



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

**Bruna Moretto Rodrigues**

**Avaliação da Ação do Hormônio Tireoidiano na  
Expressão dos RNAs Codificantes em Células  
Osteoblásticas Derivadas do Tecido Adiposo Humano**

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

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Célia Regina Nogueira

**Botucatu  
(2018)**

**Bruna Moretto Rodrigues**

**Avaliação da Ação do Hormônio Tireoidiano na  
Expressão dos RNAs Codificantes em Células  
Osteoblásticas Derivadas do Tecido Adiposo Humano**

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

Orientador (a): Prof(a). Dr(a). Célia Regina Nogueira

**Botucatu  
(2018)**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Rodrigues, Bruna Moretto.

Avaliação da ação do hormônio tireoidiano na expressão dos RNAs codificantes em células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo humano / Bruna Moretto Rodrigues. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Célia Regina Nogueira

Capes: 20700008

1. Metabolismo. 2. Osteoblastos. 3. Triiodotironina. 4. Hormônios tireoidianos. 5. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.

Palavras-chave: Metabolismo ósseo; Osteoblastos; RNASeq; T3S; Triiodotironina.

*A todos os pós-graduandos batalhadores.*

## ***Agradecimentos***

Aos meus pais, por apostarem em minha capacidade, pela confiança, suporte e apoio para que eu pudesse chegar onde estou.

A minha orientadora, Dra. Célia, que sempre me apoiou e confiou na minha capacidade fornecendo oportunidades que me proporcionaram aprendizados e experiências grandiosas.

As amigadas que pude fortalecer ou realizar durante esta jornada e suas grandes contribuições tanto para minha vida acadêmica quanto a pessoal.

Aos bioinformatas, que me auxiliaram em minhas análises e foram fundamentais para a execução deste trabalho e para meu aprendizado.

Aos técnicos de laboratórios e colegas de trabalho, que sempre foram companheiros e solícitos em me auxiliar em diferentes etapas do trabalho, além de contribuírem para meu aprendizado e crescimento.

A USP – ESALQ e a ULISBOA - IMM e aos profissionais que lá conheci, por me proporcionar novos aprendizados e compartilharem seus conhecimentos e tecnologias para meu desenvolvimento pessoal e de meu trabalho.

A UNESP - FMB e a Unipex, por fornecer toda a estrutura e suporte para que este trabalho fosse desenvolvido.

A CAPES e a FAPESP, pelos auxílios financeiros.

*“Os cientistas dizem que somos feitos de átomos, mas um passarinho me contou que somos feitos de histórias.”*

**Eduardo Galeano**

## **Resumo**

RODRIGUES, B.M. **Avaliação da Ação do Hormônio Tireoidiano na Expressão dos RNAs Codificantes em Células Osteoblásticas Derivadas do Tecido Adiposo Humano.** 2018. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2018.

O sistema esquelético é um sistema complexo com intenso metabolismo composto de células, proteínas e minerais. Os osteoblastos, são células fundamentais para o tecido, desempenhando duas funções principais: formação óssea e regulação da reabsorção por meio da modulação da osteoclastogênese. Sendo assim, essas células desempenham funções primordiais para o desenvolvimento e manutenção óssea. Diversas moléculas sistêmicas atuam no tecido, sendo os hormônios tireoidianos um destes. Eles são fundamentais para o metabolismo ósseo já que alterações hormonais culminam em desordens ósseas. Osteoblastos possuem receptores nucleares para T3 e apesar de pouco compreendido, ele afeta diversos aspectos do desenvolvimento da célula, assim como vias modulatórias da remodelação óssea. Diversas linhagens celulares têm sido utilizadas para estudos de osteoblastos, sendo as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo humano (hA-CTMs) um modelo promissor para osteoindução. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do T3 supra-fisiológico (T3S) na expressão gênica diferencial em osteoblastos diferenciados a partir de hA-CTMs. As células obtidas de 3 doadores foram submetidas a osteoindução por 16 dias com coquetel de diferenciação (dexametasona, ácido ascórbico e  $\beta$ -glicerofosfato) e caracterizadas pela presença de osteocalcina, fosfatase alcalina e matriz mineralizada. O tratamento com T3 ( $10^{-8}$ M) foi realizado por 72h e o RNA foi extraído para preparação das bibliotecas de mRNAs e sequenciamento na plataforma Illumina. A análise bioinformática englobou os softwares: FastQC para controle de qualidade, Kallisto para alinhamento (Hg19), Deseq2 no R para análise de expressão gênica diferencial (DE), análise de enriquecimento para Gene Ontology (GO) e REVIGO para construções de gráficos. A diferenciação osteoblástica foi confirmada pela presença de seus marcadores, assim como foi identificada a expressão gênica de outros marcadores, como fibronectina1 (FN1), osteonectina (SPARC) e colágeno tipo I (COL1A1/2). A qualidade dos RNAs, bibliotecas de mRNAs e reads obtidas do sequenciamento foram confirmadas, proporcionando a identificação de 659 genes DE. A maioria deles (55,5%) foram UP regulados pela condição

T3S identificando 30 termos GO enriquecidos. Dentre eles, o T3S modulou diversos termos ósseos: desenvolvimento ósseo, morfogênese da célula, diferenciação osteoblástica, regulação negativa da proliferação celular e ossificação; Termos de vias mecânicas (adesão célula-substrato, adesões focais, resposta ao estresse de cisalhamento líquido); Vias bioquímicas (prostaglandinas, calmodulina, TGF- $\beta$ /BMPs); Ritmo Circadiano; E diversos termos relacionados com ações moleculares. Além disso, o T3S aumentou a expressão dos genes SMAD6/7 e NOG, exercendo ação negativa sobre as vias BMPs e SMADs, favorecendo a regulação das vias TGF- $\beta$  e MAPK. As informações obtidas neste estudo comprovam a ação do T3 em osteoblastos obtidos de hA-CTMs, evidenciando seu papel modulatório em diversos níveis biológicos. Além disso, as vias bioquímicas identificadas, não estão relacionadas apenas com osteoblastos, mas com reabsorção óssea osteoclástica, apontando a complexidade da ação do T3 no metabolismo ósseo. Por fim, foi proposto uma esquematização de vias de sinalização reguladas pela condição T3S, que pode nortear investigações mais específicas desta ação hormonal em osteoblastos e no tecido ósseo.

**Palavras chaves:** Metabolismo ósseo, Osteoblastos, Triiodotironina, T3S, RNASeq.



## **Abstract**

RODRIGUES, B.M. **Evaluation of Thyroid Hormone Action Upon Encoding RNAs Expression in Osteoblastic Cells Derived from Adipose Tissue.** 2018. Thesis (Master) – Medical School Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, 2018.

The skeletal system is complex and have an intense metabolism compound with cells, proteins and minerals. The osteoblasts are fundamental cells to the tissue, executing two mainly functions: bone formation and regulation of reabsorption through osteoclastogenesis modulation. Therefore, these cells perform primordial functions to the bone development and maintenance. Several systemic molecules act in the tissue and the thyroid hormones are one of them. They are fundamental to the bone metabolism, once hormone alterations result in bone disorders. Osteoblasts have T3 nuclear receptors, and although not well elucidated it affects many aspects of the cell development so as pathways that modulates the bone remodeling. Several cells lineages have been used in osteoblasts studies, and human adipose-derived Mesenchymal stem-cells (hA-MSCs) are a promising model to osteoinduction. Thus, the aim of this study was to investigate the supraphysiological T3 (T3S) influence in the gene differential expression in osteoblasts differentiated from hA-MSCs. The cells obtained from three donators were submitted to osteoinduction for 16 days with a differentiation cocktail (dexamethasone, ascorbic acid,  $\beta$ -glycerophosphate) and characterized by the presence of osteocalcin, alkaline phosphate and mineralized matrix. The cells were treated with T3 ( $10^{-8}$ M) for 72h and the RNA was extracted to mRNA library prepare and sequenced by Illumina platform. The bioinformatic analysis included the software: FastQC to quality control, Kallisto to alignment (Hg19), Deseq2 in R to differential gene expression (DE) analysis, enrichment analysis to Gene Ontology (GO) and REVIGO to graphs construction. The osteoblastic differentiation was confirmed by the presence of their markers as well as was identified the gene expression of other markers, such as: fibronectin 1 (FN1), osteonectin (SPARC) and collagen type 1 (COL1A1/2). The RNAs, mRNA library and sequencing reads quality were confirmed, providing the identification of 659 genes DE. The majority (55,5%) were upregulated by T3S condition with 30 GO terms identified. Between them, the T3S modulated several bone terms: bone development, cell morphogenesis, osteoblastic differentiation, negative regulation of cell proliferation and ossification; Mechanical pathway terms (cell-substrate adhesion, focal adhesion and response to fluid shear stress); Biochemical

pathways (prostaglandins, calmodulins, TGF-  $\beta$ /BMPs); Circadian rhythm; And diverse terms related to molecular action. Also, the T3S increased the expression of the genes SMAD6/7 and NOG, exercising negative action on BMPs and SMADs pathways and promoting the regulation of TGF- $\beta$  and MAPK pathways. The information obtained in this study confirm the T3 action in osteoblasts from hA-MSCs, demonstrating their modulatory role in several biologic levels. Furthermore, the biochemical pathways identified, are not related only to osteoblasts, but with bone osteoclastic reabsorption, highlighting to the complexity of T3 action in the bone metabolism. Finally, it was proposed a diagram of the signaling pathways regulated by T3S, which can be a guiding study to more specific investigations of this hormonal action in osteoblasts and in the bone tissue.

**Key-Words:** Bone Metabolism, Osteoblasts, Triiodothyronine, T3S, RNASeq.

## Sumário

<b>1. Introdução</b>	<b>12</b>
1.1 Tecido Ósseo	12
1.1.1. Osteoblastos	12
1.1.1.1. Formação óssea	13
1.1.1.2. Regulação da reabsorção óssea	13
1.2. Hormônios tireoidianos no metabolismo ósseo	13
1.3. Modelo <i>in vitro</i> para estudo de osteoblastos	13
<b>2. Objetivos</b>	<b>17</b>
2.1. Hipótese	17
2.2. Objetivos	17
2.2.1. Objetivo Geral	17
2.2.2. Objetivos Específicos	17
<b>Referências</b>	<b>18</b>
<b>3. Resultados</b>	<b>21</b>
3.1. Manuscrito	21
Resumo	22
Abstract	22
Introdução	23
Metodologia	24
Resultados	25
Discussão	29
Referências	34
<b>Anexos</b>	<b>39</b>
A. Comitê de Ética	39
B. Alteração de Título	41
<b>Apêndices</b>	<b>42</b>
A. Quantificação de Fosfatase Alcalina	42
B. Quantificação de Osteocalcina	42
C. Quantificação da matriz mineralizada	43
D. Qualidade do RNA	43
E. Qualidade das bibliotecas de mRNA	44
F. Análise Bioinformática	45

### 1.1. Tecido Ósseo

O sistema esquelético é um sistema complexo com intenso metabolismo, que apresenta funções estruturais e metabólicas essenciais para a vida, promovendo suporte e movimento do corpo, proteção para os órgãos viscerais e reserva de minerais cálcio e fosfato (1,2). O osso possui componentes orgânicos: células (osteócitos, osteoblastos e osteoclastos), colágeno tipo I, proteínas não colágenas e lipídeos; e componentes inorgânicos: cristais de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  – compostos por cálcio (Ca) e fosfato (P) - e outros minerais como magnésio, sódio e potássio (1,3).

Durante toda a vida do indivíduo adulto, ocorre um processo de manutenção dos ossos, chamado de remodelação óssea. Processo pelo qual os osteoclastos reabsorvem matriz óssea e os osteoblastos formam nova matriz, promovendo a substituição de ossos velhos e reparo de danos (1,2). O processo de remodelação equilibrado é imprescindível para a homeostase do tecido. O desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea pode afetar a integridade do esqueleto levando à perda de massa óssea, enfraquecimento dos ossos e aumento do risco de fraturas, ocasionando em diversas desordens, como Osteoporose, doença de Paget, Osteopetrose e Osteossarcoma (1–5).

