Golden LA, Tarjan G, Madison LD, Stern PH. Insulin-like growth factor I production is essential for anabolic effects of thyroid hormone in osteoblasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15:188-97.
36. D'Amelio P, Grimaldi A, Di Bella S, Brianza SZ, Cristofaro MA, Tamone C, et al. Estrogen deficiency increases osteoclastogenesis up-regulating T cells activity: a key mechanism in osteoporosis. *Bone*. 2008;43:92-100.
37. Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch*. 2003;70:300-6.
38. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, Dani C. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*. 2005;87:125-8.
39. Basson MA. *Signaling in Cell Differentiation and Morphogenesis*. Cold Spring Harbor Perspect Biol. 2012;4:1-21.

40. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, et al. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)(2)D(3) in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291:987-94.
41. Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K. Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKLRANK interaction. *J Cell Physiol.* 2004;201:17-25.
42. Yarak S, Okamoto OK. Células-tronco derivadas de tecido adiposo humano: desafios atuais e perspectivas clínicas. *An Bras Dermatol.* 2000;85:647-56.
43. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8:315-17.
44. Tuan RS, Boland G, Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther.* 2002;5:32-45.
45. Gimble J, Guilak F. Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization and differentiation. *Cytotherapy.* 2003;5:362-9.
46. Schaffler A, Buchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells-basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells.* 2007;25:818-27.

47. Pu LL, Cui X, Fink BF, Gao D, Vasconez HC. Adipose aspirates as a source for human processed lipoaspirate cells after optimal cryopreservation. *Plast Reconstr Surg.* 2006;117:1845-50.
48. Oberbauer E, Steffenhagen C, Wurger C, Gabriel C, Redl H, Wolkank S. Enzymatic and non-enzymatic isolation systems for adipose tissue-derived cells: current state of the art. *Cell Regen (London).* 2015;30:4-7.
49. Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Ver.* 2007;3:239-248.
50. Le Blanc K, Ringdén O. Immunomodulation by mesenchymal stem cells and clinical experience. *J Intern Med.* 2007;262:509-25.
51. Nishikawa S, Goldstein RA, Nierras CR. The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:725-9.
52. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:11-21.
53. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.* 2008;15:109-16.
54. Mizuno H, Hyakusoku H. Mesengenic potential and future clinical perspective of human processed lipoaspirate cells. *J Nippon Med Sch.* 2003;70:300-6.

55. Lin TM, Tsai JL, Lin SD, Lai CS, Chang CC. Accelerated growth and prolonged lifespan of adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells in a medium using reduced calcium and antioxidants. *Stem Cells Dev.* 2005;14:92-102.
56. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct.* 2008;26:664-75.
57. Girolamo L, Sartori MF, Albisetti W & Brini AT. Osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells: comparison of two different inductive media. *J Tissue Eng Regen Med.* 2007;1: 154-57.
58. Luna ACL, Madeira MEP, Conceição TO, Moreira JALC, Laiso RAN, Maria DA. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Res Notes.* 2014;7:552.
59. Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH, Lim B. Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18:1013-22.
60. Yoon D, Kim Y, Jung H, Paik S, Lee J. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif.* 2011;44:428-40.
61. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin C-S. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413:353-357.

62. Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemali M, Ghadirkhomi E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. 2014;7:118-26.
63. Weizhuo W, Olson D, Cheng B, Guo X, Wang K. Sangui Draconis resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. J Ethnopharmacol. 2012;142:168-74.
64. Choi KM, Seo YK, Yoon HH, Song KY, Know SY, Lee HS, et al. Effect of ascorbic acid on bone marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and differentiation. J Biosci Bioeng. 2008;105:586-94.
65. Hadzir SN, Ibrahim SN, Abdul Wahab RM, Zainol Abidin IZ, Senafi S, Ariffin ZZ, et al. Ascorbic acid induces osteoblast differentiation of human suspension mononuclear cells. Cytotherapy. 2014;16:674-82.
66. Yuasa M, Yamada T, Taniyama T, Masaoka T, Xuetao W, Yoshu T, et al. Dexamethasone enhances osteogenic differentiation of bone marrow- and muscle-derived stromal cells and augments ectopic bone formation induced by bone morphogenetic protein-2. Plos One. 2015;10:1-23.
67. Langenbach F, Handschel J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and β -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. Stem Cell Res Ther. 2013;4:117.


