

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS

PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS

FISIOLÓGICAS

MONIQUE PATRICIO SINGULANI

ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS ESTROMAIS

DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS ADULTAS E SENIS

SUBMETIDAS OU NÃO AO TREINAMENTO DE FORÇA

ARAÇATUBA

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
CAMPUS DE ARAÇATUBA - FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FISIOLÓGICAS

ANÁLISE DO POTENCIAL OSTEOGÊNICO DE CÉLULAS ESTROMAIS
DERIVADAS DA MEDULA ÓSSEA DE RATAS ADULTAS E SENIS
SUBMETIDAS OU NÃO AO TREINAMENTO DE FORÇA

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio
de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de
“Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Monique Patricio Singulani

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA

2014

Autorizo a reprodução e divulgação parcial ou total deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S617a Singulani, Monique Patricio.
Análise do potencial osteogênico de células estromais derivadas da medula óssea de ratas adultas e senis submetidas ou não ao treinamento de força / Monique Patricio Singulani. - Araçatuba, 2014
95 f. : il.; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rita Cássia Menegati Dornelles

1. Envelhecimento 2. Osteoporose 3. Treinamento de resistência 4. Células mesenquimais estromais 5. Osteoblastos
I. T.

CDD 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

Monique Patricio Singulani

Análise do potencial osteogênico de células estromais derivadas da medula óssea de ratas adultas e senis submetidas ou não ao treinamento de força

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Ciências Fisiológicas”.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientada: Monique Patricio Singulani

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Aprovado em: 05/08/2014

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: FOA/UNESP

Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Instituição: FORP/USP

Prof^a. Dr^a. Sandra Lia do Amaral

Instituição: FC-Bauru/UNESP

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 25.08.1988, Guaratinguetá – SP.

Filiação: Robio Schultes Singulani

Juceli Patricio Singulani

2006/2009: Curso de Graduação em Fisioterapia no Centro Universitário Católico Salesiano *Auxilium* de Araçatuba – UNISALESIANO – Araçatuba – SP.

2010/2011: Curso de Pós-Graduação *Latu-Sensu* em Terapia Manipulativa na Escola Brasileira de Fisioterapia Manipulativa – EBRAFIM – Faculdade da Alta Paulista – Tupã – SP.

2012/2014: Curso de Pós-Graduação *Stricto-Sensu* em Ciências Fisiológicas nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – FOA – Araçatuba – SP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Robio (*in memoriam*) e Juceli, ao meu irmão Danilo e ao meu
companheiro Antonio Luis, pelo amor, compreensão, apoio e incentivo imensurável.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba/SP, pela oportunidade de realizar o curso.

À Diretora da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba/SP, Prof^a. Adj. Ana Maria Pires Soubhia e ao Vice-Diretor Prof. Titular Wilson Roberto Poi pelo apoio.

A todos os funcionários da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba/SP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios da realização de disciplinas e conclusão do projeto de pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Rita Cássia Menegati Dornelles pela oportunidade deste estudo, pela orientação, pelos ensinamentos, pela paciência, pelo exemplo de dedicação e profissionalismo.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Penha de Oliveira e ao Prof. Dr. Mário Jefferson Quirino Louzada pelo apoio e colaboração em todas as etapas deste trabalho, pelo aprendizado e disponibilização da estrutura física durante todo procedimento experimental.

À Prof^a. Dr^a. Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune pelo fornecimento de seu laboratório para realização de experimentos, pelo aprendizado, pela disponibilidade e prontidão.

Ao Prof. Dr. Antônio Hernandes Chaves Neto, pela colaboração, pelo aprendizado, pela disposição, pelo auxílio na realização deste trabalho e considerável amizade.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Lia do Amaral e ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti pela presença e participação na banca examinadora e pelas imprescindíveis considerações científicas para o melhor aperfeiçoamento deste trabalho.

Aos membros docentes e não docentes do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba/SP e do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba/SP.

Ao meu amigo Leandro Figueiredo dos Santos, pela vivência, pelo companheirismo, pela colaboração deste trabalho e pela sua devotada dedicação.

A todos os integrantes dos Laboratórios de Fisiologia Endócrina e do Envelhecimento, Farmacologia e do Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP de Araçatuba/SP pela amizade, pela colaboração, pelo aprendizado e auxílio durante todo procedimento experimental.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - Processo 2011/15501-0) pela concessão do auxílio à pesquisa.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho, a minha cordial Gratidão.

“Seja a mudança que deseja ver o mundo.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

SINGULANI, M P. **Análise do potencial osteogênico de células estromais derivadas da medula óssea de ratas adultas e senis submetidas ou não ao treinamento de força.** 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Células tronco mesenquimais (CTMs) derivadas do estroma da medula óssea possuem potencial para se diferenciar *in vivo* e *in vitro*, em vários tipos celulares, incluindo osteoblastos e adipócitos. Durante o envelhecimento, há o maior número de células que se diferenciam espontaneamente em adipócitos, comprometendo a qualidade óssea, bem como perda da massa óssea decorrente do estilo de vida sedentário. Dentre fatores capazes de modular a diferenciação de CTMs em prol a formação óssea, sinais mecânicos estão sendo estudados como alternativa para o tratamento da osteoporose. Neste estudo, analisamos como o treinamento de força (TF) influencia a remodelação óssea durante o envelhecimento. Para isso, analisamos o potencial osteogênico de diferenciação de CTMs isoladas da medula óssea de ratas adultas (09 meses) e idosas (21 meses) que realizaram ou não o exercício físico com sobrecarga. Os resultados mostraram que o TF aumentou a expressão da proteína óssea morfogênica 2 (*BMP2*), regulando a diferenciação dos osteoblastos e formação óssea por promover *up-regulation* do fator de transcrição relacionado com o Runt 2 (*Runx2*) e *down-regulation* do fator de transcrição de adipócitos, receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (*Ppar γ*) em CTMs diferenciadas de doadoras idosas. Além disso, os valores de densidade mineral óssea areal e os parâmetros biomecânicos na tíbia das ratas idosas foram otimizados após a realização do TF. Estes resultados sugerem que o aumento dos fatores de transcrição e proteínas de matriz, bem como o decréscimo de *Ppar γ* , desencadeado pelo TF, contribui para a melhoria da qualidade do osso de ratas idosas treinadas.

PALAVRAS-CHAVE: Envelhecimento; Osteoporose; Treinamento de resistência;
Células mesenquimais estromais; Osteoblastos.

ABSTRACT

SINGULANI, M P. **Analysis of osteogenic potential of stromal cells derived from bone marrow of adult and senile rats submitted or not to strength training.** 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

In vivo and *in vitro* studies indicate that a subpopulation of bone marrow stromal cells derived mesenchymal stem cells (MSCs) has potential to differentiate into multiple cell types, including osteoblasts and adipocytes. During the aging, greater number of cells is able to differentiate spontaneously into adipocytes, committing bone quality, well as loss of bone mass due to the sedentary lifestyle. Among the factors capable of modulating differentiation of MSCs to promote bone formation mechanical signals are being studied as an alternative for the treatment of osteoporosis. In this study, we analyzed how the strength training (ST) participates in the bone remodeling during the aging. For this purpose, we analyzed the osteogenic potential of differentiation of MSCs isolated from the bone marrow of adult (09 months) and elderly (21 months) female rats that performed or not physical activity with overcharge. The results showed that the ST increased the bone morphogenic protein 2 (*BMP2*), regulated the osteoblast differentiation and bone formation for up-regulation of the osteogenic master transcription factor, Runt-related transcription factor 2 (*Runx2*) and the down-regulation of the adipocytes master transcription factor, peroxisome proliferator-activated receptor γ (*Ppar\gamma*) in differentiated MSCs of the elderly donors. In addition, the values of areal bone mineral density and biomechanical parameters in the tibia of elderly rats were optimized after the realization of ST. These results suggest that increase of transcription factors and matrix proteins as well as the decrease of *Ppar\gamma*, triggered by ST, contributes to better bone quality of trained elderly.

KEY WORDS: Aging; Osteoporosis; Resistance training; Mesenchymal stromal cells; Osteoblast.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imagem ilustrativa modificada do processo de remodelação óssea. O processo de remodelação consiste em: Fase 1: recrutamento de precursores de osteoclastos em local específico. Fase 2: reabsorção óssea e o recrutamento de CTMs e osteoprogenitores. Fase 3: diferenciação dos osteoblastos e síntese de osteóide. Fase 4: mineralização do osteóide e formação óssea com a finalização do processo de remodelação óssea.

Figura 2. Imagem ilustrativa modificada do sistema RANK/RANKL/OPG. Osteoblastos produzem OPG e RANKL sob a ação de diversos fatores tais como citocinas, hormônios e fatores de crescimento. OPG ligar-se a RANKL inativando-o e inibindo sua ligação com RANK, resultando na inibição da osteoclastogênese. Na ausência de OPG, RANKL liga-se e ativa o seu receptor, RANK, expresso em osteoclastos e precursores de osteoclastos. A interação RANK/RANKL estimula a diferenciação, recrutamento e ativação osteoclástica.

Figura 3. Imagem ilustrativa modificada da via de sinalização Wnt/ β -Catenina na diferenciação dos osteoblastos. A tradução de genes que estimulam a diferenciação dos osteoblastos exige a translocação de β -Catenina para o núcleo das CTMs. β -Catenina é alvo de degradação pelo complexo GSK-3 β /AP1/Axin. A ligação da proteína Wnt ao complexo composto por receptor Frizzled e os receptores lipoprotéicos 5/6 (LRP 5/6) interrompe esse processo, permitindo β -Catenina interagir com o complexo TCF/LEF-1 participando da regulação da expressão de genes importantes para a proliferação, diferenciação e comprometimento de CTMs em prol dos osteoblastos.

Figura 4. Imagens ilustrativas da escada utilizada para o TF.

Figura 5. Imagens ilustrativas do manuseio para o acoplamento de tubos cônicos (50 mL) contendo esferas de aço à cauda do animal correspondendo a sobrecarga imposta no TF (A; B).

Figura 6. Imagens ilustrativas da execução do TF de ratas AD e SEN (A; B; C; D).

Figura 7. Imagens ilustrativas da dissecação (A), secção das epífises do fêmur (B; C) e extração da medula óssea através da introdução de agulha acoplada a seringa e meio de crescimento celular de ratas AD e SEN (D).

Figura 8. Imagem ilustrativa da contagem de células nucleadas do estroma da medula óssea provindas de ratas AD e SEN, realizada com auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer) e microscópio óptico de luz invertida.

Figura 9. Imagem ilustrativa da confluência celular de 70-80% de cultura de CTMs do estroma da medula óssea do grupo SEN TF, obtidas através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz invertida. Obj. 10x.

Figura 10. Imagens ilustrativas modificadas do ensaio de flexão em 3 pontos (A) e curva de carga/deflexão modificado (B).

Figura 11. Análise indireta da taxa de proliferação celular pelo método colorimétrico do MTT realizado após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF.

Figura 12. Quantificação proteica realizada após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF.

Figura 13. FAL (U/mg de proteína) realizada após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF.

Figura 14. Detecção da mineralização da matriz extracelular por meio da coloração com vermelho de alizarina e quantificação da mineralização biológica realizada após 21 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Imagens obtidas por sistema de câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz invertida, escaneadas e editadas no formato “TIFF”.

Figura 15. Detecção adipogênica por meio da coloração com *Oil Red O* realizada após 21 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD e SEN para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Imagens obtidas por sistema de câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz invertida, escaneadas e editadas no formato “TIFF”. Obj. 20x.

Figura 16. Análises por *Real Time* PCR de marcadores de expressão gênica realizadas após 14 dias de indução da diferenciação com MO, para fatores de transcrição tais como (A; B) *Catnb*, (C; D), *Runx2* e (E; F) *Pparγ* de ratas AD e SEN, para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF.

Figura 17. Análises por *Real Time* PCR de marcadores de expressão gênica realizadas após 14 dias de indução da diferenciação com MO, para proteínas não colagenosas de matriz óssea tais como (A; B) *BMP2*, (C; D), *Opn* e (E; F) *Ocn* de ratas AD e SEN, para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF.

Figura 18. Imagem ilustrativa modificada de fatores que participam das vias de formação óssea. Estímulo mecânico externo promove a diminuição da expressão gênica de Sost, resultando na ativação da via de sinalização canônica Wnt regulando a expressão de genes importantes para a proliferação, diferenciação e comprometimento de CTMs em prol dos osteoblastos.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Análise da qualidade do tecido ósseo obtida por meio da avaliação da densitometria óssea e ensaio mecânico dos grupos de ratas AD e SEN.

LISTA DE ABREVIATURAS

μg – micrograma

μL – microlitro

μm – micrômetro

μM – micromolar

Actb – β -actina

AD – adulto

AP1 – polipose adenomatosa coli - 1

BMP – proteína morfogênica óssea

C – meio de crescimento celular

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – hidroxiapatita

Ca^{2+} – cálcio

Catnb – β -Catenina

CEUA – comissão de ética no uso de animais

CK1 α – caseína quinase 1 α

cm^2 – centímetro quadrado

CO_2 – dióxido de carbono

C_T – ciclo limiar

CTM – célula tronco mesenquimal

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – sulfato de cobre

DEPC – dietilpirocarbonato

DEXA – *dual-energy x-ray absorptiometry*

DMO – densidade mineral óssea

DMOa – densidade mineral óssea areal

DNA – ácido desoxirribonucleico

DNAC – ácido desoxirribonucleico complementar

DVL – fosfoproteína citoplasmática *Dishevelled*

E₂ – estrógeno

EPM – erro padrão da média

FAL – fosfatase alcalina

FM – teste de força máxima

g – força gravitacional

g – gramas

GAP – junções comunicantes

GSK-3 β – glicogênio sintase quinase-3 β

h – hora

IGF – fator de crescimento insulínico

IL-1 – interleucina tipo 1

L - litro

LRP5/6 – receptores de lipoproteína 5/6

m – metro

M – molar

M-CSF – fator estimulante da colônia de monócitos

MEM – meio Essencial Mínimo

mg – miligrama

min – minutos

mJ – milijoule

mL – mililitro

mm – milímetro

mM – milimolar

mmol – milimol

MO – meio osteogênico

MTT – 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo tetrazolina

N – Newton

Na₂CO₃ – carbonato de sódio

Na₃C₆H₅O₇ – citrato de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

NH₄OH – hidróxido de amônia

nm – nanômetro

°C – graus Celsius

Obj – Objetiva

Ocn – osteocalcina

OPG – osteoprotegerina

Opn – osteopontina

p – nível de significância

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia de polimerase

pg – picograma

pH – potencial de hidrogênio

PO₄³⁻ – fosfato

Ppar γ – receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ

PTH – paratormônio

RANK – receptor ativador do fator nuclear kappa β

RANKL – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β

Real Time PCR – reação em cadeia da polimerase em tempo real

RNA – ácido ribonucleico

RNA_m – ácido ribonucleico mensageiro

RQ – quantificação relativa

Runx2 – fator de transcrição relacionado com o runt 2

s – segundos

SDS – dodecil sulfato de sódio

SED – sedentário

SEN – senil

SFB – soro fetal bovino

TCF/LEF-1 – fatores de células T/potenciadore linfoide 1

TF – treinamento de força

TGF β – fator de crescimento transformante β

TIFF – *tagged image file format*

TNF- α – fator de necrose tumoral α

U – unidade

v – volume

vs – *versus*

Wnt – via homóloga de *Wingless*

ΔC_T – delta do ciclo limiar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	28
2. PROPOSIÇÃO	39
2.1. Proposição geral.....	39
2.2. Proposições específicas.....	39
3. METODOLOGIA	42
3.1. Animais	42
3.2. Ciclo Estral	42
3.3. Treinamento de Força.....	43
3.4. Coleta dos materiais.....	46
3.5. Isolamento das células tronco mesenquimais (CTMs) do estroma da medula óssea	46
3.6. Diferenciação osteogênica.....	49
3.7. AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOLÁSTICA.....	50
3.7.1 Análise indireta da taxa de proliferação celular.....	50
3.7.2 Proteína total.....	51
3.7.3 Fosfatase alcalina (U/mg de proteína)	51
3.7.4 Detecção da mineralização da matriz extracelular	52
3.7.5 Quantificação da mineralização da matriz extracelular.....	53
3.7.6 Detecção adipogênica	53
3.8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO E PROTEÍNAS NÃO COLAGENOSAS DA MATRIZ ÓSSEA	54
3.8.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa	54
3.8.2 Real Time PCR.....	55

3.9. ANÁLISE DA QUALIDADE DO TECIDO ÓSSEO.....	57
3.9.1 Densitometria óssea	57
3.9.2 Ensaio mecânico	57
3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4. RESULTADOS.....	60
4.1. Análise da taxa de proliferação celular	60
4.2. Proteína total	61
4.3. Fosfatase alcalina (U/mg de proteína).....	62
4.4. Detecção e quantificação da mineralização biológica	64
4.5. Detecção adipogênica	65
4.6. Expressão gênica de fatores de transcrição	67
4.7. Expressão gênica de marcadores de proteína não colagenosa da matriz óssea.....	69
4.8. Análise da qualidade do tecido ósseo através da densitometria óssea e ensaio mecânico	71
8. DISCUSSÃO.....	73
9. CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	84
ANEXO	94

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O fenômeno do envelhecimento é condição mundial, progressiva, irreversível e intrínseca ao ser humano. O número de pessoas que atingem a terceira idade vem aumentando perceptivelmente nas sociedades atuais, consequente dos históricos baixos níveis de fecundidade e mortalidade experimentados pelas mesmas (KINSELLA; HE, 2009). O aumento da expectativa média de vida populacional repercute em maior incidência no desenvolvimento de comorbidades e complicações sistêmicas, propiciando prejuízos psicobiológicos e sócio-comportamentais. Essas complicações predis põem ao declínio funcional, que sob a influência de maus hábitos de vida, potencializam a instalação de patologias tal como a osteoporose. Portanto, resulta em comprometimento da independência e autonomia do indivíduo idoso e aumenta a demanda de recursos econômicos nos serviços sociais, médicos e institucionais, conduzindo ao aumento de morbidade e mortalidade da população idosa (CHRISTENSON *et al.*, 2012; COOPER *et al.*, 2011; KINSELLA; HE, 2009).

