

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

LEANDRO FIGUEIREDO DOS SANTOS

**ATUAÇÃO DA OCITOCINA NO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO
OSTEOBLÁSTICA DE RATAS SENIS**

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

**ATUAÇÃO DA OCITOCINA NO PROCESSO DE DIFERENCIAÇÃO
OSTEOBLÁSTICA DE RATAS SENIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientado: Leandro Figueiredo dos Santos

Orientadora: Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles

ARAÇATUBA

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial 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

S237a Santos, Leandro Figueiredo dos.
Atuação da ocitocina no processo de diferenciação
osteoblástica de ratas senis / Leandro Figueiredo dos
Santos. - Araçatuba, 2014
84 f. : il. + 1 CD-ROM

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

1. Envelhecimento 2. Osteogênese 3. Ocitocina 4. Osso e ossos I. T.

CDD 612

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leandro Figueiredo dos Santos

“Atuação da ocitocina no processo de diferenciação osteoblástica de ratas senis”

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas.

Área de Concentração: Fisiologia

Orientadora: Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles

Aprovado em: 05/08/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. Rita Cássia Menegati Dornelles

Instituição: FOA/UNESP

Prof. Dr. Willian Fernando Zambuzzi

Instituição: IBB-Botucatu/UNESP

Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti

Instituição: FORP/USP

DADOS CURRICULARES

Nascimento: 27.12.1989, Guararapes - SP

Filiação: João Rodrigues dos Santos

Dilma Almira Machado de Figueiredo dos Santos

2007/2010: Curso de Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paulista – UNIP- Araçatuba – SP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, João e Dilma, por todo apoio, incentivo e sustentação de ideais, esclarecendo e guiando meus passos desde sempre. Dedico este trabalho aos dois, pelo exemplo de perseverança e espírito de luta que sempre me ensinaram e exemplificaram.

AGRADECIMENTOS

À UNESP – Universidade Estadual Paulista, pela oportunidade de realizar este curso.

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

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

À FUNDUNESP (Fundação para Desenvolvimento da UNESP) e a Pró-Reitoria de Pós-graduação da UNESP (PROPG-UNESP) pelo apoio financeiro durante as viagens para realização de disciplinas e conclusão dos experimentos.

À todos os funcionários da UNESP, que de acordo com suas funções, prestaram sua importante parcela de contribuição nos diferentes estágios de realização desta pesquisa.

A todos os funcionários da biblioteca da FOA, pela prontidão nos atendimentos e revisão bibliográfica.

À Prof^a Dr^a Sandra Helena Penha de Oliveira, pela valiosa colaboração tanto estrutural quanto intelectual para realização desta pesquisa.

Ao Prof^o Dr Antonio Hernades Chaves Neto, pela amizade, paciência e por toda prontidão e competência na elaboração desta pesquisa.

À Prof^a Dr^a Ana Cláudia de Melo Stevanato Nakamune, por sempre manter seu laboratório de portas abertas para execução de experimentos, por sua sensibilidade e dedicação em ensinar.

À mestranda Monique Patricio Singulani, pelo imensurável companheirismo e amizade no decorrer do mestrado, por toda contribuição e auxílio intelectual durante todas as etapas desta pesquisa.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia, Thamine, Victor, Dalise e demais, pela amizade e por toda contribuição e esclarecimentos durante os experimentos.

Aos amigos de laboratório Camila, Angela, Mayumi, Larissa, Samuel, Noelle e Wagner e a todos demais pela amizade, paciência e auxílio durante os experimentos.

Às novas amigadas que surgiram durante a realização do mestrado, que presenciaram muito das alegrias e dificuldades desse processo ao meu lado.

À minha orientadora Dr^a Rita Cássia Menegati Dornelles, acima de tudo pela paciência, pelo acolhimento e por todo suporte na conclusão desta pós-graduação.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte das novas descobertas aqui relatadas.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus pais, pelo alicerce que construíram em nossa família me possibilitando-me voos cada vez maiores na direção do conhecimento, meus eternos e sempre infindáveis agradecimentos.

A toda minha família, principalmente aqueles que acompanharam lado a lado todo esse processo como meu irmão Fernando, Tia Júlia e Milene. E especialmente as minhas duas avós, vó Cida e vó Nena, que desde sempre me ajudam nos conselhos e orações, meu muito obrigado.

Aos meus eternos companheiros da vida, Regiane e Fabiano, que pela amizade e irmandade, deram apoio desde o ingresso ao término deste curso.

A todos os amigos que sempre prestaram suporte, seja material ou moral, na execução deste trabalho, em especial ao Flávio pela prontidão frente a qualquer imprevisto em todas as fases desse mestrado.

A todos os companheiros do outro lado da vida, que sempre intuíram e me sustentaram no bem.

E sobretudo à Deus, por todas oportunidades de crescimento que coloca em meu caminho.

“Faça o necessário, depois o possível, e de repente, você estará fazendo o impossível”.

(Francisco de Assis)

RESUMO

SANTOS, LF. Atuação da ocitocina no processo de diferenciação osteoblástica de ratas senis. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

RESUMO

Ocitocina (OT) é hormônio peptídico sintetizado no hipotálamo e armazenado na neurohipófise. A literatura evidencia atuação anabólica da OT no esqueleto de animais jovens. Em nosso laboratório estamos realizando pesquisas para estudar a ação da OT no metabolismo ósseo, durante o envelhecimento. Analisamos inicialmente o processo de remodelação óssea alveolar em ratas com 24 meses e detectamos ação importante da OT na maior formação óssea nesses animais, o que não foi observado em animais com 12 meses. Esses resultados evidenciaram a necessidade de investigação da ação da OT, visando à compreensão dos mecanismos envolvidos na maior formação óssea em organismos senis, no período caracterizado pela aciclicidade estral (estropausa – 24 meses) comparado com organismos adultos com ciclo estral regular (12 meses). Nesse estudo foi avaliada a influência da idade (12 e 24 meses) e a ação da OT associada a indutores osteogênicos clássicos durante a diferenciação em linhagem osteogênica de células-tronco mesenquimais (CTMs) a partir do estroma da medula óssea de fêmures de ratas Wistar, com 12 e 24 meses. Quatro grupos de cada idade foram formados, sendo: MC (meio de crescimento); MO (meio de crescimento suplementado com indutores osteogênicos); MCO (meio de crescimento + OT); MOO (meio de crescimento suplementado com indutores osteogênicos + OT). O ensaio com vermelho de alizarina demonstrou mineralização biológica a partir do 17º dia no grupo com 12 meses em ambos os grupos osteogênicos (MO e MOO), porém a adição de OT (MOO) promoveu a mineralização a partir do 14º dia. No grupo de 24 meses não foi detectada mineralização em nenhum dia experimental no grupo MO, porém a adição de OT no meio (MOO) promoveu a mineralização a partir do 17º dia. As escalas de expressão gênica de *osterix*, *ocitocina* e *receptor de ocitocina* foram menores no grupo 24 meses que no grupo 12 meses, assim como as proteínas de matriz analisadas (*sialoproteína óssea*, *osteopontina* e *osteocalcina*) e esses genes foram mais expressos nos grupos tratados com OT, em ambas as idades, e o receptor de ocitocina apenas no grupo 12 meses. PGE₂ mostrou aumento no grupo MO em relação a MOO, em ambas as idades. Neste estudo demonstramos a ação anabólica da OT, estimulando células de animais, com esqueleto maduro, na antecipação (12 meses) e promoção (24 meses) do fenótipo mineralizante, evidenciando promessa de terapia para controle da osteoporose.

PALAVRAS CHAVE: Envelhecimento; osteogênese; ocitocina; osso e ossos.

ABSTRACT

SANTOS, LF. Action of oxytocin in the process of osteoblast differentiation in senescent rats. 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2014.

ABSTRACT

Peripheral oxytocin (OT) has been shown to have direct effects on the skeleton, and to provide stimulus for the activity of osteoblasts, as an anabolic factor affecting bone mass. The effects of OT can vary with age. Here we evaluated the effects of OT on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells, in 12- and 24-month-old Wistar female rats. Four treatment groups were formed for each age group: control (C) (growth medium); osteogenic medium (OM); control + oxytocin (C+OT) (growth medium + oxytocin) and osteogenic medium + oxytocin (OM+OT). Alizarin Red assay was performed and in cells from 12-month-old rats mineralization was detected on day 17 in OM. However, the addition of OT to osteogenic medium (OM+OT) provided biological mineralization on day 14. In cells from 24-month-old acyclic rats, the OM subgroup showed no mineralization; in the OM+OT subgroup mineralization was detected on day 17. *Osterix*, matrix protein (*bone sialoprotein*, *osteopontin* and *osteocalcin*) and *oxytocin* gene expression was lower in the 24-month-old than the 12-month-old group; these proteins were increased by OT. The *oxytocin receptor* was up-regulated only in the 12-month-old group and PGE₂ showed an increase in the OM group than in the OM + OT group in both age groups. These findings suggest that OT shows different, differentiation-dependent actions, and is important in the biological mineralization performed by osteoblasts, mainly in cells of bone marrow mesenchymal stem cells from acyclic 24-month-old rats highlighting oxytocin as a potential therapy for control of osteoporosis.

KEY WORDS: Aging; Osteogenesis; Oxytocin; Bone and bones.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Pirâmide etária absoluta, demonstrando projeção de aumento da população idosa nos anos de 2010 e 2050.

Figura 2 - Microtomografia óssea do colo do fêmur de ratas de 18 meses.

Figura 3 - Formação óssea no terço médio do alvéolo de ratas intactas com 12 e 24 meses.

Figura 4 - Demonstração da técnica de extração da medula proveniente dos animais de 12 e 24 meses onde após a retirada os fêmures são dissecados, epífises removidas seguidas pela lavagem do conteúdo medular com meio de cultura.

Figura 5- Quantificação celular pelo método colorimétrico do MTT realizado após 3, 7, 14 e 21 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico dos grupos de CTMs de ratas cíclicas de 12 meses.

Figura 6 – Quantificação celular pelo método colorimétrico do MTT realizado após 3, 7, 14, 21 e 28 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico dos grupos de CTMs de ratas acíclicas de 24 meses.

Figura 7 – Quantificação proteica realizada após 3, 7, 14 e 21 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico dos grupos de CTMs de ratas cíclicas de 12 meses.

Figura 8 - Quantificação proteica realizada após 3, 7, 14, 21 e 28 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico dos grupos de CTMs de ratas acíclicas de 24 meses.

Figura 9 - Atividade da fosfatase alcalina realizada após 3, 7, 14 e 21 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico dos grupos de CTMs de ratas cíclicas de 12 meses.

Figura 10 - Atividade da fosfatase alcalina realizada após 3, 7, 14, 21 e 28 dias de indução da diferenciação com meio osteogênico dos grupos de CTMs de ratas acíclicas de 24 meses.

Figura 11 – (A) Mineralização biológica do grupo 12 meses nos 14^o, 17^o e 21^o dias experimentais. Imagens capturadas através de scanner. (B) Quantificação da mineralização pela técnica do vermelho de alizarina em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 12 meses, nos 14^o, 17^o e 21^o dias.

Figura 12 -. (A) Mineralização biológica do grupo 24 meses nos 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dias experimentais. Imagens capturadas através de scanner. (B) Quantificação da mineralização pela técnica do vermelho de alizarina em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 24 meses, nos 14^o, 17^o, 21^o e 28^o dias.

Figura 13 - Coloração com *Oil Red O* aos 28 dias do grupo 24 meses.

Figura 14 - Determinação da concentração de prostaglandina E₂, por ELISA, no sobrenadante de culturas de CTMs de ratas de 12 meses e 24 meses no 7^o e 14^o dias experimentais.

Figura 15 - Expressão gênica de ocitocina no 14^o dia experimental da cultura de CTMs da medula óssea de ratas de 12 meses e 24 meses.

Figura 16 - Expressão gênica do receptor de ocitocina no 14^o dia experimental da cultura de CTMs da medula óssea de ratas de 12 meses e 24 meses.

Figura 17 - Expressão gênica do osterix no 14º dia experimental da cultura de CTMs da medula óssea de ratas de 12 meses e 24 meses.

Figura 18 - Expressão de sialoproteína óssea, osteopontina, osteocalcina e proteína morfogênica óssea 2, no 14º dia experimental da cultura de CTMs da medula óssea de ratas de 12 meses e 24 meses.

Figura 19 - Concentração plasmática de ocitocina de ratas de 12 meses e 24 meses.

