

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 45/0: /2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

REGIANE MARQUES CASTRO OLIMPIO

EFEITO DA TRIIODOTIRONINA (T3) E ESTRÓGENO (E2)  
SOBRE A EXPRESSÃO GÊNICA E PROTEICA DE RANKL,  
OPG E C-FOS EM OSTEÓBLASTOS DERIVADOS DE  
CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS HUMANAS

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,  
Universidade Estadual Paulista “Júlio de  
Mesquita Filho”, Câmpus de Botucatu como  
parte dos requisitos para obtenção do título de  
Doutor em Fisiopatologia em Clínica Médica.

Orientadora: Profa. Adjunta Célia Regina Nogueira

Botucatu

2017

REGIANE MARQUES CASTRO OLIMPIO

EFEITO DA TRIIODOTIRONINA (T3) E ESTRÓGENO (E2)  
SOBRE A EXPRESSÃO DE GÊNICA E PROTEICA DE  
RANKL, OPG E C-FOS EM OSTEOLASTOS DERIVADOS  
DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAS HUMANAS

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

Olímpio, Regiane Marques Castro.

Efeito da Triiodotironina (T3) e Estrógeno (E2) sobre a expressão gênica e proteica de RANKL, OPG e c-Fos em osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais humanas / Regiane Marques Castro Olímpio. - Botucatu, 2017

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira  
Capes: 20700008

1. Osteoblastos. 2. Células-tronco. 3. Estrogênios.  
4. Triiodotironina. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais; Estrógeno; Osteoblastos ; Triiodotironina.

## *Agradecimentos*

*À Deus por me sustentar nas alegrias e dificuldades, pela sua fidelidade e sempre estar no controle de minha vida.*

Ao meu marido Juliano pelo apoio e incentivo.

À minha mãe Maria José pelo esforço, investimento e dedicação e por acreditar em mim para que eu chegasse até aqui.

À minha sogra pelas constantes orações.

À toda família Olimpio e Castro pelo carinho, orações e apoio.

À minha orientadora, Profa. Dra. Célia Regina Nogueira, pela oportunidade, compreensão e ensinamentos em todos os momentos que foram necessários.

À Dra. Patrícia Pinto Saraiva pela amizade, pelos ensinamentos, atenção e suporte para execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Durvanei Augusto Maria pela imensa ajuda nos trabalhos e amizade.

À Profa. Dra. Gláucia Maria Fernanda da Silva Mazeto por todas as orientações dadas nesse estudo e durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Renata Azevedo de Melo Luvizotto pela disponibilidade, amizade e carinho.

À Profa. Dra. Camila Renata Correa e ao professor Willian Fernando Zambuzzi pela atenção e disponibilidade.

Ao professores Adriano Namó Cury, Márcia Guimarães da Silva, Marise Lazaretti Castro pela disponibilidade e pelas opiniões fornecidas para melhora dos manuscritos.

Ao Dr. Fausto Viterbo de Oliveira Neto e sua equipe que gentilmente forneceu grande suporte para a realização desse trabalho.

À Maria Teresa Síbio, Miriane de Oliveira, Fernanda Cristina Fontes Moretto e Bianca Mariani Gonçalves sempre presentes desde o início dessa caminhada. Pessoas que Deus colocou em minha vida para abençoar pessoalmente e profissionalmente. Deus recompense grandemente. Também ao Lucas Solla Mathias, Igor Carvalho Deprá pela ajuda que nunca foi negada e pela amizade e Sarah Maria Berneze Costa.

Ao meu amigo que sempre deixa muita saudade, Mário Bruno, por interceder pela minha vida e pelos sábios conselhos e ensinamentos que me deu em todas as dificuldades enfrentadas na pós graduação e na minha vida.

À todas as bibliotecárias dessa Universidade, exemplo de educação, simpatia e atenção  
Aos profissionais da Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX) por todo auxílio prestados e amizade.