A osteoporose, considerada relevante problema de saúde pública mundial (COOPER *et al.*, 2011; JEON *et al.*, 2011), caracteriza-se pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo resultante do desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea, conduzindo a fragilidade e ao aumento da incidência de fraturas ósseas (KANIS *et al.*, 1994). Em função do perfil hormonal, mulheres que transitam no período menopausal compõem o grupo com maior risco de osteoporose e, portanto, susceptibilidade a fraturas, resultante da diminuição da densidade mineral óssea (DMO) atribuída ao aumento no *turnover* ósseo de tal forma que a magnitude de osso reabsorvido durante o ciclo de remodelação é superior à que é substituída (CHRISTENSON *et al.*, 2012; ESHRE, 2010; KANIS *et al.*, 1994). Nos EUA, no ano de 2005, o número de fraturas osteoporóticas foi estimado em mais de 2 milhões com

custos totais de 17 milhões de dólares. Mulheres com 65 anos ou mais representaram 74% do total das fraturas, estimando-se 89% dos custos relacionados (ENSRUD, 2013). Em 2025, a incidência anual e custos relacionados a fraturas por fragilidade óssea aumentará em 50%, sendo esta condição consideravelmente maior em mulheres menopausadas, por possuírem cerca de 40 a 50% da massa óssea a menos até o final da vida (COMPSTON, 2001; ENSRUD, 2013).

O osso é tecido bastante ativo. Trata-se de tecido conjuntivo especializado e altamente vascularizado constituído por células ósseas e por matriz extracelular, possuindo importantes funções estruturais e metabólicas. A matriz extracelular óssea constitui cerca de 90% do peso total do osso compacto. É formada por matéria orgânica (30 a 35%) colagenosa constituída de colágeno do tipo I e não colagenosa tais como osteocalcina (Ocn) e osteopontina (Opn). A matéria inorgânica (65 a 70%) presente na matriz extracelular óssea é composta por íons de cálcio (Ca^{2+}) e de fosfato (PO_4^{3-}) que se depositam sob a forma de cristais de hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (AMADEI *et al.*, 2006; TURNER, 1998).

No esqueleto em desenvolvimento, a atividade metabólica óssea é primordialmente referida ao crescimento e a modelação óssea, processos pelos quais o osso atinge forma e tamanho maturo. Já no esqueleto adulto, a atividade metabólica é predominantemente voltada à remodelação óssea correspondendo à deposição de material orgânico e reabsorção óssea, efetuados por osteoblastos e osteoclastos em processos dinâmicos e contínuos, mantendo a integridade anatômica e estrutural do tecido ósseo (DATTA *et al.*, 2008; ESHRE, 2010; GAMBACCIANI, 2013).

O evento da remodelação óssea é iniciado pelo processo de reabsorção óssea dependente do recrutamento de precursores dos osteoclastos presentes nos tecidos

hematopoiéticos. A maturação e a ativação dos osteoclastos são mediados por citocinas tais como o fator estimulante da colônia de monócito (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANKL), responsáveis por induzir a expressão de genes característicos da linhagem osteoclástica (DATTA *et al.*, 2008; GAMBACCIANI, 2013). M-CSF atua na proliferação e recrutamento de progenitores de osteoclastos e RANKL estimula a ativação por meio da interação com RANK (receptor ativador do fator nuclear kappa-B) induzindo a secreção de prótons e enzimas líticas na zona de reabsorção ou lacuna de *Howship*, iniciando o processo osteolítico de degradação da matriz mineral e orgânica (GAMBACCIANI, 2013; GAMBACCIANI; LEVANCINI, 2014; MANOLAGAS *et al.*, 2000). Após o período de reabsorção, osteoclastos sofrem apoptose, possivelmente induzido por fatores responsáveis também por estimular a formação óssea pelos osteoblastos (DATTA *et al.*, 2008; GAMBACCIANI, 2013)

Osteoblastos surgem de células osteoprogenitoras parcialmente diferenciadas derivadas das células tronco mesenquimais (CTMs) originárias do estroma da medula óssea e possuem importante funcionalidade na formação do tecido ósseo durante o desenvolvimento embrionário, crescimento, remodelação e reparação óssea (OWEN, 1988). Portanto, o processo da osteogênese se inicia com o recrutamento e a proliferação de células osteoprogenitoras, que sob a influência de fatores específicos, como a proteína morfogênica óssea (BMP, moléculas pertencentes à família de fatores transformadores de crescimento β , TGF β), fator de crescimento insulínico (IGF), 1,25-hidroxivitamina D, PTH, estrógeno (E_2) e a via de transdução de sinal Wnt/ β -Catenina, modulam a expressão de marcadores osteoblásticos, aumentando a seletividade na diferenciação de CTMs nas linhagens osteoblásticas que por tanto, diferenciam-se progressivamente em pré-osteoblastos e osteoblastos (DATTA *et al.*, 2008;

GAMBACCIANI; LEVANCINI, 2014). A diferenciação osteogênica requer ainda a expressão de genes específicos, tais como fator de transcrição relacionado com o Runt 2 (Runx2) e Osterix que influencia eventos celulares resultando na produção de matriz extracelular orgânica e fatores necessários para o processo de mineralização pelos osteoblastos (DAVID *et al.*, 2007; DATTA *et al.*, 2008; PATSCH *et al.*, 2011;). Após o processo de diferenciação, osteoblastos convergem para a lacuna de reabsorção sintetizando a parte orgânica da matriz, compondo espessa camada de osteóide. Assim, a mineralização do osso ocorre com deposição de cristais de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ na matriz extracelular, que atuam na regulação da mineralização, manutenção da força, estabilidade e integridade do osso. Logo, osteoblastos que se tornam quiescentes e aprisionados pela própria matriz recém-sintetizada, passam a ser denominados osteócitos (AMADEI *et al.*, 2006; DATTA *et al.*, 2008)

Durante a transição de osteoblastos para osteócitos, as células perdem numerosos fenótipos osteoblásticos e adquirem características de osteócitos, tais como elevada expressão de Ocn e morfologia específica. Por possuírem prolongamentos citoplasmáticos contidos nos canalículos ósseos, os osteócitos constituem complexa rede interconectando uns com os outros, aos osteoblastos e células de revestimento ósseo do endóstio e perióstio por redes celulares, estabelecendo junções (GAP) e mediando à comunicação intercelular em resposta às modificações sistêmicas, bem como às modificações na superfície óssea e, portanto, responsáveis pela manutenção da matriz óssea e vitalidade das células ósseas (AMADEI *et al.*, 2006; DATTA *et al.*, 2008; HAKEDA *et al.*, 2000). Assim, o desenvolvimento e a homeostase do sistema esquelético está na dependência de remodelação óssea equilibrada, no qual, a formação óssea é correspondente à reabsorção, essencial para a manutenção da DMO normal (Figura 1) (TURNER, 1998).

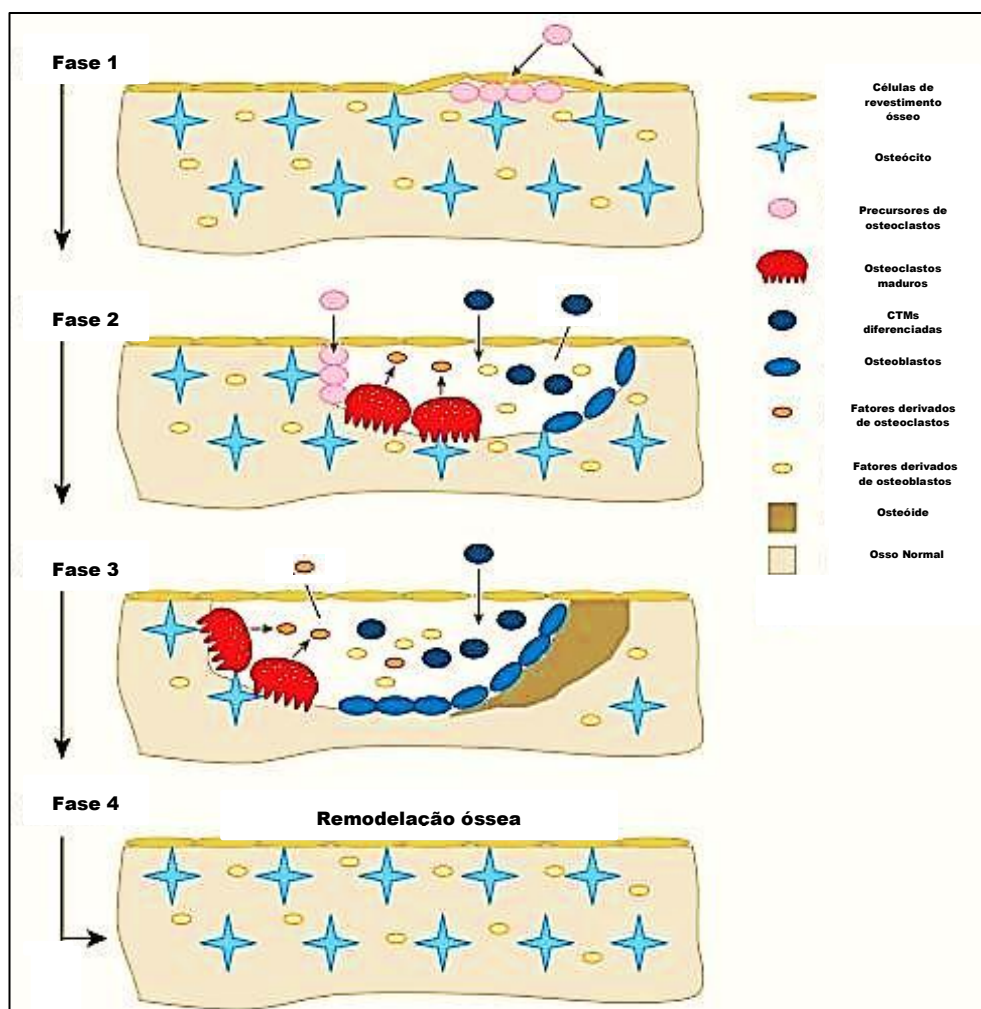


Figura 1. Imagem ilustrativa modificada do processo de remodelação óssea. O processo de remodelação consiste em: Fase 1: recrutamento de precursores de osteoclastos em local específico. Fase 2: reabsorção óssea e o recrutamento de CTMs e osteoprogenitores. Fase 3: diferenciação dos osteoblastos e síntese de osteóide. Fase 4: mineralização do osteóide e formação óssea com a finalização do processo de remodelação óssea (FENG; McDONALD, 2011).

Na menopausa, as alterações celulares que ocorrem dependentes da deficiência de estrógeno (E_2) resultam na diminuição de massa óssea decorrente do aumento no *turnover* ósseo. Estudos realizados com camundongos com diminuição de esteróides sexuais por ooforectomia aumentou a formação de osteoclastos por elevar a produção e ação de citocinas tais como fator de necrose tumoral α ($TNF\alpha$) e interleucina-1 ($IL-1$) (AN *et al.*, 2014; ARTSI *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013). $IL-1$ e $TNF\alpha$, responsáveis pela

osteoclastogênese e em prol à reabsorção óssea, estimulam precursores de osteoblastos a sintetizarem citocinas tal como IL-6, M-CSF e RANKL, bem como diminuem a síntese de TGF β e osteoprotegerina (OPG), sendo este, antagonista a diferenciação e ativação osteoclástica por ligar-se a RANKL inibindo sua ligação com RANK (Figura 2). Esses fatores aumentam a reabsorção óssea consequente da maior formação de precursores de osteoclastos, regulados por baixa concentração de E_2 , predispondo a fragilidade óssea em mulheres menopausadas (AN *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2013; MANOLAGAS, 2000).

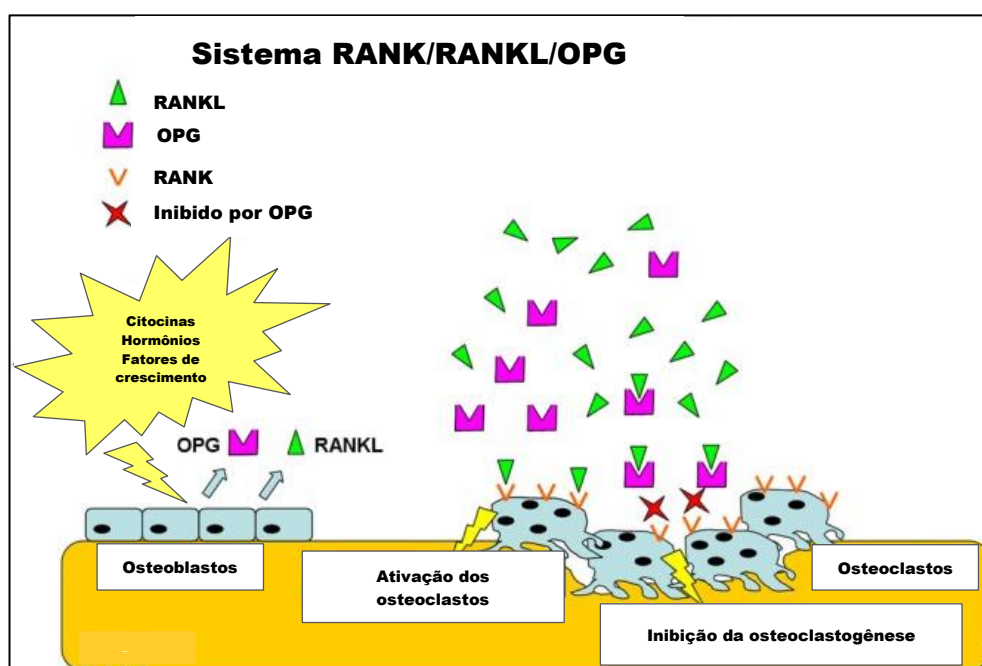


Figura 2. Imagem ilustrativa modificada do sistema RANK/RANKL/OPG. Osteoblastos produzem OPG e RANKL sob a ação de diversos fatores tais como citocinas, hormônios e fatores de crescimento. OPG ligar-se a RANKL inativando-o e inibindo sua ligação com RANK, resultando na inibição da osteoclastogênese. Na ausência de OPG, RANKL liga-se e ativa o seu receptor, RANK, expresso em osteoclastos e precursores de osteoclastos. A interação RANK/RANKL estimula a diferenciação, recrutamento e ativação osteoclástica. Assim, a proporção de OPG/RANKL é decisiva para a reabsorção do osso (NARDONE *et al.*, 2014).

É postulado que alterações no número e função de osteoblastos resultam de déficits qualitativos e quantitativos nas CTMs. A etiopatogenia da osteoporose

associada com o envelhecimento e déficit de E_2 esta intimamente relacionada com alterações no número CTMs, como também declínio funcional do microambiente celular tanto ao potencial intrínseco de diferenciação osteoblástica, produção de moléculas de sinalização em prol da formação óssea quanto reduzida capacidade de regeneração tecidual (CASTILLO *et al.*, 2014; MOERMAN *et al.*, 2004; PRZYBILLA *et al.*, 2014). Estudo demonstrou que CTMs derivadas da linhagem C57BL/6 possui maior número de células capazes de diferenciar-se espontaneamente em adipócitos, na ausência de estímulos adipogênicos (MOERMAN *et al.*, 2004). Estes resultados indicam que, com o envelhecimento, o potencial de diferenciação da linhagem de adipócitos é aumentado e que maiores proporções de tais células estão presentes nas fases tardias da diferenciação, diminuindo a qualidade do osso (CASTILLO *et al.*, 2014; PRZYBILLA *et al.*, 2014).

O exercício físico é amplamente recomendado como estratégia eficaz para redução do risco de fraturas osteoporóticas por gerar ações mecânicas que beneficiam o sistema osteomuscular e participar nos processos de remodelação óssea (GIANOUDIS *et al.*, 2014; TURNER & ROBLING, 2003). Diferentes programas de exercícios físicos, tais como o treinamento de resistência progressiva e sobrecarga de alta intensidade têm demonstrado manutenção ou melhoram na densidade mineral óssea (DMO) e aumento da massa e força muscular em mulheres na pós-menopausa e em homens acima de 60 anos de idade por causarem estímulos osteogênicos devido ao aumento do estresse mecânico (GIANOUDIS *et al.*, 2014). É consenso na literatura (BOSKEY; COLEMAN, 2010) que o tecido ósseo é mecanosensitivo e em resposta ao aumento de tensão (exercício físico) pode alterar a sua massa e sua estrutura.

Os efeitos dos exercícios físicos sobre o sistema esquelético são dependentes de fatores como a intensidade do exercício, a maturidade esquelética, bem como a

localização anatômica e o tipo de osso a ser analisado. Diversos estudos realizados em animais mostraram que o dinamismo do exercício, com estímulos de curta duração, de alta intensidade e intervalados (TURNER, 1998; YARROW *et al.*, 2012), tal como o treinamento de resistência de alta intensidade também denominado de treinamento de força (TF), são particularmente eficazes para a formação óssea por produzirem respostas osteogênicas e favorecerem a expressão de marcadores osteoblásticos, decorrente da geração de forte tensão, desencadeando o efeito piezoelétrico ósseo (MENKES *et al.*, 1993). Isso é implicado pela presença de sinais bioquímicos que parecem refletir campo elétrico, provavelmente decorrente da sobrecarga aplicada que gera suporte de peso em regiões ósseas específicas gerando tensão, deformação, compressão, torção ou cisalhamento do tecido ósseo. Essas ações mecânicas que são sinalizadas ao tecido ósseo pelos osteócitos (receptores mecânicos) geram diferenças no potencial elétrico das células ósseas, que agem como campo elétrico estimulador da atividade celular, levando à deposição de minerais nos pontos de estresse (MENKES *et al.*, 1993). Além disso, a carga mecânica decorrente do TF promove a diminuição da expressão gênica de Sost, resultando na ativação da via de sinalização canônica da Wnt, através da ligação da proteína Wnt ao complexo composto por receptor *Frizzled* e os receptores lipoprotéicos 5/6 (LRP 5/6). Essa interação determina inibição da fosfoproteína citoplasmática *Dishevelled* (DVL), que por sua vez deixa de recrutar complexo de degradação [Axin, polipose adenomatosa Coli (AP1), caseína quinase 1 α (CK1 α) e glicogênio sintase quinase-3 β (GSK-3 β)] da β -Catenina. Em maior concentração citoplasmática, a β -Catenina transloca-se para o interior do núcleo onde interage com a família de fatores de células T/potenciador linfóide 1 (TCF/LEF-1) (Figura 3) regulando a transcrição da expressão de genes importantes para a proliferação, diferenciação e apoptose de células

ósseas bem como aumentando o comprometimento de CTMs em prol dos osteoblastos e anti-adipogênico (BU *et al.*, 2012; SPATZ *et al.*, 2013; WILLIAMS, 2014).