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – microlitro

Actb – β -actina

BMP2 – proteína morfogênica óssea tipo 2

BSA – albumina sérica bovina

BSP – sialoproteína óssea

cm^2 – centímetro quadrado

CO_2 – dióxido de carbono

C_T - ciclo limiar

CTMs – células-tronco mesenquimais

DEPC – dietilpirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucléico

DNAC – ácido desoxirribonucléico complementar

E_2 – estrógeno

ELISA – ensaio imuno-adsorvente ligado a enzima

EIA – enzima imunoensaio

EPM – erro padrão da média

FAL – fosfatase alcalina

g – força gravitacional

h - hora

IL-1 – interleucina 1

IL-6 – interleucina 6

IL-11- interleucina 11

M – molar

M-CSF – fator estimulante da colônia de monócitos

MEM – meio essencial mínimo

mg – miligrama

min - minutos

mL – mililitro

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

Na₂CO₃ – carbonato de sódio

NaHCO₃ – bicarbonato de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanômetro

nM - nanomolar

°C – graus celsius

Ocn – osteocalcina

OPG - osteoprotegerina

Opn – osteopontina

OT - ocitocina

OTR- receptor de ocitocina

Osx - osterix

Oxt – ocitocina (gene)

Oxtr – receptor de ocitocina (gene)

PBS – tampão fosfato salina

PCR – reação em cadeia de polimerase

PGE₂ – prostaglandina E tipo 2

pH – potencial de hidrogênio

RANK – receptor ativador do fator nuclear kappa β

RANK –L – ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β

Real time-PCR – PCR quantitativo em tempo real

RIE - radioimunoensaio

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

SFB – soro fetal bovino

TGF β – fator de crescimento transformante β

TIFF – *tagged image file format*

TNF- α – fator de necrose tumoral α

TRAP – enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato

U – unidade

ΔC_T – delta do ciclo limiar

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	23
2- OBJETIVOS:	31
3- METODOLOGIA.....	33
3.1- Animais.....	33
3.2 - Protocolo de obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs)	33
3.3 - Avaliação do processo de diferenciação osteoblástica.....	37
3.3.1 Análise indireta da quantidade de células pelo método do MTT	37
3.3.2. Proteína total	37
3.3.3. Atividade da fosfatase alcalina	38
3.3.4 Detecção e quantificação da mineralização da matriz extracelular	39
3.4 - Expressão gênica	40
3.4.1 - Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa	40
3.4.2.- <i>Real Time</i> PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real).....	41
3.5.- Prostaglandina E ₂ (PGE ₂):.....	43
3.6.- Ocitocina plasmática:	43
3.7 - Análise Estatística:	44
4 - RESULTADOS	46
4.1 – Quantidade de células viáveis:.....	46
4.2 - Proteína total.....	48
4.3 - Atividade da fosfatase alcalina	50
4.4 - Mineralização biológica.....	52
4.4 - Detecção de adipócitos.....	54
4.5 - Prostaglandina E ₂	57
4.6 - <i>Real time</i> PCR	58
4.7 - Ocitocina plasmática	62
5 - DISCUSSÃO	64
6- CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS.....	83
Parecer de aprovação do comitê de ética no uso de animais.....	84

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Os avanços da ciência e descobertas de tratamentos nos últimos anos propiciam à população mundial aumento na expectativa de vida e consequente aumento no número de pessoas com mais de 60 anos, onde, no ano de 2050 no Brasil, a projeção é que haja 105 mil mulheres a mais que homens na população acima de 60 anos (Figura 1).



Fig. 1 – Pirâmide etária absoluta, demonstrando projeção de aumento da população idosa nos anos de 2010 e 2050. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

Com isso, temos enfrentado desafios significativos na área da saúde e no tratamento das doenças crônicas e degenerativas que acompanham a terceira idade como, por exemplo, a diabetes, hipertensão, problemas vasculares, artrite, osteoporose e outras (AMADEI *et al.*, 2006; KINSELLA; HE, 2009). A osteoporose atinge uma em cada quatro mulheres na menopausa e, após os 65 anos, uma em cada três, sendo que a redução da massa óssea após a menopausa apresenta relação primária com o funcionamento ovariano (MELTON, 2000).

Dentre as doenças citadas acima, realizamos estudos experimentais (COLLI, 2012; COLLI *et al.*, 2012; GARCIA, 2012) que visam o conhecimento e a compreensão dos mecanismos envolvidos com o decréscimo da massa óssea e

comprometimento da estrutura, bem como na utilização de fármacos e terapias que possibilitem o controle e prevenção da doença, resultando em qualidade de vida melhor do portador e envelhecimento saudável.

Na fase adulta a estrutura esquelética é mantida através da remodelação óssea, processo fisiológico importante para a manutenção da integridade do esqueleto e mecanismo para fornecer íons cálcio e fosfato, os quais podem ser liberados ou conservados dentro do esqueleto (KONG; PENNINGER, 2000). Fisiologicamente, este processo consiste na remoção de quantidade de componentes ósseos, seguida imediata pela formação (MANOLAGAS *et al.*, 2002), ou seja, há interação constante das atividades dos osteoblastos e osteoclastos, células que executam essa função respectivamente (BARLOW *et al.*, 2010)

Os osteoblastos são responsáveis pela produção da matriz orgânica do tecido ósseo (MARKS; POPOFF, 1988) e encontram-se dispostos em camada contínua, na superfície da matriz óssea não mineralizada produzida por eles mesmos. Estas células ósseas originam-se de células tronco mesenquimais (CTMs) e fatores de transcrição tais como Runx2 (DATTA *et al.*, 2008; DUCY *et al.*, 1997) e osterix (KARSENTY, 1999; NAKASHIMA *et al.*, 2002) parecem influenciar tanto a diferenciação de CTMs em células osteoprogenitoras, quanto a diferenciação de células osteoprogenitoras em pré-osteoblastos, sendo que nesse processo de diferenciação há a participação cronológica de proteínas como fosfatase alcalina, sialoproteína óssea, osteopontina, osteocalcina e proteína morfogênica óssea (DUCY *et al.*, 1997; KARSENTY, 1999; KOMORI, 2003; YAMAGUCHI *et al.*, 2000).

Osteoclastos são células multinucleadas com tamanho entre 50 a 100 μm , capazes de degradarem a matriz óssea mineralizada, sendo estas células multinucleadas com tamanho entre 50 a 100 μm (MANOLAGAS, 2000; VÄÄNÄNEN,

2005). Estão localizados em cavidades de reabsorção da superfície óssea, denominadas lacunas de *Howship* e possuem a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) no seu citoplasma (MINKIN, 1982). Vários fatores ativadores dos osteoclastos já foram identificados, entre eles, a interleucina 1 (IL-1), IL-6 e IL-11, o fator de necrose tumoral α (TNF- α), o fator estimulante da colônia de monócitos (M-CSF), receptor ativador do fator nuclear Kappa-B (RANK) e seu ligante - RANKL. No final dos anos 90, Hofbauer (1999) relatou a ação do RANKL e RANK como fatores principais envolvidos na gênese dos osteoclastos. RANK está presente em precursores de osteoclastos e a interação de RANKL e RANK resulta em inibição da apoptose dos osteoclastos e estimulação na diferenciação e ativação dessas células, promovendo assim a reabsorção óssea. Observam-se efeitos antagônicos quando RANKL se liga a osteoprotegerina (OPG), bloqueando a diferenciação celular dos osteoclastos e preservando a integridade óssea (KWAN TAT *et al.*, 2004).

No início da remodelação óssea, células precursoras de osteoclastos, são recrutadas respondendo a sinais físicos captados por mecanoreceptores e sinais hormonais, concentrando-se na superfície óssea que será reabsorvida, fundem-se e se diferenciam em osteoclastos multinucleados, que irão degradar tanto os componentes minerais quanto os orgânicos, através da secreção de enzimas ácidas e hidrolíticas, liberando então fragmentos colagenosos além de minerais (DATTA *et al.*, 2008). Sabe-se que osteoclastos sofrem apoptose, possivelmente induzida pelo fator transformador de crescimento β (TGF- β), responsável também pela atração dos osteoblastos (MEGHJI, 1992; WATTS, 1999). Os osteoblastos, recrutados para a cavidade de reabsorção, atuam preenchendo-a com matriz recém sintetizada e secretada conhecida como osteóide, a qual é posteriormente será molde para

deposição mineral (DATTA *et al.*, 2008). Ainda neste processo, os osteoblastos são envoltos pela matriz que eles próprios sintetizaram tornando-se osteócitos, ou seja, células terminalmente diferenciadas constituindo mais de 90% das células do osso adulto (KNOTHE-TATE *et al.*, 2004).

Portanto, o controle da proliferação e diferenciação das células ósseas bem como de suas atividades está sob a ação de diversos fatores sistêmicos, locais e ambientais, cuja ação combinada e frequentemente simultânea é indispensável para a manutenção da homeostase do tecido ósseo (RAISZ; RODAN, 1998)

Alterações no processo de remodelação óssea podem levar, entre outras desordens, a osteoporose (NAJJAR *et al.*, 1977). Alguns fatores tais como a menor secreção de estrógeno (E_2) na mulher menopausada (CARDOSO NETO *et al.*, 2006), estão relacionados com o desequilíbrio entre reabsorção e formação óssea e a ocorrência de osteoporose já que o E_2 tem sido estabelecido como um dos principais hormônios para a manutenção da massa óssea e a sua deficiência como causa de diminuição da massa óssea decorrente de aumento da remodelação óssea que ocorre de maneira desarmônica, havendo maior reabsorção em relação à formação óssea. Riggs e colaboradores (2002) realizaram estudos ao longo das últimas décadas e verificaram relação entre a deficiência de E_2 e a patogênese da diminuição óssea em mulheres pós-menopausa.

A literatura apresenta conjunto de ações desencadeadas pelo E_2 sobre a linhagem de osteoblastos (SPELSBERG *et al.*, 1999), osteoclastos (NAKAMURA *et al.*, 2007; OURSLER *et al.*, 1994) e outras células da medula óssea tais como células T e B (ONOE *et al.*, 2000; WEITZMANN *et al.*, 2006). Além disso, há informações da atuação inibidora do E_2 na formação de citocinas pro-reabsorção, TNF- α , IL-1, IL-6, MCS-F, prostaglandina E_2 (PGE_2) e RANK-L (CLOWES *et al.*, 2005) bem como no

aumento da produção de fatores anti-reabsortivos tais como fator TGF- β (OURSLER *et al.*, 1991) e OPG (HOFBAUER *et al.*, 1999). Estudo de nosso laboratório (GARCIA, 2012) demonstrou osteopenia acentuada em ratas senis castradas comparadas a ratas que receberam cirurgia fictícia (sham) de remoção dos ovários (Figura 2). A diminuição da massa óssea, constatada no estudo citado, pode estar relacionada com a diminuição da concentração de E₂, decorrente da castração, já que E₂ desempenha ação anabólica no tecido ósseo.

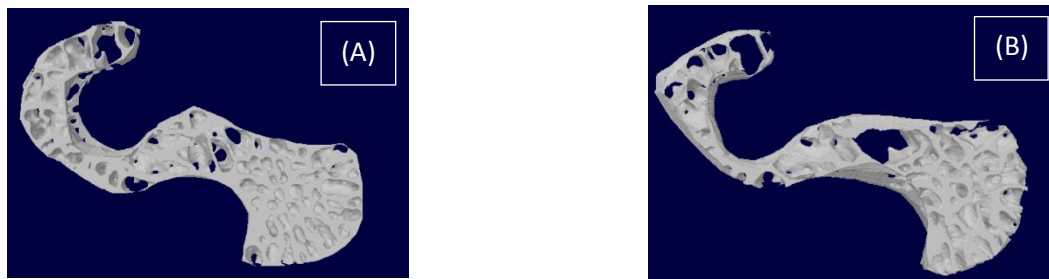


Fig. 2- Microtomografia óssea do colo do fêmur de ratas de 18 meses (A) sham-ovariectomizadas e (B) ovariectomizadas no 15^o mês (GARCIA, 2012).

Além disso, estudos têm demonstrado a existência de controle central na formação óssea destacando a ocitocina (OT), cujos receptores (OTR) foram detectados em osteoblastos e osteoclastos humanos (COPLAND *et al.*, 1999; AMLING *et al.*, 2001; COLUCCI *et al.*, 2002; PETERSSON *et al.*, 2002). A OT é um hormônio peptídico sintetizado no hipotálamo e armazenado na neurohipófise, classicamente relacionado com os processos fisiológicos que acompanham a gravidez e lactação, estando envolvido nos processos de contração uterina e ejeção de leite. Embora suas ações fisiológicas mais amplamente investigadas estejam relacionadas à reprodução, incluindo os processos de lactação e cuidados maternos, OT também parece participar em vários outros processos fisiológicos, devido à constatação de receptores para OT em mioblastos, ovários, testículos, timo,

coração, rim, adipócitos, osteoclastos e osteoblastos (CROWLEY e ARMSTRONG, 1992; ZINGG e LAPORTE, 2003).

Alguns estudos nas últimas décadas demonstram ações da OT no processo de remodelação óssea, com atividade em prol a formação óssea (TAMMA *et al.*, 2009; COLAIANNI *et al.*, 2011; BERANGER *et al.*, 2014). Em precursores osteoblásticos e em osteoblastos humanos, a ativação dos receptores de OT promove aumento na síntese de prostaglandina E₂, que é substância descrita por aumentar formação óssea, após estímulo com OT (COPLAND *et al.*, 1999). Grupos de pesquisadores como o de Elabd (2007; 2008) e Tamma (2009) evidenciaram participação de OT no processo de remodelação óssea em animais jovens. Elabd e colaboradores (2007; 2008) verificaram que injeção intramuscular de OT promoveu melhora na densidade mineral óssea e que a supressão do hormônio ou de seus receptores, em camundongos machos e fêmeas jovens, provocou redução da formação óssea. Colaianni e colaboradores (2011) relataram que a administração de 17 β -estradiol estimulou aumento da secreção de OT por osteoblastos e que o esteróide também pode induzir a expressão de OTR em osteoblastos. Os efeitos da OT no reparo de defeitos ósseos, bem como na prevenção da osteoporose pós-menopausa, onde há diminuição nas concentrações de estrógeno, demandam mais estudos para melhor compreensão. Em ratas senis, com idade correspondente à faixa etária de maior incidência de menopausa e pós-menopausa na mulher, informações pertinentes à ação da OT sobre o metabolismo ósseo são desconhecidos.