Aos funcionários e amigos da seção de Pós-graduação pelo carinho, simpatia e disposição em ajudar sempre.

Ao departamento de Clínica Médica - Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro e por viabilizar a realização desse estudo.

*Ao Deus justo e fiel*

*Aquele que começou boa obra há de completá-la  
Filipenses 1.6 porque a palavra do Senhor é reta e todas as  
suas obras são fiéis. Salmo 33.4*

## Resumo

O tecido ósseo é extremamente complexo e regulado por fatores sistêmicos e locais, apresentando considerável atividade metabólica que envolve a remoção do osso mineralizado pelos osteoclastos, seguida pela formação da matriz óssea pelos osteoblastos. A associação de triiodotironina (T3) e estrógeno (E2) pode levar a uma resposta complexa à atividade do tecido ósseo sendo que o T3 possui efeito tanto sobre a reabsorção como na formação óssea e o E2, em baixo nível, pode levar a osteoporose e no estado normal garante a supressão de citocinas, a partir do sistema RANKL, OPG e c-Fos, que participam ativamente no remodelamento ósseo. Dessa forma, muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de verificar a ação hormonal sobre o metabolismo ósseo. Entre essas pesquisas, têm sido isoladas células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir do tecido adiposo humano e diferenciadas em osteoblastos. Baseado nisso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito do T3 e E2 nas concentrações infrafisiológica (T3I/  $10^{-10}$ M e E2I/  $10^{-9}$ M); fisiológicas (T3F/ $10^{-9}$ M e E2F/ $10^{-8}$ M) e suprafisiológicas (T3S/ $10^{-8}$ M) separadamente e em diferentes associações de T3I (T3I+E2I e T3I+E2F); T3F (T3F+E2I e T3F+E2F) e T3S (T3S+E2I e T3S + E2F) e diferentes associações de E2I (E2I+T3I e E2I+T3F e E2I+T3S); E2F (E2F+T3I e E2F+T3F e E2F+T3S) sobre a expressão gênica e proteica de RANKL, OPG e c-FOS. Quando associados, a maioria desses hormônios aumentou os níveis gênicos da célula estudada. Em conclusão, podemos afirmar que as doses analisadas de T3 e E2, foram capazes de aumentar os níveis gênicos e a síntese proteica de RANKL, OPG e c-FOS e que principalmente nas associações foi eficaz para aumentar a expressão gênica desses genes.

**Palavra chave:** Células-tronco mesenquimais; Triiodotironina; Estrógeno; RANKL; OPG e c-FOS e osteoblasto.



## **Abstract**

Bone tissue is extremely complex and is regulated by systemic and local factors, presenting a considerable metabolic activity involving the removal of mineralized bone by osteoclasts in balance with the formation of bone matrix by osteoblasts. The association of triiodothyronine (T3) and estrogen (E2) may lead the activity of bone tissue to complex responses, due to T3 effects on both bone formation and reabsorption, and E2 being able to lead to osteoporosis when at low levels, or, at normal levels, maintain the suppression of the cytokines RANKL, OPG, and c-FOS, which take part actively on bone remodeling. To date, many studies have been done to verify hormone actions on bone metabolism. Among them, mesenchymal stem cells (MSC) have been isolated from human adipose tissue and differentiated into osteoblasts. The aim of our study was to evaluate the effect of both T3 and E2 on RANKL, OPG, and c-FOS gene and protein expression, at infra- (T3I,  $10^{-10}$ M; E2I,  $10^{-9}$ M), physiological (T3F,  $10^{-9}$ M; E2F,  $10^{-8}$ M) supra- (T3S,  $10^{-8}$ M) and doses. Cells were treated with hormones separately or in all possible combinations of T3 and E2 doses. The majority of associated treatments increased gene expression levels of all genes. We can state that the doses included in this study, of both hormones, efficiently increase the expression of the analyzed genes, especially when associated.