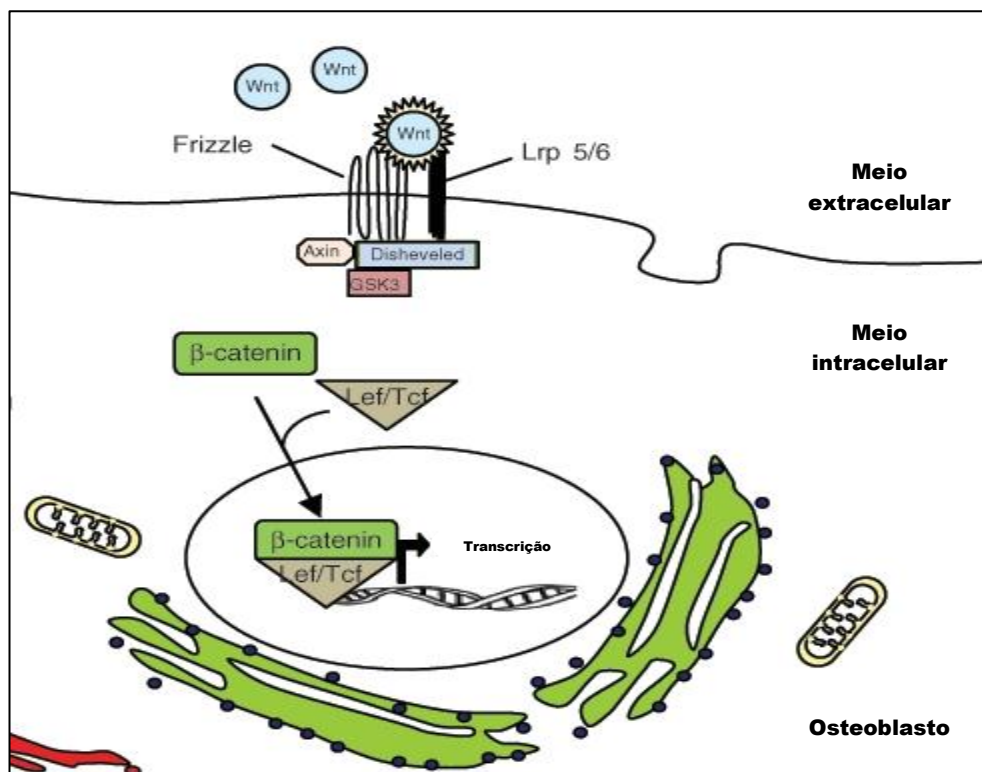


Figura 3. Imagem ilustrativa modificada da via de sinalização Wnt/β-Catenina na diferenciação dos osteoblastos. A tradução de genes que estimulam a diferenciação dos osteoblastos exige a translocação de β-Catenina para o núcleo das CTMs. β-Catenina é alvo de degradação pelo complexo GSK-3β/AP1/Axin. A ligação da proteína Wnt ao complexo composto por receptor *Frizzled* e os receptores lipoprotéicos 5/6 (LRP 5/6) interrompe esse processo, permitindo β-Catenina interagir com o complexo TCF/LEF-1, participando da regulação da expressão de genes importantes para a proliferação, diferenciação e comprometimento de CTMs em prol dos osteoblastos (NARDONE *et al.*, 2014).

Fatores mecânicos também estão envolvidos com a modulação de BMPs que, apesar de atuarem cooperativamente a via de sinalização Wnt/β-Catenina na regulação da diferenciação dos osteoblastos, estão fortemente associadas a expressão de Runx2 e previamente algumas proteínas importantes, tais como Opn e Ocn, com o estado de maturação dos osteoblastos e formação óssea (LEE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013).

Embora haja diversas pesquisas que definam a fisiopatologia e o desenvolvimento da osteoporose, ainda é necessária gama de informações sobre o mecanismo pelo qual o TF influencia positivamente na qualidade óssea durante a senescência. Logo, o objetivo principal deste estudo foi analisar o potencial de diferenciação osteogênica de CTMs provindas de animais senis condicionados ao TF, contribuindo assim para a obtenção de conhecimentos relacionados ao metabolismo ósseo e proporcionar informações que auxiliem no desenvolvimento e utilização, na prática clínica, de meios de prevenção para patologias ósseas.

PROPOSIÇÃO

2. PROPOSIÇÃO

2.1. Proposição geral

Avaliar o processo de diferenciação osteogênica de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea de ratas adultas (AD) e senis (SEN) sedentárias (SED) e submetidas ao treinamento de força (TF).

2.2. Proposições específicas

- Avaliar indiretamente a taxa de proliferação celular de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea através da técnica do MTT após 0, 7 e 14 dias de indução de diferenciação com MO;
- Mensurar a quantificação proteica de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico (MO);
- Mensurar a fosfatase alcalina (U/mg de proteína) de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea por meio do método colorimétrico após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO;
- Avaliar a mineralização biológica de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea através de coloração com o corante vermelho de alizarina e quantificação após 21 dias de indução da diferenciação com MO;
- Avaliar o processo de diferenciação adipogênica de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea através da coloração com *Oil Red O* após 21 dias de indução da diferenciação com MO;

- Analisar a expressão gênica de fatores de transcrição (*β -Catenina*, *Runx2* e *Ppar γ*) e proteínas da matriz extracelulares ósseas não colagenosas (*BMP2*, *Opn* e *Ocn*) de culturas primárias de CTMs originárias do estroma da medula óssea através do *Real Time* PCR após 14 dias de indução da diferenciação com MO;
- Verificar a qualidade do tecido ósseo de tíbias esquerdas de todos os grupos experimentais, pela análise de densitometria óssea e ensaio mecânico.

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Para o presente estudo foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) intactas com 6 e 18 meses de idade, provenientes do biotério central da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – FOA – UNESP. Os animais foram acondicionados no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, mantidos em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa), com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade do ar ($55 \pm 10\%$) e ciclo de luz claro-escuro (12 h/12 h), com início da fase escura às 19 h, controlado. Os animais receberam ração comercial (Presence® Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil) e água *ad libitum*.

Após o acompanhamento do ciclo estral, os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais: adultas sedentárias (AD SED); adultas condicionadas ao TF (AD TF); senis sedentárias (SEN SED) e senis condicionadas ao TF (SEN TF).

Os procedimentos experimentais foram realizados conforme protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) - FOA/UNESP, de acordo com o processo 00462-2012.

3.2. Ciclo Estral

Foi realizado acompanhamento e análise do ciclo estral mediante esfregaço vaginal colhido no período matutino (9 h), analisado a fresco em microscópio óptico (LONG; EVANS, 1922) de todos os animais experimentais durante 15 dias (3/4 ciclos).

Para este estudo foram utilizados somente animais AD que apresentaram ritmicidade na produção dos hormônios ovarianos, ou seja, ciclicidade reprodutiva, exibindo ciclos estrais com quatro fases distintas: metaestro, diestro, proestro e estro.

Também foram utilizados animais SEN que apresentaram alteração na ritmicidade na produção dos hormônios ovarianos, não possuindo o perfil cíclico reprodutivo, ou seja, com comprovada irregularidade no ciclo estral (peri-estropausa) (LEFEVRE; McCLINTOCK, 1988).

3.3. Treinamento de Força

Os animais dos grupos experimentais AD TF e SEN TF realizaram TF proposto em escada [parâmetros de 1,13 x 0,18 m; 2 cm (espaço entre degraus); 80° de inclinação; com local para descanso no topo (diâmetro de 20 x 20 x 20 cm)] (HORNBERGER JUNIOR; FARRAR, 2004). O protocolo de treinamento teve duração 120 dias, três sessões por semana (em dias alternados), onde cada sessão correspondeu a 5 escaladas (séries) com intervalos de 120 s entre cada série. A figura 4 apresenta a escada utilizada para o TF.

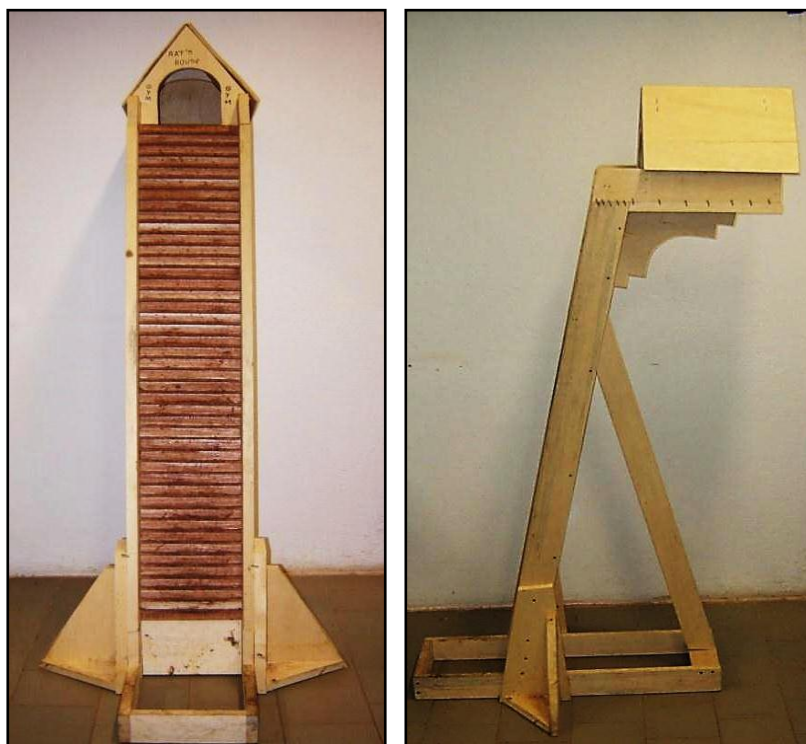


Figura 4. Imagens ilustrativas da escada utilizada para o TF.

Ressaltamos que o tamanho da escada requer que os animais realizem de 8 a 12 movimentos dinâmicos (repetições) por subida (série).

Na semana que antecedeu o TF, os animais foram submetidos ao período de adaptação ao exercício físico sem acréscimo de sobrecarga, 3 vezes por semana em dias alternados, 5 séries de escalada com intervalo de descanso de 120 s entre cada série com o intuito de ambientação dos animais ao exercício proposto. Dois dias após o período de adaptação, foi realizado o teste de força máxima (FM). A carga inicial foi correspondente a 75% do peso corporal imposta aos mesmos por meio de tubo (s) cônico(s) (50 mL) contendo esferas de aço acopladas à cauda dos animais (Figura 5). A cada nova série foi acrescentada 30 g de sobrecarga até o momento que o animal não realizasse o movimento completo de subida. A sobrecarga imposta na subida anterior a da falha do movimento completo foi considerada a carga máxima do animal, a qual serviu como base para os cálculos da sobrecarga a serem aplicadas durante o período de treinamento. O TF foi então, iniciado 48 h após o término do teste de FM.

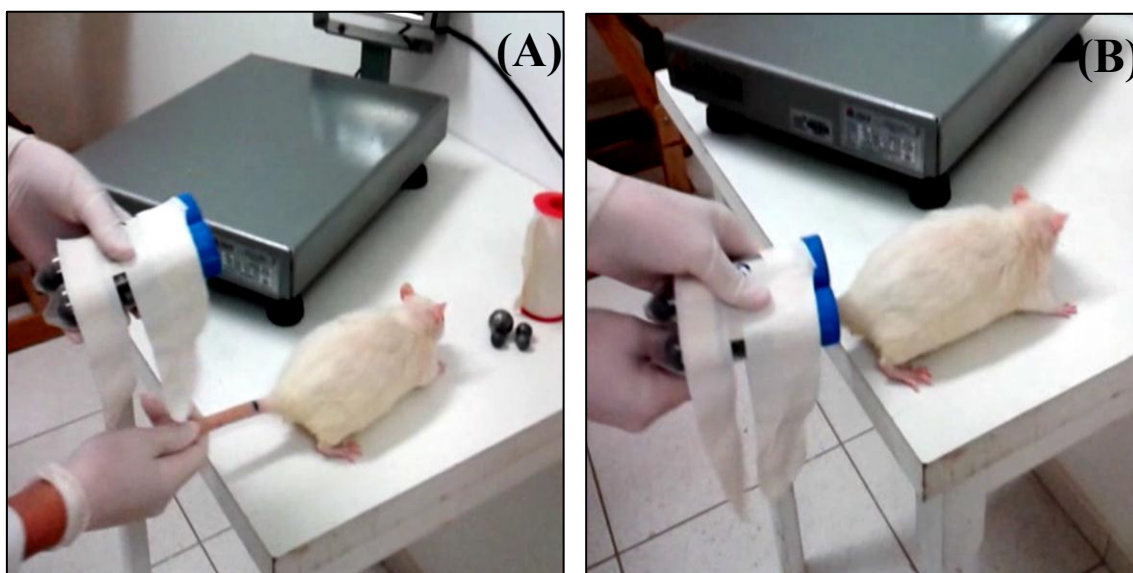


Figura 5. Imagens ilustrativas do manuseio para o acoplamento de tubos cônicos (50 mL) contendo esferas de aço à cauda do animal correspondendo a sobrecarga imposta no TF (A; B).

A partir da determinação do teste de FM, os animais realizaram o TF (Figura 6) com sobrecarga correspondente a 60% à FM na 1ª semana. A cada semana seguinte foi acrescentado 10% da sobrecarga correspondente ao teste FM, assim sucessivamente até o limite de 80% (3ª semana), o qual foi mantido até o final do período de TF. Quinzenalmente foram realizados novos testes de FM para a obtenção e manutenção da capacidade de FM dos animais. Ao final do TF os animais possuíam idades de 9 e 21 meses.

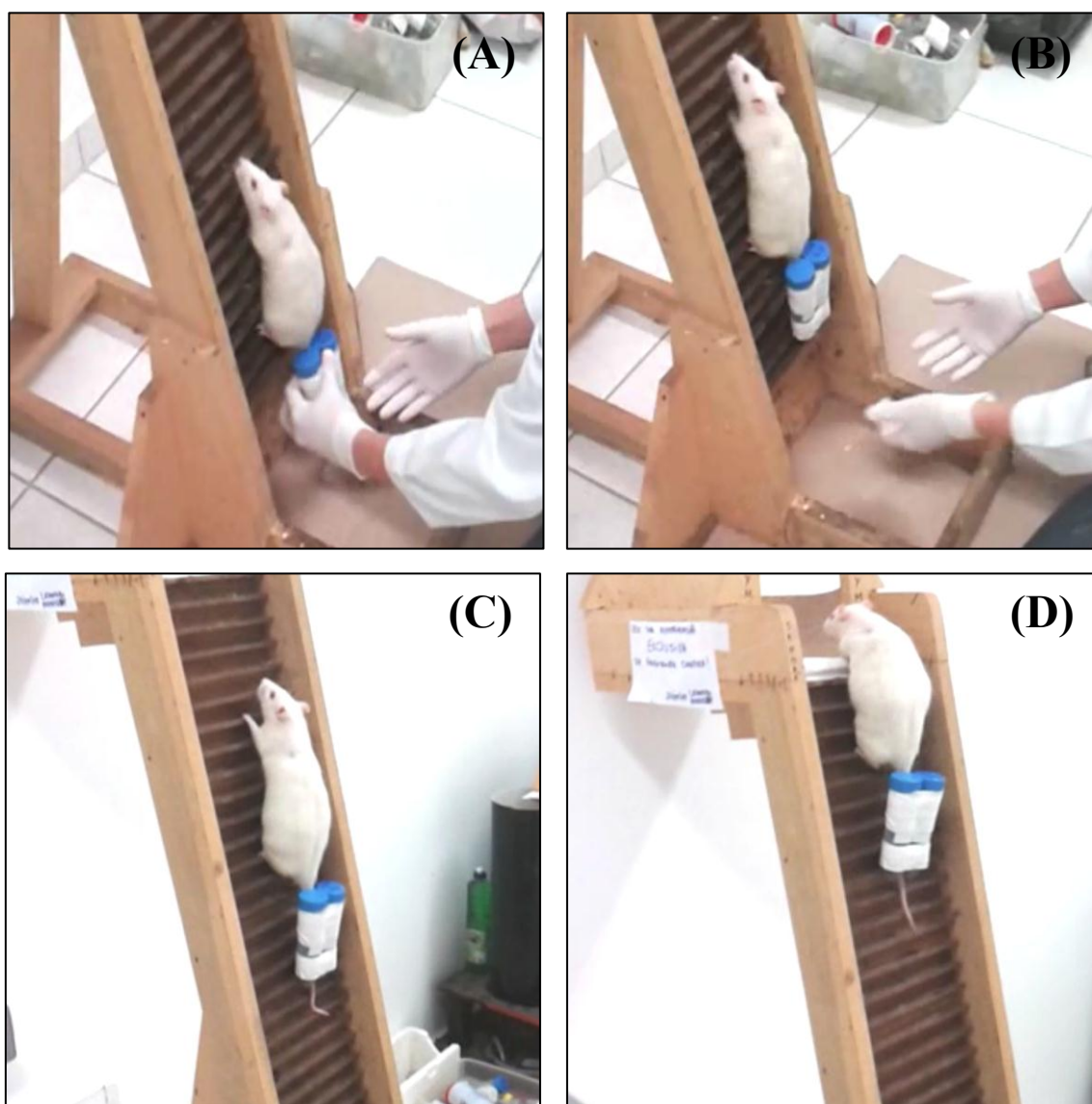


Figura 6. Imagens ilustrativas da execução do TF de ratas AD e SEN (A; B; C; D).

3.4. Coleta dos materiais

Cento e vinte dias após o início do TF os animais foram anestesiados com anestésico Hypnol (Pentobarbital sódico a 3% - 0,3 mL p/ cada 100 g de peso corpóreo via intramuscular) e mortos por decapitação para a retirada asséptica dos fêmures utilizados para o isolamento e cultivo de células em cultura primária e tíbias esquerdas armazenadas em solução salina 0,9% à -20°C para posterior ensaio mecânico.