Estudo realizado (COLLI, 2012) em nosso laboratório analisou o processo de remodelação óssea alveolar de ratas com 12 e 24 meses após administração de OT, com metodologia semelhante à utilizada pelo grupo de Colaianni (2011).

Constatamos aumento na formação óssea no reparo alveolar das ratas com 24 meses tratadas com OT, comparando com grupo que recebeu apenas solução fisiológica. Entretanto, nas ratas de 12 meses o tratamento com OT não desencadeou alteração significativa no processo de reparo ósseo (Figura 3).

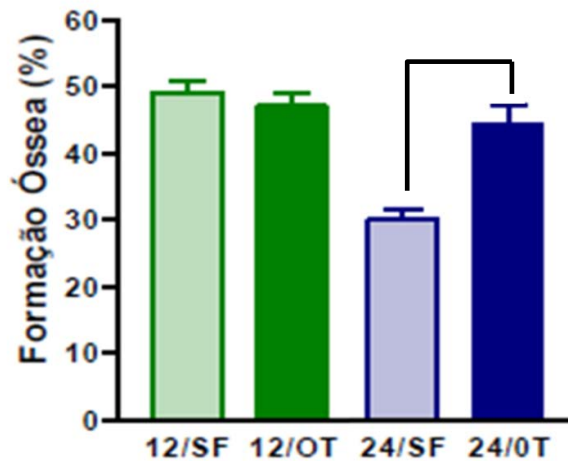


Fig. 3- Formação óssea no terço médio do alvéolo de ratas intactas com 12 e 24 meses, que receberam duas injeções intraperitoneais com intervalo de 12 horas de solução fisiológica (grupos SF) ou ocitocina (grupos OT), destacando a maior formação óssea alveolar no grupo 24/OT quando comparado a 24/SF. N= 8 animais/grupos (COLLI, 2012).

Portanto, torna-se importante a investigação dos mecanismos celulares envolvidos na formação óssea em resposta a OT, visando à compreensão dos mecanismos envolvidos na maior formação óssea em organismos senis, em período caracterizado pela aciclicidade estral (estropausa – 24 meses) comparado com organismos adultos exibindo ciclo estral regular (12 meses).

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS:

Nosso objetivo geral foi avaliar a influência da idade e a ação da OT associada a indutores osteogênicos clássicos durante a diferenciação em linhagem osteogênica de CTMs do estroma da medula óssea de ratas Wistar com 12 e 24 meses de idade.

Objetivos específicos:

1- Quantificação da viabilidade celular no 3º, 7º, 14º e 21º dias do processo de diferenciação, através da técnica do MTT;

2- Atividade da fosfatase alcalina e a proteína total 3º, 7º, 14º e 21º dias do processo de diferenciação através de métodos colorimétricos;

3- Expressão gênica de proteínas de matriz óssea (*Opn*, *Osc*, *Bsp* e *Bmp2*) no 14º dia do processo de diferenciação via *Real Time* PCR;

4- Mineralização biológica no 17º e 21º dias do processo de diferenciação em linhagem osteogênica pela técnica do Vermelho de Alizarina;

5- Expressão gênica do receptor de ocitocina (*Oxtr*) e ocitocina (*Oxt*) no 14º dia do processo de diferenciação em linhagem osteogênica via *Real Time* PCR.

6- Determinação das concentrações plasmáticas de OT dos animais doadores das CTMs.

METODOLOGIA

3- METODOLOGIA

3.1- Animais

Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O protocolo experimental do presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (processo 00981-2012) da Faculdade de Odontologia da UNESP, *campus* de Araçatuba.

Para este trabalho foram utilizadas ratas Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), com 12 e 24 meses, mantidas em gaiolas coletivas (quatro animais/caixa) em ambiente com temperatura em $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo de luz controlada (12/12 h), ração comercial (Presence® Ratos e Camundongos, Paulínia, SP, Brasil) e água ad libitum, provenientes do biotério central da FOA/UNESP, foram selecionadas após a análise do ciclo estral.

O esfregaço vaginal de todos os animais foi colhido para verificação do ciclo estral, por volta das 9 h da manhã, segundo a técnica de Long e Evans (1922) e analisado a fresco ao microscópio óptico, durante 15 dias.

Os animais de 12 meses utilizados neste estudo exibiram ciclos estrais com fases distintas: metaestro, diestro, proestro e estro, o que reflete ritmicidade na produção dos hormônios ovarianos, ou seja, ciclicidade reprodutiva e animais de 24 meses que apresentaram irregularidade no ciclo estral, refletindo alteração na ritmicidade na produção dos hormônios ovarianos (LEFEVRE; MCCLINTOCK, 1988).

3.2 - Protocolo de obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais (CTMs)

Para obter e isolar CTMs foi utilizado o protocolo descrito por Wang e colaboradores (2012), com adaptações. A extração e isolamento das CTMs de ratas

com 12 e 24 meses ocorrem após decapitação (necessário utilizar este método, pois anestésicos interferem na dosagem plasmática de ocitocina) para coleta sanguínea e remoção asséptica dos ossos. Após a dissecação, limpeza e retirada de todos os tecidos moles aderentes às epífises dos ossos a medula foi lavada com 10 mL de meio essencial mínimo (MEM, Sigma Aldrich™, St. Louis, MO, USA) suplementado 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, utilizando seringa de 20 mL com uma agulha acoplada (Figura 4).

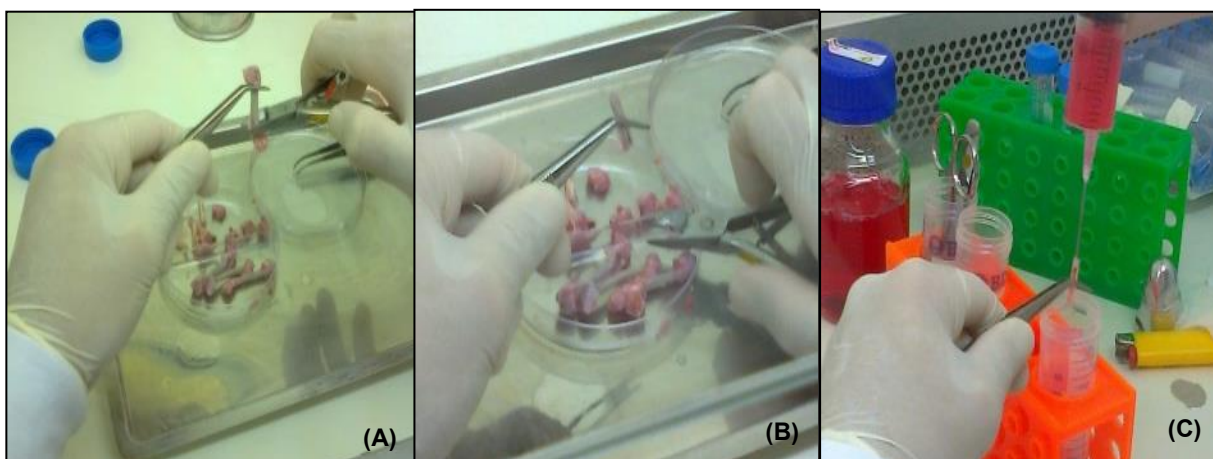


Fig. 4- Demonstração de extração da medula proveniente dos animais de 12 e 24 meses. (A) Limpeza e remoção de tecidos moles; (B) Remoção das epífises do fêmur; (C) Lavagem do conteúdo medular com meio de cultura em seringa acoplada com agulha.

As células liberadas foram coletadas e então desagregadas por meio de repetidas aspirações dos segregados da medula através de agulha de calibre de 20 mm, centrifugadas (1000 × g, 4 min, 4°C) e mantidas em frascos de 75 cm² (Corning Inc., USA) contendo 15 mL de meio. O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias e durante todo o tempo de cultivo as células são mantidas a 37 °C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

Na subconfluência da cultura primária (7-10 dias), o meio de cultura foi removido e em seguida adicionado solução de tripsina a 0,25% (Gibco), para obtenção de suspensão celular. Após centrifugação ($1000 \times g$, 4 min, $4^{\circ}C$), o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de células foi ressuspenso, homogeneizado e posteriormente utilizado no plaqueamento dos experimentos de diferenciação osteogênica na densidade de 3×10^4 células/mL em placas de poliestrieno de 24 poços (TPP, Barcelona, Espanha).

3.2.1 – Diferenciação celular

Após as células atingirem a confluência de 70-80% nos poços, se iniciou a indução osteogênica correspondendo o dia 0 experimental, para cada idade foram determinados os seguintes grupos experimentais:

- MC = Meio de crescimento*;
- MO= Meio osteogênico**;
- MCO= Meio de crescimento + OT***;
- MOO= Meio osteogênico + OT.

* Meio de crescimento é o meio de cultivo comum a todos os grupos, composto por: meio essencial mínimo (MEM – Sigma), suplementado com 25 mM de $NaHCO_3$ (MERK), 4 mM de L-glutamina (Sigma Aldrich™), 10% de soro fetal bovino (Gibco), 50 μg e 50 UI/mL de Estreptomicina/Penicilina (Sigma), 10 $\mu g/mL$ de Sulfato de Gentamicina (Sigma) e 0,25 $\mu g/mL$ de Fungizone (Gibco).

** A diferenciação celular foi induzida através da adição de meio osteogênico proveniente da suplementação do meio de crescimento com 50 $\mu g/mL$ de ácido ascórbico (Sigma), 10 mM β -glicerofosfato (Sigma) e 10^{-8} M dexametasona (Sigma).

***O estímulo das culturas celulares é realizado com a adição de 100 nM de ocitocina (Sigma Aldrich™), diluída em tampão PBS, nos meios de crescimento e osteogênico (grupos MCO e MOO) (COPLAND *et al.*, 1999; TAMMA *et al.*, 2009).

O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias e durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37° C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico.

3.3 - Avaliação do processo de diferenciação osteoblástica

3.3.1 Análise indireta da quantidade de células pelo método do MTT

A quantidade de células viáveis foi avaliada após o término de cada período (3, 7, 14 e 21 dias) da adição do meio osteogênico pelo método colorimétrico do MTT-Formazan. Esta análise baseia-se na redução do sal de MTT {3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-brometo tetrazolina} em cristais de formazan pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado pela succinato desidrogenase, enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, e o sal de tetrazolina (MTT), hidrossolúvel e de cor amarela, é convertido em cristais de formazan, de cor azul escura. Somente células viáveis possuem esta capacidade o que indica atividade mitocondrial e consequente viabilidade celular (MOSSMANN, 1983).

Após os períodos determinados, o meio de cultura foi removido e solução contendo 1mL de solução de MTT (0,5 mg de MTT/mL de meio de cultura sem SFB) foi adicionada em cada poço. Após a incubação por 3 h a 37°C, o meio foi removido e o formazan intracelular foi liberado pela solubilização com 1 mL de etanol. As placas foram agitadas por 5 min antes de mensurar as absorbâncias das amostras em leitora de microplacas a 570 nm (Spectramax 190 Microplate Reader supplied with Softmax[®] Pro data Acquisition & Analysis Software, CA, USA).

3.3.2. Proteína total

A quantificação proteica foi realizada pelo método de Lowry e colaboradores (1951), a partir de lisado celular obtido através da adição de solução de SDS 1 mg/mL (dodecil sulfato de sódio, Sigma Aldrich[™]) após 3, 7, 14 e 21 dias da adição do meio osteogênico.

Após a remoção do meio de cultura os poços foram lavados com PBS (Gibco) gelado de 8 a 10°C, foi adicionado 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 carbonato de sódio (MERK) a 2% em hidróxido de sódio (MERK) 0,1M (reagente A) com sulfato de cobre (MERK) 0,5% em citrato de sódio (MERK) 1% (reagente B) que formam o reagente C, após adição da amostra nos tubos de ensaio, adicionou-se o reagente C e os tubos foram mantidos em repouso durante 10 minutos após agitação. Em seguida foi acrescentada solução diluída de Folin Ciocalteau (Sigma Aldrich™) em H₂O ultra-pura (1:1). Nos tubos do branco, foi adicionada solução de SDS. Albumina (Sigma Aldrich™) 0,1% foi usada como padrão. Após 30 min a absorbâncias foram mensuradas em comprimento de onda de 660 nm em leitora de microplaca e a concentração de proteína total, em µg/mL, foi calculada a partir de curva padrão.

3.3.3. Atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina foi avaliada nos mesmos lisados celulares obtidos para a análise citada acima, após 3, 7, 14 e 21 dias da adição do meio osteogênico. A reação para determinação da atividade enzimática ocorreu por meio da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, baseado no método de Roy (1970), utilizando kit comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). O princípio desse kit envolve a liberação de p-nitrofenol e fosfato inorgânico a partir de p-nitrofenil fosfato em meio alcalino, reação da qual participa a enzima fosfatase alcalina. Para isso são utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos são adicionados 50 µL de substrato e 0,5 mL de tampão dietanolamina a 0,3 mmol/mL, pH 10,1. Nos tubos padrões são acrescentados 50 µL da solução padrão. Os tubos são mantidos a 37°C por 2 min. Em seguida, são

adicionados, em cada tubo teste, 50 μ L do lisado de células dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos são mantidos a 37° C por 10 min. Após esse período é adicionado em todos os tubos (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor (Na_2CO_3 0,09 mmol/mL e NaOH 0,25 mmol/mL) e em seguida a absorbância é mensurada em leitora de placas utilizando-se o comprimento de onda de 590 nm e a atividade da fosfatase alcalina através de curva padrão.