#### 1.1.1.1. Osteoblastos

Originados de células-tronco mesenquimais, o processo de diferenciação dos osteoblastos é regulado por dois principais fatores de transcrição, RUNX2 e OSTERIX, e por diferentes vias de sinalização como WNT e BMP/TGF- $\beta$  (6). Essas células vivem ativas de poucos até 100 dias, e após esse período, podem adentrar a matriz óssea extracelular (ECM) diferenciando-se em osteócitos (1,3); podem se transformar em células de revestimento ósseo; ou podem sofrer apoptose (7).

Há três fases no seu desenvolvimento: Proliferação, Maturação da matriz e Mineralização da matriz (6). São células fundamentais para a manutenção da massa óssea e desempenham duas funções primordiais:

### **1.1.1.2. Formação óssea**

Esse processo ocorre por meio da síntese, deposição e mineralização da ECM. A ECM é composta por materiais inorgânicos em sua maioria e matriz orgânica (osteóide). Primeiramente, os osteoblastos maduros sintetizam no citoplasma as proteínas do osteóide: colágeno tipo I em sua maioria, proteínas ósseas como osteocalcina, osteopontina e sialoproteína, e fatores de crescimento (BMP e TGF- $\beta$ ) (6,8). Após sua ligação com a matriz extracelular no local de formação do novo osso por meio de integrinas, os osteoblastos são ativados por mecanotransdução e depositam o osteóide no local específico (6).

O processo de mineralização se inicia com o acúmulo dos íons Ca e P em vesículas intracelularmente e formação dos cristais de hidroxiapatita pelo auxílio de moléculas ligadas ao Ca e da Fosfatase Alcalina (FA) (7,8). Os cristais são secretados pela célula sobre a ECM e as proteínas ósseas e fibras de colágeno auxiliam na sua deposição e distribuição. O estresse de cisalhamento de fluido (FSS) também influencia no processo de deposição mineral (7).

### **1.1.1.3. Regulação da Reabsorção óssea**

Os osteoclastos são responsáveis pela remoção da matriz mineralizada, promovendo a reabsorção óssea através da liberação de enzimas proteolíticas (1,2). A osteoclastogênese é o processo pelo qual células precursoras de osteoclastos (mononucleadas) se fundem e diferenciam-se em osteoclastos maduros (multinucleados) ativos. O principal mecanismo regulador da osteoclastogênese - e consequentemente da remodelação óssea - é mediado por osteoblastos pelas vias RANK/RANKL/OPG (1,4).

## **1.2. Hormônios tireoidianos no metabolismo ósseo**

Os hormônios da tireoide são essenciais para o desenvolvimento ósseo, desempenhando funções importantes sobre sua formação (durante o desenvolvimento) e manutenção (na fase adulta). Alterações nos níveis desses hormônios afetam o metabolismo ósseo podendo causar doenças. Crianças com alterações hormonais apresentam diversas irregularidades na formação óssea, no qual o hipotireoidismo atrasa o desenvolvimento ósseo e o hipertireoidismo o acelera (9–11).

Em adultos, a Triiodotironina (T3) atua sobre o turnover e remodelação óssea. No hipotireoidismo, há diminuição do turnover, prolongamento do ciclo de remodelação e

comprometimento da atividade de osteoblastos e osteoclastos. Já no hipertireoidismo, há aumento do turnover ósseo, encurtamento do ciclo de remodelação e aumento da formação e reabsorção, porém em proporções irregulares. Esses fatos resultam em aumento do risco de fraturas no hipotireoidismo e perda de massa óssea, aumento do risco de fraturas e osteoporose no hipertireoidismo (9,10,12).

Ambos os receptores nucleares, TR $\alpha$ 1 e TR $\beta$ 1, estão presentes tanto no tecido ósseo como em suas células: osteoblastos, osteócitos e osteoclastos. No entanto, TR $\alpha$  é expresso em níveis superiores que o TR $\beta$ , sugerindo que esta isoforma é a principal via de ação do T3 neste tecido (10,12).

Sabe-se que *in vitro*, o T3 atua sobre osteoblastos estimulando sua diferenciação e atuando sobre seu metabolismo. Ele pode desempenhar ações autócrinas ou parácrinas, estimulando outras vias de ação sobre osteoblastos e modula a expressão de diversas citocinas envolvidas na osteoclastogênese e remodelação óssea (9–11) (Tabela1). Estudos com osteoblastos diferenciados de CTMs derivadas do tecido adiposo humano mostraram que o T3 afeta sua diferenciação e expressão de marcadores. Em dose suprafisiológica, ele diminuiu a quantidade de matriz extracelular, aumentou produção de RANKL e diminuiu TNF- $\alpha$  (13,14).

**Tabela 1.** Ação do T3 sobre Osteoblastos. O T3 atua na diferenciação osteoblástica e afeta seu metabolismo. T3 aumenta a expressão dos marcadores de diferenciação citados. Pode ter ação parácrina sobre outras vias de desenvolvimento sobre osteoblastos. E afeta moduladores da remodelação óssea.

---

### **Ação do T3 em Osteoblastos**

---

#### **Marcadores de diferenciação**

Colágeno tipo I, Osteopontina, Osteocalcina, Fosfatase Alcalina, MMP-9  
(Metaloproteinase de matriz 9), MMP-13

#### **Ação parácrina sobre outras vias**

IGF-1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1), PTH (Hormônio da paratireoide), FGF (Fator de crescimento fibroblástico)

#### **Citocinas da remodelação óssea**

RANKL, OPG, M-CSF (Fator de estimulação de colônias de macrófagos), IL-6, IL-8, PGE2  
(Prostaglandina 2)

---

Outro fato importante é que colônias de osteoclastos estimuladas com T3 *in vitro*, não apresentam aumento de reabsorção óssea, diferentemente do que ocorre em co-culturas com osteoblastos. Diante disso, supôs-se que o T3 induz indiretamente a reabsorção óssea, por meio da ação direta sobre osteoblastos (15).

### **1.3. Modelo *in vitro* para estudo de osteoblasto**

Para o estudo do tecido ósseo e de seus complexos mecanismos, o cultivo de osteoblastos *in vitro* é um modelo promissor. Muitos modelos para cultivo de osteoblastos são utilizados em pesquisa, como células de origem animal (principalmente de camundongos), células imortalizadas, células malignas, células originadas de tecido primário sadios ou não e mais recentemente, células tronco induzidas (16,17). O uso de culturas primárias e de origem humana proporcionam menos vieses para a pesquisa clínica, com resultados mais relevantes e sem a desvantagem da diferença interespecie (17).

O uso de células-tronco mesenquimais (CTMs) com sua capacidade multipotente de diferenciação vem crescendo e atualmente elas são aplicadas para diversos fins: pesquisas, transplantes, medicina regenerativa, engenharia de tecidos, terapia celular, aplicações clínicas, entre outros. Elas podem ser obtidas através da medula óssea, tecido adiposo, cordão umbilical ou sangue peritoneal (18) e é possível induzir sua diferenciação para osteoblastos, adipócitos, condroblastos e mioblastos (6,19–24).

Apesar de atualmente ser o padrão ouro para usos clínicos, o processo de isolamento de CTMs da medula óssea apresenta algumas desvantagens já que é um procedimento doloroso que necessita do uso de anestesia geral, possui riscos de infecção e rende um número celular baixo. Outra opção de obtenção de CTMs é o isolamento por meio do tecido adiposo, que compreende um procedimento mais simples, de lipossucção, com rendimento alto de células. Esse procedimento vem ganhando notoriedade e se mostra promissor para o uso clínico (18,25).

Guneta, et al. (22) testou *in vitro* CTMs isoladas da medula óssea e do tecido adiposo sobre mesmas condições e observou que ambas são semelhantes quanto a morfologia, expressão fenotípica e potencial de diferenciação, no entanto, CTMs derivadas do tecido adiposo apresentaram maior capacidade de proliferação e auto renovação, além de apresentarem processo de senescência tardio. Muitos trabalhos têm desenvolvido metodologias de isolamento de CTMs a partir do tecido adiposo e de diferenciação osteoindutiva resultando em células osteoblásticas (13,22,23,26). O emprego desses novos

procedimentos e metodologias proporcionam maiores oportunidades para pesquisas e aplicações na área óssea.

Diante das informações descritas, foi possível transmitir uma visão geral do contexto no qual este trabalho está inserido.

Os osteoblastos, células ósseas, importantes para o processo de remodelação óssea, relacionadas com ambos os processos de formação e reabsorção, possuem respostas à ação *in vitro* ao hormônio T3, que *in vivo*, é de extrema importância para o metabolismo ósseo. O T3 afeta desde a diferenciação e metabolismo dessas células, até processos ósseos de turnover e remodelação. Dentre várias metodologias de obtenção deste tipo celular para estudos *in vitro*, foi apresentada aqui, uma nova metodologia de obtenção de CTMs a partir do tecido adiposo e sua diferenciação através de osteoindução.

Sabendo da importância do estudo do tecido ósseo sobre ação do T3, que em doses não fisiológicas provocam desordens ósseas, e que os osteoblastos possuem respostas diretas ao T3, compreender um pouco do metabolismo dos osteoblastos nos fará entender uma parcela a mais sobre o metabolismo ósseo frente a este hormônio.



## **2. Objetivos**

---

### **2.1. Hipótese**

O hormônio tireoidiano T3 modula o perfil transcricional de osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais obtidas a partir de tecido adiposo humano.

### **2.2. Objetivos**

#### **2.2.1. Objetivo Geral**

Analisar a expressão gênica diferencial de osteoblastos sobre efeito de T3 em dose suprafisiológica.

#### **2.2.2. Objetivos Específicos**

- Estabelecer e caracterizar cultura de osteoblastos a partir da diferenciação de CTMs obtidas de tecido adiposo humano.
- Tratar cultura de osteoblastos com hormônio T3 em dose suprafisiológica.
- Realizar o sequenciamento dos mRNAs através da técnica de sequenciamento de nova geração (RNASeq).
- Identificar perfis transcricionais e padrão de expressão gênica dos osteoblastos tratados e não tratados, comparando sua expressão diferencial.
- Analisar os termos ontológicas enriquecidos referentes aos genes diferencialmente expressos entre os grupos.

## Referências

1. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann NY Acad Sci.* 2006;396(1092):385–96.
2. Stapleton M, Sawamoto K, Alméciga-Díaz CJ, Mackenzie WG, Mason RW, Orii T, et al. Development of Bone Targeting Drugs. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1345):1–15.
3. Cawthray J, Wasan E, Wasan K. Bone-seeking agents for the treatment of bone disorders. *Drug Deliv Transl Res.* 2017;1–16.
4. Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(12):1332–41.
5. Feng X, McDonald JM. Disorders of Bone Remodeling. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2011;6(1):121–45.
6. Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci.* 2007;12(May 2014):3068–92.
7. Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, Perrault CM. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4(November).
8. Fernández-Tresguerres-Hernández-Gil I, Alobera-Gracia MA, Del-Canto-Pingarrón M, Blanco-Jerez L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):E47-51.
9. Waung JA, Bassett JHD, Williams GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal development and adult bone maintenance. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(4):155–61.
10. Wojcicka A, Bassett JHD, Williams GR. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(7):3979–86.
11. Kim H-Y, Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. *Bone Res.* 2013;1(2):146–61.
12. Pascual A, Aranda A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(7):3908–16.
13. Olimpio RMC. Efeito da triiodotironina (T3) e estrógeno (T2) sobre a expressão gênica e proteica de RANKL, OPG E c-FOS em osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais humanas. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina,

- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2017.
14. Costa SMB. Efeito do estrógeno (E2) e da Triiodotironina (T3) na síntese proteica de RANKL e TNF- $\alpha$  em células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo. [Dissertação]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2017.
  15. Harvey CB, O’Shea PJ, Scott AJ, Robson H, Siebler T, Shalet SM, et al. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function. *Mol Genet Metab.* 2002;75(1):17–30.
  16. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res Part A.* 2014;102(8):2636–43.
  17. Czekanska E, Stoddart M, Richards R, Hayes J. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cells Mater.* 2012;24:1–17.
  18. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baghaban Eslaminejad M. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs.* 2017;204(2):59–83.
  19. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 2007;109(4):1743–51.
  20. Rolandsson S, Andersson Sjöland A, Brune JC, Li H, Kassem M, Mertens F, et al. Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells. *BMJ Open Respir Res.* 2014;1(1):e000027.
  21. Lee WC, Shi H, Poon Z, Nyan LM, Kaushik T, Shivashankar G V., et al. Multivariate biophysical markers predictive of mesenchymal stromal cell multipotency. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(42):E4409–18.
  22. Guneta V, Tan NS, Chan SKJ, Tanavde V, Lim TC, Wong TCM, et al. Comparative study of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in similar microenvironmental conditions. *Exp Cell Res.* 2016;348:155–64.
  23. Hamid AA, Idrus R, Aminuddin S Bin, Sathappan S, Chua K. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during induction of cartilage differentiation. *Clinics.* 2012;67(2):99–106.
  24. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(6):455–63.
  25. Klar AS, Zimoch J, Biedermann T. Skin Tissue Engineering: Application of Adipose-

Derived Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–12.