**Key-words:** Mesenchymal stem cells; Triiodothyronine; Estrogen; RANKL; OPG; c-FOS; osteoblast.

## Sumário

1.Introdução.....	1
1.1 Osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais .....	2
1.2 Ação da via OPG/RANK/RANKL.....	3
1.2.1 Interação do fator de transcrição c-Fos na via OPG/RANK/RANKL.....	4
1.3 Papel do hormônio Tireoidiano no remodelamento ósseo .....	5
1.4 Papel do Estrógeno na remodelação óssea .....	6
2. Hipótese.....	7
3. Objetivos.....	7
3.1 Objetivo Geral .....	7
3.2 Objetivos Específicos .....	7
Referências Bibliográficas.....	9
4. Resultados.....	13
4.1 Manuscrito 1 .....	13
Introduction .....	16
Materials and Methods .....	17
Results .....	22
Discussion.....	30
Conclusions .....	32
4.2 Manuscrito 2 .....	37
Introdução.....	41
Pacientes e Métodos .....	42
Resultados.....	46
Discussão .....	55
Conclusão .....	59
Referências Bibliográficas.....	60
4.3 Manuscrito 3 .....	63
Introdução.....	66
Pacientes e Métodos .....	67
Resultados.....	71
Discussão.....	79
Conclusão .....	83

Referências .....	83
Conclusão .....	86

## **Introdução**

O osso é um tecido que tem o poder de regenerar e reparar-se constantemente ao longo de toda a vida. Esse processo designado remodelação óssea permite a reparação de ossos antigos e danificados. Dessa forma, células especializadas como os osteoclastos que removem a matriz mineralizada e osteoblastos que depositam nova matriz óssea, trabalham em conjunto durante este processo [1].

Os osteoblastos regulam diretamente a síntese e mineralização da matriz óssea por meio do seu próprio mecanismo de ação. Além disso, a reabsorção óssea é indiretamente controlada por essas células por meio de fatores parácrinos que atuam nos osteoclastos. Por exemplo, a liberação do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$  (RANKL) pelos osteoblastos inicia a reabsorção óssea, por meio da ligação ao receptor ativador do fator nuclear kappa  $\beta$  (RANK) presente na superfície de precursores de osteoclastos [2]. Ainda nesse processo de remodelação, a osteoprotegerina (OPG) produzida pelos osteoblastos é um receptor que se liga ao RANKL competindo com o RANK inibindo a diferenciação e o processo de reabsorção pelos osteoclastos *in vitro* e *in vivo* [3]. A quantidade de OPG produzida regula a massa óssea e com a elevada produção dessa proteína faz com que o RANKL esteja menos disponível para ligação com o RANK, favorecendo assim o aumento da massa óssea. Menores concentrações de OPG resultam em maior disponibilidade de RANKL para a ligação com RANK, contribuindo para maior reabsorção e diminuição da massa óssea [4]. Desse modo, acredita-se que a OPG possa ter efeito protetor sobre o osso.

Outro fator secretado pelos osteoblastos, que participa da remodelação, é a proteína c-Fos que, quando elevada, favorece a maturação e proliferação dos osteoblastos *in vitro* [5]. Essa proteína tem ação importante tanto nos osteoblastos como

nos osteoclastos, porém, ainda não é totalmente elucidado a função de c-Fos nos diferentes processos de remodelação óssea [6].

Fatores sistêmicos como hormônio tireoidiano e estrógeno atuam no tecido ósseo, tanto no processo de reabsorção como na formação óssea. Assim, no organismo, esses hormônios interagem com os fatores locais da remodelação para manter a integridade do esqueleto. Entretanto, não é totalmente esclarecido como esses hormônios atuam nas células ósseas apesar de algumas vias serem conhecidas [7].