A atividade de FAL (U/mg de proteína total) foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pelo conteúdo de proteína total determinada a partir do mesmo lisado celular.

3.3.4 Detecção e quantificação da mineralização da matriz extracelular

Nos dias 14°, 17° e 21° foram realizadas as detecções da mineralização através do método do vermelho de alizarina (GREGORY *et al.*, 2004). Para esta análise, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e preenchidos com formol tamponado neutro a 10% por 30 min. Após este período, foram lavados com H_2O destilada e aplicada a solução de alizarina (Sigma) a 2% à temperatura ambiente por 15 min, que cora em vermelho as áreas de mineralização ricas em cálcio. Após repouso de 30 min, o excesso de corante foi removido e as placas lavadas com 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 escaneadas (scanner HP scanjet 5590).

A quantificação da mineralização foi realizada de acordo com o método descrito por Gregory (2004). Brevemente, 450 μ L de ácido acético a 10% (v/v) foram adicionados a cada poço corado com vermelho de alizarina (Sigma). As amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 30 min sob agitação. Após esse período, 400 μ L da solução de cada poço foram transferidas para tubos e foram adicionados

150 μ L de hidróxido de amônio em cada tubo para neutralizar o ácido e esta solução transferida para placa de 96 poços para a leitura das absorbâncias à 405 nm em leitor de placa. Os dados foram expressos pela densidade óptica.

3.4 - Expressão gênica

3.4.1 - Extração e quantificação do RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA total das células foi realizada por meio da adição do reagente de Trizol LS (Invitrogen™, Carlsbad, CA, EUA). Para isso, após remoção do meio de cultura contido nos poços, foi adicionado 1 mL do reagente Trizol LS (Invitrogen™) que permaneceu à temperatura ambiente, por 10 min, para posterior raspagem do poço com ponteira, e obtenção de suspensão celular. Essa suspensão foi acondicionada em tubos *ependorfs* DNase/RNase *free*.

A seguir, foi realizado o isolamento do RNA usando reagentes convencionais, aos quais foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (MERK Millipore, Darmstadt, Alemanha) para cada mL de Trizol LS. 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 e as fases aquosas superiores recolhidas em tubos de 1,5 mL e mantidas em banho de gelo picado.

Para precipitação do RNA, foram adicionados 3 mL de isopropanol (MERK Millipore), para cada mL de fase aquosa coletada. As amostras foram estocadas a 20°C negativos (*overnight*) e os tubos foram centrifugados a 4°C e 13000 g, por 15 min, para obtenção dos precipitados que, posteriormente, foram dissolvidos em etanol a 75% (MERK Millipore) e novamente centrifugados a 4°C e 10000 g, por 10 min. Após lavagem com etanol a 75%, as amostras foram deixadas por 5 min vertidas em papel absorvente para evaporação do etanol sobressalente. Os precipitados formados

foram dissolvidos em 20µL de H₂O ultrapura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato, Applied Biosystems Life Technologies) e armazenados em freezer -80°C.

Alíquotas 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) onde foram adicionados em cada 8 µL de amostra (2,5 µg de RNA), 1 µL de DNase I e DNase *Buffer* 10x e após centrifugação e incubação por 10 min a 70°C foi adicionada a solução de parada (*Stop Solution*) e os tubos armazenados em -20°C.

O DNA complementar (cDNA) 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 4µL *Buffer* 5x, 2µL de DTT (0,1 M) e 1µ L H₂O ultrapura 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* for q-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.

3.4.2.- Real Time PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real)

A expressão quantitativa do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema *Taqman®* (Applied Biosystems, Life Technologies, EUA) em *StepOne™ plus Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Life Technologies, United Kingdom). Para esta reação foi utilizado *primers* e sondas inventoriados marcadas com fluoróforo FAM

disponibilizados pela mesma empresa: Ocitocina (*Oxt* - Rn00564446_g1); Receptor de Ocitocina (*Oxtr* - Rn00563503_m1); Osteocalcina (*Ocn* - Rn00566386_g1); Osteopontina (*Opn*- Rn00563571_m1); Sialoproteína Óssea (*Bsp* - Rn00561414_m1); Osterix (*Osx* – Rn02769744_s1) and Proteína morfogênica óssea tipo 2 (*Bmp2* – Rn90931). Também foi realizada a amplificação do gene constitutivo com *primers* e sonda inventariado: 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 1:8 (*Opn*, *Ocn*, *Bmp2*,*Actb*) e 1:1 (*Oxt*, *Oxtr*, *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. Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos a partir do qual a amplificação atinge limiar que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado.

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 (*cicle 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 MC de

cada idade), 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). Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos primers utilizados.

3.5.- Prostaglandina E₂ (PGE₂):

A determinação da concentração de PGE₂ no sobrenadante das células provenientes dos animais de 12 e 24 meses nos 7º e 14º dias experimentais foi realizada através de ELISA (ensaio imuno-adsorvente ligado à enzima). Kit comercial (*Prostaglandin E₂ EIA Kit-Monoclonal, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA*) foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante.

3.6.- Ocitocina plasmática:

A dosagem de OT foi realizada por radioimunoensaio de duplo anticorpo no laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP/USP, sob a orientação de Prof. Dr. José Antunes Rodrigues. Alíquotas de 250 µL de plasma foram pipetadas em tubos aos quais foram adicionados 500 µL de acetona a 40C. Em seguida, foi realizada agitação por 1 minuto e centrifugação (3000 rpm). O conteúdo sobrenadante foi vertido em tubos com adição de 1 mL de éter de petróleo a 40C. Após 1 minuto de agitação, a fase superior foi aspirada e a inferior foi liofilizada e armazenada a -200C. No momento da realização do radioimunoensaio, o material liofilizado foi descongelado e ressuspenso em solução tamponada em volume correspondente a 40% de volume do plasma utilizado (100 µL). Todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio e a dose mínima detectada foi de 0,8 pg/mL.

3.7 - Análise Estatística:

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism®, versão 5.0 para Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA) e submetidos à *Two-way ANOVA* seguida pelo pós-teste de Bonferroni. Para a análise estatística das concentrações plasmática de ocitocina, foi utilizado o *teste t de Student*. 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. 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 – Quantidade de células viáveis:

Ao término de cada período (dias experimentais), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de 24 poços, foram submetidas ao teste de conversão do MTT em cristais de formazan (MOSSMANN, 1983).

Os resultados obtidos nos 3^o, 7^o, 14^o e 21^o dias experimentais no grupo de células provenientes de ratas cíclicas com 12 meses, evidenciaram aumento gradual até o 14^o dia no grupo MC (Fig. 5). Entretanto, no 21^o dia do grupo MCO, ocorreu redução na quantidade de células viáveis. Os grupos com MO apresentaram valores significativamente menores que nos grupos com MC, sendo que a adição de OT potencializou esta diminuição aos 14 dias de cultivo celular.

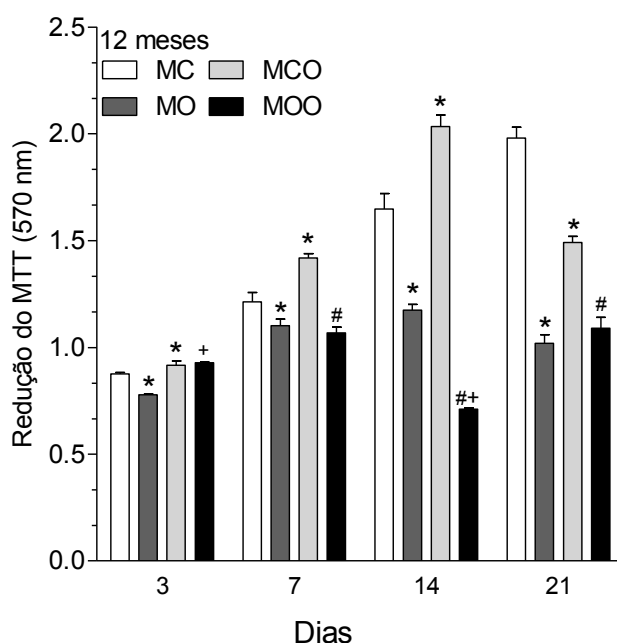


Fig. 5: Quantidade de células viáveis em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 12 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de

ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

Ao final do 3^o, 7^o, 14^o, 21^o e 28^o dia, grupo de células provenientes de ratas acíclicas de 24 meses apresentaram aumento gradual da quantidade de células viáveis. Observa-se que ao longo do período analisado nos grupos que não tiveram indução a diferenciação (MC e MCO), apresentaram valores estatisticamente maiores em comparação aos grupos MO e MOO. Além disso, a adição de OT ao meio de crescimento potencializou esse aumento, a partir do 14^o dia, inclusive quando comparado a MC. Os grupos MO e MOO, não demonstraram diferenças na quantidade de células viáveis em nenhum dia experimental, quando comparados entre si. (Fig. 6).

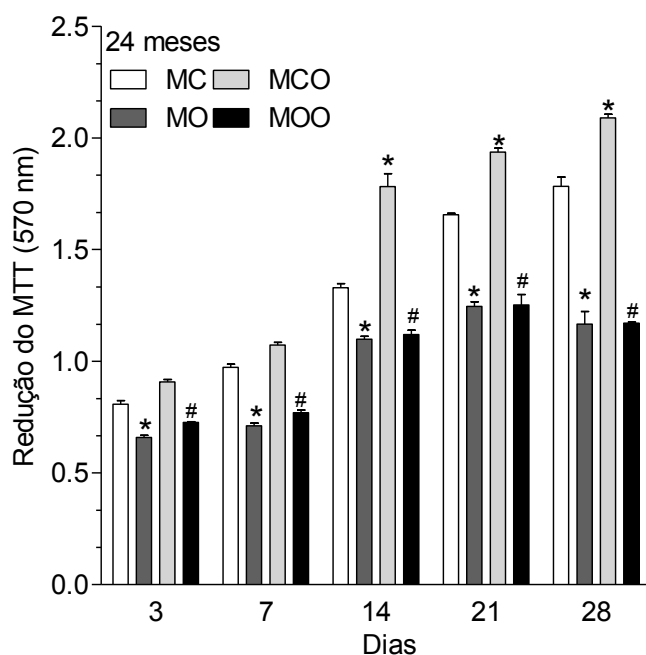


Fig. 6: Quantidade de células viáveis em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 24 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

Quando comparamos os valores obtidos, observamos que a escala de redução do MTT a formazan, correspondente quantidade de células viáveis, é praticamente a mesma em ambas as idades experimentais.

4.2 - Proteína total

Essa dosagem foi realizada através do método de Lowry e colaboradores (1951) no grupo de células provenientes de ratas cíclicas de 12 meses no término do 3º, 7º, 14º e 21º dias e no grupo de células provenientes de ratas acíclicas de 24 meses no término do 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.

O grupo 12 meses apresentou aumento gradativo na dosagem proteica até o 14º dia. No 7º, 14º e 21º dia os grupos tratados com meio osteogênico (MO e MOO) apresentaram menor quantidade de proteínas que os grupos controles (MC e MCO) (Fig. 7). No 14º dia o grupo meio de crescimento (MC) mostra-se aumentado também em relação ao meio de crescimento com OT (MCO) e MOO apresenta menor quantidade proteica em comparação a MO e MCO ainda no 14º dia.