68. Calle JD, Sañudo C, Verde LS, Renedo RJG, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone*. 2011;49:830-38.
69. Sila-Asna M, Bunyaratvej A, Maeda S, Kitaguchi H, Bunyaratavej N. Osteoblast differentiation and bone formation gene expression in strontium-inducing bone marrow mesenchymal stem cell. *Kobe J Med Sci*. 2007;53:25-35.
70. Cantatore FP, Corrado Um, Grano H, Quarta G, Colucci S, Melillo N. Osteocalcin synthesis by human osteoblasts from normal and osteoarthritic bone after vitamin D3 stimulation. *Clin Rheumatol*. 2004;23:490-5.
71. Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature*. 2007;13:791801.
72. Mariscal ME, Costa CAS, Tavares HS, Bianchi J, Hebling J, Machado JPB. Osteoblast differentiation is enhanced by a nano-to-micro hybrid titanium surface created by Yb:YAG laser irradiation. *Clin Oral Invest*. 2015;3:503-11.
73. Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *J Periodontal Res*. 2002;37:161-5.
74. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone*. 2003;32:136-41.
75. Zallone A. Direct and indirect estrogen actions on osteoblasts and osteoclasts. *Ann NY Acad Sci*. 2006;1068:136-41.

76. Brennan MA, Haugh MG, O'Brien FJ, Mc Namara LM. Estrogen withdrawal from osteoblasts and osteocytes causes increased mineralization and apoptosis. *Horm Metab Res.* 2014;46:537-45.
77. Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:49-60.
78. Bassett JHD, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Endocr Ver.* 2016;37:135-87.
79. Edmonds M. A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002; 71: 285-389.
80. Meyer S, Temme C, Wahle E. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2004; 39: 197-216.

9. Apêndice

APENDICE I – Aprovação do comitê de ética e Termo de consentimento livre e esclarecido do projeto de pesquisa

DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA	
Título da Pesquisa: EFEITO DO ESTRÓGENO E DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NA EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE RANKL E TNF- α EM CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO	
Pesquisador Responsável: Sarah Maria Barneze Costa	
Área Temática:	
Versão: 2	
CAAE: 41564915.4.0000.5411	
Submetido em: 10/03/2015	
Instituição Proponente: Departamento de Clínica Médica	
Situação da Versão do Projeto: Aprovado	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio	



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TERMINOLOGIA OBRIGATÓRIA EM ATENDIMENTO A RESOLUÇÃO 466/12-CNS-MS)

A Sra. está sendo convidada a participar de uma pesquisa chamada “Efeito do estrógeno e do hormônio tireoidiano na expressão gênica e proteica de RANKL e TNF- α em células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo” que pretende verificar a ação de dois genes junto a esses hormônios para estudar mais especificamente o mecanismo de desenvolvimento das doenças ósseas, entre elas a osteoporose, e assim aperfeiçoar e/ou criar novos tratamentos clínicos.

A Sra. foi selecionada a participar dessa pesquisa por ser mulher, ter entre 18 a 50 anos de idade e estar realizando a cirurgia de abdominoplastia ou bariátrica no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu.

Desta forma, a pesquisa consta da coleta de um fragmento seu de gordura (2 gramas) (esta descartada em condições normais de cirurgia, não havendo prejuízos a você paciente) para a utilizarmos, experimentalmente, na obtenção das células tronco mesenquimais, que serão diferenciadas em células do osso para assim receberem os tratamentos hormonais e verificar a ação dos genes propostos. Também, haverá coleta de sangue (6ml) para verificar se seus exames estão normais e quando o sangue for retirado, você poderá sentir um desconforto, dor e/ou causar hematomas.

Caso você não queira participar da pesquisa, é seu direito e isso não vai interferir com seu tratamento ou preferência de agendamento médico, assim como interferências trabalhistas. Você poderá retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa sem nenhum prejuízo.

É garantido total sigilo do seu nome e resultado do exame, em relação aos dados relatados nesta pesquisa.

Você receberá uma via deste termo, e outra via será mantida em arquivo pelo pesquisador por cinco anos.

Qualquer dúvida adicional, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa, através do fone: (14) 3880-1608/1609.

CONCORDO EM PARTICIPAR DA PESQUISA

Nome: _____ RG do hospital: _____
Endereço: _____ Telefone: () _____
Assinatura: _____