### **1.1 Osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais**

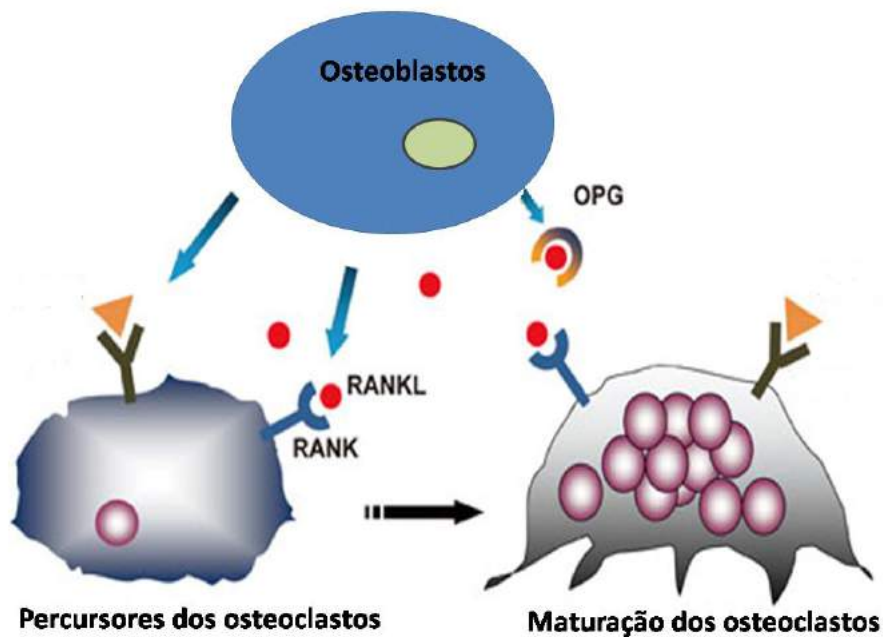
Nos últimos anos testemunhamos grande avanço no campo da biologia do tecido ósseo. A observação científica sobre esse tecido evoluiu de forma particularmente interessante, com o mesmo passando a ser considerado um órgão extremamente complexo, regulado por uma série de fatores sistêmicos e locais [8]. Nesse sentido, uma série de descobertas fundamentais tem contribuído para melhor entendimento da biologia óssea, dentre os quais podemos destacar a identificação de receptores para hormônios sexuais na membrana das células ósseas [9,10]; a identificação de linhagens de células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir do tecido adiposo (TA) e sua diferenciação em osteoblastos [11,12] e a indução à osteoclastogênese a partir do sistema OPG/RANKL/RANK [13].

Frente a isso, alguns estudos mostram que o TA, que é derivado do mesênquima, contém um estroma que pode ser isolado. Esse tecido representa fonte considerável de células-tronco (CT) com potencial de múltiplas linhagens. Estas células, chamadas de CT multipotentes derivadas de adipócitos, foram estabelecidas em cultura e mantiveram suas características ao longo de várias passagens [14]; além disso, podem se diferenciar, *in vitro*, em adipócitos, condroblastos e osteoblastos [15].

Sabe-se que, após o processo de diferenciação osteogênica, os osteoblastos desempenham importante 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 [16]. A diferenciação dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea, ocorre a partir de progenitores hematopoéticos, processo conhecido como osteoclastogênese. Conforme anteriormente explicitado, essas células mantêm uma estreita relação, objetivando a manutenção da massa óssea. Dessa forma, após a remoção do osso mineralizado pelos osteoclastos, ocorre a formação pelo osteoblastos [17], processo conhecido como remodelação óssea.

### **1.2 Ação da via OPG/RANK/RANKL**

Um importante estimulador da osteoclastogênese é a via OPG/RANK/RANKL. RANKL é produzido por precursores de osteoblastos e pode ser liberado na matriz óssea ou permanecer na membrana dessas células. Já o RANK está presente em precursores osteoclásticos que, ao se ligar com RANKL, ativa a diferenciação dos precursores à osteoclastos maduros. A osteoprotegerina (OPG), uma proteína homóloga aos membros da superfamília de receptores do TNF, atua como um inibidor solúvel da ativação dos osteoclastos, ligando-se ao RANKL e impedindo a maturação dessas células [18].