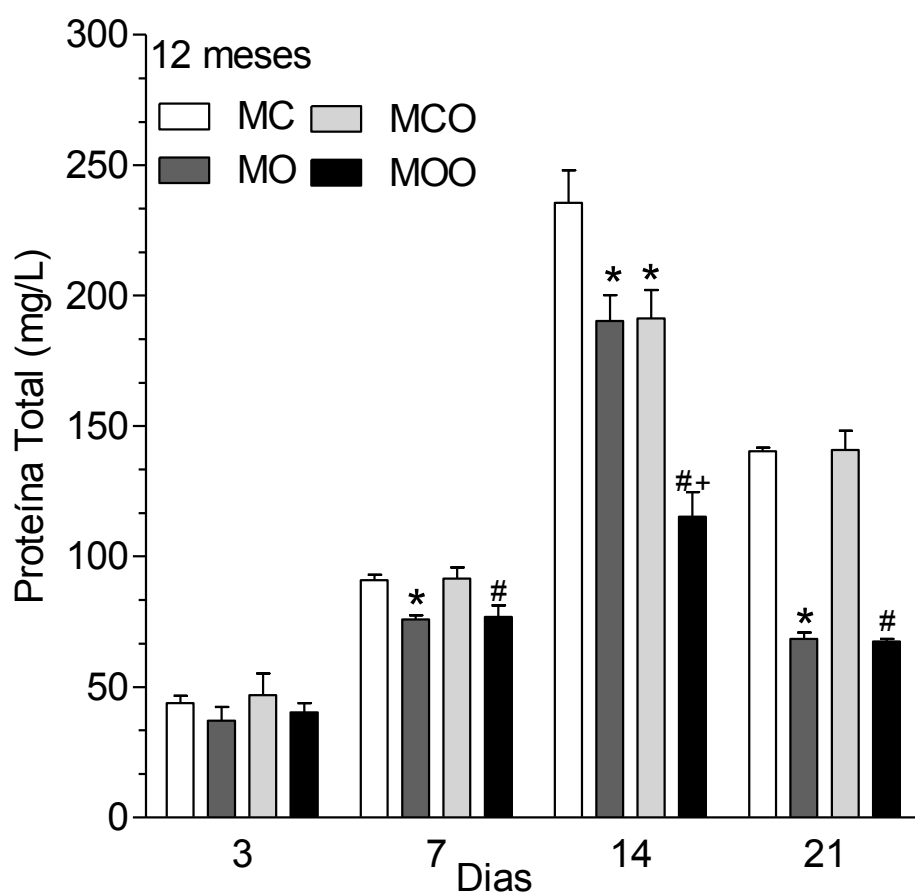


Fig. 7: Proteína total em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 12 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

No cultivo de CTMs proveniente de ratas acíclicas com 24 meses, o conteúdo proteico foi maior nos grupos que receberam tratamento com OT (MCO e MOO) em relação aos grupos que não receberam OT (MC e MO), no 3º dia (Fig. 8). Os resultados referentes ao 14º dia são antagônicos nos meios que receberam adição de OT, isto é, nas células cultivadas no meio de crescimento (MCO), o conteúdo proteico foi maior enquanto que nas células do meio osteogênico (MOO) a concentração de proteínas foi menor. Esse padrão de resposta se repetiu nos 21º e 28º dias. Além disso, no 28º dia a concentração de proteínas foi menor no meio osteogênico (MO) quando comparado com o grupo MC.

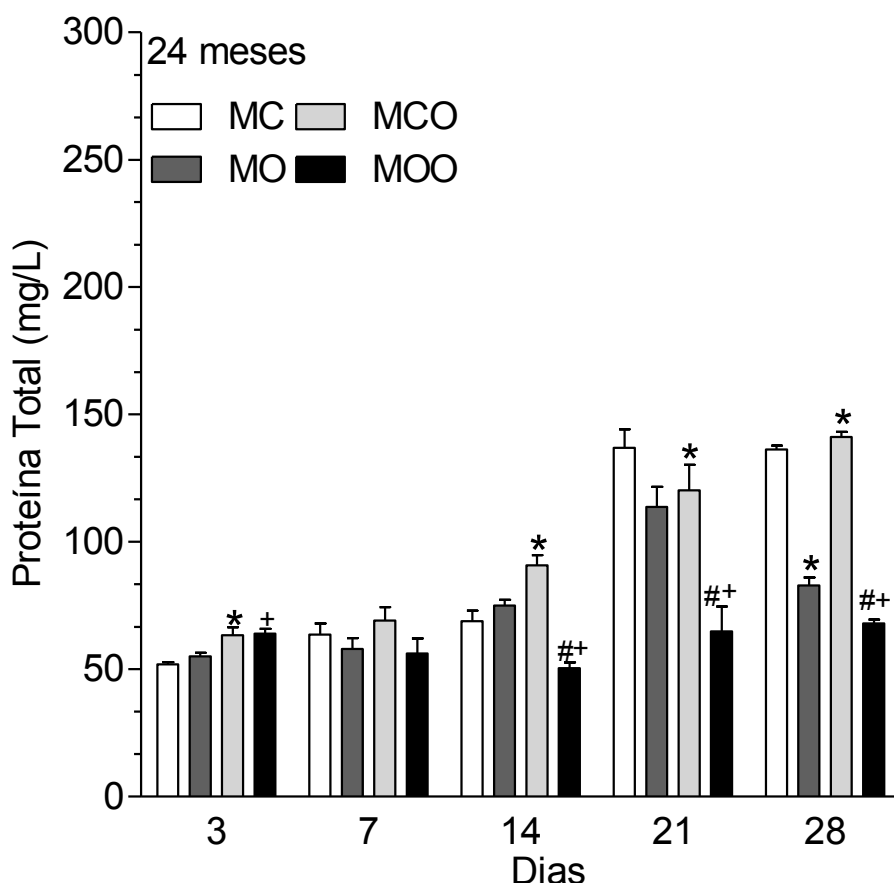


Fig. 8: Proteína total em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 24 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

4.3 - Atividade da fosfatase alcalina

Foi realizada análise da atividade da FAL, no grupo de células provenientes de ratas cíclicas com 12 meses no término do 3º, 7º, 14º e 21º dias e no grupo de células provenientes de ratas acíclicas com 24 meses no término do 3º, 7º, 14º, 21º e 28º dias.

O grupo de 12 meses apresentou, no 7º dia experimental, aumento significativo na atividade da FAL no grupo de células cultivadas no meio de crescimento com OT em relação às cultivadas no MC e MOO (Fig. 9). Outras diferenças são encontradas somente no 21º dia, onde a atividade específica da FAL foi maior no grupo meio osteogênico com OT (MOO) em comparação aos demais grupos. Observa-se também

que a administração de OT no meio de crescimento desencadeou diminuição significativa na atividade da enzima FAL.

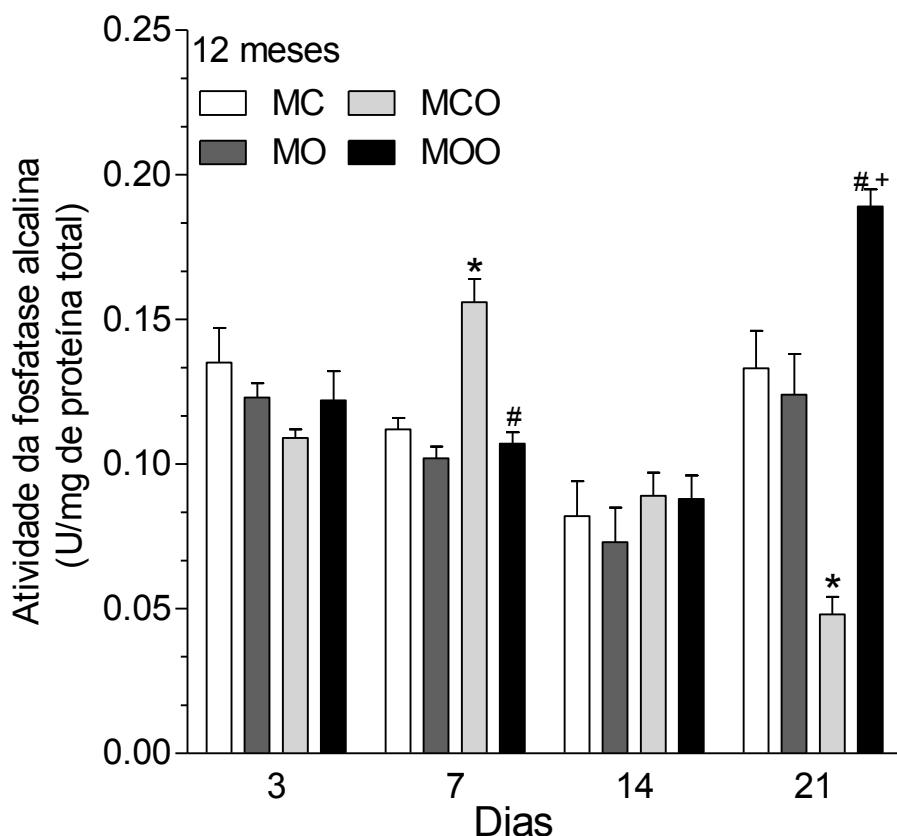


Fig. 9: Atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 12 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

O cultivo de CTMs provenientes de ratas acíclicas com 24 meses, no 3º dia em meio osteogênico com (MOO) ou sem (MO) adição de OT, apresentou atividade enzimática menor (Fig. 10). Destacamos que as células do MO apresentaram menor atividade durante todo o período de análise. Entretanto, no meio osteogênico com adição de OT (MOO) ocorreu aumento gradativo na atividade enzimática até o 21º dia, com diminuição significativa no 28º dia. Nos grupos MC e MCO a atividade específica de FAL apresenta diminuição gradual a partir do 14º dia.

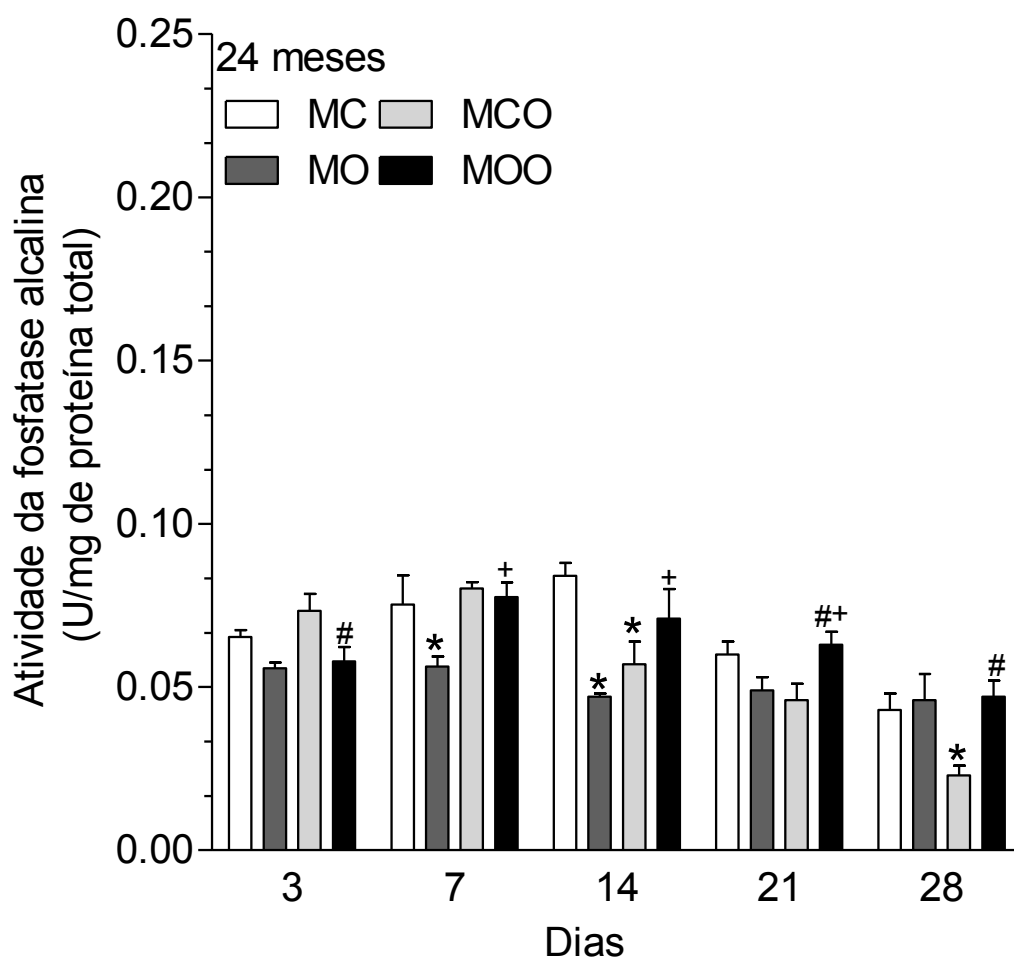


Fig. 10: Atividade da fosfatase alcalina em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 24 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

Quando observamos à escala de atividade de FAL em ambas as idades experimentais, verificamos que o grupo de células de ratas com 24 meses apresenta menor atividade desta enzima quando comparado com o grupo de células de ratas com 12 meses, em cada sub-grupo de acordo com o dia experimental.

4.4 - Mineralização biológica

Para constatarmos a real indução da diferenciação de CTMs em osteoblastos maduros, o método utilizado foi à coloração com vermelho de Alizarina que cora em

vermelho, sítios de mineralização. No grupo de células provenientes de ratas cíclicas de 12 meses essa coloração foi realizada no 14º, 17º e 21º dias. No grupo de células provenientes de ratas acíclicas de 24 meses a coloração foi realizada nestes mesmos dias, incluindo um dia a mais, o 28º dia.

No grupo de células de ratas cíclicas com 12 meses, a mineralização foi detectada a partir do 17º dia no meio osteogênico sem OT (MO) (Fig. 11 A e B). Entretanto, a adição de OT no meio osteogênico (MOO) propiciou mineralização biológica a partir do 14º dia.