26. Wang N, Wang F, Gao Y, Yin P, Pan C, Liu W, et al. Curcumin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. *J Pharmacol Sci.* 2016;132:192–200.

### 3.1. Manuscrito

#### **Molecular Mechanisms of Action of Supraphysiological T3 in human osteoblasts identified from RNASeq**

Mecanismos moleculares de ação do T3 Suprafisiológico em osteoblastos humanos identificados a partir de RNASeq

Bruna Moretto Rodrigues<sup>1</sup>, Lucas Solla Mathias<sup>1</sup>, Regiane Marques Castro Olimpio<sup>1</sup>, Sarah Maria Barneze Costa<sup>1</sup>, Miriane de Oliveira<sup>1</sup>, Célia R. Nogueira<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Internal Medicine, Medical School Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil.

#### **Corresponding Author:**

Bruna Moretto Rodrigues

Medical School Botucatu, São Paulo State University - UNESP

Distrito de Rubião Jr s/n, 18618-000 - Botucatu, SP, Brazil.

E-mail: bruna.morettor@gmail.com

## Resumo

Os hormônios tireoidianos são essenciais para o desenvolvimento e manutenção dos ossos. Os osteoblastos, células efetoras do tecido, que atuam na formação e remodelação óssea, são modulados pelo T3, porém, por mecanismos ainda pouco elucidados. Assim, o objetivo do estudo foi investigar a influência do T3 suprafisiológico (T3S) sobre a expressão gênica de osteoblastos humanos, a fim de elucidar mecanismos envolvidos nesta ação. As células, obtidas a partir da osteoindução de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano de 3 doadores, foram caracterizadas e tratadas com T3 ( $10^{-8}$ M). Os dados de expressão gênica foram obtidos a partir de RNASeq e análise bioinformática (Kallisto e Deseq2) além de análises de enriquecimento de Gene Ontology (GO). Foram identificados 659 genes diferencialmente expressos pelo tratamento, sendo a maioria (55.5%) UP regulados, com identificação de 30 termos GO. O T3S modulou diversos termos ósseos: desenvolvimento ósseo, morfogênese da célula, diferenciação osteoblástica, regulação negativa da proliferação celular e ossificação; Termos de vias mecânicas (adesão célula-substrato, adesões focais, resposta ao estresse de cisalhamento líquido); Vias bioquímicas (prostaglandinas, calmodulina, TGF- $\beta$ /BMPs); Ritmo Circadiano; E diversos termos relacionados com ações moleculares. Além disso, verificamos que o T3S aumentou a expressão dos genes SMAD6/7 e NOG, exercendo ação negativa sobre as vias BMPs e SMADs, favorecendo a regulação das vias TGF- $\beta$  e MAPK. As informações obtidas no estudo apresentam de forma geral novos conhecimentos sobre a ação do T3S em osteoblastos, podendo ser um norteador para investigações mais específicas.

**Palavras-Chave:** Metabolismo ósseo, Osteoblastos, Triiodotironina, T3S, RNASeq.

## Abstract

The thyroid hormones are essential to the development and maintenance of bones. The osteoblasts, effective cells of the tissue, that act in the bone formation and remodeling, are modulated by T3, although, through mechanisms still not well elucidated. Thus, the aim of the study was investigated the influence of supraphysiological T3 (T3S) upon the human osteoblasts gene expression, in order to clarify the involved mechanisms in this action. The cells were obtained through the osteoinduction of mesenchymal stem-cells from human adipose tissue of three donators, characterized and treated with T3 ( $10^{-8}$ M). The gene

expression data were obtained from RNASeq and bioinformatics analysis (Kallisto and Deseq2) and analysis of gene ontology enrichment was performed. Were identified 659 genes differentially expressed, where the majority (55,5%) were upregulated with 30 GO terms identified. The T3S modulated several bone terms: bone development, cell morphogenesis, osteoblastic differentiation, negative regulation of cell proliferation and ossification; Mechanical pathway terms (cell-substrate adhesion, focal adhesion and response to fluid shear stress); Biochemical pathways (prostaglandins, calmodulins, TGF- $\beta$ /BMPs); Circadian rhythm; And several terms related to molecular action. Also, the T3S increased the expression of the genes SMAD6/7 and NOG, exercising negative action on BMPs and SMADs pathways and promoting the regulation of TGF- $\beta$  and MAPK pathways. The information obtained in this article provide, in general ways, new knowledge about the T3S action in osteoblasts and can be a guiding study to more specifics investigations.

**Key-Words:** Bone Metabolism, Osteoblasts, Triiodothyronine, T3S, RNASeq.

## Introdução

O sistema esquelético é um sistema complexo com intenso metabolismo, que apresenta funções estruturais e metabólicas essenciais para a vida (1,2). Dentre seus componentes, se encontram os osteoblastos, originados de células-tronco mesenquimais (CTMs), são responsáveis pela síntese, deposição e mineralização da matriz extracelular óssea promovendo a formação do osso (1,3). Além disso, são fundamentais para o controle do processo de remodelação óssea, modulando a osteoclastogênese e a reabsorção óssea (1,4).

Muitos fatores sistêmicos e locais atuam como reguladores desse processo, sendo os hormônios tireoidianos (HT) um destes (1,3,4). Os HT são essenciais para o desenvolvimento ósseo, desempenhando funções importantes sobre sua formação e manutenção. Alterações nos níveis desses hormônios afetam o metabolismo ósseo podendo causar doenças (5–7). Como exemplo, o hipotireoidismo resulta em aumento do risco de fraturas e o hipertireoidismo na perda de massa óssea e osteoporose (5,7,8).

Atualmente, diversos modelos celulares são utilizados para o estudo do tecido ósseo (9,10). Modelos de cultura primária de origem humana a partir de CTMs derivadas do tecido adiposo (hA-CTMs) são promissoras (11,12) e osteoblastos podem ser obtidos a partir de coquetéis de osteoindução sem dificuldades (13–20).

Sabe-se que osteoblastos apresentam receptores nucleares para os hormônios tireoidianos e que *in vitro*, a triiodotironina (T3) atua estimulando sua diferenciação e modulando seu metabolismo (5–7,20,21). No entanto, a ação do T3 sobre a proliferação, desenvolvimento celular e formação óssea ainda permanece controversa, devido a diferenças experimentais (22). Além disso, os mecanismos moleculares de ação envolvidos na atuação do T3 sobre o tecido ósseo em geral são pouco elucidados (5,6,8,22).

O presente estudo objetivou avaliar, por meio da análise do transcriptoma global (RNASeq), os efeitos do T3 sobre a expressão gênica em osteoblastos humanos a fim de elucidar mecanismos moleculares envolvidos nesta ação.

## **Metodologia**

### **Cultura de CTMs**

hA-CTMs obtidas de 3 doadores e devidamente caracterizadas (23), foram cedidas pelo banco de células da Unidade Experimental de Pesquisa (Unipex) da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB).

### **Indução Osteogênica e tratamento com T3**

As CTMs (4.000 células/cm<sup>2</sup>) foram submetidas a osteoindução com meio DMEN acrescido de dexametasona (100nM), ácido ascórbico (50µM) e β-glicerofosfato (10mM) por período de 16 dias e sua confirmação foi apresentada pela síntese de osteocalcina, fosfatase alcalina e formação de matriz mineralizada conforme descrito por Olímpio et al (24). Os osteoblastos foram tratados com T3 suprafisiológico (T3S), na concentração 10<sup>-8</sup>M, por 72h (20) e células sem acréscimo hormonal foram denominadas de grupo controle (C).

### **Sequenciamento do RNA**

O RNA Total dos osteoblastos extraído pelo método do Trizol (Invitrogen™) foi verificado quantitativamente (Qubit™ Fluorometer) e qualitativamente (Agilent 2100 Bioanalyzer). 500ng de RNA foi utilizado para a construção das bibliotecas de cDNA pelo TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation Kit (Illumina). Verificação da sua quantidade (KAPA Biosystems) e qualidade (Agilent 2100 Bioanalyzer) foram realizadas. Pair-end reads (100pb) foram obtidas no aparelho HiSeq 2500 (Illumina) pelo HiSeq® SBS Kit v4 (200 Cycle).



## **Análise Bioinformática**

O controle de qualidade das reads obtidas foi realizado através do FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). As reads foram alinhadas e quantificadas pelo Kallisto (versão 0.43.0) (25) utilizando como referência o índice do genoma humano (Hg19) (<http://www.ensembl.org>). Os dados de abundância (Counts) gerados foram importados pelo pacote Bioconductor Tximport do R (26) e utilizados pelo pacote Deseq2 (27) para a análise da expressão gênica diferencial. Deseq2 baseia-se no método de análise de “reads counts” e em modelos lineares generalizados, distribuição binomial negativo e estimativas “shrinkage” para dispersões (27). A análise do design multifator foi utilizada para controlar o efeito da variação biológica entre as amostras dentro da mesma condição. Em casos de alta variabilidade, Deseq2 baseia-se em estimativas genéticas para obter resultados (27). Essas abordagens fazem do Deseq2 uma poderosa ferramenta de análise de expressão diferencial e variação biológica (28). Os genes diferencialmente expressos (DE) foram classificados em “UP/DOWN” considerando valores de FoldChange (FC) > 1,2/-1,2 e Pvalue < 0,05. As análises de enriquecimento foram realizadas pelo Gene Ontology (GO) (<http://www.geneontology.org/>) através do teste exato de Fisher com correção múltipla FDR (FDR/Pvalue<0,05). Uma pré-análise foi realizada nos dados, e termos distantes da área de interesse foram eliminados. Para representação dos termos GO enriquecidos e agrupados por similaridade (Similaridade=0.7), gráficos interativos foram gerados pelo REVIGO (<http://revigo.irb.hr/>) (29).

## **Resultados**

### **Marcadores ósseos**

Além das proteínas ósseas osteocalcina e fosfatase alcalina e da formação de matriz mineralizada já analisadas, a metodologia nos permitiu verificar a expressão gênica de outros marcadores ósseos a partir do número de fragmentos gerados (Fragmentos por Kilobase por Milhão - FPKM), tais como: FN1 (Fibronectina 1), SPARC (Osteonectina), COL1A1 e COL1A2 (Colágeno tipo I) e ALPL (fosfatase alcalina).

Já que osteoblastos expressam os receptores nucleares TR $\alpha$  (mais comum) e TR $\beta$ , o nível de expressão em FPKM desses genes (THRA e THRB) foram verificados e encontramos expressão de ambos os genes, em uma proporção de THRA/THRB = 6.2.

## **Regulação transcricional pela condição T3S**

A fim de verificar as modificações transcricionais provocadas pela condição T3S, foi analisada a expressão gênica diferencial entre os grupos T3S e controle (T3SxC), no qual obteve-se 659 genes DE, sendo 366 UP-regulados e 293 DOWN-regulados.

A [Figura1](#) apresenta por meio de um Heatmap a DE entre os grupos analisados, considerando os 50 genes UP regulados com maiores FC. É possível notar que os grupos com tratamento de T3S apresentam maior expressão genética em relação aos grupos controles, representando assim sua UP regulação.