**Figura 1.** Sistema RANKL/RANKL/OPG: Osteoblastos regulam a diferenciação dos osteoclastos. A ligação RANKL/RANK ativa a diferenciação e maturação dos osteoclastos. A OPG liga-se ao RANKL e impede a ligação RANKL/ RANK e consequentemente a maturação dos osteoclastos e a reabsorção óssea. Adaptada de Na Kyung Lee, 2010 [19].

### 1.2.1 Interação do fator de transcrição c-Fos na via OPG/RANK/RANKL

O c-Fos, um componente da proteína ativadora 1 (AP-1) é um importante fator de transcrição para a osteoclastogênese [20]. A deficiência deste componente pode levar a osteopetrose grave, secundária a falta de osteoclastos maduros, visto que o mesmo é necessário para a diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Por outro lado, a superexpressão de c-Fos pode induzir ao osteossarcoma e/ou a osteoesclerose que são caracterizadas pelo aumento da massa óssea devido à maior diferenciação dos osteoblastos [21]. Nicholls *et al* [22] relatam que ele desenvolve importante função na

osteoclastogênese como parte da ativação da via RANKL. Porém, ainda há divergência quanto ao seu real efeito na manutenção do estado de diferenciação de osteoclastos [20].

### **1.3 Papel do hormônio Tireoidiano no remodelamento ósseo**

As ações do hormônio triiodotironina (T3) no osso são complexas e apenas parcialmente compreendidas. Sabe-se que o T3 age por meio de vias diretas e indiretas, durante todas as fases do ciclo do remodelamento ósseo e possui efeito tanto sobre a reabsorção como sobre a formação óssea sendo, portanto, importante para a manutenção da integridade do esqueleto. Além disso, o hormônio aumenta a expressão do mRNA do RANKL em células pré-osteoblásticas, ativando a osteoclastogênese [23].

A interação da atividade dos osteoblastos com osteoclastos, definido como remodelamento ósseo, diminui na vida adulta. Esse fato pode se agravar com a ocorrência do hipotireoidismo [24], predispondo ao retardo neste remodelamento, principalmente na fase de mineralização [25]. Já no hipertireoidismo, ocorre um aumento na atividade osteoblástica e osteoclástica com predomínio de reabsorção óssea, representando fator de risco para a osteoporose [26].

Contudo, alguns estudos relatam que a reabsorção óssea osteoclástica estimulada pelo T3 ocorre somente na presença de co-culturas de osteoblastos [27,28] indicando que o alvo primário da ação do T3 é osteoblastos. Isto indica uma possível interação com o RANKL para que o processo de diferenciação induzida pelo hormônio ocorra. Entretanto, Kanatani *et al.* [28] observaram que T3 estimulou a diferenciação osteoclástica de maneira dose-dependente, aumentando a OPG, mas não a expressão do RANKL, sugerindo que o efeito estimulatório do T3 na formação de osteoclastos não foi mediado pelo sistema RANKL/OPG.



Outros fatores, como c-Fos e prostaglandina E2 (PGE2) poderiam regular a diferenciação osteoclástica independentemente do sistema RANK/RANKL. Embora o hormônio tireoidiano aumente a atividade de osteoblastos e osteoclastos *in vivo* e em cultura de células, pouco é conhecido sobre seus efeitos na transcrição de genes alvo nestas células [7].

#### **1.4 Papel do Estrógeno na remodelação óssea**

Devido às suas múltiplas funções, os osteoblastos e osteoclastos estão sob controle rigoroso de hormônios, dentre eles o estradiol (E2) [29]. Esse hormônio pode tanto estimular como inibir a proliferação de osteoblastos, e também exercer importante influência nos osteoclastos. A diminuição do E2 estimula a osteoclastogênese, o que ocorreria via mediação osteoblástica e seria dependente da presença de receptores para interleucina-6 (IL-6) nessas células [30]. O E2 se liga aos osteoblastos induzindo-os a aumentar a produção de OPG e suprimir a produção de RANKL – uma combinação de sinais que impede a formação de osteoclastos, mantendo o controle sobre a perda óssea [31,32].