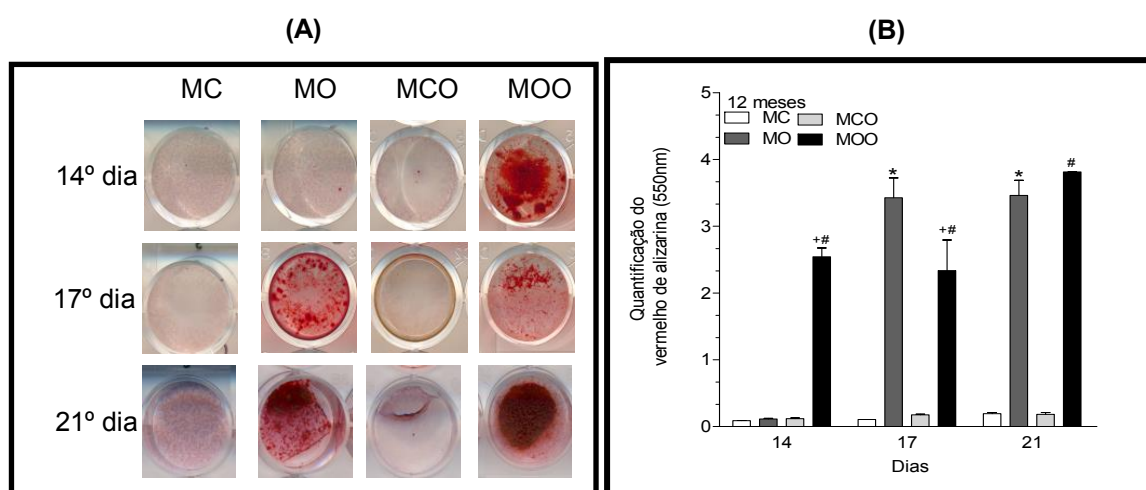


Fig. 11: (A) Mineralização biológica do grupo 12 meses nos 14º, 17º e 21º dias experimentais. Imagens capturadas através de scanner. (B) Quantificação da mineralização pela técnica do vermelho de alizarina em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 12 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

No grupo de células provenientes de ratas acíclicas com 24 meses, a mineralização ocorreu somente no grupo de células cultivadas em meio osteogênico que recebeu OT (MOO). Destacamos que a mineralização foi detectada a partir do 17º dia e não no 14º dia, como ocorreu na cultura de células provenientes de animais com 12 meses. Portanto, a partir do 17º dia as células do meio osteogênico tratadas

com OT (MOO) apresentam mineralização, esta que se evidencia também no 21º e 28º dia de experimentos. O grupo meio osteogênico sem OT (MO) não apresentou mineralização em nenhum dos dias experimentais (Fig. 12 A e B).

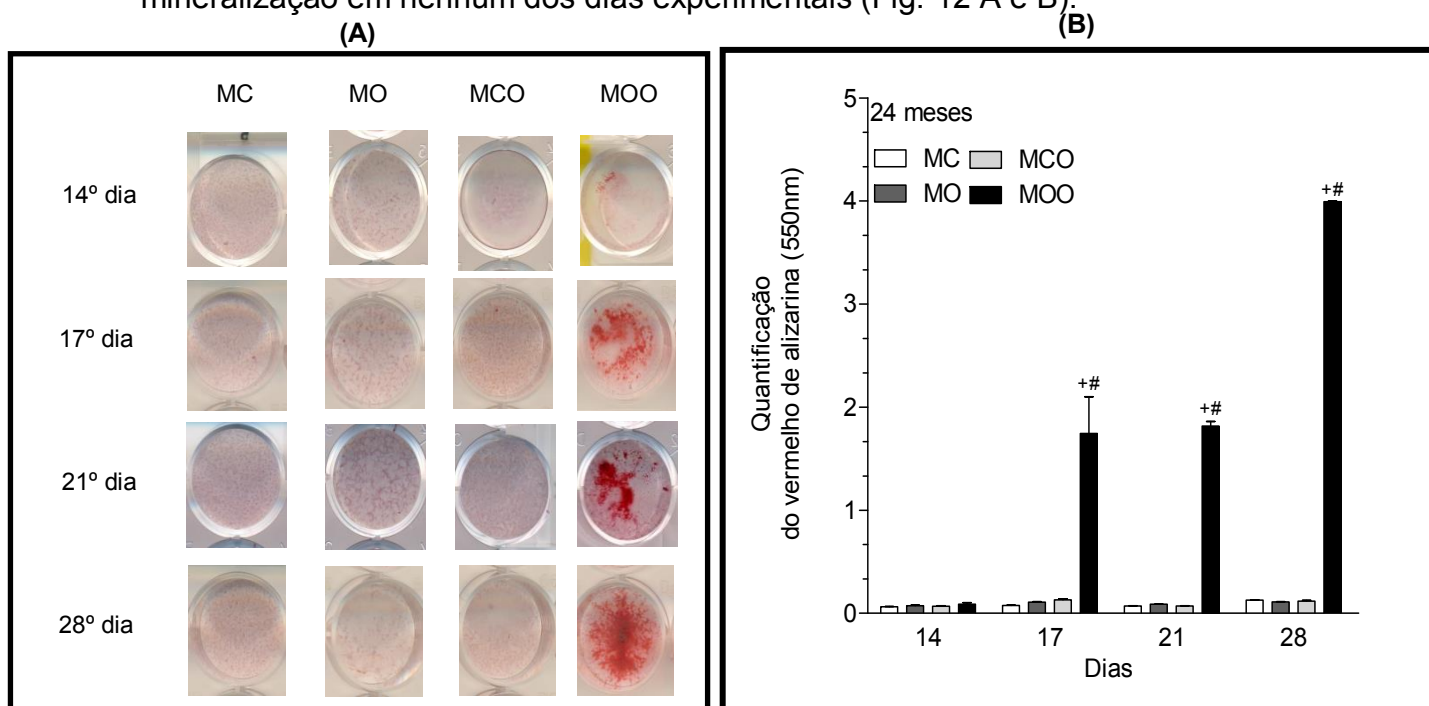


Fig. 12: (A) Mineralização biológica do grupo 24 meses nos 14º, 17º, 21º e 28º dias experimentais. Imagens capturadas através de scanner. (B) Quantificação da mineralização pela técnica do vermelho de alizarina em culturas de CTMs da medula óssea de ratas com 24 meses distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

4.4 - Detecção de adipócitos

Pela não constatação de mineralização do grupo MO, no grupo de 24 meses, foi realizada a detecção de adipócitos através da coloração com *Oil Red O*, corante que tem afinidade por precipitações de triacilgliceróis, no 28º dia experimental. A técnica consiste em fixação da cultura com formalina a 10% por 30 min, seguindo de lavagens com água e incubação com isopropanol 60%. No tempo de incubação prepara-se a solução de trabalho *Oil Red O*, que foi diluído em isopropanol (0,3% de

Oil Red O) e posteriormente é diluído em água destilada (3:5) formando o reagente de trabalho. Foi realizada incubação de 15 minutos e lavagens para retirada do excesso de corante, foi realizada contra coloração com Hematoxilina filtrada. Após lavagem com água foi feita a captura de imagens com câmera digital acoplada a microscópio óptico de luz invertida,

As vesículas intracelulares de lipídios em adipócitos maduros apresentam-se como manchas vermelhas brilhantes enquanto os núcleos corados aparecem em azul violeta.

Podemos observar no grupo MO algumas vesículas intracelulares de lipídios, porém a presença destas é mais evidente no grupo MOO (Fig. 13).

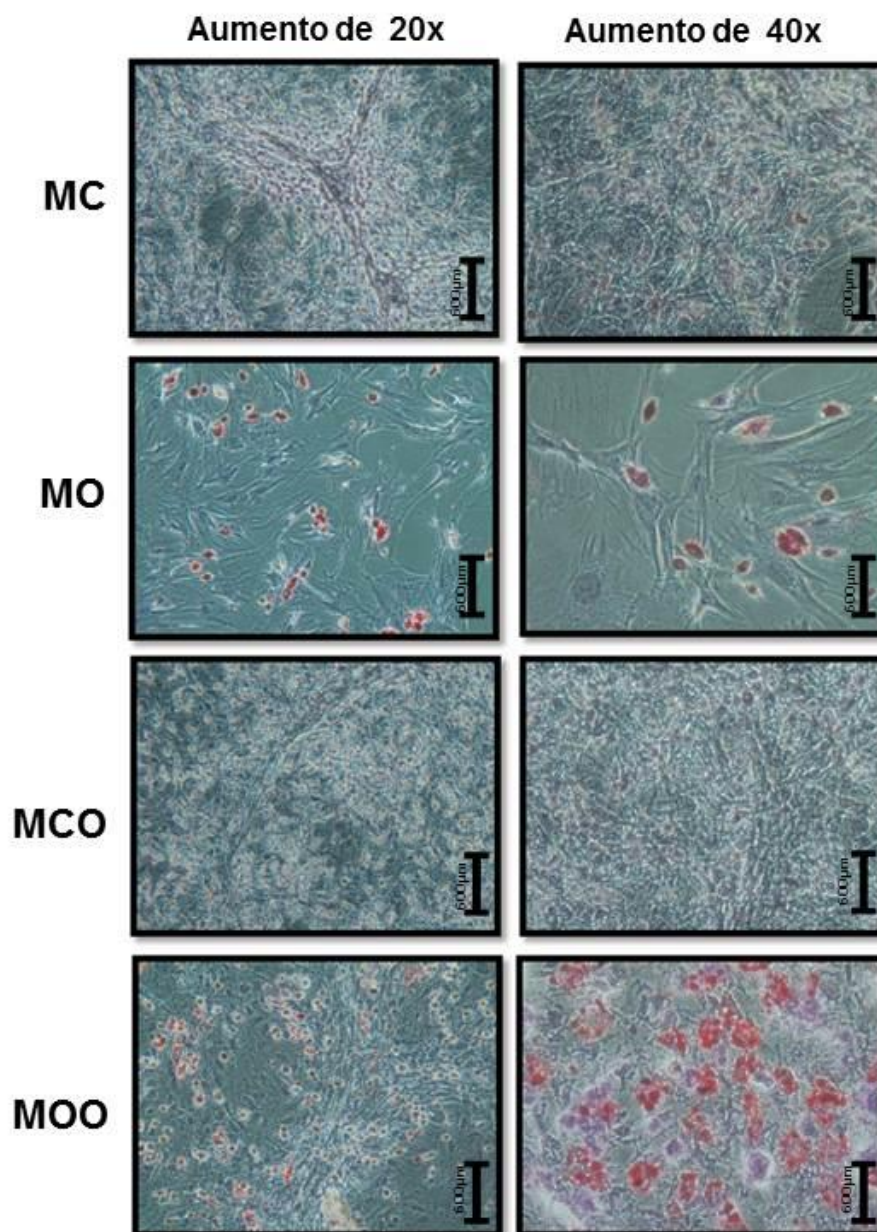


Fig. 13: Coloração com *Oil Red O* aos 28 dias do grupo 24 meses evidenciando em vermelho as vesículas de triacilgliceróis. Imagens capturadas em microscópio de luz invertida em dois aumentos (20x e 40x).

4.5 - Prostaglandina E₂

Análise da concentração de prostaglandina E₂ (PGE₂) foi determinada no sobrenadante proveniente dos 7º e 14º dias experimentais da cultura de CTMs dos animais de 12 e 24 meses, através de ELISA.

Comparados com MC, MO mostrou aumento significativo de PGE₂, tanto no 7º tanto no 14º dia no grupo de 12 meses [Figura 14 (A)]. No grupo de 24 meses o grupo MO só demonstrou aumento em relação a MC no 7º dia [Figura 14 (B)]. Entretanto MOO apresentou diminuição nas concentrações de PGE₂ em comparação ao grupo MO em ambas idades nos dias analisados.

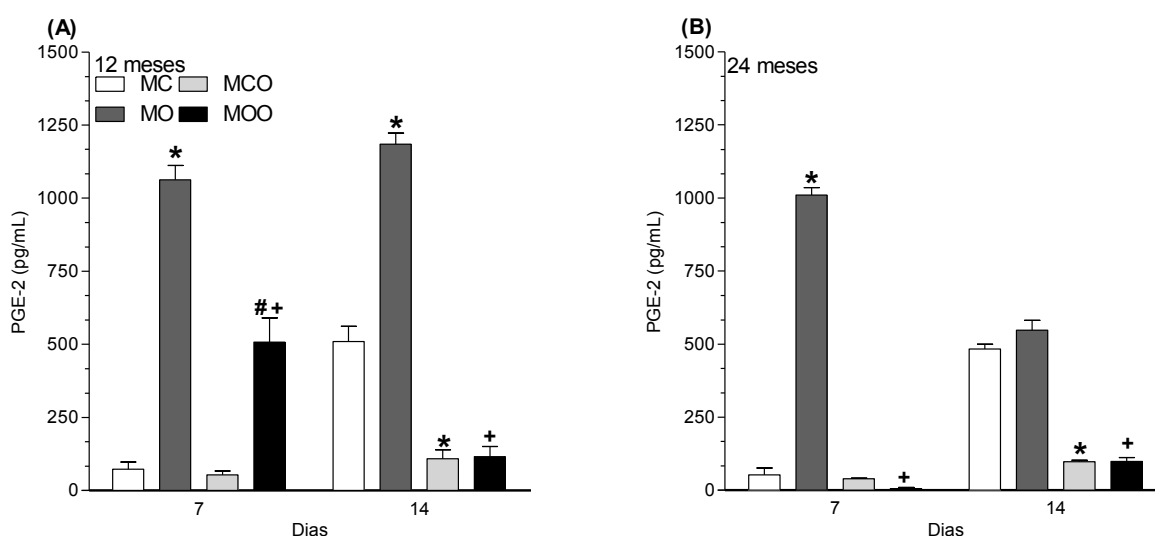


Fig. 14. Determinação da concentração de prostaglandina E₂, por ELISA, no sobrenadante de culturas de CTMs de ratas de 12 meses (A) e 24 meses (B) no 7º e 14º dias experimentais distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). *p<0,05 vs MC; #p< 0,05 vs MCO; +p<0,05 vs MO. Resultados expressos em Média ± EPM.