## **Análise de Gene Ontology**

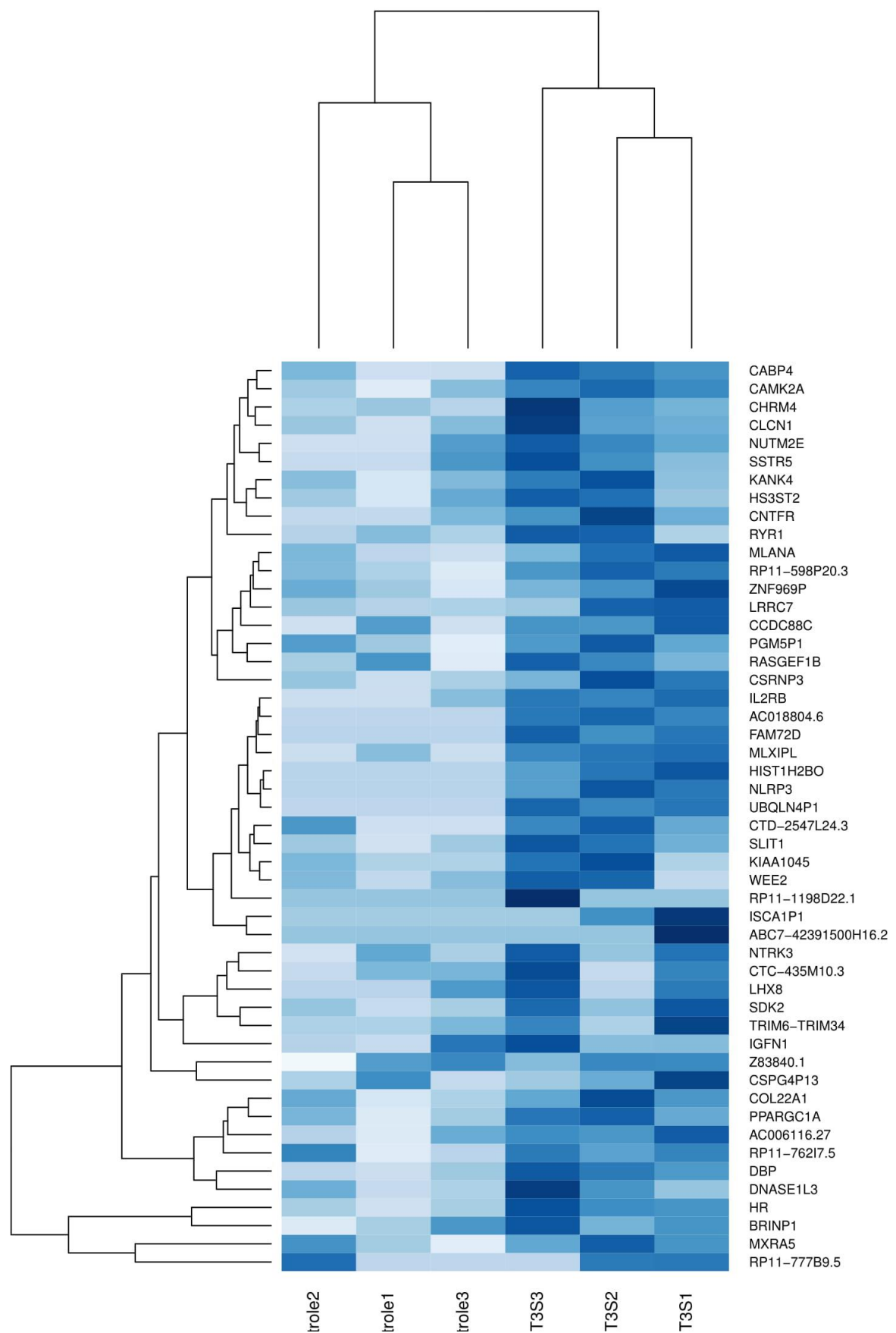
Para maior compreensão da ação dos genes DE, analisou-se termos GO enriquecidos. A fim de simplificar a interpretação dos resultados e a elucidação dos mecanismos biológicos afetados, foi utilizada a ferramenta REVIGO, no qual agrupa e resume listas de termos GO com base em similaridade semântica, reduzindo termos redundantes (29).

A comparação T3SxC apresentou apenas termos enriquecidos para os genes UP, sendo 30 no total. Observa-se termos relacionados com Processos Biológicos (PB) na [Figura2](#), Funções Moleculares (MF) na [Figura3](#) e sem agrupamento por similaridade na [Figura4](#).

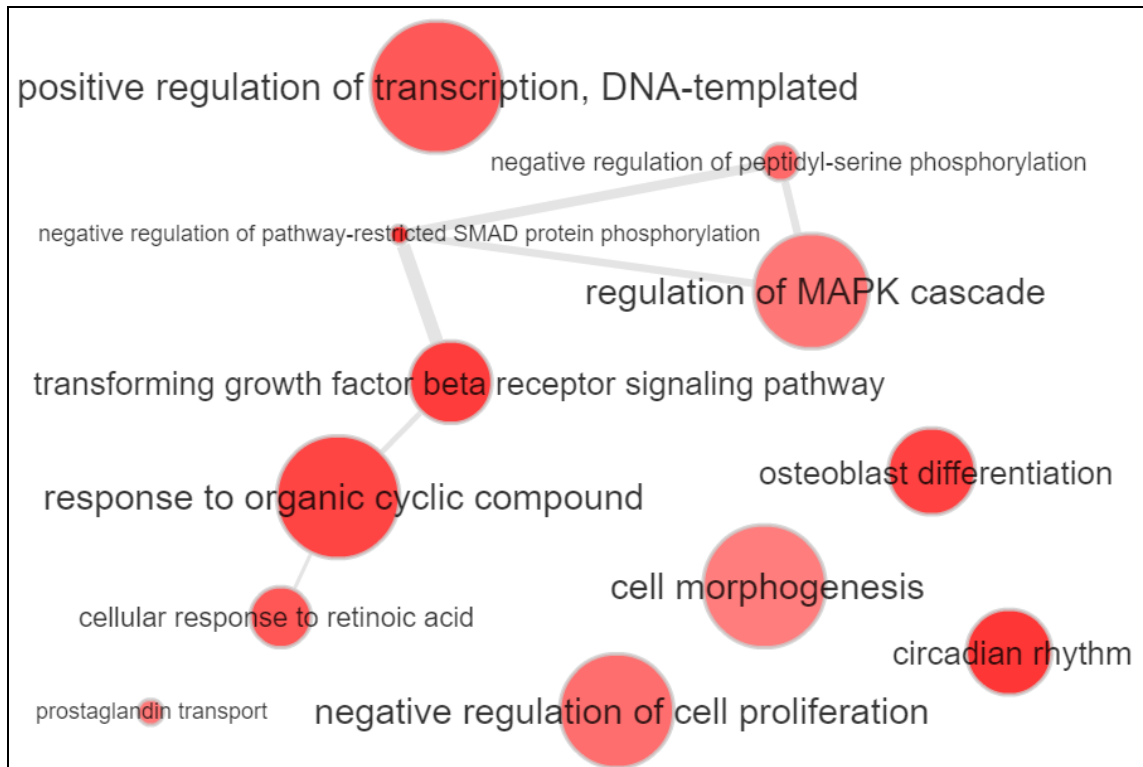
Nota-se nos gráficos, que os termos estão representados por círculos de tamanhos distintos e conectados por linhas de diferentes espessuras. O tamanho dos círculos representa a generalidade do termo, no qual círculos maiores representam termos gerais e círculos menores termos mais específicos. Já a espessura das linhas, representa o grau de similaridade entre os termos, no qual, linhas mais espessas indicam maior similaridade.

## **Modulação de genes específicos**

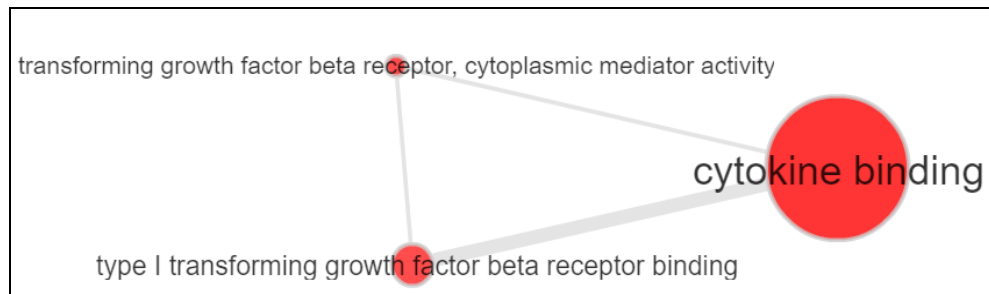
O T3S modulou a expressão de diversos genes relacionados com o desenvolvimento ósseo e celular. Na [Tabela1](#), estão representados genes UP regulados para os termos relacionados com os processos em questão.



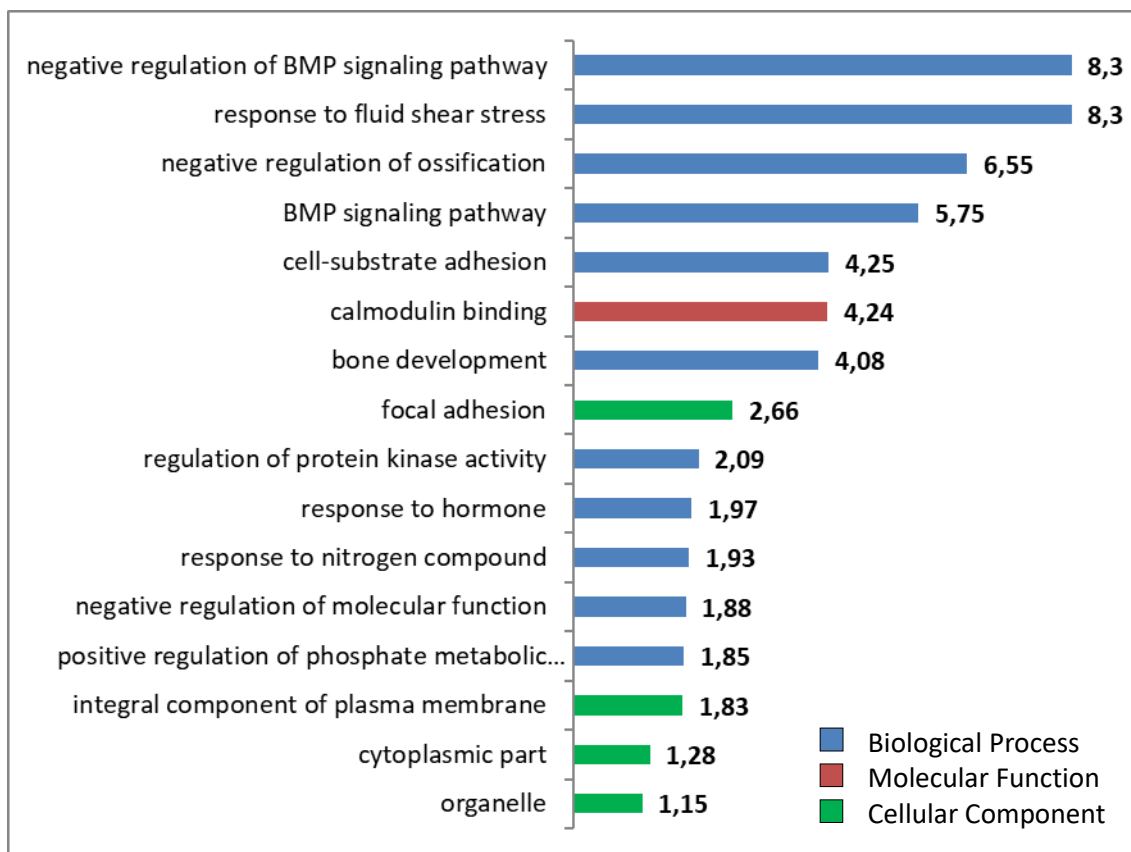
**Figura1.** Heatmap mostrando a DE dos 50 genes com os maiores FC (Up regulados). Tons mais escuros representam maior expressão gênica. [\(Voltar para o texto\).](#)



**Figura2.** Termos enriquecidos no GO e agrupados por similaridade para os genes UP (T3SxC). Termos relacionados com Processos Biológicos. ([Voltar para o texto](#)).