A diminuição do E2 é o fator responsável pela gênese da osteoporose após a menopausa, por interferir na atividade metabólica óssea, acelerando o ciclo de remodelação com perda óssea intensa [33]. Porém, apesar do E2 poder diminuir a osteoclastogênese [32]. Existem evidências sugerindo que o declínio da função ovariana após a menopausa, com declínio de E2, estaria associado com o aumento espontâneo de proteínas como RANKL e OPG [34].

Considerando as possíveis repercussões ósseas das alterações nas concentrações tanto do T3 como do E2 e a presença de pontos não elucidados nessa fisiopatologia, o presente estudo pretendeu avaliar em osteoblastos, a expressão gênica e proteica de

fatores locais envolvidos na remodelação óssea e que poderiam induzir a osteoclastogênese, na presença e ausência de T3 e E2. Esse estudo resultou em três manuscritos, os quais se encontram expostos ao longo dessa tese.

## Referências Bibliográficas

1. Hadjidakis D J, Androulakis I I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006; 1092: 385–396.
2. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédini F, Heymann D. Rankl/ RANK. osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64:2334–50.
3. Arikan F, Buduneli N, Küçükç,üler N. Osteoprotegerin levels in peri-implant crevicular fluid. *Clin Oral Implants Res.* 2008; 19:283–8.
4. Kim YD, Kim SS, Hwang DS, Kim SG, Kwon YH, Shin SH, et al. Effect of low-level laser treatment after installation of dental titanium implant-immunohistochemical study of RANKL, RANK, OPG: an experimental study in rats. *Lasers Surg Med.* 2007; 39: 441–50.
5. McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, et al. Developmental expression and activities of specific fos and jun proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology.* 1996; 137: 4398 - 4408.
6. Wagner EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* 2002;61 Suppl 2:ii40-2.
7. 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 thyroih hormone. *Cell Biochem Funct.* 2008; 26:107-10.
8. Urano T. Updates on lifestyle-related diseases and bone metabolism. Genomic aspects of metabolic syndrome and osteoporosis. *Clin Calcium.* 2014;11:1631-41.

9. Chaudhri RA, Schwartz N, Elbaradie K, Schwartz Z, Boyan BD. Role of ER $\alpha$ 36 in membrane-associated signaling by estrogen. *Steroids*. 2014;81:74-80.
10. Torday JS. Evolution and cell. *Am J Physiol Cell*. 2013;7:682-9.
11. Cordeiro-Spinetti E, de Mello W, Trindade LS, Taub DD, Taichman RS, Balduino A. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation. *Front Cell Dev Biol*. 2014;27:2-7.
12. Halai M, Ker A, Meek RD, Nadeem D, Sjoström T, Su B, et al. Scanning electron microscopical observation of an osteoblast/osteoclastco-culture on micropatterned orthopaedic ceramics. *J Tissue Eng*. 2014 Sep 19;5:2041731414552114. doi: 10.1177/2041731414552114. eCollection 2014.
13. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front Immunol*. 2014;20:500-11.
14. Tsuji W, Rubin JP, Marra KG. Adipose-derived stem cells: implications in tissue regeneration. *World J Stem Cells*. 2014;6:312-21.
15. 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;7:552-64.
16. Hayden RS, Fortin JP, Harwood B, Subramanian B, Quinn KP, Georgakoudi I, et al. Cell-tethered ligands modulate bone remodeling by osteoblast and osteoclasts. *Adv Funct Mater*. 2014;4:472-9.
17. Feng X, McDonald JM. disorders of bone remodeling. *Ann Rev Pathol Mech Dis*. 2011; 6:121-45.
18. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-

inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95:3597.