4.6 - Real time PCR

A expressão gênica foi realizada através da técnica de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR). Os alvos avaliados foram ocitocina (*Oxt*), receptor de ocitocina (*Oxtr*), osterix (*Osx*), Sialoproteína óssea (*Bsp*), osteopontina (*Opn*), osteocalcina (*Ocn*) e proteína morfogênica óssea tipo 2 (*Bmp2*). Os experimentos foram realizados com amostras coletadas no 14º dia experimental de todos os grupos experimentais. O controle endógeno utilizado foi β -actina e o grupo MC de cada idade foi a amostra calibradora.

No grupo MO, das células provenientes dos animais de 12 meses, ocitocina foi mais expressa em relação ao seu controle (MC) e o tratamento com ocitocina amplificou essa expressão no grupo osteogênico (MOO) [Figura 15 (A)]. Já no grupo 24 meses, OT foi expressa apenas no grupo MOO [Figura 15 (B)].

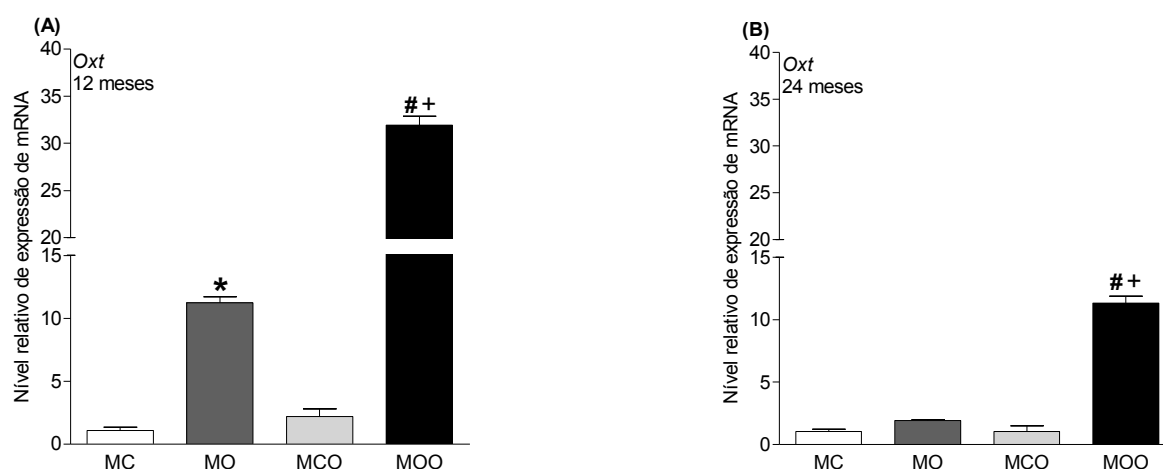


Fig. 15. Expressão gênica de ocitocina (*Oxt*) no 14º dia experimental da cultura de CTMs da medula óssea de ratas de 12 meses (A) e 24 meses (B) distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM

Receptor de ocitocina (OTR) foi expresso no grupo MOO das células provenientes dos animais de 12 meses [Figura 16 (A)], já no grupo 24 meses não foi detectada a expressão gênica de OTR [Figura 16 (B)].

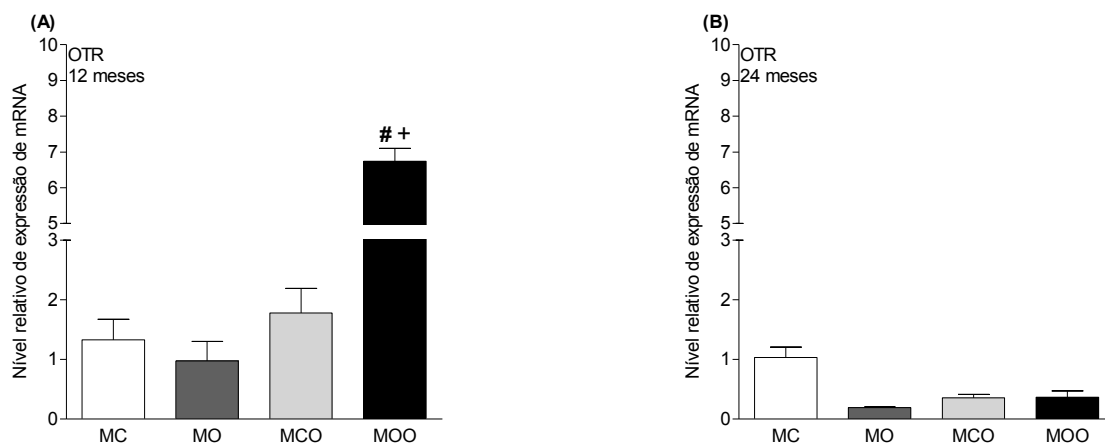


Fig. 16. Expressão gênica do receptor de ocitocina (*Oxtr*) no 14º dia experimental da cultura de CTMs de ratas de 12 meses (A) e 24 meses (B) distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

Para analisar os estágios finais do processo de diferenciação osteoblástica, verificamos a expressão de mRNA do Osterix (*Osx*). O grupo 12 meses demonstrou aumento significativo na expressão gênica deste marcador, nos grupos osteogênicos (MO e MOO), e esse aumento foi mais evidente no grupo MOO [Figura 17 (A)]. No grupo de células provenientes dos animais de 24 meses não houve diferenças significante a expressão deste marcador [Figura 17 (B)].

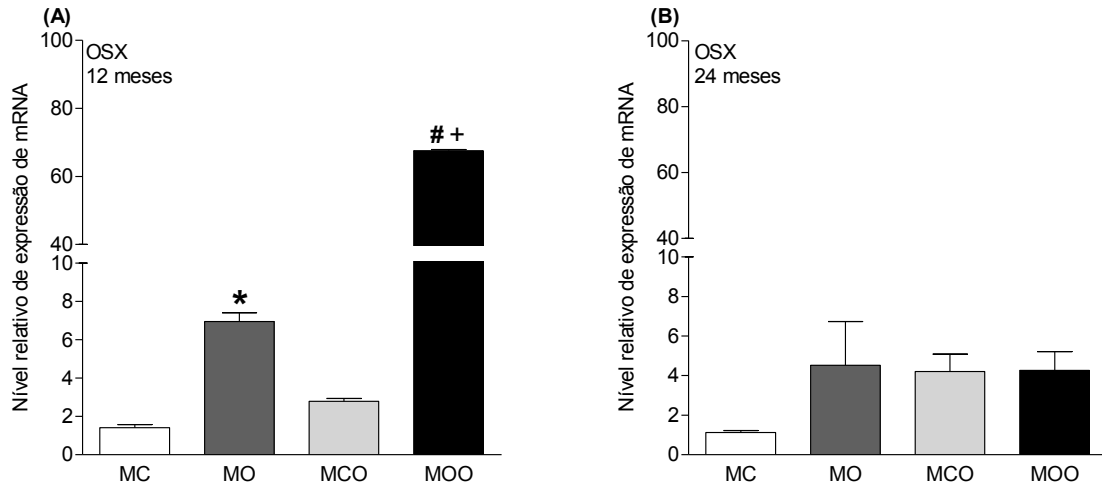


Fig. 17. Expressão gênica de osterix (*Osx*) no 14^o dia experimental da cultura de CTMs de ratas de 12 meses (A) e 24 meses (B) distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

Durante o processo de mineralização as proteínas de matriz são expressas pela maquinaria osteoblástica e o aumento da concentração dessas proteínas se traduz em melhor qualidade de osso orgânico formado (LIAN & STEIN, 1995). Portanto, faz-se necessário a análise dessas proteínas como marcadores do processo de diferenciação.

Neste estudo, a sialoproteína óssea (*Bsp*), osteopontina (*Opn*) e osteocalcina (*Ocn*) demonstraram aumento exponencial na expressão gênica em ambas idades nos grupos MOO em comparação aos grupos MO, apesar de a resposta ao estímulo com OT ter ocorrido em menores escalas no grupo de células provenientes de animais de 24 meses, quando comparado as de 12 meses (Figura 18). A expressão de proteína morfogênica óssea tipo 2 (*Bmp2*) foi maior no grupo MO em comparação a MC e o tratamento com OT amplificou essa resposta (MOO) no grupo de células provenientes dos animais de 12 meses [Figura 18 (G)]. No grupo 24 meses os grupos osteogênicos apresentaram aumento em relação ao controle, porém o grupo MO apresentou maiores expressões de *Bmp2* quando comparado a MOO [Figura 18 (H)].

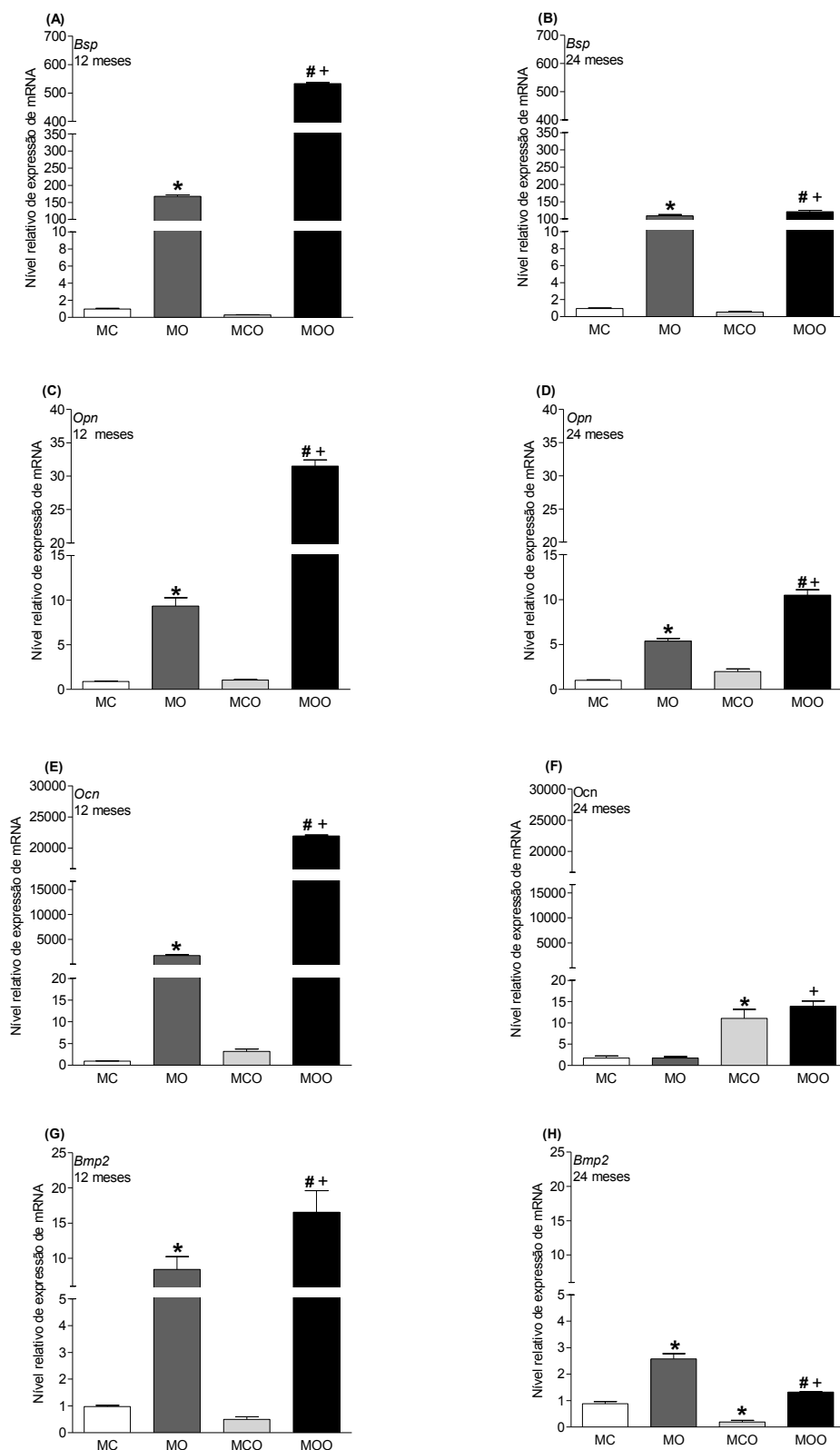


Fig. 18. Expressão gênica das proteínas de matriz no 14^o dia experimental. Expressão de sialoproteína óssea (*Bsp*), osteopontina (*Opn*), osteocalcina (*Ocn*) e proteína morfogênica óssea (*Bmp2*) na cultura de CTMs de ratas de 12 meses (A, C, E, G) e 24 meses (B, D, F, H) distribuídas nos grupos meio de crescimento (MC) e osteogênico (MO) com adição de

ocitocina (MCO; MOO). * $p < 0,05$ vs MC; # $p < 0,05$ vs MCO; + $p < 0,05$ vs MO. Resultados expressos em Média \pm EPM.

4.7 - Ocitocina plasmática

A determinação das concentrações plasmáticas de OT tem sido sugerida como uma nova proposta no pré-diagnóstico de osteoporose (ELABD *et al.*, 2008). Investigamos as concentrações deste hormônio nos animais doadores de ambas as idades. O grupo de animais senis de 24 meses apresentou concentrações plasmáticas de OT maiores quando comparadas aos animais adultos de 12 meses (Figura 19).