**Figura3.** Termos enriquecidos no GO e agrupados por similaridade para os genes UP (T3SxC). Termos relacionados com Funções Moleculares. ([Voltar para o texto](#)).



**Figura4.** Termos enriquecidos no GO para os genes UP (T3SxC). Representação dos termos não agrupados por similaridade, expressos em Fold Enrichment (FE). Termos relacionados com PB, MF e Componente Celular (CC). ([Voltar para o texto](#)).

## Discussão

Dos 659 genes DE modulados pela condição T3S, a maioria deles (55.5%) foram UP regulados enriquecendo diversos termos GO.

O primeiro agrupamento relevante de termos GO é: *bone development*, *cell morphogenesis*, *osteoblast differentiation*, *negative regulation of cell proliferation*, *negative regulation of ossification* e *response to hormone*, que comprova a ação efetiva do T3 sobre osteoblastos derivados de hA-CTMs. Diversas linhagens de osteoblastos respondem ao T3 (5–7,20–22), aqui demonstramos que o T3 atua no desenvolvimento ósseo agindo sobre processos de morfogênese, diferenciação e proliferação de osteoblastos derivados de hA-CTMs, evidenciando assim, que essa linhagem celular humana é um bom modelo experimental.

**Tabela 1.** Ação do T3S sobre transcriptoma de osteoblastos. O T3S UP regulou diversos genes relacionados com processos de desenvolvimento ósseo, diferenciação osteoblástica, regulação da ossificação e proliferação celular, e morfogênese da célula. Genes representados por seus IDs e nomes. Genes em negrito correspondem a genes encontrados em mais de um termo. ([Voltar para o texto](#)).

Term	IDs / Gene names
<b>bone development</b>	ACTN3 (Alpha-actinin-3), CYP26B1 (Cytochrome P450 26B1), DYM (Dymeclin), <b>ENG (Endoglin)</b> , FAM20C (Extracellular serine/threonine protein kinase FAM20C), FOXN3 (Forkhead box protein N3), <b>MEF2C (Myocyte-specific enhancer factor 2C)</b> , PHOSPHO1 (Phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase), PIP4K2A (Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase type-2 alpha), RYR1 (Ryanodine receptor 1), SBDS (Ribosome maturation protein SBDS), SMAD9 (Mothers against decapentaplegic homolog 9).
<b>osteoblast differentiation</b>	CLTC (Clathrin heavy chain 1), DBP (Peroxisomal multifunctional enzyme type 2), FZD1 (Frizzled-1), <b>GDF10 (Growth/differentiation factor 10)</b> , <b>MEF2C</b> , <b>NOG (Noggin)</b> , SNAI1 (Zinc finger protein SNAI1), <b>TMEM64 (Transmembrane protein 64)</b> , TP53INP2 (Tumor protein p53-inducible nuclear protein 2), TPM4 (Tropomyosin alpha-4 chain), <b>WNT11 (Protein Wnt-11)</b> .
<b>negative regulation of ossification</b>	<b>GDF10</b> , <b>ID1 (DNA-binding protein inhibitor ID-1)</b> , <b>MEF2C</b> , <b>NOG</b> , <b>RBPJ (Recombining binding protein suppressor of hairless)</b> , <b>SMAD6 (Mothers against decapentaplegic homolog 6)</b> , <b>TMEM64</b> , <b>TWSG1 (Twisted gastrulation protein homolog 1)</b> .
<b>cell morphogenesis</b>	ANTXR1 (Anthrax toxin receptor 1), CABP4 (Calcium-binding protein 4), CAMK2A (Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II subunit alpha), <b>DDR1 (Epithelial discoidin domain-containing receptor 1)</b> , <b>DICER1 (Endoribonuclease Dicer)</b> , FLRT3 (Leucine-rich repeat transmembrane protein), FZD4 (Frizzled-4), <b>ID1</b> , IL7R (Interleukin-7 receptor subunit alpha), ITGA4, ITGA8 (Integrin alpha-4, Integrin alpha-8), KIDINS220 (Kinase D-interacting substrate of 220 kDa), KLF7 (Krueppel-like factor 7), MAP2 (Microtubule-associated protein 2), MAP4K4 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4), <b>MEF2C</b> , NEO1 (Neogenin), NFASC (Neurofascin), <b>NGFR (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 16)</b> , <b>NOG</b> , NPTX1 (Neuronal pentraxin-1), NRP1 (Neuropilin-1), RELN (Reelin), TENM3 (Teneurin-3).
<b>negative regulation of cell proliferation</b>	COPS8 (COP9 signalosome complex subunit 8), <b>DDR1</b> , <b>DICER1</b> , DUSP10 (Dual specificity protein phosphatase 10), <b>ENG</b> , ETS1 (Protein C-ets-1), HTT (Sodium-dependent serotonin transporter), ITCH (E3 ubiquitin-protein ligase Itchy homolog), KLF10 (Krueppel-like factor 10), KLF9 (Krueppel-like factor 9), <b>MEF2C</b> , NCK2 (Cytoplasmic protein NCK2), NDRG4 (Protein NDRG4), <b>NGFR</b> , <b>NOG</b> , NRP1 (Protein kinase C-binding protein NELL1), PELI1 (E3 ubiquitin-protein ligase pellino homolog 1), PPARGC1A (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), RBBP4 (Histone-binding protein RBBP4), <b>RBPJ</b> , <b>SMAD6</b> , SSTR5 (Somatostatin receptor type 5), <b>TWSG1</b> , WFDC1 (WAP four-disulfide core domain protein 1), <b>WNT11</b> , ZNF503 (Zinc finger protein 503).

É possível verificar que o T3S, aumenta a expressão de genes relacionados com morfogênese e diferenciação osteoblástica e regula negativamente a proliferação celular e o processo de ossificação (Tabela1). O T3 é conhecido por estimular a expressão de marcadores de diferenciação de osteoblastos (5–7,21,22,30), porém, quanto a seus efeitos na proliferação e matriz extracelular, os resultados são ainda controversos (6,7,22). Outros trabalhos que investigaram a ação do T3 em osteoblastos também mostraram que a proliferação celular é diminuída em doses à 100nM (21,30). Em trabalho anterior, mostramos que o T3S isolado atuou negativamente sobre a matriz mineralizada, reduzindo sua síntese e deposição (24).

Os processos de diferenciação e manutenção dos osteoblastos podem ser regulados tanto por vias mecânicas como bioquímicas (31), no entanto, os mecanismos moleculares de

ação envolvidos na atuação do T3 sobre o tecido ósseo ainda são pouco elucidados (5,6,8,22). O T3S aumentou a expressão de diversos genes relacionados com vias de sinalização mecânica: *cell-substrate adhesion*, *focal adhesion* e *response to fluid shear stress*.

Adesões célula-matriz extracelular (ECM), que incluem a adesão focal, comumente ocorrem em osteoblastos (32–35). Elas conectam o citoesqueleto das células a proteínas da ECM através de integrinas transmembranas e são responsáveis por ativar vias de mecanotransdução, no qual os sinais físicos da superfície celular são convertidos em sinais bioquímicos intracelularmente (36). Diversos processos celulares são regulados por mecanotransdução (34,36). No esqueleto, a mecanotransdução é importante para a manutenção da massa e força óssea (37) e em osteoblastos, influencia processos de diferenciação, proliferação, adesão, mineralização e sobrevivência (33,37). *Response to fluid shear stress* é outro mecanismo bem descrito pelo qual os osteoblastos ativam a mecanotransdução (31,37).

As vias bioquímicas ativadas pela mecanotransdução estão sendo estudadas, e dentre elas, já foram identificadas em osteoblastos vias de cálcio, prostaglandinas E2 (PEG2) e TGF- $\beta$ /BMPs (31,32,37–39). Em nossa investigação, essas três vias foram enriquecidas pela condição T3S.

Estudos mostram que o T3 modula a síntese de PEG2 em osteoblastos (21,40), provavelmente por mecanismos indiretos ainda não definidos. Em nosso estudo, o T3S aumentou a expressão de genes relacionados com *prostaglandin transport*. Sabe-se que as prostaglandinas são moduladas por hormônios, citocinas ou mecanotransdução, atuando sobre a formação e reabsorção óssea (41). Um estudo recente com osteoblastos derivados de células estromais da medula óssea humana (42) relatou que a PEG2 possui papel inibitório na mineralização da matriz óssea. Podemos especular assim, que um dos mecanismos pelo qual o T3S regulou negativamente a ossificação e diminuiu a formação de matriz, poderia ser pelo aumento da concentração de prostaglandina na célula.

O T3S também UP regulou os genes relacionados à *calmodulin binding*. Calmodulina (CaM) é uma proteína de ligação ao cálcio (Ca) que pode agir ligada a ele ou não, atuando sobre diferentes alvos e processos biológicos (43). Sabe-se que o  $Ca^{2+}$  atua como mensageiro secundário principalmente sobre a diferenciação e proliferação dos osteoblastos, assim como as CaM que são ativadas pelo aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (43–47). Hormônios, fatores de crescimento e mecanotransdução atuam em osteoblastos através de vias de sinalização do Ca por mecanismos não elucidados completamente (43). Trabalhos que descrevem a ação do T3 sobre as vias de Ca e CaM em osteoblastos não foram encontrados.

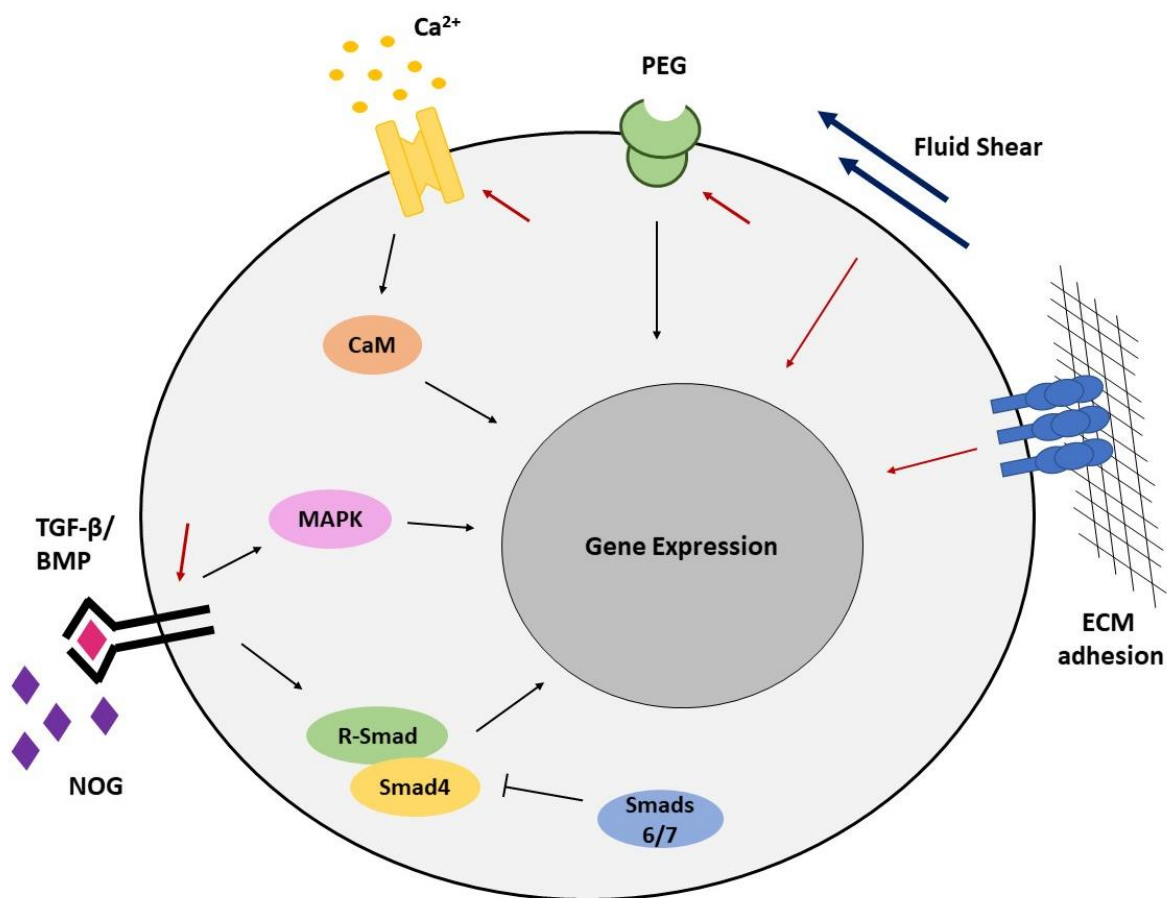
Em relação a vias de sinalização bioquímicas identificadas pela análise de GO, foi possível identificar e agrupar diversos termos relacionados com a via de sinalização da superfamília do fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), tais como: *cytokine binding*, *TGF- $\beta$  receptor cytoplasmic mediator activity*, *type I TGF- $\beta$  receptor binding*, *regulation of protein kinase activity*, *TGF- $\beta$  receptor signaling pathway*, *BMP signaling pathway*, *negative regulation of BMP signaling pathway*, *negative regulation of peptidyl-serine phosphorylation*, *negative regulation of pathway-restricted SMAD protein phosphorylation* e *regulation of MAPK cascade*.