3.5. Isolamento das células tronco mesenquimais (CTMs) do estroma da medula óssea

As CTMs do estroma da medula óssea foram isoladas de acordo com protocolo de Wang e colaboradores (2012), com modificações. Os fêmures dos animais de cada grupo experimental foram removidos, dissecados e as epífises seccionadas em condições assépticas, a fim de se proceder a extração da medula óssea para a eluição e processamento celular (Figura 7).

Segregados da medula óssea foram extraídos e suspensos em 20 mL de meio essencial mínimo (MEM, Sigma Aldrich™, St. Louis, MO, USA) suplementados com 25 mM de NaHCO₃ (MERK, Germany), 4 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich™), 10% de soro fetal bovino inativado (SFB, Gibco, Grand Island, NY, USA), 50 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco), 10 µg/mL de sulfato de gentamicina (Gibco) e 0,25 µg/mL de fungizone (Gibco), com pH 7,4 (meio de crescimento celular - C) através da introdução de agulha de calibre de 20 mm acoplado a seringa de 20 mL na cavidade medular (Figura 7).

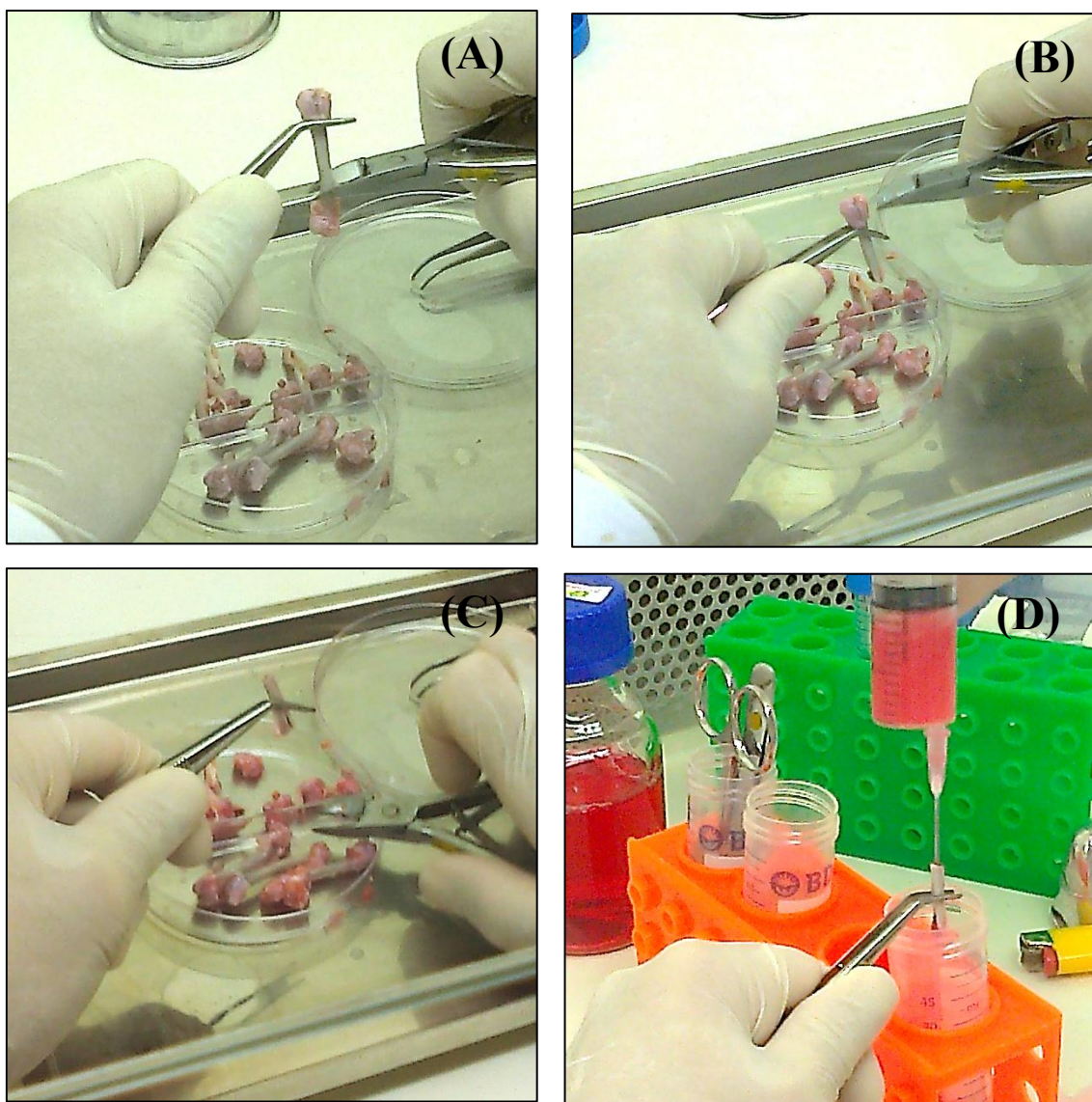


Figura 7. Imagens ilustrativas da dissecação (A), secção das epífises do fêmur (B; C) e extração da medula óssea através da introdução de agulha acoplada a seringa e meio de crescimento celular de ratas AD e SEN (D).

A suspensão celular foi desagregada por meio de repetidas aspirações dos segregados da medula através de agulha de calibre de 20 mm. Após centrifugação ($10000 \times g$, 4 min, 4°C) o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi ressuspensão e homogeneizado em 40 mL de meio C e posteriormente filtrados com rede de aço de poros de $70 \mu\text{m}$ de tamanho. A contagem de células nucleadas foi realizada com auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer) e solução Turk, solução diluidora

baseada em azul de metileno, que promove a lise de eritrócitos permitindo evidenciar somente CTMs do estroma da medula óssea como demonstrado na Figura 8. Foram contados os 4 retículos da câmara de Neubauer que foi preenchido com alíquota da suspensão celular homogênea combinada com o volume de solução Turk (1:20) e analisado em microscópio óptico de luz invertida (Olympus CKX41- Olympus Optical CO., Ltda., Japão). O número de células contadas foi multiplicado pelo fator de correção (20) para expressar o total de células por alíquota.

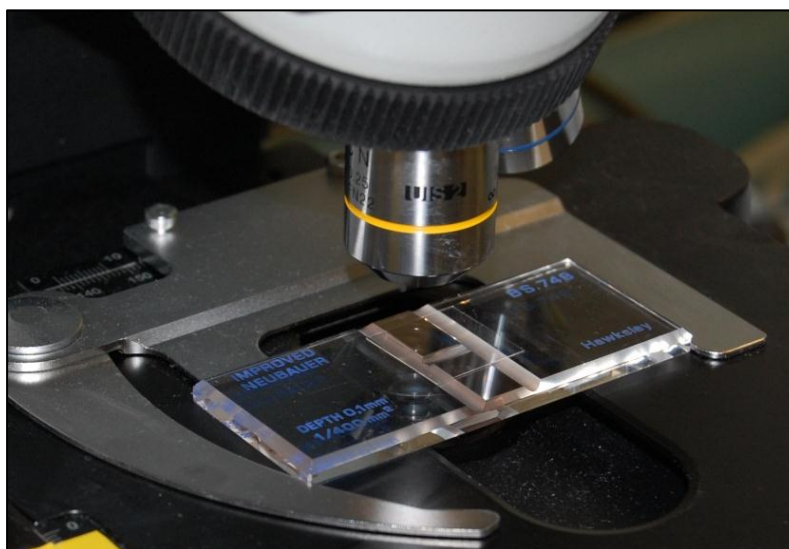


Figura 8. Imagem ilustrativa da contagem de células nucleadas do estroma da medula óssea providas de ratas AD e SEN, realizada com auxílio de hemocitômetro (câmara de Neubauer) e microscópio óptico de luz invertida.

Cultura primária de CTMs originárias do estroma da medula foi obtida pelo plaqueamento das células processadas providas de animais de cada grupo experimental (AD SED, AD TF, SEN SED, SEN TF) na densidade de 19×10^5 células nucleadas por cm^2 de poço, em placas de poliestireno de 24 poços (TPP – Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Espanha). As células foram cultivadas em incubadora a 37°C e em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico ao longo de todos os

procedimentos experimentais e realimentadas com meio C a cada três dias até atingirem a confluência de 70-80% o que equivaliu a aproximadamente 10 dias para os grupos experimentais AD e 15 dias para os grupos experimentais SEN, onde então se iniciou a indução osteogênica correspondendo o dia 0 experimental (MANIATOPOULOS *et al.*, 1988). A figura 9 apresenta a confluência celular de 70-80% de cultura primária de CTMs do estroma da medula óssea.

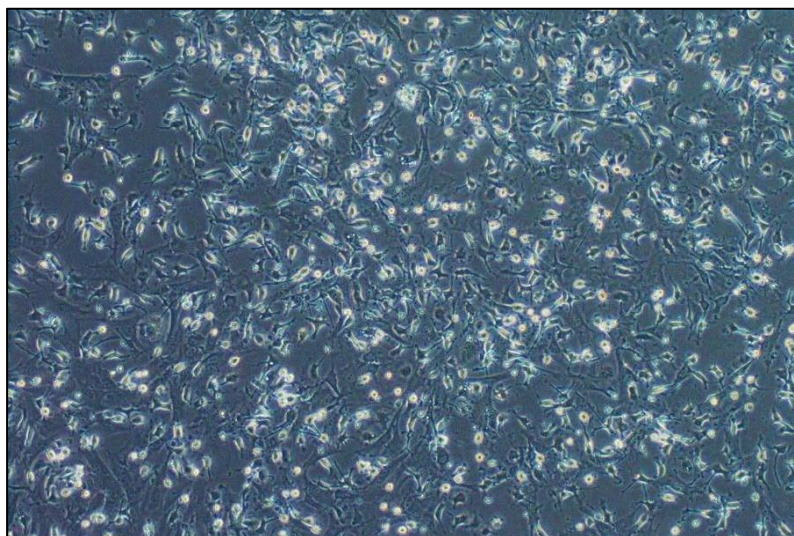


Figura 9. Imagem ilustrativa da confluência celular de 70-80% de cultura de CTMs do estroma da medula óssea do grupo SEN TF, obtidas através de câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz invertida. Obj. 10x.

3.6. Diferenciação osteogênica

A diferenciação osteogênica de cultura primária de CTMs originárias do estroma da medula foi induzida através da adição de meio de diferenciação osteogênica (MO) correspondendo o dia 0 experimental, proveniente da suplementação do meio C com 50 µg/mL de ácido ascórbico (Sigma Aldrich™), 10 mM β-glicerofosfato (Sigma Aldrich™) e 10^{-8} M dexametasona (Sigma Aldrich™) (MANIATOPOULOS *et al.*, 1988). Assim foram constituídos os grupos experimentais conforme descrito: C SED

(meio de crescimento celular de CTMs de doadoras sedentárias), MO SED (meio de diferenciação osteogênica de CTMs de doadoras sedentárias), C TF (meio de crescimento celular de CTMs de doadoras condicionadas ao TF) e MO TF (meio de diferenciação osteogênica de CTMs de doadoras condicionadas ao TF) de animais AD e SEN. As células foram cultivadas e submetidas a ensaios experimentais nos 0, 7, 14 e 21 dias da adição do MO.

3.7. AVALIAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS OSTEOLÁSTICA

3.7.1 Análise indireta da taxa de proliferação celular

A análise indireta da taxa proliferação celular foi avaliada após 0, 7 e 14 dias da adição do MO pelo método colorimétrico do MTT. Esse ensaio é dependente da redução do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo tetrazolina, Sigma Aldrich™), pela desidrogenase mitocondrial de células viáveis em produto azul em forma de cristais (formazan). A quantidade desses cristais é diretamente proporcional à coloração azul e permite estimativa do número de mitocôndrias proporcional ao número de células viáveis da cultura o que demonstra indiretamente a taxa de proliferação celular. Após os períodos determinados os meios de culturas foram removidos e solução contendo 0,5 mL de solução de MTT (0,5 mg de MTT/mL de meio de cultura sem SFB, Sigma Aldrich™) foi adicionado a cada poço. Após a incubação por 3 h a 37°C, a solução foi aspirada e o formazan intracelular solubilizado com a adição de 1 mL de etanol absoluto (MERK). As placas foram agitadas por 5 min e uma alíquota de 200 µL de cada poço foi transferida para placa de 96 poços. As absorbâncias das amostras foram mensuradas a 570 nm (MOSMANN, 1983) em leitora de microplaca *SpectraMax 190 com SoftMax® Pro Data Acquisition & Analysis Software* (Molecular Devices, CA, USA).

3.7.2 Proteína total

A dosagem de proteína total foi quantificada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), determinada em lisados celulares obtidos através da solução de SDS 1 mg/mL (dodecil sulfato de sódio, Sigma Aldrich™) após 0, 7 e 14 dias da adição do MO. Após a remoção do meio de cultura e os poços lavados com PBS (Gibco), foram adicionados 1,5 mL de solução de SDS e realizadas sucessivas aspirações e raspagens com o intuito de lisar as células. A dosagem de proteína total ocorreu através da adição de soluções de Na_2CO_3 (MERK) a 2% em NaOH (MERK) a 0,1 M, com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (MERK) a 0,5% em $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (MERK) a 1% em tubos contendo as amostras. Os tubos foram agitados e mantidos em repouso durante 10 min. Em seguida foi acrescentado 0,5 mL de solução de reagente fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma Aldrich™) em H_2O ultrapura (1:1) onde foram mantidos em repouso por 30 min. A solução de SDS foi adicionada nos tubos brancos. Albumina a 0,1% (Sigma Aldrich™) foi usada como padrão. As absorbâncias foram mensuradas em comprimento de onda de 660 nm em leitora de microplaca (Molecular Devices) e a concentração de proteína total, em $\mu\text{g/mL}$, foi calculada a partir de curva padrão.

3.7.3 Fosfatase alcalina (U/mg de proteína)

A fosfatase alcalina (FAL) (U/mg de proteína) foi determinada nos mesmos lisados celulares obtidos para a análise citada acima, através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) e baseado no método de Roy (1970) com modificações. O princípio desse kit envolve a liberação de timolftaleína e PO_4^{3-} inorgânico a partir de p-timolftaleína monofosfato em meio alcalino, reação da qual participa a enzima FAL.

A enzima foi determinada após 0, 7, 14 dias da adição do MO e para isso foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato e 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/mL, pH 10,1. Nos tubos padrões foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 min. Em seguida, foram adicionados, em cada tubo teste, 50 µL do lisado de células dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos foram mantidos a 37° C por 10 min. Após esse período foram adicionados em todos os tubos 2 mL do reagente de cor (Na₂CO₃ 0,09 mmol/mL e NaOH 0,25 mmol/mL). As absorbâncias foram mensuradas em comprimento de onda de 590 nm em leitora de microplaca (Molecular Devices). Os valores da FAL foram expressos em U/L equivalente a 1 µmol de timoftaleína/min à 37°C e pH 10,15, calculada a partir da medida do tubo padrão. Os dados foram normalizados pelo conteúdo de proteína total (1µmol de timoftaleína/min por mg de proteína, ou U/mg) (LOWRY *et al.*, 1951).

3.7.4 Detecção da mineralização da matriz extracelular

Ao final do 21º dia, o meio de cultura foi removido, os poços lavados com PBS gelado (Gibco) e preenchidos com formaldeído (MERK) a 10% por 30 min. Em seguida, os poços foram lavados com H₂O deionizada e adicionado 1 mL da solução de vermelho de alizarina (*Alizarin Red S*, Sigma Aldrich™), que cora em vermelho, áreas de mineralização ricas em Ca²⁺ (GREGORY *et al.*, 2004). Após repouso de 30 min, o excesso de corante foi removido e as placas lavadas com H₂O e as placas mantidas semi-abertas à temperatura ambiente até a secagem total. Os poços foram analisados e as imagens representativas de cada grupo experimental foram obtidas por sistema de câmera digital (Olympus DP12-2) acoplada ao microscópio óptico de luz invertida (Olympus CKX41- Olympus Optical CO., Ltda., Japão).

3.7.5 Quantificação da mineralização da matriz extracelular.

A quantificação da mineralização foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory (2004). Foram adicionados 450 μ L de solução de ácido acético a 10% (v/v) a cada poço previamente corado com vermelho de alizarina. A placa foi mantida à temperatura ambiente por 30 min sob agitação. Foram transferidos 400 μ L do conteúdo de cada poço para tubos tipo *ependorf*, posteriormente adicionado 150 μ L NH_4OH para neutralizar. As absorbâncias foram mensuradas em comprimento de onda de 405 nm em leitora de microplaca (Molecular Devices).

3.7.6 Detecção adipogênica

Durante o experimento de diferenciação osteogênica foi observado em alguns grupos estruturas compatível com acúmulos lipídicos no interior das células. Para comprovar de que se tratava de adipócitos o corante *Oil Red O* (Sigma Aldrich™) foi utilizado ao final do 21º dia (AHRARI *et al.*, 2013). Para isso o meio de cultura foi removido e os poços lavados com PBS gelado (Gibco) e preenchidos com formaldeído (MERK) a 10% por 30 min seguindo de lavagens com H_2O deionizada e incubação com isopropanol (Sigma Aldrich™) 60%. Foi realizada incubação da solução de *Oil Red O* [0,3% de *Oil Red O* diluído em isopropanol e H_2O deionizada (3:5)] por 15 min e após lavagens com H_2O deionizada. As células foram contratadas com 300 μ L de Hematoxilina de Mayer por 3 min à temperatura ambiente. Os poços foram lavados com H_2O deionizada para posterior análise e as imagens foram obtidas por sistema de câmera digital (Olympus DP12-2) acoplada ao microscópio óptico de luz invertida (Olympus CKX41-Olympus Optical CO., Ltda., Japão).

3.8. ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE FATORES DE TRANSCRIÇÃO E PROTEÍNAS NÃO COLAGÊNICAS DA MATRIZ ÓSSEA

3.8.1 Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA total das células foi realizada após 14 dias da adição do MO, utilizando reagente Trizol (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). Para isso, após remoção do meio de cultura contido nos poços, foram adicionados 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen™) em cada poço, a qual permaneceu à temperatura ambiente por 10 min. Após vigorosa raspagem do poço, o volume de Trizol (Invitrogen™) correspondente foi transferido para tubo tipo *ependorf* DNase e RNase *free* de 1,5 mL aos quais foram adicionados 200 µL de clorofórmio (MERK Millipore, Darmstadt, Alemanha) para cada mL de Trizol (Invitrogen™). Os tubos foram vigorosamente agitados por 30 s e, logo após, mantidos em repouso à temperatura ambiente, por 5 min. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 4°C e 13000 g, por 15 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi acrescentado isopropanol (MERK Millipore), para cada volume de fase aquosa coletada (v/v).