19. Na Kyung Lee. Molecular Understanding of Osteoclast Differentiation and Physiology. *Endocrinol Metab.* 2010; 4: 264: 269.

20. Wagner EF, Matsuo K. Signalling in osteoclasts and the role of Fos/AP1 proteins. *Ann Rheum Dis.* 2003; 62:83-5.

21. Ishida N, Hayashi K, Hoshijima M, Ogawa T, Koga S, Miyatake Y, et al. Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis in vitro and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J Biol Chem.* 2002; 277: 41147-56.

22. Nicholls JJ, Brassill NJ, Williams GR, Bassett JHD. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol.* 2012;213:209-21.

23. Mundy GRaC D, Oyajobi BO. Bone remodeling. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 5th ed. Washington: American Society for Bone and Mineral Research; 2003. p. 28-31.

24. Vestergaard P, Bassett L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. *Thyroid.* 2002;12:411-9.

25. Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR $\beta$ -selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol.* 2003;285:1135-41.

26. Beederman M, Farina EM, Reid RR. Molecular basis of cranial suture biology and disease: Osteoblastic and osteoclastic perspectives. *Genes Dis.* 2014;1:120-5.

27. Ikeda K, Takeshita S. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. *J Bone Metab.* 2014;21:163-7.
28. Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K. Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL /RANK interaction. *J Cell Physiol.* 2004; 201:17-25.
29. Wilson TG, Kornman KS. *A bioquímica e a fisiologia do periodonto.* São Paulo: Quintessence; 2001. Fundamentos de Periodontia. p. 61-107.
30. Bland R.. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin. Sci.* 2000; 98: 217-40.
31. Silha JV, Mishra S, Rosen CJ, Beamer W.G, Turner R.T, Powell D.R, et al. Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice. *J. Bone Miner. Res.* 2003; 18: 1834-41.
32. Kang JH, Ko HM, Moon JS, Yoo HI, Jung JY, Kim MS, et al. Osteoprotegerin expressed by osteoclasts: an autoregulator of osteoclastogenesis. *J Dent Res.* 2014; 11: 1116 -23.
33. Xiong J, Onal M, Jilka RL, Weinstein RS, Manolagas S. O' Brien CA. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nat Med.* 2011; 17: 1235–1241.
34. Dunder U, Kavuncu V, Ciftci IH, Evcik D, Solak O, Cakir T. et al. The effect of risedronate treatment on serum cytokines in postmenopausal osteoporosis: a 6-month randomized and controlled study. *J Bone Miner Metab.* 2009; 27: 464-470.

## **Conclusão**

A técnica aplicada permitiu o cultivo e caracterização das CTMs. A diferenciação osteoblástica a partir de agentes osteoindutivos e a comprovação da existência de osteoblastos foi conseguida pelos métodos aplicados. Essa metodologia foi adequadamente caracterizada e serviu como base para analisar o efeito das diferentes concentrações de T3 e E2 e suas associações sobre a expressão gênica e proteica de Rankl, OPG e c-Fos.

As concentrações de T3 estimularam o aumento da expressão gênica e proteica de RANKL e OPG e diminuiu progressivamente os níveis de mRNA e proteína de c-

Fos. Entre as associações de T3 e E2 foi demonstrado que potencializaram a expressão gênica de RANKL, OPG e c-Fos. Na associação de T3 $10^{-8}$ M e/ou E2I/ $10^{-10}$ M e/ou E2F/ $10^{-9}$ M foi observado que a interação RANKL/ OPG tem função primordial no controle da remodelação óssea.

A dose de E2 administrada ao grupo E2F elevou os níveis de RANKL, OPG e c-Fos em relação ao C, porém a expressão de RANKL mostrou-se aumentada no grupo E2I enquanto a expressão de OPG estava diminuída e não causou nenhum efeito sobre c-Fos. Ao associar o T3 aos tratamentos de E2, observamos que a presença de T3 aumenta os níveis gênicos de RANKL, OPG e c-FOS quando comparados aos grupos E2I ou E2F.