TGF- $\beta$  e membros da sua superfamília como *bone morphogenetic proteins* (BMPs) e *growth differentiation factors* (GDFs) atuam por meio da ativação do complexo dos receptores *serine/threonine kinases* tipo I e II que iniciam a sinalização intracelular dependente de Smads, no qual há fosforilação das R-Smads (Smads2/3 na via de TGF- $\beta$  e Smads1/5/8 para vias BMPs/GDFs) que formam complexos com as Co-Smads (Smad4) e translocam até o núcleo ativando fatores de transcrição; ou independente de Smads, por meio de vias envolvendo as MAPK, tais como: ERK, JNK e p38. Ambas as vias, principalmente BMPs, estão relacionadas com a diferenciação e metabolismo de osteoblastos (48–51).

O T3S exerceu ação negativa sobre a regulação das vias Smads, já que aumentou a expressão das Smads inibidoras (I-Smads), Smad6 e 7, afetando a regulação de TGF- $\beta$  e BMP. A regulação negativa da via BMP também foi enriquecida, já que além de aumentar a expressão das I-Smads, o T3S aumentou a expressão de Noggin (NOG), um ligante antagonista de BMP, que inibe sua ação, ligando-se a seu receptor (48,49). Deste modo, acreditamos que o T3S está regulando a via TGF- $\beta$  por meio de sua ativação independente de Smads, ativando as MAPKs. A [Figura5](#) mostra esquematicamente as vias os quais o T3S afetou.

*In vivo*, o hipertireoidismo aumenta o *turnover* ósseo e promove o encurtamento do ciclo de remodelação reduzindo-o pela metade. A reabsorção osteoclástica é estimulada fora da proporção da mineralização osteoblástica ocasionando perda de massa óssea que resulta em osteoporose (5,7,8,52). Os HT regulam o início e o tempo de duração do ciclo de remodelação (7). O termo identificado como *circadian rhythm* pode explicar o fato do T3S alterar o ritmo e duração dos ciclos de remodelação e turnover ósseo.





**Figura5.** Esquematização das vias de ação reguladas pela condição T3S nos osteoblastos. Ele regulou vias mecânicas (setas vermelhas) e bioquímicas (setas pretas) afetando a expressão gênica. *ECM adhesion*, incluindo as adesões focais e *fluid shear stress* foram as vias mecânicas identificadas, os quais podem afetar a expressão gênica por vias de mecanotransdução diretas ou de modo indireto afetando as vias bioquímicas. PEG pode sofrer influência direta do T3 ou ser modulada pela influência de mecanotransdução. T3S aumentou a expressão de vias de CaM, porém nenhum estudo descreve a ação do T3 sobre ela. CaM são ativadas por aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular, no qual sofrem influência de mecanotransdução; este pode ser um mecanismo indireto pelo qual o T3 exerce ações sobre CaM. Também não é possível concluir se a ação do T3 sobre as vias TGF- $\beta$ /BMPs é direta ou indireta, porém identificamos aumento da expressão de Smads6/7 que inibem a ação das vias dependente de Smads; e que, associado ao aumento de NOG, regulou negativamente a via BMP. Sendo assim, a via TGF- $\beta$  deve estar atuando por meio de MAPK para afetar a expressão gênica. Assim como a ação indireta do T3 pode ser via mecanotransdução, as vias CaM, PEG e TGF- $\beta$ /BMPs também podem afetar uma as outras, expondo a complexidade de modulação do metabolismo afetado pela condição T3S. ([Voltar para o texto](#)).

*In vitro*, sabe-se que o T3 atua sobre osteoclastos e conseqüentemente sobre o processo de reabsorção, por meios indiretos através da sua ação direta sobre osteoblastos. Sendo os osteoblastos então, um intermediário na ação T3-osteoclastos. Prostaglandinas, TGF- $\beta$  e mobilização de  $Ca^{2+}$  são moduladores da reabsorção óssea induzida por HT (21,22).

Assim, é possível especular que além de afetar o metabolismo dos osteoblastos, essas vias influenciam a reabsorção óssea em osteoclastos.

Fica claro que o T3 possui ações moleculares sobre osteoblastos, como também confirmado pelos termos: *response to organic cyclic compound*, *cellular response to retinoic acid*, *positive regulation of transcription*, *DNA-templated*, *negative regulation of molecular function*. Esses termos mostram que a regulação pela condição T3S pode ser tanto ativadora ou repressora de determinadas moléculas ou processos moleculares e biológicos.

Em resumo, diante da complexidade do metabolismo dos osteoblastos, envolvido com diversas vias e cascatas de sinalização bioquímicas que possuem influência de diversos hormônios, citocinas, fatores de crescimento e regulação mecânica, até chegar ao núcleo e efetivamente atuar sobre um gene específico; e diferentes modelos de estudo de osteoblastos *in vitro*, permanece desafiador compreender a biologia dessas células. Identificamos diversos genes e vias sendo moduladas pela condição T3S, desde vias mecânicas (adesões focais, *fluid shear stress*) e vias bioquímicas (prostaglandinas, calmodulina, TGF- $\beta$ /BMPs), que de certa forma também possuem influências entre si. Sendo assim, o estudo realizado por nós pode ser um norteador de como o T3S atua e modifica o metabolismo destas células, sendo necessários estudos mais aprofundados em cada uma das vias para elucidação dos mecanismos de ação específicos do T3. *In vivo*, doses elevadas de T3 modificam o metabolismo ósseo provocando anormalidades e culminando em osteoporose, assim, compreender os mecanismos modificadores da homeostase de osteoblastos, que são células fundamentais para a regulação do metabolismo ósseo, é de grande valia visionando terapias ósseas.

## Referências

1. Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann NY Acad Sci.* 2006;396(1092):385–96.
2. Stapleton M, Sawamoto K, Alméciga-Díaz CJ, Mackenzie WG, Mason RW, Orii T, et al. Development of Bone Targeting Drugs. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1345):1–15.
3. Cawthray J, Wasan E, Wasan K. Bone-seeking agents for the treatment of bone disorders. *Drug Deliv Transl Res.* 2017;1–16.
4. Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest.* 2012;42(12):1332–41.
5. Waung JA, Bassett JHD, Williams GR. Thyroid hormone metabolism in skeletal

- development and adult bone maintenance. *Trends Endocrinol Metab.* 2012;23(4):155–61.
6. Kim H-Y, Mohan S. Role and Mechanisms of Actions of Thyroid Hormone on the Skeletal Development. *Bone Res.* 2013;1(2):146–61.
  7. Wojcicka A, Bassett JHD, Williams GR. Mechanisms of action of thyroid hormones in the skeleton. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(7):3979–86.
  8. Pascual A, Aranda A. Thyroid hormone receptors, cell growth and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(7):3908–16.
  9. Czekanska EM, Stoddart MJ, Ralphs JR, Richards RG, Hayes JS. A phenotypic comparison of osteoblast cell lines versus human primary osteoblasts for biomaterials testing. *J Biomed Mater Res Part A.* 2014;102(8):2636–43.
  10. Czekanska E, Stoddart M, Richards R, Hayes J. In search of an osteoblast cell model for in vitro research. *Eur Cells Mater.* 2012;24:1–17.
  11. Klar AS, Zimoch J, Biedermann T. Skin Tissue Engineering: Application of Adipose-Derived Stem Cells. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–12.
  12. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baghaban Eslaminejad M. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells Tissues Organs.* 2017;204(2):59–83.
  13. Melief SM, Zwaginga JJ, Fibbe WE, Roelofs H. Adipose Tissue-Derived Multipotent Stromal Cells Have a Higher Immunomodulatory Capacity Than Their Bone Marrow-Derived Counterparts. *Stem Cells Transl Med.* 2013;2(6):455–63.
  14. Lee WC, Shi H, Poon Z, Nyan LM, Kaushik T, Shivashankar G V., et al. Multivariate biophysical markers predictive of mesenchymal stromal cell multipotency. *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(42):E4409–18.
  15. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RCR. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood.* 2007;109(4):1743–51.
  16. Rolandsson S, Andersson Sjöland A, Brune JC, Li H, Kassem M, Mertens F, et al. Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells. *BMJ Open Respir Res.* 2014;1(1):e000027.
  17. Guneta V, Tan NS, Chan SKJ, Tanavde V, Lim TC, Wong TCM, et al. Comparative study of adipose-derived stem cells and bone marrow-derived stem cells in similar microenvironmental conditions. *Exp Cell Res.* 2016;348:155–64.
  18. Hamid AA, Idrus R, Aminuddin S Bin, Sathappan S, Chua K. Characterization of human adipose-derived stem cells and expression of chondrogenic genes during

- induction of cartilage differentiation. *Clinics*. 2012;67(2):99–106.
19. Wang N, Wang F, Gao Y, Yin P, Pan C, Liu W, et al. Curcumin protects human adipose-derived mesenchymal stem cells against oxidative stress-induced inhibition of osteogenesis. *J Pharmacol Sci*. 2016;132:192–200.
  20. Olimpio RMC. 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. [Tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”; 2017.
  21. Klaushofer K, Varga F, Glantschnig H, Fratzlzelman N, Czerwenka E, Leis HJ, et al. The regulatory role of thyroid hormones in bone cell growth and differentiation. *J Nutr*. 1995;125.
  22. Harvey CB, O’Shea PJ, Scott AJ, Robson H, Siebler T, Shalet SM, et al. Molecular mechanisms of thyroid hormone effects on bone growth and function. *Mol Genet Metab*. 2002;75(1):17–30.
  23. Olimpio RMC, Oliveira M, Sibio MT, Moretto FCF, Deprá IC, Mathias LS, Gonçalves BM, Rodrigues BM, Maria DA, Tilli HP, Costa SMB, Mazeto GMFS, Saraiva PP NC. Cell viability assessed in a reproducible model of human osteoblasts derived from human adipose-derived stem cells. *PLoS One*. A ser publicado 2018.
  24. Olimpio RMC, Oliveira M, Sibio MT, Moretto FCF, Deprá IC, Mathias LS, Gonçalves BM, Rodrigues BM, Maria DA, Tilli HP, Costa SMB, Mazeto GMFS, Saraiva PP NC. Supraphysiological triiodothyronine (T3) dose associated with estrogen (E2) modulates the expression of Rankl and OPG in human osteoblasts. *Mol Cell Endocrinol*. A ser publicado 2018.
  25. Bray NL, Pimentel H, Melsted P, Pachter L. Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *Nat Biotechnol*. 2016;34(5):525–7.
  26. Sonesson C, Love MI, Robinson MD. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Research*. 2016;4:1521.
  27. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
  28. McCarthy DJ, Chen Y, Smyth GK. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(10):4288–97.
  29. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. Gibas C, editor. *PLoS One*. 2011;6(7):e21800.