As amostras foram estocadas à -20°C *overnight*. Posteriormente os tubos foram centrifugados a 4°C, 13000 g, por 15 min, para obtenção dos precipitados dissolvidos em etanol a 75% (MERK Millipore). Após centrifugação a 4°C, 10000 g, por 10 min, o excesso de etanol foi desprezado e as amostras vertidas em papel absorvente por 5 min para evaporação do etanol residual. Os precipitados formados foram dissolvidos em 20 µL de H₂O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Applied Biosystems Life Technologies) e estocados à -80°C. Aliquotas de 2 µL de cada amostra de RNA total obtido, foram então, diluídas em 98 µL de H₂O destilada Ultra pura DNase/RNase *free*

(Invitrogen Life Technologies) para quantificação do RNA das amostras em leitora de placa onde foram consideradas comprimentos de onda de 280 e 260 nm.

Com o propósito de eliminar a contaminação por DNA genômico, foi realizado tratamento com DNase I (Sigma Aldrich™) onde foram adicionados em cada 8 µL de amostra (2,5 µg de RNA), 1 µL de DNase I e DNase *Buffer* 10x (Sigma Aldrich™) e após centrifugação e incubação por 10 min a 70°C foi adicionada a solução de parada (Stop Solution, Sigma Aldrich™) e os tubos armazenados à -20°C.

O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir do RNA tratado, por reação de transcrição reversa, com a adição de 1 µL Oligo DT, 1 µL de dNtp *mix* (10 mM cada) e 10 µL do RNA tratado com DNase, os tubos foram incubados a 65°C por 5 min. Após foram adicionados 4 µL *Buffer* 5x, 2 µL de DTT (0,1M) e 1 µL H₂O tratada com DEPC por tubo, seguido de incubação a 42°C por 2 min. Após 1 µL de *Superscript II* (*SuperScript® II First-Strand Synthesis SuperMix* por qRT-PCR, Invitrogen™) foi adicionada e os tubos incubados a 42°C por 50 min seguidos de 15 min a 70°C. As amostras então foram transferidas para tubos novos e armazenadas à 4°C.

3.8.2 Real Time PCR

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de *Real Time* PCR, utilizando-se o sistema *Taqman*® (Applied Biosystems Life Technologies) em aparelho *StepOne™ Real-Time PCR System* (Applied Biosystems Life Technologies). Para esta reação foram utilizados *primers* e sondas inventoriados marcadas com fluoróforo FAM (Applied Biosystems Life Technologies): Osteocalcina (*Ocn* - Rn00566386_g1); Osteopontina (*Opn* - Rn00563571_m1); Runx2 (*Runx2* - Rn01512298_m1); receptor ativado por proliferadores de peroxissoma γ (*Pparg*) (*Pparg* - Rn00440945_m1); β -Catenina (*Catnb* - Rn00584431_g1); BMP2

(*Bmp2* - Rn90931). Também foi realizada a amplificação do gene constitutivo com *primer* e sonda inventoriados: β -actina (*Actb* - Rn00667869_m1), utilizado como controle positivo da reação. Uma amostra negativa (H₂O) foi submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* utilizados.

Alíquotas de 2 μ L do DNAC, nas diluições 1:4 (*Opn*, *Ocn*, *BMP2*, *Catnb*, *Runx2*, *Pparg*, *Actb*) sintetizado a partir do RNAm foram utilizadas juntamente com reagentes *Taqman*[®] *Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems Life Technologies), em volume final de reação de 10 μ L. A reação de amplificação compreende de 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e 40 ciclos de 15 s a 95°C a 1 min e 60°C, conforme recomendado pelo fabricante.

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvo foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando-se a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Para a RQ de cada amostra, foi utilizado o valor de C_T (*cycle threshold* ou ciclo limiar), definido após a reação, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atingiu dado limiar detectado, que permitiu a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. O valor do C_T do gene alvo é subtraído do valor do C_T do normalizador (*Actb*) e resulta no valor de ΔC_T ; o valor de ΔC_T do gene alvo é, então, subtraído do valor do ΔC_T do calibrador (grupo C SED de ratas AD), e é encontrado o valor de $\Delta\Delta C_T$. Este valor foi utilizado na fórmula do nível de expressão $FC = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ (*normalized fold change relative to calibrator*), onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do normalizador, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.9. ANÁLISE DA QUALIDADE DO TECIDO ÓSSEO

3.9.1 Densitometria óssea

A densidade mineral óssea areal (DMOa, g/cm^2) e o conteúdo mineral ósseo (CMO, g) foram determinados nas tíbias esquerdas dos animais por *dual-energy X-ray absorptiometry* (DEXA) (Lunar DPX Alpha, WI, EUA), com *software* especial para pequenos animais. A avaliação que determina propriedade do biomaterial correlacionada à resistência óssea (MARSHALL *et al.*, 1996) foi realizada após o sacrifício dos animais e dissecação das tíbias.

3.9.2 Ensaio mecânico

As propriedades biomecânicas das tíbias esquerda dos animais foram avaliadas pelo ensaio de flexão em 3 pontos (Figura 10A) usando máquina universal de ensaios (DL 3000, EMIC ®, São Jose dos Pinhais, PR, Brasil). Tensão de ruptura óssea (N), rigidez extrínseca (N/mm), tenacidade (mJ) e resiliência (mJ) foram obtidas por software do dispositivo e calculadas a partir da curva de carga/deflexão (Figura 10B), registrados a parâmetros padronizados de célula de carga a 2000 N de capacidade a velocidade de 5 mm/min (TURNER; BURR, 1993).

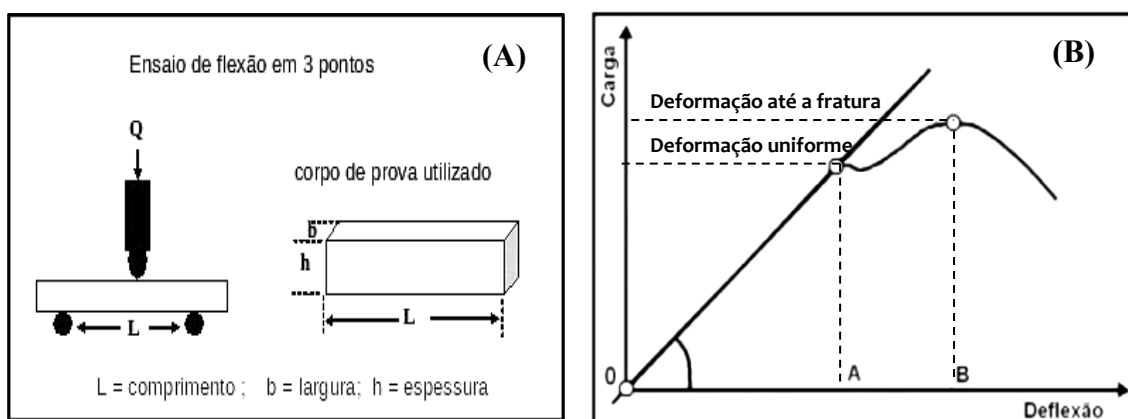


Figura 10. Imagens ilustrativas modificadas do ensaio de flexão em 3 pontos (A) e curva de

carga/deflexão modificada (B) (SILVA; VOLPON, 2004).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados usando o *software GraphPad Prism®*, versão 6.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e submetidos à *2way* ANOVA seguido do pós-teste de múltiplas comparações Bonferroni. Os dados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) e o nível de significância utilizado é de 5% ($p < 0,05$) para todas as comparações.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Análise indireta da taxa de proliferação celular

Os resultados obtidos pelo método colorimétrico do MTT após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (Fig. 11A) e SEN (Fig. 11B) demonstraram crescente proliferação celular no decorrer dos dias experimentais analisados. CTMs de doadoras de ambas as idades condicionadas ao TF evidenciaram aumento significativo na proliferação celular quando comparadas aos grupos C SED, no 0 dia experimental (Fig. 11A-B).

Após 7 dias da indução do MO em ambos os grupos de CTMs diferenciadas de ratas AD foi possível evidenciar aumento significativo da proliferação celular quando comparados aos grupos C.

No 14º dia experimental, foi possível verificar diferença significativa da proliferação em ambos os grupos de CTMs de doadoras AD condicionadas ao TF em relação aos grupos SED (Fig. 11A), enquanto que CTMs diferenciadas de doadoras SEN apresentaram redução significativa da proliferação celular quando comparadas aos grupos C (Fig. 11B).

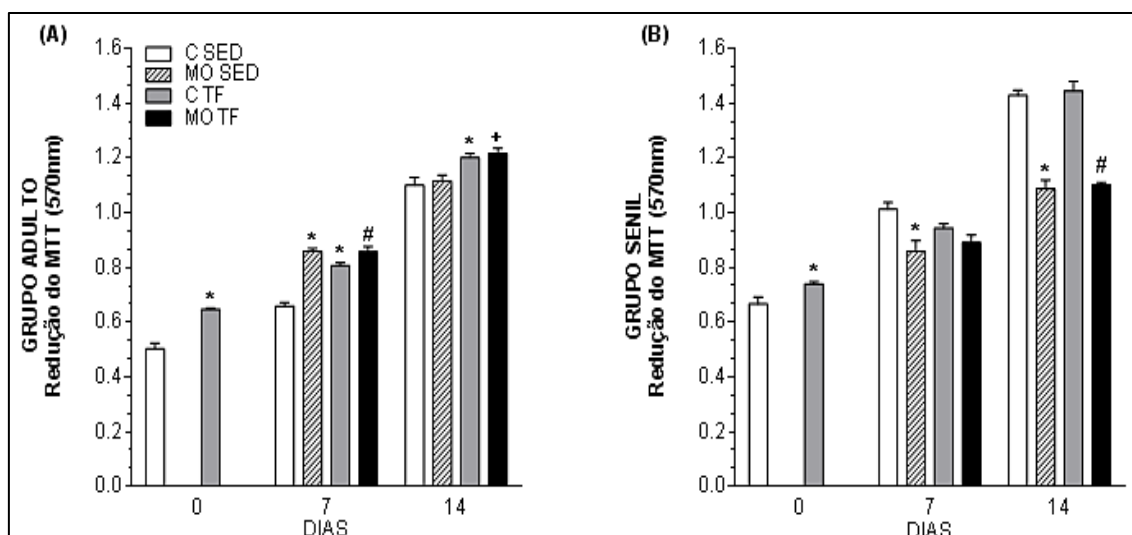


Figura 11. Análise indireta da taxa de proliferação celular pelo método colorimétrico do MTT realizado após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Abreviaturas: * $p < 0,05$ vs grupo C SED; + $p < 0,05$ vs grupo MO SED; # $p < 0,05$ vs grupo C TF.

4.2. Proteína total

A quantificação proteica tem por finalidade avaliar a quantidade de matriz orgânica das células. Quando analisado o dia 0 experimental de CTMs pertencentes aos grupos AD (Fig. 12A) e SEN (Fig. 12B) foi possível constatar maior quantificação de proteína nos grupos condicionados ao TF, porem não estatístico para o grupo SEN (Fig. 12B).

CTMs de doadoras AD, em ambos os dias experimentais 7º e 14º, possuíram maior concentração nos grupos MO, independentes do condicionamento ao TF. Entretanto os grupos C TF obtiveram quantificações superiores as SED (Fig. 12A).

No grupo de CTMs de ratas SEN, o TF pareceu não influenciar na quantificação do 7º dia experimental, entre os grupos de CTMs diferenciadas, porem o grupo C TF

apresentou aumento significativo quando comparado as CTMs de doadoras SED e MO TF. Já no 14º dia experimental, CTMs diferenciadas de ratas condicionadas ao TF demonstrou aumento significativo da quantificação proteica, quando comparado ao grupo MO SED, tendo este, apresentado menor concentração quando comparado ao grupo C SED (Fig. 12B).

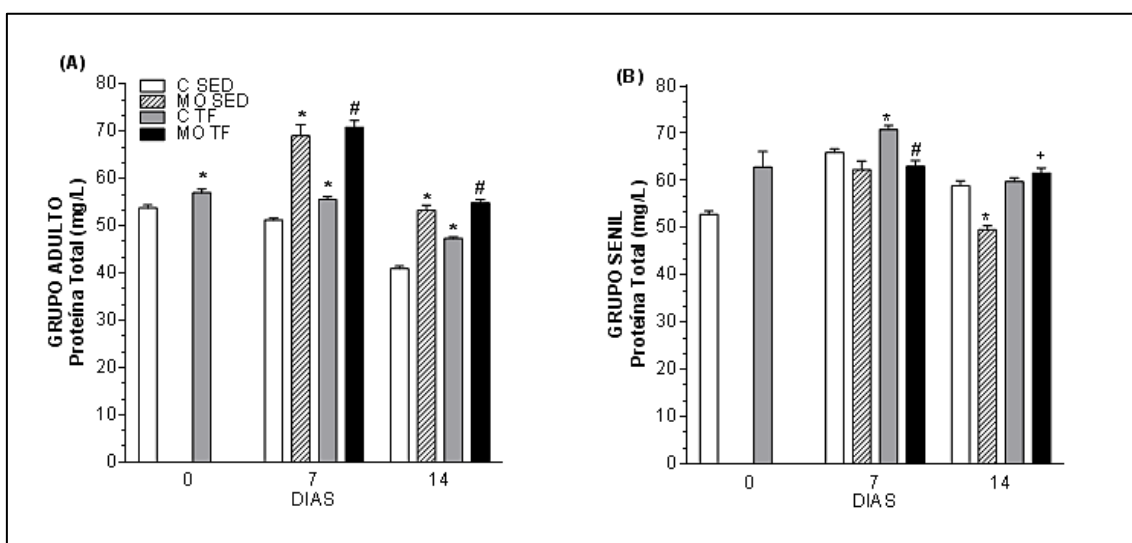


Figura 12. Quantificação proteica realizada após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Abreviaturas: * $p < 0,05$ vs grupo C SED; + $p < 0,05$ vs grupo MO SED; # $p < 0,05$ vs grupo C TF.

4.3. Fosfatase alcalina (U/mg de proteína)

A FAL (U/mg de proteína) foi determinada a partir de dados obtidos da FAL correlacionados com os resultados da proteína total. CTMs diferenciadas de ratas AD obtiveram crescente aumento da FAL no decorrer dos dias experimentais analisados.

Quando analisado o 7º dia experimental, foi possível constatar aumento significativo da FAL nos grupos de CTMs diferenciadas de ratas AD quando comparadas aos grupos C, independente do condicionamento ao TF (Fig. 13A).

No 14º dia experimental, houve aumento significativo da FAL no grupo SED, quando comparados aos grupos C e ao grupo de CTMs diferenciadas de ratas condicionadas ao TF (Fig. 13A).

Quando analisado CTMs diferenciadas de ratas SEN (Fig. 13B), em todo período experimental analisado, a FAL foi constante e em menor concentração quando comparado ao grupo AD (Fig. 13A). Ainda foi possível constatar somente no 7º experimental, aumento significativo da FAL em ambos os grupos de CTMs diferenciadas das ratas SEN quando comparada ao grupo C (Fig. 13B).

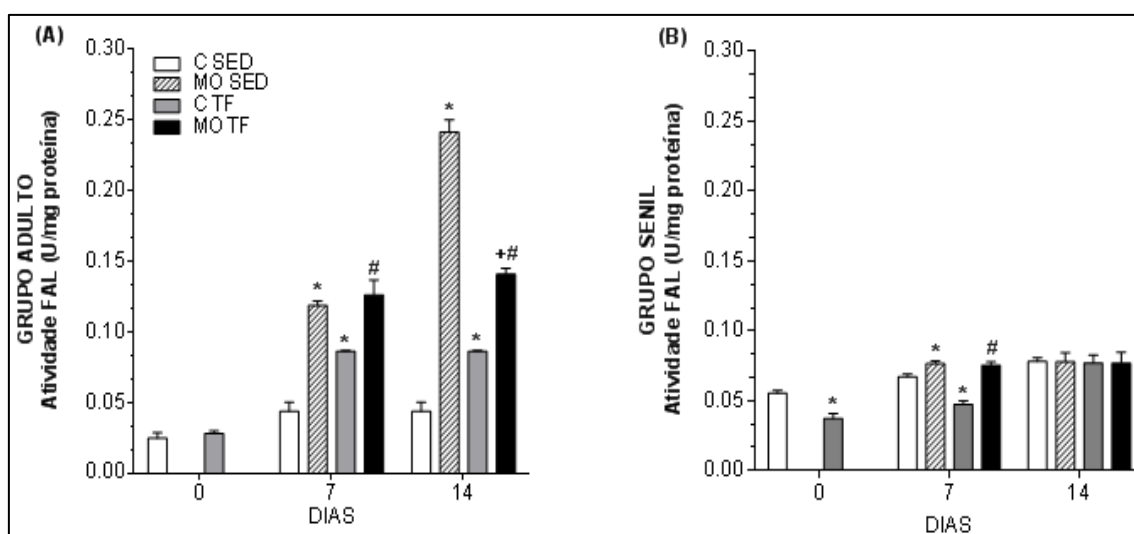


Figura 13. FAL (U/mg de proteína) realizada após 0, 7 e 14 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Abreviaturas: * $p < 0,05$ vs grupo C SED; + $p < 0,05$ vs grupo MO SED; # $p < 0,05$ vs grupo C TF.

4.4. Detecção e quantificação da mineralização biológica

A detecção da mineralização da matriz extracelular por meio da coloração com vermelho de Alizarina (*Alizarin Red*), que cora em vermelho, sítios de mineralização e a quantificação da mineralização biológica foram realizados nos grupos de CTMs de ratas AD (Fig. 14A) e SEN (Fig. 14B) após 21 dias de indução da diferenciação com MO.

CTMs diferenciadas apresentaram detecção da mineralização extracelular e quantificação da mineralização biológica significativamente maior quando comparadas aos grupos C de ambas as idades (Fig. 14A-B).