30. Varga F, Rumpler M, Luegmayer E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: Depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int.* 1997;61(5):404–11.
31. Wittkowske C, Reilly GC, Lacroix D, Perrault CM. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. *Front Bioeng Biotechnol.* 2016;4(November).
32. Castillo AB, Blundo JT, Chen JC, Lee KL, Yereddi NR, Jang E, et al. Focal Adhesion Kinase Plays a Role in Osteoblast Mechanotransduction In Vitro but Does Not Affect Load-Induced Bone Formation In Vivo. *PLoS One.* 2012;7(9):1–11.
33. Schneider G, Burrige K. Formation of Focal Adhesions by Osteoblasts Adhering to Different Substrata. *Exp Cell Res.* 1994;214(1):264–9.
34. Schneider GB, Zaharias R, Stanford C. Osteoblast integrin adhesion and signaling regulate mineralization. *J Dent Res.* 2001;80(6):1540–4.
35. Lim JY, Dreiss AD, Zhou Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, et al. The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography. *Biomaterials.* 2007;28(10):1787–97.
36. Wu C. Focal Adhesion. *Cell Adh Migr.* 2007;1(1):13–8.
37. Rangaswami H, Schwappacher R, Tran T, Chan GC, Zhuang S, Boss GR, et al. Protein kinase G and focal adhesion kinase converge on Src/Akt/ $\beta$ -catenin signaling module in osteoblast mechanotransduction. *J Biol Chem.* 2012;287(25):21509–19.
38. Wang L, Zhang X, Guo Y, Chen X, Li R, Liu L, et al. Involvement of BMPs/Smad Signaling Pathway in Mechanical Response in Osteoblasts. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26(6):1093–102.
39. Papachroni KK, Karatzas DN, Papavassiliou KA, Basdra EK, Papavassiliou AG. Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease. *Trends Mol Med.* 2009;15(5):208–16.
40. Klaushofer K, Hoffmann O, Gleispach H, Leis HJ, Czerwenka E, Koller K, et al. Bone-resorbing activity of thyroid hormones is related to prostaglandin production in cultured neonatal mouse calvaria. *J Bone Miner Res.* 1989;4(3):305–12.
41. Veldman CR, Schläpfer I, Schmid C. Prostaglandin E2 stimulates sodium-dependent phosphate transport in osteoblastic cells via a PKC-mediated pathway. *Endocrinology.* 1998;139(1):89–94.
42. Mirsaidi A, Tiaden AN, Richards PJ. Prostaglandin E2 inhibits matrix mineralization

- by human bone marrow stromal cell-derived osteoblasts via Epac-dependent cAMP signaling. *Sci Rep*. 2017;7(1):2243.
43. Zayzafoon M. Calcium/calmodulin signaling controls osteoblast growth and differentiation. *J Cell Biochem*. 2006;97(1):56–70.
  44. Zayzafoon M, Fulzele K, McDonald JM. Calmodulin and calmodulin-dependent kinase II $\alpha$  regulate osteoblast differentiation by controlling c-fos expression. *J Biol Chem*. 2005;280(8):7049–59.
  45. Choi YH, Choi JH, Oh JW, Lee KY. Calmodulin-dependent kinase II regulates osteoblast differentiation through regulation of Osterix. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432(2):248–55.
  46. Pedersen ME, Fortunati D, Nielsen M, Brorson SH, Lekva T, Nissen-Meyer LSH, et al. Calmodulin-dependent kinase 1 $\beta$  is expressed in the epiphyseal growth plate and regulates proliferation of mouse calvarial osteoblasts in vitro. *Bone*. 2008;43(4):700–7.
  47. Seo JH, Jin YH, Jeong HM, Kim YJ, Jeong HG, Yeo CY, et al. Calmodulin-dependent kinase II regulates Dlx5 during osteoblast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;384(1):100–4.
  48. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *Int J Biol Sci*. 2012;8(2):272–88.
  49. Huang W, Yang S, Shao J, Li Y-P. Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. *Front Biosci*. 2007;12(May 2014):3068–92.
  50. BLAIR HC, ZAIDI M, SCHLESINGER PH. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J*. 2002;364(2):329–41.
  51. Yan X, Liu Z, Chen Y. Regulation of TGF-beta signaling by Smad7. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2009;41(4):263–72.
  52. Reddy PA, Harinarayan C V, Sachan A, Suresh V, Rajagopal G. Bone disease in thyrotoxicosis. *Indian J Med Res*. 2012 Mar 15;135(2):277–86.

## Anexos

### A. Comitê Ética



UNESP -FACULDADE DE  
MEDICINA DE BOTUCATU



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO HORMÔNIO TIREOIDIANO NA EXPRESSÃO DOS RNAs NÃO CODIFICANTES EM CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS DERIVADAS DO TECIDO ADIPOSEO

**Pesquisador:** Bruna Moretto Rodrigues

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 56007816.7.0000.5411

**Instituição Proponente:** Departamento de Clínica Médica

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.576.760

##### Apresentação do Projeto:

Uma área emergente de pesquisa envolve a atuação dos hormônios tireoideanos sobre o tecido ósseo, cujos mecanismos ainda não são completamente conhecidos. Uma das abordagens experimentais para estudar essa atuação envolve o uso de células-tronco de tecido adiposo que são diferenciadas posteriormente em osteoblastos, que podem então ser expostos aos hormônios tireoideanos. Neste estudo as investigadoras pretendem utilizar células-tronco encontradas em tecido adiposo de pacientes do sexo feminino submetidas a abdominoplastia. Serão retirados 2g de tecido adiposo que seria descartado no ato operatório. As pacientes devem ter exames pré-operatórios mostrando função tireoideana normal (que serão identificados em revisão de prontuário). Serão efetuadas então etapas de diferenciação das células tronco em osteoblastos, tratamento dos osteoblastos com triiodotironina (T3) e análise de sequenciamento de RNA entre células osteoblásticas tratadas ou não com o T3. O objetivo final será o estudo da ação dos hormônios tireoideanos em RNAs de células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo.

##### Objetivo da Pesquisa:

Estudar ação dos hormônios tireoideanos em RNAs de células osteoblásticas derivadas do tecido adiposo.

**Endereço:** Chácara Butignolli, s/n

**Bairro:** Rubião Junior

**UF:** SP

**Município:** BOTUCATU

**CEP:** 18.618-970

**Telefone:** (14)3880-1608

**E-mail:** capellup@fmb.unesp.br

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os riscos são pequenos, já que se utiliza material coletado em procedimento (indicado por outras razões) e somente algumas poucas informações de prontuário serão coletadas. Quanto aos benefícios, serão indiretos, advindos do melhor conhecimento da relação, por exemplo, entre hipertireoidismo e osteoporose.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de pesquisa de grande valor científico e metodológico, que utilizará tecidos de pacientes em pequena quantidade e sem adicionar procedimentos invasivos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE é escrito de forma clara e fácil entendimento. São apresentadas outras autorizações e documentos pertinentes.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomendo aprovação.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto de Pesquisa APROVADO, deliberado em reunião do CEP de 06/06/2016, sem necessidade de envio à CONEP.

O CEP solicita aos pesquisadores que após a execução do projeto em questão, enviem para análise o respectivo "Relatório Final de Atividades", o qual deverá ser enviado via Plataforma Brasil na forma de "NOTIFICAÇÃO".

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_669855.pdf	10/05/2016 17:04:56		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	10/05/2016 17:04:17	Bruna Moretto Rodrigues	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	LabGenetica.pdf	06/05/2016 12:34:25	Bruna Moretto Rodrigues	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	04/03/2016 14:44:13	Bruna Moretto Rodrigues	Aceito
Outros	Anuencia.pdf	04/03/2016 14:40:00	Bruna Moretto Rodrigues	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoPesquisa.pdf	01/03/2016 11:54:37	Bruna Moretto Rodrigues	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BOTUCATU, 06 de Junho de 2016



## B. Alteração de Título



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de Botucatu



### MUDANÇA DE TÍTULO EM PROJETO DE PESQUISA

**Objetivo Acadêmico:** Dissertação de Mestrado

Título constante no parecer inicial de aprovação:

**Avaliação da Ação do Hormônio Tireoidiano na Expressão dos RNAs não Codificantes em Células Osteoblásticas Derivadas do Tecido Adiposo**

Título final:

**Avaliação da Ação do Hormônio Tireoidiano na Expressão dos RNAs Codificantes em Células Osteoblásticas Derivadas do Tecido Adiposo Humano**

Data da reunião do CEP que aprovou o parecer inicial: 06/06/2016

Declaramos que o trabalho não sofreu alterações nos objetivos e/ou conteúdo metodológico da época de apresentação para análise do CEP.

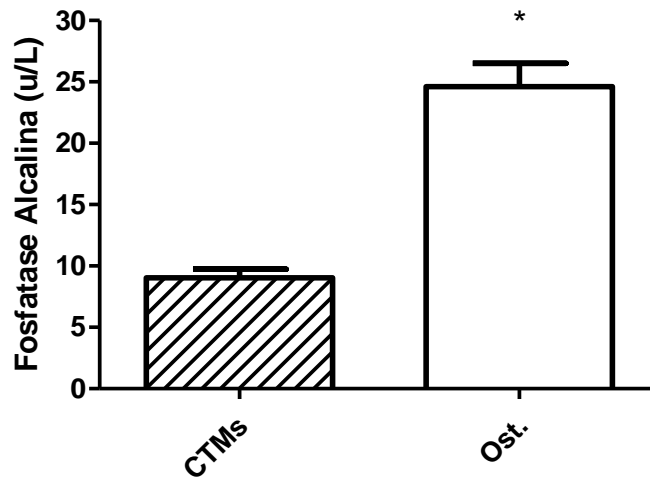
Célia Regina Nogueira  
Nome/assinatura original do(a) Orientador(a)

Bruna Moretto Rodrigues  
Nome/assinatura original do (a) Orientado(a)

## Apêndices

### A. Quantificação de Fosfatase Alcalina

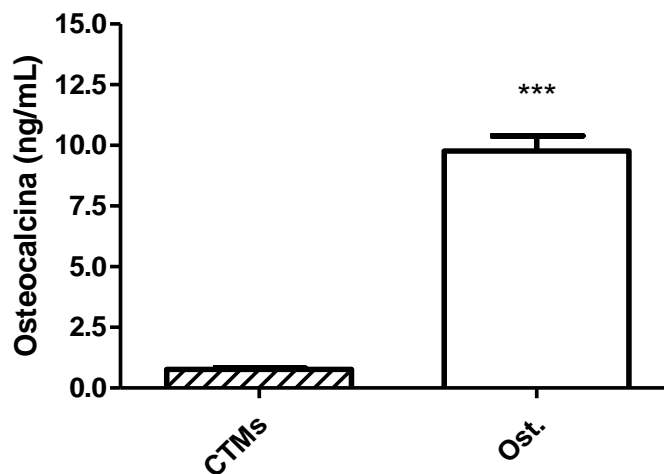
Comparando as CTMs e osteoblastos em relação à presença da proteína óssea fosfatase alcalina, observa-se um aumento expressivo desta proteína após a osteoindução (Figura1).



**Figura1.** Gráfico da produção de Fosfatase Alcalina (ELISA) pelas CTMs e osteoblastos (Ost) no 16º dia de osteoindução. Maior expressão da proteína nos Ost. comparado às CTMs ( $p < 0,05$ ).

### B. Quantificação de Osteocalcina

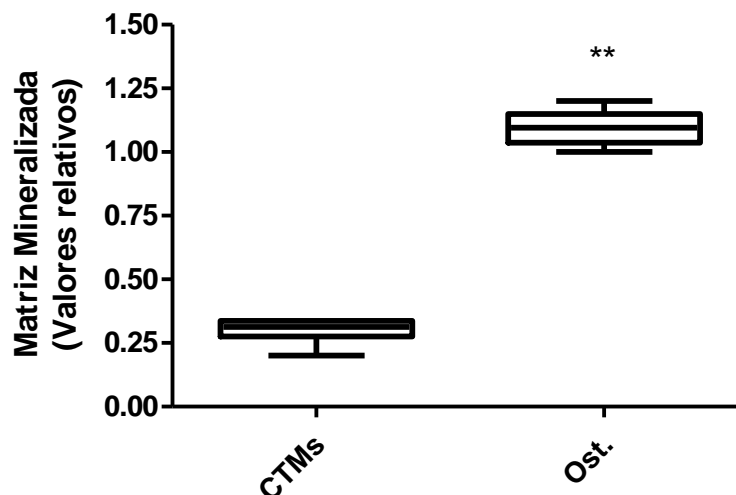
Para a proteína óssea osteocalcina, o mesmo perfil de aumento pelas células osteoinduzidas é observado (Figura2).



**Figura2.** Gráfico da produção de Osteocalcina (ELISA) pelas CTMs e osteoblastos (Ost) no 16º dia de osteoindução. Maior expressão da proteína nos Ost. comparado às CTMs ( $p < 0,001$ ).

### C. Quantificação da matriz mineralizada

Pela quantificação da matriz, pode-se observar que há processo de formação da matriz mineralizada pelos osteoblastos, o que não é observado nas CTMs (Figura3).



**Figura3.** Gráfico da quantificação da matriz mineralizada (Alizarin Red) pelas CTMs e osteoblastos (Ost) no 16º dia de osteoindução. Produção de matriz nos Ost. significativamente maior do que nas CTMs ( $p < 0,01$ ).

### D. Qualidade do RNA

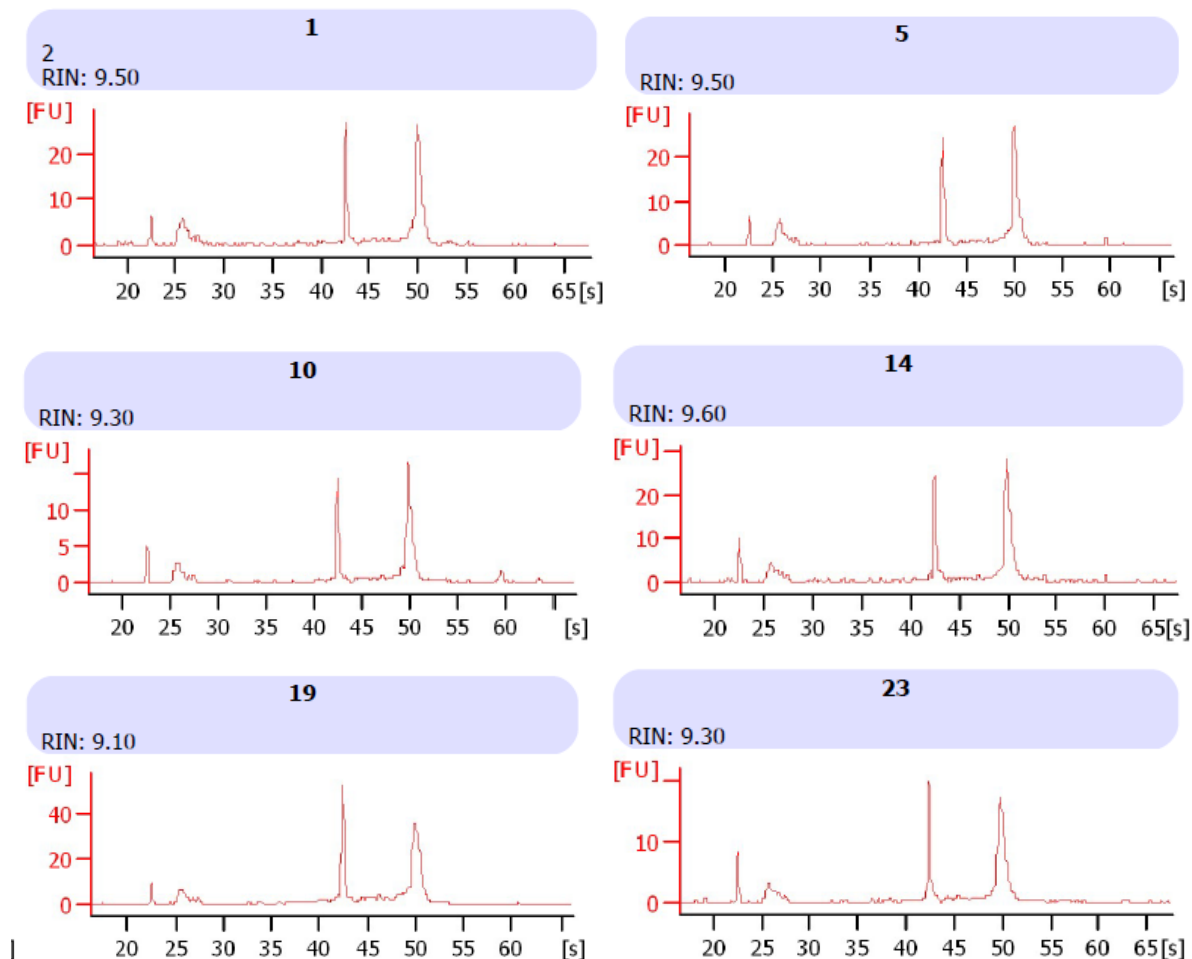
As amostras de RNA foram devidamente quantificadas e qualificadas. Os valores de RIN (9,1 – 9,6) estavam adequados para a etapa de preparação de bibliotecas e sequenciamento (Quadro1).

**Quadro1.** Valores da concentração de RNA em ng/ul e do RIN (Número de integridade de RNA).

Número amostra	Nome amostra	[ ] (ng/ul)	RIN
1	Controle1	1340	9,5
5	T3S1	1190	9,5
10	Controle2	668	9,3
14	T3S2	840	9,6
5	Controle3	1650	9,1
6	T3S3	798	9,3

Através da análise dos eletroferogramas gerados pelo software do Bioanalyzer, é possível notar que as bandas ribossomais 18s (Pico entre 40 e 45s) e 28s (Pico em 50s) apresentam valores altos de detecção por fluorescência e não é possível ver picos representativos

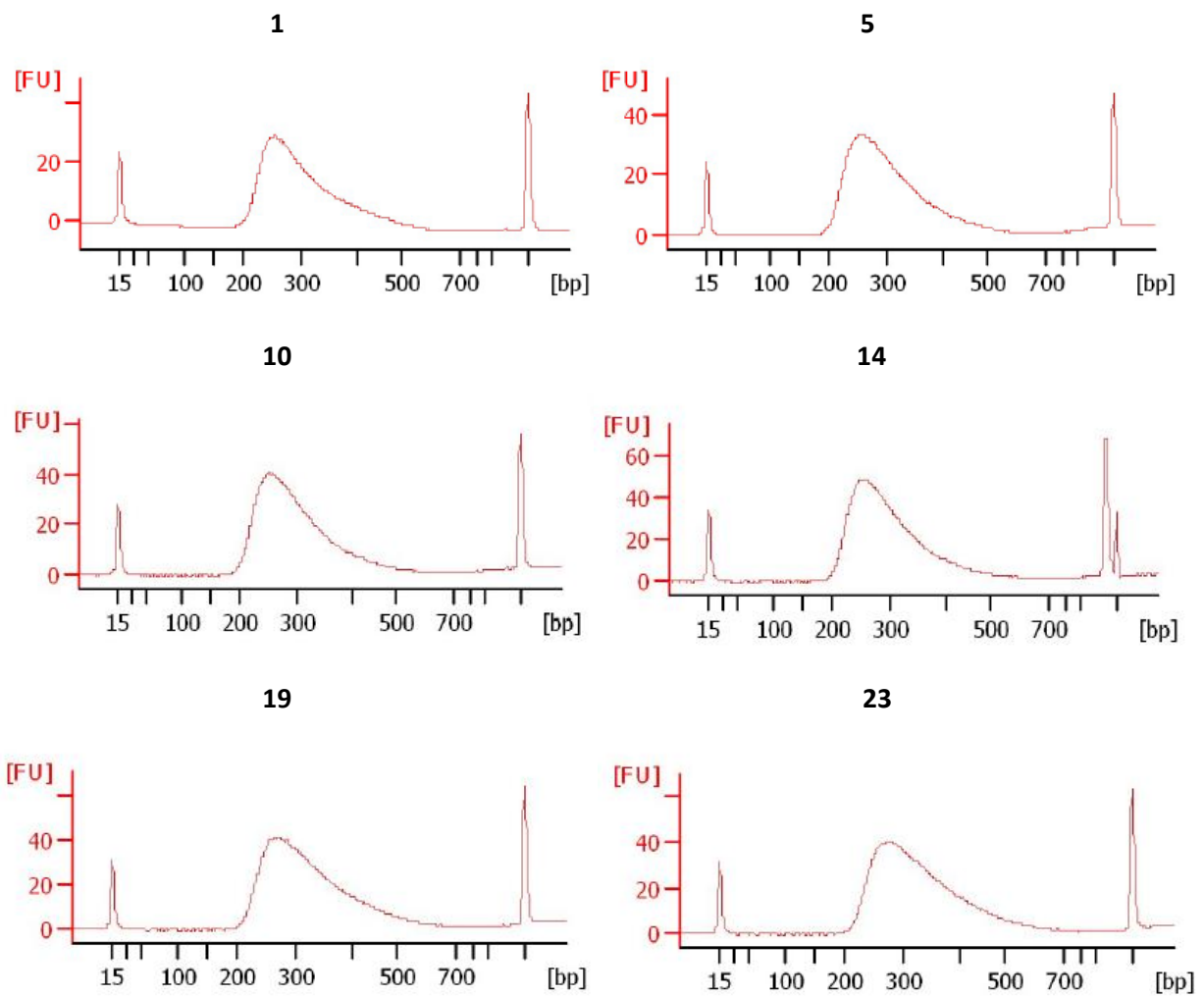
de fragmentos de RNA menores, indicando RNAs de alta integridade, que são confirmados por seus valores de referência de RIN (Figura4).



**Figura4.** Eletroferogramas representativos das amostras de RNA. Nos eletroferogramas observam-se os picos 18s e 28s bem definidos. O software calcula a proporção 28s/18s e número do RIN baseando-se nas áreas do eletroferograma.

## E. Qualidade das bibliotecas de mRNA

Na Figura5, através dos eletroferogramas, é possível confirmar a presença de somente uma banda bem definida com valores entre 260 e 300 bp, que são os valores de referência para o tamanho dos fragmentos de bibliotecas, conforme indicado pelo kit de construção. Sendo assim, as amostras de bibliotecas de mRNA obtiveram valores esperados e adequados frente ao controle de qualidade.



**Figura5.** Eletroferograma representativo das bibliotecas de mRNA para as amostras. Nos eletroferogramas observa-se apenas um pico entre 260-300 pb, representando o tamanho dos fragmentos das bibliotecas.

## F. Análise Bioinformática

A fim de verificar a qualidade das reads geradas no sequenciamento, estas foram submetidas ao controle de qualidade pelo software FastQC pelo comando:

```
fastqc -o file_output/ file_input/amostra.fastq.gz
```

A qualidade das reads foi verificada para todas as amostras, no qual foram observados bons parâmetros de qualidade para prosseguimento das análises: *Per base sequence quality* (Scores altos), *Per sequence quality scores* (PhredScore=35), *Per base sequence content* (20-30), *Per sequence GC content* (52-54), *Per base N content* (zero), *Sequence Length Distribution* (101pb).

Para a execução do alinhamento ao transcriptoma humano e contagem das reads pelo software Kallisto, o seguinte código foi utilizado:

```
kallisto quant -i file_inputIndex/ensembl_hg19.idx -t 8 -b 100 -o file_output  
file_input/amostra_R1.fastq file_input/amostra_R2.fastq
```

O software gerou o arquivo “abundance.tsv” para cada uma das amostras, no qual foram importados para o Deseq2 através do pacote Tximport:

```
files <- file.path(dirsamples, samples$run, "abundance.tsv")  
tx2gene <- read.csv(file.path(dir, "tx2gene.csv"))  
txi <- tximport(files, type="kallisto", tx2gene=tx2gene)
```

A lista de “Counts” foi gerada, com um total de 35.377 genes associados, 50.636.382 Counts totais para o grupo controle e 49.466.094 Counts para o grupo T3S.

Por fim, foram realizadas: análise do design multifator para controlar o efeito da variação biológica entre os pacientes (1), normalização das amostras pelo teste binomial negativo (padrão do Deseq2) (2), e análise de expressão diferencial comparando Controle e T3S.

```
(1) dds <- DESeqDataSetFromTximport (txi,  
colData = samples,  
design = ~ patient + condition)  
(2) dds <- DESeq(dds)  
(3) res <- results (dds, contrast=c("condition", "T3S", "Control"))
```

Os valores de FC e Pvalue gerados foram utilizados para seleção dos genes UP e DOWN regulados.