Na detecção de mineralização da matriz extracelular foi possível verificar aumento da coloração vermelha nos grupos MO TF de ambas as ratas AD e SEN quando comparadas com os grupos MO SED.

Os grupos MO TF de ambas as idades também tiveram maiores valores estatísticos na quantificação da mineralização biológica, uma vez que em CTMs diferenciadas de grupos de ratas AD TF ($1,517 \pm 0,112$) obtiveram mineralização biológica de 42% a mais do que o grupo SED ($0,888 \pm 0,009$) (Fig. 14A). E o grupo de ratas SEN TF ($1,374 \pm 0,033$), apresentaram mineralização biológica de 21% a mais do que o grupo SED ($1,088 \pm 0,097$) (Fig. 14B).

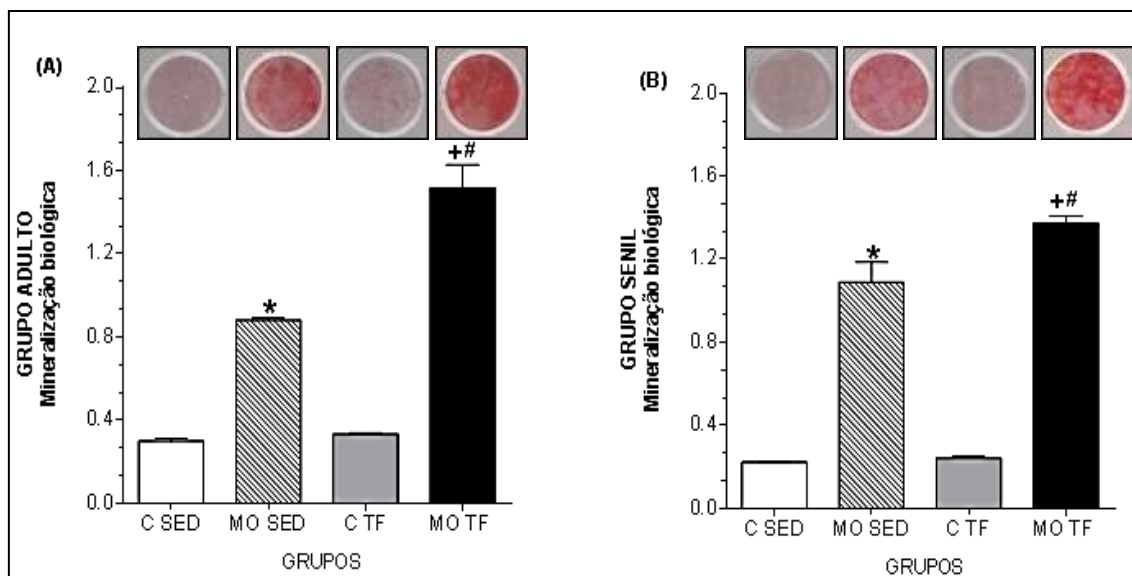


Figura 14. Detecção da mineralização da matriz extracelular por meio da coloração com vermelho de alizarina e quantificação da mineralização biológica realizada após 21 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD (A) e SEN (B) para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Imagens obtidas por sistema de câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz invertida. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Abreviaturas: * $p < 0,05$ vs grupo C SED; + $p < 0,05$ vs grupo MO SED; # $p < 0,05$ vs grupo C TF.

4.5. Detecção adipogênica

Na coloração com *Oil Red O*, vesículas intracelulares de lipídios em adipócitos maduros são coradas em vermelho enquanto os núcleos são corados em azul violeta. Nesta análise realizada em CTMs de ratas AD e SEN no 21º dia experimental, foi possível detectar presença de adipócitos em ambas as idades nos grupos MO SED e MO ST (Fig. 15).

DETECÇÃO ADIPOGÊNICA

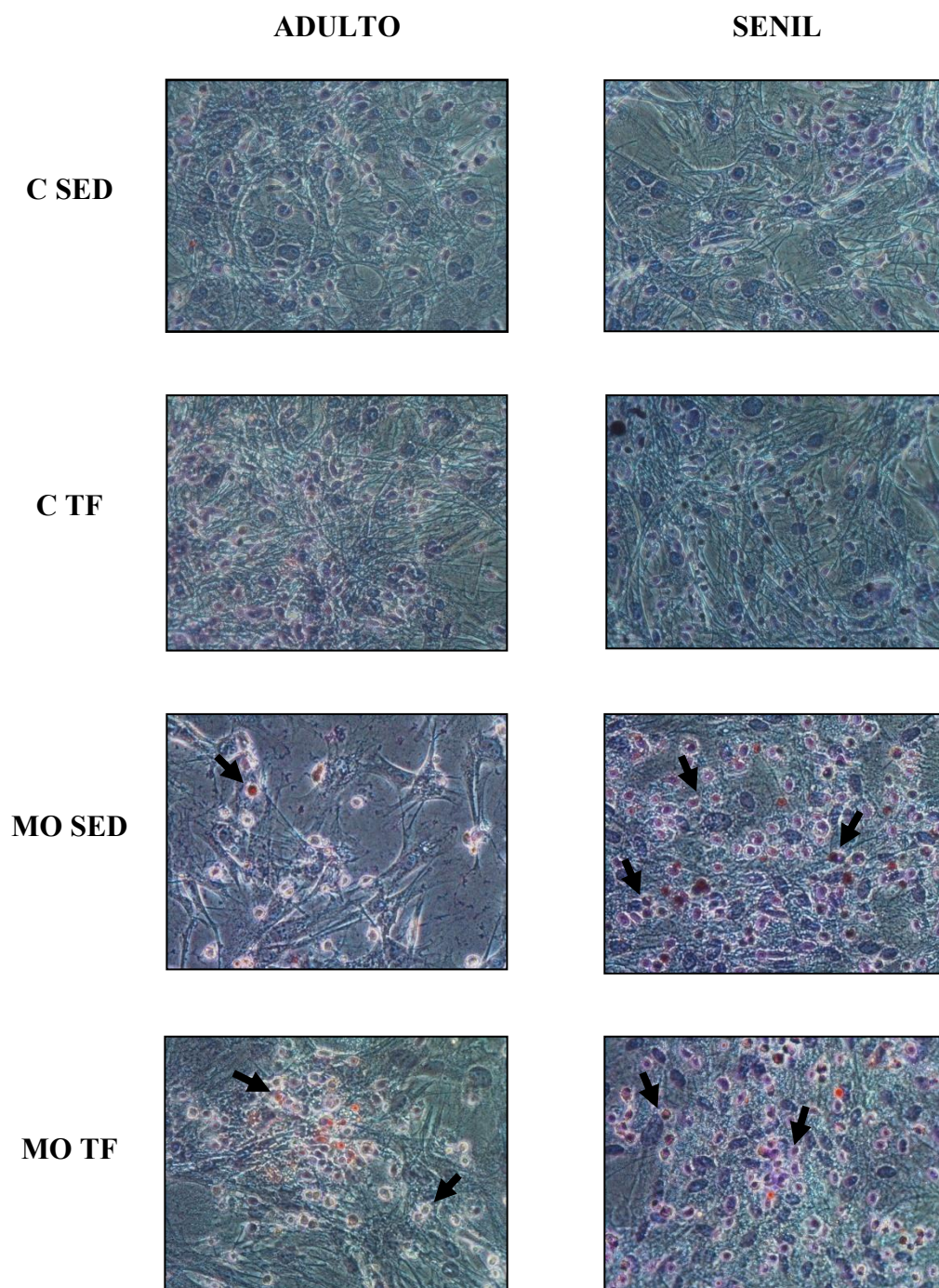


Figura 15. Detecção adipogênica por meio da coloração com *Oil Red O* realizada após 21 dias de indução da diferenciação com MO dos grupos de CTMs de ratas AD e SEN para os grupos experimentais C SED, MO SED, C TF e MO TF. Imagens obtidas por sistema de câmera digital acoplada ao microscópio óptico de luz invertida. Obj. 30x.

4.6. Expressão gênica de fatores de transcrição

Diversos fatores podem modular a expressão de marcadores osteoblásticos específicos, destacando o TF por gerar integração de diferentes vias de sinalização resultando na diferenciação de CTMs na linhagem osteoprogenitora e amadurecimento osteoblástico.

Foi demonstrado nas análises quantitativas por *Real Time* PCR marcadores tais como *Catnb* e *Runx2*, possuindo nível de expressão estatisticamente maior nos grupos de CTMs diferenciadas de ratas AD (Fig. 16A-C) e SEN (Fig. 16B-D).

CTMs diferenciadas de ratas SEN condicionadas ao TF possuíram quantificações para *Catnb* menores quando comparado ao grupo SED (Fig. 16B). Já, as quantificações para *Runx2*, CTMs diferenciadas de ratas SEN condicionadas ao TF apresentaram-se estatisticamente maior quando comparado ao grupo SED (Fig. 16D). Além disso, CTMs diferenciadas de ratas SEN (Fig. 16B-D) também possuíram maiores níveis de expressão gênica para *Catnb* e *Runx2* quando comparada ao grupo AD (Fig. 16A-C).

Também foi demonstrado na análise por *Real Time* PCR, *Ppar γ* possuindo nível de expressão de RNAm relativo significativamente maior para o grupo MO TF de CTMs de ratas AD (Fig. 16E) e entre o grupo MO SED de ratas ELD (Fig. 16F).

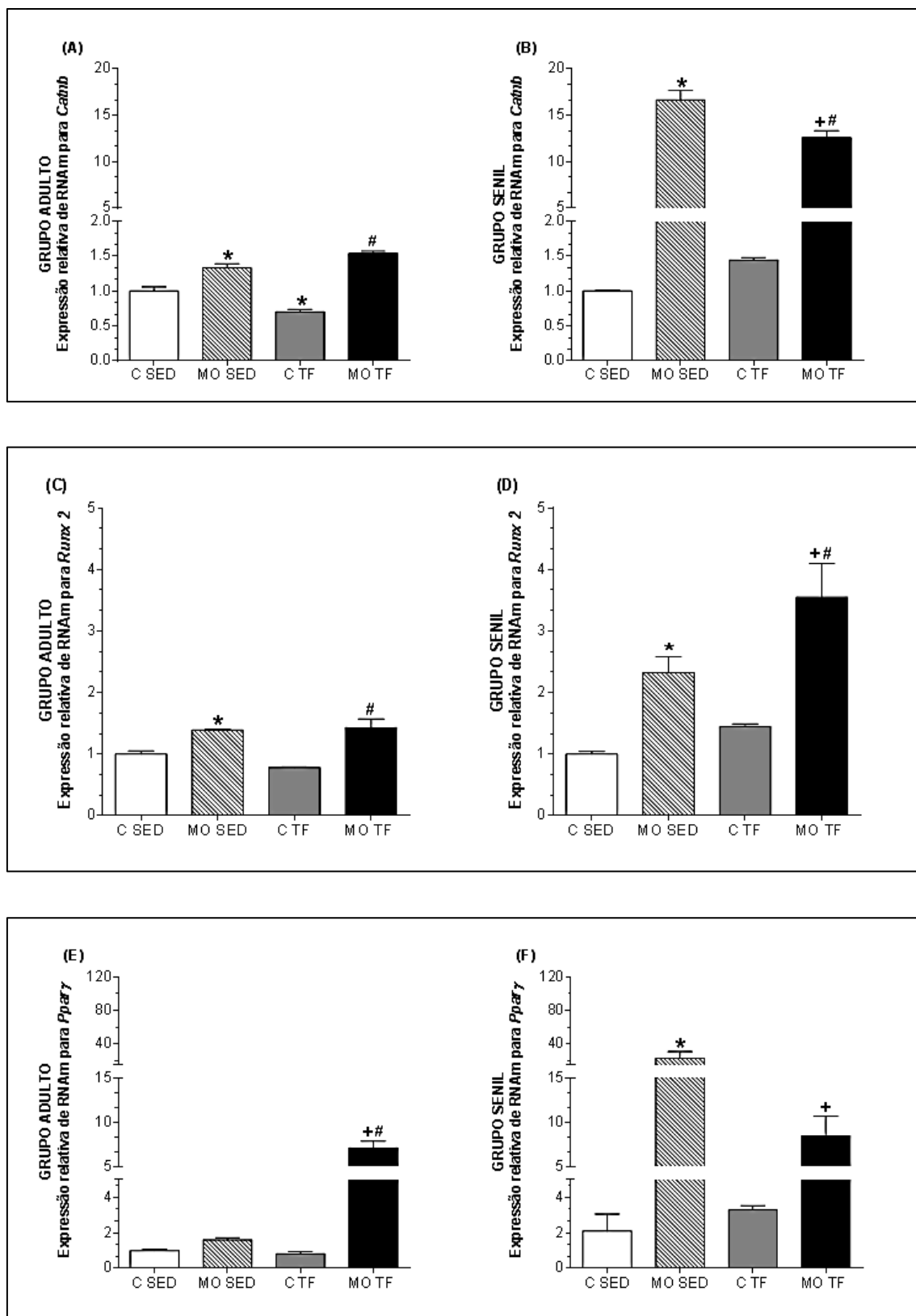


Figura 16. Análises por *Real Time* PCR de marcadores de expressão gênica realizadas após 14 dias de indução da diferenciação com MO, para fatores de transcrição tais como (A; B) *Catnb*, (C; D), *Runx2* e (E; F) *Pparγ* de ratas AD e SEN, para os grupos experimentais C SED, MO

SED, C TF e MO TF. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Abreviaturas: *p < 0,05 vs grupo C SED; +p < 0,05 vs grupo MO SED; #p < 0,05 vs grupo C TF.

4.7. Expressão gênica de marcadores de proteína não colagenosas da matriz óssea

Foram analisadas quantitativamente por *Real Time* PCR no 14º dia experimental expressões de genes marcadores de proteínas não colagenosas da matriz óssea tais como *BMP2* que demonstraram estatisticamente maiores nos grupos de CTMs diferenciadas quando comparados aos grupos C e ainda, significativamente e maiores nos grupos de CTMs diferenciadas de animais condicionados ao TF quando comparados aos grupos MO SED tanto de ratas AD (Fig. 17A) como de ratas SEN (Fig. 17B). Nível de expressão de RNAm relativo para *Opn* mostrou diferença significativa entre os grupos CTMs diferenciadas de ratas AD (Fig. 17C) e SEN (Fig. 17D) quando comparado com os grupos C. Ainda foi possível verificar aumento significativo da expressão de RNAm para *Opn* em CTMs diferenciadas dos doadoras AD condicionadas ao TF em relação ao grupo SED (Fig. 17C). Além disso foi possível identificar quantitativamente maior expressão gênica em CTMs de ratas SEN quando comparadas com as ratas AD (Fig. 17C-D). As expressões relativas de RNAm para *Ocn* também mostraram diferenças significante entre os grupos osteogênicos tanto de ratas AD (Fig. 17E) como de ratas SEN (Fig. 17F) versus os grupos C e ainda, nas CTMs diferenciadas de ambas as idades das doadoras SED obtiveram maiores expressões quando comparadas aos grupos condicionados ao TF (Fig. 17E-F).

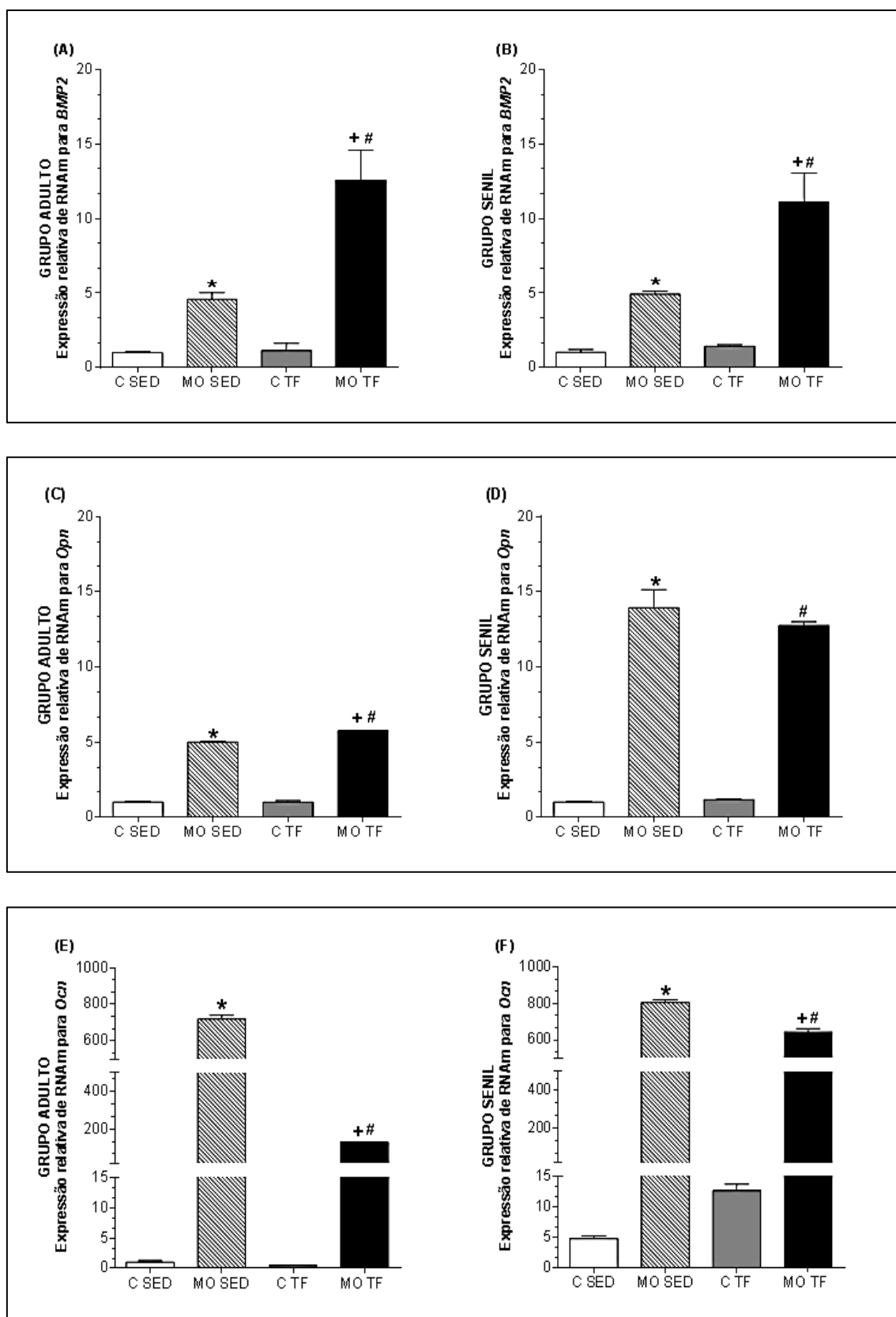


Figura 17. Análises por *Real Time* PCR de marcadores de expressão gênica realizadas após 14 dias de indução da diferenciação com MO, para proteínas não colagenosas da matriz óssea tais como (A; B) *BMP2*, (C; D), *Opn* e (E; F) *Ocn* de ratas AD e SEN, para os grupos experimentais

C SED, MO SED, C TF e MO TF. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EPM. Abreviaturas: *p < 0,05 vs grupo C SED; +p < 0,05 vs grupo MO SED; #p < 0,05 vs grupo C TF.

4.8. Análise da qualidade do tecido ósseo através da densitometria óssea e ensaio mecânico

Densidade mineral óssea areal (DMOa) foi menor no grupo de ratas SEN SED quando comparadas com o grupo de ratas AD SED (Tabela 1). No entanto, o CMO e DMOa foram significativamente maiores nos grupos de ratas condicionadas a TF de ambas as idades em comparação com grupos de ratas SED. Além disso, análises biomecânicas tais como tensão de ruptura óssea, rigidez extrínseca, tenacidade e resiliência (Tabela 1) também possuíram valores médios superiores nos grupos de ratas condicionadas a TF versus os grupos SED. O grupo de ratas SEN submetidas ao TF apresentaram parâmetros de resistência óssea, compatíveis com os animais AD (Tabela 1).

TABELA 1. Densitometria Óssea e Ensaio Mecânico

	GRUPO			
	AD SED	AD TF	SEN SED	SEN TF
DMO a (g/cm²)	0,130 $\pm$ 0,002	0,152 $\pm$ 0,003*	0,118 $\pm$ 0,002*	0,152 $\pm$ 0,003 [#]
CMO (g)	0,194 $\pm$ 0,004	0,213 $\pm$ 0,006*	0,181 $\pm$ 0,004	0,215 $\pm$ 0,005 [#]
Tensão de ruptura (N)	87,67 $\pm$ 3,701	107,6 $\pm$ 2,449*	85,10 $\pm$ 2,272	105,0 $\pm$ 1,816 [#]
Rigidez extrínseca (N/mm)	190,7 $\pm$ 6,024	223,4 $\pm$ 9,059*	190,9 $\pm$ 7,848	237,6 $\pm$ 6,538 [#]
Tenacidade (mJ)	39,86 $\pm$ 2,124	55,66 $\pm$ 1,686*	44,46 $\pm$ 2,163	59,57 $\pm$ 2,750 [#]
Resiliência (mJ)	27,15 $\pm$ 1,273	32,70 $\pm$ 0,932*	27,11 $\pm$ 1,228	36,34 $\pm$ 2,008 [#]

Tabela 1. Análise da qualidade do tecido ósseo obtida por meio da avaliação da densitometria óssea e ensaio mecânico dos grupos de ratas AD e SEN. Os valores foram apresentados como média $\pm$ EMP. Abreviações: *p < 0,05 vs grupo AD SED; [#]p < 0,05 vs grupo SEN SED.

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Nossos resultados evidenciaram aumento na expressão de *Runx2* e *BMP2* nas CTMs diferenciadas de doadoras SEN que realizaram TF, bem como diminuição da expressão de *Pparγ* e aumento na mineralização biológica. Estes resultados contribuem para a compreensão de como o TF atua e propicia a qualidade óssea em idosas treinadas.

Para caracterizar a diferenciação de células osteoblásticas provindas de CTMs de ratas doadoras AD e SEN, utilizamos parâmetros como a FAL (U/mg de proteína), expressão de fatores de transcrição, de proteínas não colagenosas da matriz e mineralização biológica. Parâmetros estes, amplamente utilizados por outros autores (ISHIDA; HEERSCHKE, 1997; JAISWAL *et al.*, 2000; MOIOLI *et al.*, 2007). Além disso, estudo realizado em humanos com idade entre 14 e 79 anos demonstrou a expressão gênica das células do estroma da medula óssea caracterizada por diversos marcadores de diferenciação citando-se *Runx2* para osteoblastos e *Pparγ* para adipócitos (JIANG *et al.*, 2008). Destacamos também a correlação da expressão de proteínas não colagenosas tais como *Opn* e *Ocn* e a mineralização da matriz extracelular no processo da osteoblastogênese (ARONOW *et al.*, 1990; BELLOWS *et al.*, 1999; COWLES *et al.*, 1998).

As CTMs e precursores de osteoblastos são altamente sensíveis a estímulo mecânico (DELAINE-SMITH; REILLY, 2012), pois quando submetidas a esta estimulação demonstram aumento do potencial intrínseco para proliferação celular bem como maior diferenciação de células osteoprogenitoras em osteoblastos com consequente produção de matriz mineralizada, *in vivo* e *in vitro* (MAUNEY *et al.*, 2004; HELL *et al.*, 2012; TURNER *et al.*, 1998). *In vitro*, forças mecânicas de tensão a tração

e de cisalhamento de fluídos parecem estar associados ao aumento da osteogênese e inibição da adipogênese (DELAINE-SMITH; REILLY, 2012), reproduzindo efeitos biológicos referentes *in vivo* tal como exercício físico de maior sobrecarga (TURNER; ROBLING, 2003). Além disso, em outros estudos realizados com CTMs de humanos e de ratos demonstraram que a tensão mecânica aplicada *in vitro* foi suficientemente capaz de estimular a proliferação, a expressão de marcadores fenotípicos de células osteoblásticas, a diferenciação osteogênica e a deposição de matriz extracelular mesmo com ausência de indutores osteogênicos ou sob condições de cultura de adipócitos (KREKE *et al.*, 2005; SEN *et al.*, 2009; WARD *et al.*, 2007). Nesse estudo verificamos aumento na taxa de proliferação celular e proteína total em CTMs e CTMs diferenciadas de ratas AD condicionadas ao TF. No entanto, CTMs diferenciadas de doadoras SEN mostraram diminuição na taxa de proliferação celular, possivelmente devido às células apresentarem declínio da capacidade proliferativa e diminuição da diferenciação osteogênica decorrentes de mudanças relacionadas à idade no microambiente ósseo (CASTILLO *et al.*, 2014; MOERMAN *et al.*, 2004; PRZYBILLA *et al.*, 2014).

Análises *in vitro* evidenciaram que durante o processo de diferenciação, os osteoblastos sintetizam componentes da matriz óssea e indicadores bioquímicos da formação óssea (DELGADO-CALLE *et al.*, 2011). Entretanto, a síntese destes componentes pode ser alterada em decorrência da deficiência hormonal, envelhecimento e inatividade física. Entre os fatores envolvidos para essa alteração, é destacada a ação do E₂ e sua modulação no processo de diferenciação osteogênica, através dos receptores esteroidais presentes em células osteoprogenitoras (QU *et al.*, 1998; ZHOU *et al.*, 2001; BALLA *et al.*, 2008). Dados estes, evidenciados no presente estudo onde CTMs diferenciadas de doadoras SEN apresentaram FAL (U/mg de proteína) constante e ausência do aumento da concentração durante os dias experimentais analisados,

possivelmente por possuir influência do envelhecimento (BALLA *et al.*, 2008), o que difere dos resultados obtidos de CTMs diferenciadas de doadores AD. Além disso, sob tais condições como o envelhecimento e osteoporose, processos inflamatórios decorrentes da reparação óssea propiciam o aumento de produtos de diversas reações metabólicas, especialmente aqueles catalisados pela família de enzimas pirofosfatase/fosfodiesterase, entre outras geradoras de PO_4^{3-} , consistindo em fator determinante da mineralização por mecanismos independentes da FAL (FERREIRA *et al.*, 2013).

As alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônadas geram efeitos anabólicos diretos e indiretos sob o metabolismo ósseo promovendo aumento da formação de matriz óssea (COMPSTON, 2001). Estudos realizados em nosso laboratório com ratas idosas exibindo ciclo estral irregular evidenciaram concentrações esteroidais mais elevadas (75 pg/mL) em comparação com o período de aciclicidade (9,3 pg/mL), indicando que durante o processo do envelhecimento há biossíntese de hormônios esteroides gonadais e modulação em prol a formação óssea no processo de remodelação óssea. Portanto, sob a influência do exercício físico com maior sobrecarga, as CTMs diferenciadas de doadoras SEN que exibiam ciclo estral irregular, possuíram formação óssea quantitativamente superior quando comparado o grupo C e próximas de doadoras AD, evidenciando a modulação do TF sob a osteoblastogênese e formação óssea.

A sinalização Wnt promove ampla variedade de respostas, dependente ou independentemente da β -Catenina incluindo regulação da proliferação e sobrevivência celular, remodelamento do citoesqueleto participando da polaridade e motilidade celular (ALMEIDA *et al.*, 2009). A via de sinalização canônica Wnt em células mesenquimais é fundamental para a diferenciação de células progenitoras ósseas em osteoblastos devido alterar a distribuição intracelular de β -Catenina, favorecendo a ativação de

fatores de transcrição cruciais para osteoblastogênese como Runx2, e ainda importante via de sinalização pelo qual o exercício físico pode modular a formação óssea (ALMEIDA *et al.*, 2009; BU *et al.*, 2012). A estimulação mecânica, deste modo, modula a diferenciação osteogênica de CTMs em prol a formação óssea por efeito associado à preservação das concentrações intracelulares de β -Catenina resultantes da diminuição na expressão de reguladores negativos da via Wnt, tais como Sost (Figura 18) (BOSKEY; COLEMAN, 2010; SEN *et al.*, 2009).

De fato, o aumento intracelular de β -Catenina ocorre instantes após aplicação de sinais mecânicos, decorrentes da inativação de GSK-3 β , permitindo sua ação genômica na seleção precoce da linhagem de CTMs a osteoblastogênese e regulação da expressão de genes importantes em prol dos osteoblastos (SEN *et al.*, 2009; SPATZ *et al.*, 2013; OZCIVICI *et al.*, 2010). Sendo assim, no grupo de CTMs diferenciadas de doadoras SEN condicionadas ao TF, a expressão de *Canthb*, marcador de estágios iniciais de diferenciação osteogênica e importante regulador da adipogênese (SEN *et al.*, 2009), foi diminuída quando comparado ao grupo MO SED. *Runx2*, marcador dos processos intermediários e finais da diferenciação osteogênica influenciando síntese de marcadores de proteína de matriz, foi aumentada no grupo de CTMs diferenciadas de doadoras condicionadas ao TF quando comparado ao grupo MO SED. Estes resultados sugerem que o TF promoveu a antecipação temporal no processo de diferenciação das CTMs de doadoras SEN promovendo a melhoria na deposição mineral, no final do processo de diferenciação, visto que ambos marcadores são expressos em períodos específicos durante o processo de diferenciação osteogênica (MOERMAN *et al.*, 2004; PRZYBILLA *et al.*, 2014). Porém, devido o declínio funcional do microambiente celular, cultura de CTMs de doadores SEN pareceram exibir atraso na expressão de genes determinantes em prol da formação óssea quando comparadas ao grupo AD,

indicando que o processo de diferenciação e expressão gênica das mesmas, já haviam ocorrido.

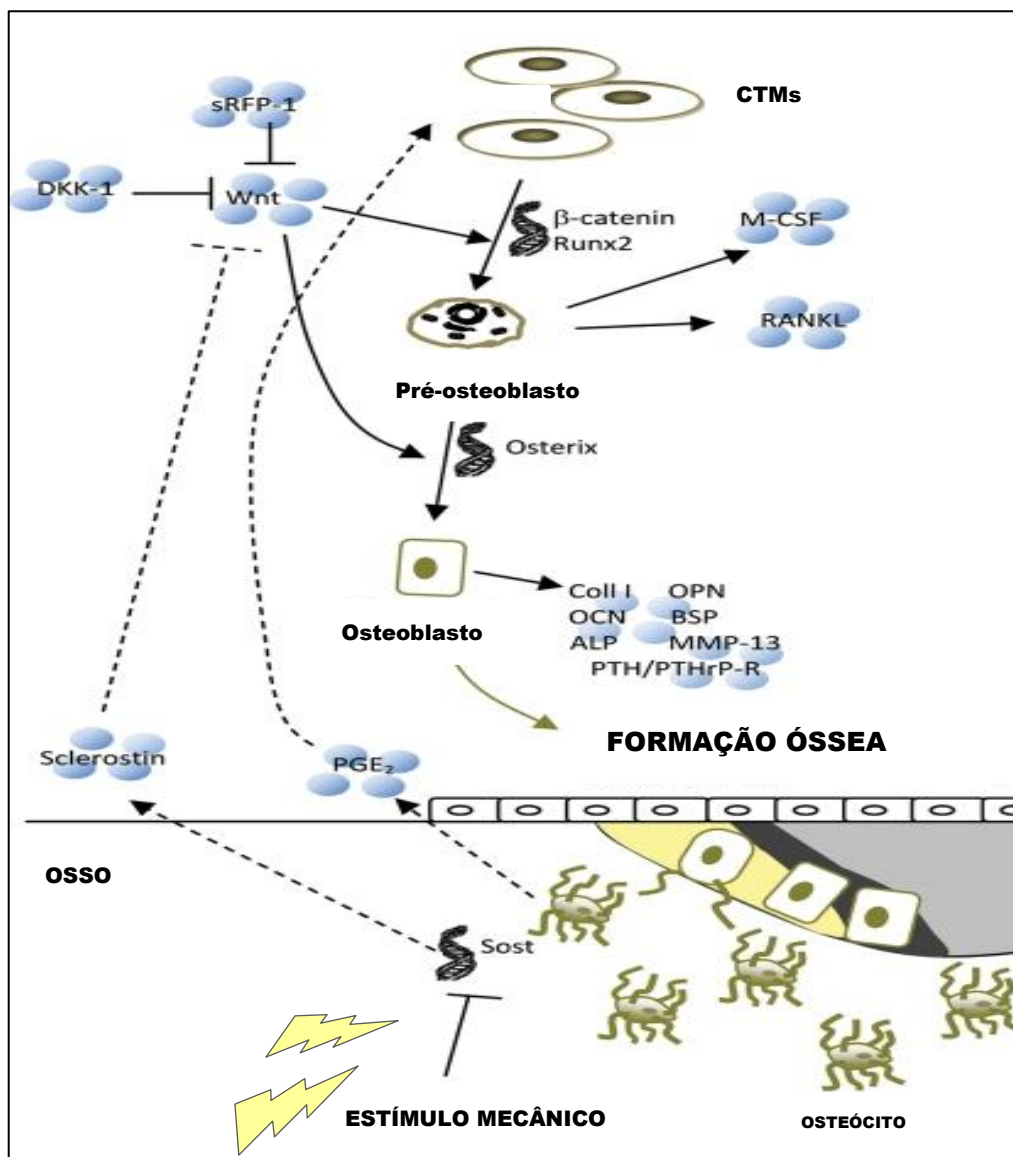


Figura 18. Imagem ilustrativa modificada de fatores que participam das vias de formação óssea. Estímulo mecânico externo promove a diminuição da expressão gênica de Sost, resultando na ativação da via de sinalização canônica Wnt regulando a expressão de genes importantes para a proliferação, diferenciação e comprometimento de CTMs em prol dos osteoblastos. (BOSKEY; COLEMAN, 2010).

Fatores como o sedentarismo e senescência influenciam na diferenciação de CTMs para linhagem osteogênica, sendo a medula óssea gradualmente substituída por gordura (MOERMAN *et al.*, 2004). O maior compromisso de CTMs na promoção osteoblastogênica por possível supressão da linhagem adipogênica pode ser confirmado pela alteração na detecção adipogênica evidenciado pela presença de vesículas intracelulares de lipídios e adipócitos maduros entre os diferentes grupos. Além disso, a expressão de RNAm para *Ppar γ* foi reduzida no grupo de CTMs de ratas SEN condicionadas ao TF e elevada no mesmo grupo de doadoras AD. Adipócitos na medula em organismos jovens parecem estar envolvidos no metabolismo energético a nível local, de modo a fornecer energia para o metabolismo ósseo ou para otimizar a temperatura local (HARDOUIN *et al.*, 2014). Corroborando assim, com os dados mencionados, visto que as ratas AD submetidas ao TF foram capazes de suportar carga de 40,3% a mais do peso corporal, sendo 11,97% a mais de sobrecarga, quando comparada com o grupo SEN, demonstrando maior atividade metabólica óssea do grupo AD.

A formação óssea também é regulada pelas BMPs, com atuação importante no recrutamento, proliferação e diferenciação das CTMs para linhagem osteoprogenitora, bem como na expressão de genes marcadores de fenótipo osteoblástico, além de serem encontradas em grandes quantidades na matriz óssea (OCARINO *et al.*, 2008). Diversos estudos indicam que BMPs modulam a diferenciação osteogênica por regular a expressão de fatores de transcrição cruciais em prol a osteoblastogênese tal como Runx2 e suprimir a expressão de fatores de transcrição em prol da adipogênese, *Ppar γ* (LEE *et al.*, 2010; LIU *et al.*, 2013; OCARINO *et al.*, 2008). BMP2 são modulados positivamente em resposta à tensão mecânica por *down-regulation* à expressão gênica de Sost e o produto proteico esclerotina (VAN BEZOOIJEN *et al.*, 2007). Ambos, sob

condições de inatividade física possuem a capacidade de inibir a produção e a atividade das BMPs por antagonizar a via de sinalização Wnt em CTMs e osteoblastos resultando em maior propensão adipogênica e comprometimento da massa óssea (LEE *et al.*, 2010; YOUNG *et al.*, 2010). Nesse estudo verificamos aumento significativo da expressão relativa de *BMP2* em CTMs diferenciadas nos grupos condicionados ao TF semelhantes em ambas as idades, o que nos demonstra a crucial atuação do exercício físico no metabolismo ósseo em organismos senis.

Proteínas não colagenosas são produzidas por osteoblastos e a determinação da sua função é determinante para a formação, mineralização e reabsorção óssea, modulando de forma positiva e negativa o processo de mineralização óssea. Além disso, a composição de mesma região óssea apresenta arranjos de proteínas de matriz não colagenosas distintas, sugerindo que o destino temporal das proteínas não colagenosas é variável no decorrer do processo de remodelação óssea (ROACH, 1994; RODRIGUEZ *et al.*, 2014). Está evidenciado que *Opn* é necessária para o início da formação de cristais e pode impedir a precipitação prematura de cristais de fosfato de cálcio que não possuem a estrutura bem coordenada de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ROACH, 1994). Nossos resultados sugerem modulação positiva do TF na expressão de *Opn* em CTMs diferenciadas de ratas AD e SEN, confirmado também pelos dados obtidos na mineralização biológica. Outras proteínas, tal como a *Ocn* atua como quimio-atrativo para o recrutamento e diferenciação de células progenitoras de osteoclastos, regulando o crescimento e o tamanho dos cristais de $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e, portanto, a quantidade de depósito mineral (ROACH, 1994). Dados obtidos neste estudo, em ambas as idades, no entanto, com menor intensidade nos organismos SEN, o TF pareceu regular negativamente a expressão *Ocn*, possivelmente como mecanismo regulador do

recrutamento e diferenciação de células progenitoras de osteoclastos, resultando em força e melhora da qualidade óssea.

A tensão mecânica aplicada no osso, decorrente do exercício físico, favorece fatores importantes na determinação da qualidade óssea (MOSTI *et al.*, 2013; RENNO *et al.*, 2007). Entre esses fatores, destacamos a cascata de sinalização celular decorrente da criação de gradiente do fluido canicular no osso, gerando aumento na concentração intracelular de cálcio, expressão de fatores de crescimento, aumento da osteogênese e produção da matriz óssea proporcionando melhor qualidade óssea (GIANOUDIS *et al.*, 2014; TURNER; ROBLING, 2003).

A idade avançada representa fator de risco para o declínio da massa e força óssea. Estas alterações na formação óssea são atribuídos a redução de osteoblastos (MANOLAGAS, 2000) e ao aumento da adiposidade da medula (ALMEIDA *et al.*, 2009), com consequente redução da DMOa (LIDA; FUKUDA, 2002). Portanto, esses estudos definem como ocorre a diminuição da massa óssea associada com a senescência e o desenvolvimento de osteopatias. Nosso estudo evidenciou como o TF atua e evita o declínio relacionado com a idade propiciando aumento significativo na DMOa, CMO e propriedades biomecânicas, determinando benefícios importantes na qualidade óssea tanto de ratas AD e como SEN.

CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

Embora a literatura evidencie efeitos benéficos da atividade física ao tecido ósseo e no organismo como um todo, ainda são necessárias elucidações quanto as implicações sobre o metabolismo ósseo no processo do envelhecimento e a fisiopatogenia da osteoporose.

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o TF pode modular processos tais como a proliferação, a diferenciação e a regulação positiva de genes marcadores de expressão do fenótipo osteoblástico tal como *Runx2* possivelmente por atuar direta ou indiretamente sob a via de sinalização osteoblastogênica otimizando a expressão e atuação da *BMP2* sob a diferenciação osteogênica em prol a formação óssea ao mesmo tempo em que suprime a adipogênese por diminuir a expressão de *Ppar γ* favorecendo maior compromisso de CTMs do estroma da medula óssea em osteoblastos. Além disso, o TF otimizou a promoção do processo de mineralização biológica *in vitro* e melhorou a qualidade óssea *in vivo* de ratas SEN osteopênicas tornando-as responsivamente semelhantes a de ratas AD.

Deste modo, podemos concluir que a realização do TF durante o período de envelhecimento contribui para a melhoria da qualidade óssea de idosas ativas. Portanto, o TF é alternativa terapêutica adequada para a prevenção bem como tratamento de indivíduos osteopênicos/osteoporóticos, principalmente daqueles que possuem restrição com a reposição hormonal.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AHRARI, I. et al. Adipose tissue derived multipotent mesenchymal stromal cells can be isolated using serum-free media. **Iran. Red Crescent Med. J.**, v. 15, n. 4, p. 324-329, Apr. 2013.

ALMEIDA, M. et al. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 40, p. 27438-27448, Oct. 2009.

AMADEI, S.U. et al. A influência da deficiência estrogênica no processo de remodelação e reparação óssea. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 42, n. 1, p. 5-12, Fev. 2006.

AN, J. H. et al. Changes of microRNA profile and microRNA-mRNA regulatory network in bones of ovariectomized mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 29, n. 3, p. 644-656, Mar. 2014.

ARONOW, M. A. et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 143, n. 2, p. 213-21, May. 1990.

ARTSI, H. et al. The Sirtuin1 Activator SRT3025 Down-regulates Sclerostin and Rescues Ovariectomy-Induced Bone Loss and Biomechanical Deterioration in Female Mice. **Endocrinology**, p. 20141334, Jun. 2014.

BALLA, B. et al. Different gene expression patterns in the bone tissue of aging postmenopausal osteoporotic and non-osteoporotic women. **Calcif. Tissue Int.**, v. 82, n. 1, p. 12-26, Jan. 2008.

BELLOWS, C. G.; REIMERS, S. M.; HEERSCHKE, J. N. Expression of mRNAs for type-I collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. **Cell Tissue Res.**, v. 297, n. 2, p. 249-259, Aug. 1999.

BOSKEY, A. L.; COLEMAN, R. Aging and bone. **J. Dent. Res.**, v. 89, n. 12, p. 1333-1348, Dec. 2010.

BU, S. et al. Treadmill training regulates β -catenin signaling through phosphorylation of GSK-3 β in lumbar vertebrae of ovariectomized rats. **Eur. J. Appl. Physiol.**, v. 112, n. 9, p. 3295-3304, Sep. 2012.

CASTILLO, A. B. et al. Estrogen receptor- β regulates mechanical signaling in primary osteoblasts. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 306, n. 8, p. E937-E944, Apr. 2014.

CHRISTENSON, E. S. et al. Osteoporosis management in post-menopausal women. **Minerva Ginecol.**, v. 64, n. 3, p. 181-194, Jun. 2012.

COMPSTON, J. E. Sex steroids and bone. **Physiol. Rev.**, v. 81, n. 1, p. 419-447, Jan. 2001.

COOPER, C. et al. Secular trends in the incidence of hip and other osteoporotic fractures. **Osteoporos Int.**, v. 22, n. 5, p. 1277-1288, May 2011.

COWLES, E. A. et al. Mineralization and the expression of matrix proteins during in vivo bone development. **Calcif. Tissue Int.**, v. 62, n. 1, p. 74-82, Jan. 1998.

DATTA, H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v. 61, n. 5, p. 577-587, May 2008.

DAVID, V. et al. Mechanical loading down-regulates peroxisome proliferator-activated receptor gamma in bone marrow stromal cells and favors osteoblastogenesis at the expense of adipogenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 5, p. 2553-2562, May 2007.

DELAINE-SMITH, R. M.; REILLY, G. C. Mesenchymal stem cell responses to mechanical stimuli. **Muscles Ligaments Tendons J.**, v. 2, n. 3, p. 169-180, Jul. 2012.

DELGADO-CALLE, J. et al. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. **Bone**, v. 49, n. 4, p. 830-838, Oct. 2011.

ENSRUD, K. E. Epidemiology of fracture risk with advancing age. **J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.**, v. 68, n. 10, p. 1236-1242, Oct. 2013.

ESHRE CAPRI WORKSHOP GROUP. Bone fractures after menopause. **Hum. Reprod. Update**, v. 16, n. 6, p. 761-773, Nov./Dec. 2010.

EVANS, H. M.; LONG, J. A. Characteristic effects upon growth, oestrus and ovulation induced by the intraperitoneal administration of fresh anterior hypophyseal substance. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 8, n. 3, p. 38-39, Mar. 1922.

FENG, X.; MCDONALD, J. M. Disorders of bone remodeling. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 6, p. 121-145, Jul. 2011.

FERREIRA, E. et al. Inflammatory cytokines induce a unique mineralizing phenotype in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. **J. Biol. Chem.**, v. 288, n. 41, p. 29494-26505, Oct. 2013.

GAMBACCIANI, M. Selective estrogen modulators in menopause. **Minerva Ginecol**, v. 65, n. 6, p. 621-630, Dec. 2013.

GAMBACCIANI, M.; LEVANCINI, M. Management of postmenopausal osteoporosis and the prevention of fractures. **Panminerva Med**, v. 56, n. 2, p. 115-131, Jun. 2014.

GIANOUDIS, J. et al. Effects of a targeted multimodal exercise program incorporating high-speed power training on falls and fracture risk factors in older adults: a community-based randomized controlled trial. **J. Bone Miner. Res.**, v. 29, n. 1, p. 182-191, Jan. 2014.

HAKEDA, Y. et al. Recent progress in studies on osteocytes--osteocytes and mechanical stress. **Kaibogaku Zasshi**, v. 75, n. 5, p. 451-456, Oct. 2000.

HARDOUIN, P.; PANSINI, V.; CORTET, B. Bone marrow fat. **Joint Bone Spine**, 2014.

HELL, R. C. et al. Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Acta Physiol.**, v. 205, n. 2, p. 292-301, Jun. 2012.

HORNBERGER, T. A.; FARRAR, R. P. Physiological hypertrophy of the FHL muscle following 8 weeks of progressive resistance exercise in the rat. **Can. J. Appl. Physiol.**, v. 29, n. 1, p. 16-31, Feb. 2004.

ISHIDA, Y.; HEERSCHE, J. N. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. **Bone**, v. 20, n. 1, p. 17-25, Jan. 1997.

JAISWAL, R. K. et al. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 13, p. 9645-9652, Mar. 2000.

JEON, Y. K. et al. Association between bone mineral density and metabolic syndrome in pre- and postmenopausal women. **Endocr. J.**, v. 58, n. 2, p. 87-93, 2011.

JIANG, Y. et al. Gene expression analysis of major lineage-defining factors in human bone marrow cells: effect of aging, gender, and age-related disorders. **J. Orthop. Res.**, v. 26, n. 7, p. 910-917, Jul. 2008.

KANIS, J. A. et al. The diagnosis of osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 9, n. 8, p. 1137-1141, Aug. 1994.

KINSELLA, K.; HE, W. **An aging world: 2008**. Washington, DC: U.S. Government Printing Office, 2009. Disponível em : <<http://www.census.gov/prod/2009pubs/p95-09-1.pdf>>. Acesso em: 25 jun. 2014.

KREKE, M. R.; HUCKLE, W. R.; GOLDSTEIN, A. S. Fluid flow stimulates expression of osteopontin and bone sialoprotein by bone marrow stromal cells in a temporally dependent manner. **Bone**, v. 36, n. 6, p. 1047-1055, Jun. 2005.

LEE, S. J. et al. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. **Biomaterials**, v. 31, n. 21, p. 5652-5659, Jul. 2010.

LEFEVRE, J.; MCCLINTOCK, M. K. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. **Biol. Reprod.**, v. 38, n. 4, p. 780-789, May. 1988.

LI, J. Y. et al. Ovariectomy expands murine short-term hemopoietic stem cell function through T cell expressed CD40L and Wnt10B. **Blood**, v. 122, n. 14, p. 2346-2357, Oct. 2013.

LIU, D. D. et al. TGF- β /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J. Cell. Biochem.**, v. 114, v. 5, p. 1105-1114, May 2013.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, n. 1, p. 265-275, Nov. 1951.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J.; MELCHER, A. H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. **Cell Tissue Res.**, v. 254, n. 2, p. 317-330, Nov. 1988.

MANOLAGAS, S. C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr. Rev.**, v. 21, n. 2, p. 115-137, Apr. 2000.

MARSHALL, D.; JOHNELL, O.; WEDEL, H. Meta-analysis of how well measures of bone mineral density predict occurrence of osteoporotic fractures. **BMJ**, v. 312, n. 7041, p. 1254-1259, May 1996.

MAUNEY, J. R. et al. Mechanical stimulation promotes osteogenic differentiation of human bone marrow stromal cells on 3-D partially demineralized bone scaffolds in vitro. **Calcif. Tissue Int.**, v. 74, n. 5, p. 458-468, May 2004.

MENKES, A. et al. Strength training increases regional bone mineral density and bone remodeling in middle-aged and older men. **J. Appl. Physiol.**, v. 74, n. 5, p. 2478-2484, May 1993.

MOERMAN, E. J. et al. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: the role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways. **Aging Cell**, v. 3, n. 6, p. 379-389, Dec. 2004.

MOIOLI, E. K.; HONG, L.; MAO, J. J. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Wound Repair Regen.**, v. 15, n. 3, p. 413-21, 2007 May-Jun. 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

MOSTI, M. P. et al. Maximal strength training in postmenopausal women with osteoporosis or osteopenia. **J. Strength. Cond. Res.**, v. 27, n. 10, p. 2879-2886, Oct. 2013.

NARDONE, V.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics (Sao Paulo)**, v. 69, n. 6, p. 438-446, Jun. 2014.

OCARINO, N. M. et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. **Nitric Oxide**, v. 19, n. 4, p. 320-325, Dec. 2008.

OWEN, M. Marrow stromal stem cells. **J. Cell Sci. Suppl.**, v. 10, p. 63-76, 1988.

OZCIVICI, E. et al. Mechanical signals as anabolic agents in bone. **Nat. Rev. Rheumatol.**, v. 6, n. 1, p. 50-59, Jan. 2010.

PATSCH, J. M. et al. Trabecular bone microstructure and local gene expression in iliac crest biopsies of men with idiopathic osteoporosis. **J. Bone Miner. Res.**, v. 26, n. 7, p. 1584-1592, Jul. 2011.

PRZYBILLA, J. et al. Understanding epigenetic changes in aging stem cells - a computational model approach. **Aging Cell**, v. 13, n. 2, p. 320-328, Apr. 2014.

QU, Q. et al. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. **Bone**, v. 22, n. 3, p. 201-209, Mar. 1998.

RENNO, A. C. et al. Effects of a progressive loading exercise program on the bone and skeletal muscle properties of female osteopenic rats. **Exp. Gerontol.**, v. 42, n. 6, p. 517-522, Jun. 2007.

ROACH, H. I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. **Cell. Biol. Int.**, v. 18, n. 6, p. 617-628, Jun. 1994.

RODRIGUEZ, D. E. et al. Multifunctional role of osteopontin in directing intrafibrillar mineralization of collagen and activation of osteoclasts. **Acta Biomater.**, v. 10, n. 1, p. 494-507, Jan. 2014.

ROY, A. V. Rapid method for determining alkaline phosphatase activity in serum with thymolphthalein monophosphate. **Clin. Chem.**, v. 16, n. 5, p. 431-436, May 1970.

SEN, B. et al. Mechanical loading regulates NFATc1 and beta-catenin signaling through a GSK3beta control node. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 50, p. 34607-34617, Dec. 2009.

SILVA, V. A.; VOLPON, J. B. Modelo de suspensão pela cauda e seu efeito em algumas propriedades mecânicas do osso do rato. **Acta Ortop. Bras.**, v. 12, n. 1, p. 22-31, Jan./Mar. 2004.

SPATZ, J. M. et al. Sclerostin antibody inhibits skeletal deterioration due to reduced mechanical loading. **J. Bone Miner. Res.**, v. 28, n. 4, p. 865-874, Apr. 2013.

TURNER, C. H.; BURR, D. B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. **Bone**, v. 14, n. 4, p. 595-608, 1993 Jul./Aug. 1993.

TURNER, C. H. et al. Recruitment and proliferative responses of osteoblasts after mechanical loading in vivo determined using sustained-release bromodeoxyuridine. **Bone**, v. 22, n. 5, p. 463-469, May 1998.

TURNER, C. H.; ROBLING, A. G. Designing exercise regimens to increase bone strength. **Exerc. Sport Sci. Rev.**, v. 31, n. 1, p. 45-50, Jan. 2003.

VAN BEZOOIJEN, R. L. et al. Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation. **J. Bone Miner. Res.**, v. 22, n. 1, p. 19-28, Jan. 2007.

ZHOU, S. et al. Estrogen modulates estrogen receptor alpha and beta expression, osteogenic activity, and apoptosis in mesenchymal stem cells (MSCs) of osteoporotic mice. **J. Cell. Biochem. Suppl.**, Suppl. 36, p. 144-155, 2001.

WANG, H. et al. Impairment of osteoblast differentiation due to proliferation-independent telomere dysfunction in mouse models of accelerated aging. **Aging Cell**, v. 11, n. 4, p. 704-713, Aug. 2012.

WARD, D. F. et al. Mechanical strain enhances extracellular matrix-induced gene focusing and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells through an extracellular-related kinase-dependent pathway. **Stem Cells Dev.**, v. 16, n. 3, p. 467-480, Jun. 2007.

WILLIAMS, B. O. Insights into the mechanisms of sclerostin action in regulating bone mass accrual. **J. Bone Miner. Res.**, v. 29, n. 1, p. 24-28, Jan. 2014.

YARROW, J. F. et al. A rehabilitation exercise program induces severe bone mineral deficits in estrogen-deficient rats after extended disuse. **Menopause**, v. 19, n. 11, p. 1267-1276, Nov. 2012.

YOUREK, G. et al. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Regen. Med.**, v. 5, n. 5, p. 713-724, Sep. 2010.

ANEXO

Parecer de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia do *Campus* de Araçatuba – UNESP



Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Análise da sinalização osteblastogênica de células estromais da medula óssea de ratas Wistar cíclicas e acíclicas" sob responsabilidade da Pesquisadora **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** e colaboração de Monique Patricio Singulani e Leandro Figueiredo dos Santos está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo **00462-2012**.

CERTIFICATE

We certify that the research "Analysis of signaling osteblastogenic of the bone marrow stromal cells of cyclic and acyclic female rats", process number **00462-2012**, under responsibility of **RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES** and with collaboration of Monique Patricio Singulani and Leandro Figueiredo dos Santos agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Edilson Exvolino
CEUA Vice-Coordenador

Faculdade de Odontologia e Faculdade de Medicina Veterinária - Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal - Rua Clóvis Pestana, 793 CEP 16050-680 Araçatuba - SP
Tel (18) 3636-1440 Fax (18) 3636-1403 E-mail: fabianocadioli@fmva.unesp.br