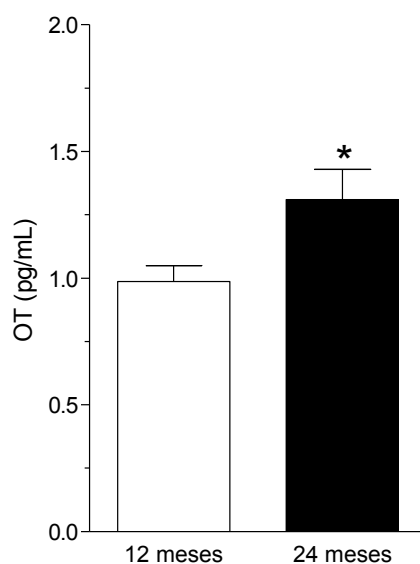


Fig. 19. Concentração plasmática de ocitocina (OT) de ratas de 12 meses e 24 meses. * $p < 0,05$ vs 12 meses. Resultados expressos em Média \pm EPM (*t-test*)

DISCUSSÃO

5 – DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo sugerem ação importante da OT no processo de mineralização biológica realizada pelos osteoblastos, principalmente em células diferenciadas das CTMs provenientes de ratas acíclicas com 24 meses. Nas células provenientes de ratas cíclicas, com 12 meses, a OT antecipa o processo de mineralização biológica.

OT periférica foi evidenciada como importante hormônio para a homeostase do tecido ósseo, devido à suas ações anabólicas. Receptores de ocitocina (OTR) foram encontrados em osteoblastos e sua interação com ligante está intimamente relacionada com a promoção do fenótipo de osteoblasto mineralizado (TAMMA *et al.*, 2009). OT pode ser produzida pelos osteoblastos da medula óssea em resposta ao estímulo positivo do estrógeno (E_2), estimulando a formação óssea, por vias autócrinas e parácrinas (COLAIANNI *et al.*, 2011; COLAIANNI *et al.*, 2012). Estudos como o de Tamma e colaboradores (2009) evidenciam efeitos positivos da OT no metabolismo ósseo de fêmeas jovens e resultados de nosso laboratório, demonstram diferença na resposta ao estímulo da OT de acordo com a idade do animal (COLLI *et al.*, 2012) o que está intimamente relacionado com as concentrações de E_2 circulantes.

O E_2 atua tanto *in vivo* quanto *in vitro* no controle da atividade osteoblástica (HOLZER *et al.*, 2002). Nos osteoblastos, o esteróide ovariano estimula a expressão dos genes que codificam a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina, osteonectina e osteoprotegerina (ERNST *et al.*, 1988; ROBINSON *et al.*, 1997; QU *et al.*, 1998). Dessa forma, o E_2 é importante para a síntese e mineralização da matriz óssea (TOMKINSON *et al.*, 1998; BLAND, 2000) além da modulação exercida na

síntese de OT (COLAIANNI *et al.*, 2011). Essas informações são pertinentes ao analisarmos todos os resultados, devido às diferenças entre os animais experimentais, onde há menor concentração de E₂ circulante nos animais de 24 meses (9,3 pg/mL), quando comparados aos animais de 12 meses (227 pg/mL) (COLLI, 2012).

Foi analisada a expressão gênica de *Oxt* em todos os cultivos celulares, sendo o aumento detectado, no grupo 12 meses, nos meios osteogênicos (MO e MOO) em relação aos seus controles (MC e MCO) (Fig.9). Entretanto, nas células dos animais de 24 meses foi possível observar a expressão de OT no grupo MOO, sugerindo uma regulação positiva promovida pela adição de ocitocina no meio.

A expressão de *Oxtr* (Fig.10) foi detectada apenas no grupo osteogênico tratado com OT nas células de animais adultos, não sendo evidenciada em nenhum grupo das células provenientes de ratas senis, sugerindo diminuição à capacidade de resposta a estímulos externos que é característica do envelhecimento (SETHE *et al.*, 2006). Essa característica de menor responsividade ao estímulo da OT no grupo de células de ratas senis se repete em vários resultados.

Nesse estudo, a análise dos resultados obtidos referentes à quantidade de células viáveis sugere que não há associação da idade do animal doador e aumento na quantidade de células (Fig. 5 e 6). Entretanto, estando acíclicos os animais doadores com 24 meses há alteração na secreção e também na ritimicidade da secreção do esteróides. Esse padrão é diferente do que ocorre nos animais cíclicos (ratas com 12 meses).

Com a evolução dos dias experimentais foi possível observar nas células de ratas com 12 meses, através da técnica da redução do MTT, aumento gradual da quantidade de células até o 14º dia em todos os grupos, exceto no grupo MOO, onde

ocorreu diminuição, assim como os grupos tratados com meio osteogênico em relação ao seus controles, assim como descrito por Lian e Stein (1995) que demonstram que conforme ocorre a diferenciação, as quantidades de células viáveis diminuem e no 14º dia observamos mineralização no grupo MOO, e no 17º no grupo MO.

O cultivo das CTMs oriundas de ratas acíclicas com 24 meses evidenciou relação tempo dependente no aumento da quantidade de células em todos os grupos experimentais (Fig. 5 e 6). A OT adicionada ao grupo controle (MCO) promoveu aumento significativo nesta taxa em comparação ao meio sem OT (MC), sugerindo atuação do hormônio no processo de aumento de quantidade de células, no grupo de CTMs de animais velhos, assim como descrito por Petersson e colaboradores (2002). Entretanto, nos grupos de células mantidas em meio osteogênico (MO) com ou sem adição de OT, pode ser verificado menor quantidade celular quando comparado com os grupos do meio de crescimento. Possivelmente pelo fato do início da diferenciação (LIAN; STEIN, 1995), mesmo no grupo MO, onde não foi constatado mineralização, que é marcador dos estágios finais da diferenciação, sugerimos que as células deste grupo, tenham se mantido em fenótipo pré-osteoblastico.

Esses resultados são interessantes, pois ao analisarmos o perfil de quantidade de células viáveis das células oriundas de animais com 12 meses (Fig.5) e de animais com 24 meses (Fig.6), mantidas em meio osteogênico, é possível verificar aumento pequeno e gradativo na cultura de células de animais mais velhos. Esse padrão é independente da adição de OT e não foi observado na cultura das células dos animais com 12 meses. É de conhecimento que a quantidade de células viáveis está relacionada com o número de cristas mitocondriais e quantidade da enzima succinato desidrogenase para essa análise. Essa enzima localiza-se na membrana interna das

cristas mitocondriais e faz a conversão do MTT em cristais de formazan. Desta forma, quanto maior for o número de cristas mitocondriais, maior a quantidade dessa enzima (MENZIES *et al.*, 2002). Não verificamos diferença na redução do MTT entre as culturas de células dos meios osteogênicos (MO e MOO). Portanto, no cultivo de CTMs provenientes de ratas velhas a quantidade celular não foi alterada pela adição de OT no meio osteogênico.

A fosfatase alcalina é marcador dos estágios anteriores ao processo de mineralização, sendo um dos resultados de seu aumento a hidrólise do β -glicerofosfato liberando fosfato inorgânico para mineralização e quando há diferenciação há diminuição na quantidade celular (LIAN; STEIN, 1995). Isto pode ser observado no grupo das células dos animais com 12 meses, principalmente no 14º dia, porém o aumento de FAL não foi evidenciado, sendo possível este ter ocorrido no intervalo dos dias experimentais 7º e 14º. Com base nos dados constata-se que a OT aplicada ao meio osteogênico promoveu aceleração na mineralização, que no meio osteogênico sem esse tratamento ocorreu somente no 17º dia.

No grupo de células provenientes de animais com 24 meses a análise da atividade da FAL das células cultivadas em MOO, evidencia aumento dessa atividade no período entre o 14º e 21º dias, pois estas células apresentaram mineralização biológica a partir do 17º dia experimental. A mineralização promovida por OT é condizente com as ações anabólicas relatadas para este hormônio em ratos jovens (ELABD *et al.*, 2007; 2008) e senis (COLLI *et al.*, 2012).

Como evidenciado, a mineralização biológica ocorreu nos dois grupos de idades experimentais, inferindo que o aumento de fosfatase alcalina, se existente, ocorreu nos intervalos experimentais dos dias analisados. Porém, existem estudos que demonstram mineralização biológica independente da ação da FAL, esses

estudos evidenciam a atuação da pirofosfatase (FERREIRA *et al.*, 2013). Futuros estudos com essa enzima e outros marcadores são necessários com células provenientes de animais nessas idades que podem apresentar uma quantidade de pirofosfato endógeno.

Copland e colaboradores (1999) demonstraram que o tratamento com 100 nM de OT foi capaz de induzir aumento nas concentrações de PGE₂ em osteoblastos diferenciados e em CTMs. Neste estudo demonstramos que PGE₂ aumentou nos grupos MO comparado com os grupos MC nos 7º e 14º dias, no grupo de 12 meses, e apenas no 7º dia no grupo de 24 meses. Entretanto MOO apresentou diminuição em comparação aos grupos MO em ambas as idades e nos dias experimentais analisados. Concluímos que nos grupos MOO a adição de OT pode ter promovido o aumento de PGE₂ nos dias iniciais do processo de diferenciação, já que a OT atua por esse mecanismo e que foi capaz de induzir a mineralização no 14º dia (12 meses) e no 17º dia (24 meses). As células dos grupos de 12 e 24 meses, apresentaram diferentes perfis na concentração de PGE₂, como diminuição e aumento, respectivamente, nos grupos MOO durante o período analisado. Isso evidencia dano nos mecanismos de síntese de PGE₂ nas células provenientes dos animais senis, durante o envelhecimento.

Para a diferenciação de CTMs em osteoprogenitores há a participação de diversos fatores de transcrição como *Osterix* sendo fator de transcrição que participa dos estágios finais da diferenciação osteoblástica (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Esse fator está aumentado nos grupos osteogênicos das células dos animais de 12 meses principalmente no grupo com adição de OT (MOO), indicando efeito da OT de *up-regulation* deste marcador, o que pode explicar a antecipação do processo de mineralização ocorrido neste grupo experimental. Já no grupo de células provenientes

de animais de 24 meses, a expressão deste marcador não foi evidenciada em nenhum grupo, sugerindo que as células que mineralizaram aos 17 dias, estejam sendo estimuladas à diferenciação de forma independente a *Osx* (Fig.17).

Vários estudos indicam que durante o envelhecimento as CTMs perdem o potencial de diferenciação, inclusive em osteoblastos (LIAN; STEIN, 1995; SETHE *et al.*, 2006; ASSUMDA; CHASE, 2011; KIM *et al.*, 2012). Na presença do meio osteogênico as células advindas de ratas senis, não demonstraram perfil de osteoblastos, tanto pela não mineralização, tanto pela não expressão das proteínas de matriz como osteopontina e osteocalcina, que é uma proteína marcadora dos estágios finais da diferenciação osteoblastica (NAKASHIMA *et al.*, 2002). Porém a adição de OT (MOO) foi capaz de promover a mineralização e aumento na expressão das proteínas de matriz, indicando ação anabólica crucial deste hormônio nessas células derivadas de animais senis (Fig. 18).

Nas células provenientes dos animais de 12 meses, OT antecipou o processo de mineralização biológica, que ocorreu no 14º dia após adição dos indutores osteogênicos. Já no grupo osteogênico sem adição de OT (MO), a mineralização foi evidenciada apenas no 17º dia. A expressão gênica das proteínas de matriz foi aumentada no grupo MOO, em comparação a MO (Fig. 18) demonstrando que mesmo com a antecipação da mineralização, a qualidade da matriz formada é melhor, pelo aumento das proteínas de matriz (LIAN; STEIN, 1995).

Quando analisamos a expressão gênica das proteínas de matriz não colagenosas, comparando as taxas de expressão entre as idades experimentais, observamos que a expressão ocorre em menores escalas no grupo de células advindas de animais senis, evidenciando o comprometimento da maquinaria celular

que as células deste grupo apresentou devido a idade do organismo doador (ASUMDA; CHASE, 2011; KASSEM; MARRIE, 2011).

Dentre as proteínas de matriz que participam do processo de diferenciação, BMP2 é essencial para a maturação osteoblástica (CANALIS *et al.*, 2003) e diminuição na expressão desta proteína está relacionada ao envelhecimento (ROSS *et al.*, 2000). No grupo de células de animais de 24 meses, essa proteína foi menos expressa no grupo MOO quando comparado a MO, porém a mineralização ocorreu apenas no grupo MOO, demonstrando atuação da OT independente da expressão desta proteína. Já no grupo das células provenientes dos animais de 12 meses, a OT amplificou a expressão de *Bmp2* o que demonstra melhora no processo de maturação osteoblástica, promovido pela OT (Fig.18 G e H).

A atuação da OT como possível indutor de diferenciação de CTMs em osteoblastos (ELABD *et al.*, 2008) pode ser constatado em nosso trabalho, pois nos grupos com meio osteogênico que receberam o tratamento com OT, tanto de 12 quanto no grupo 24 meses, ocorreu a mineralização que é evidenciada somente quando temos osteoblastos maduros (LIAN; STEIN, 1995). Esse padrão de resposta foi influenciado pela idade dos animais doadores, pois na cultura de células provenientes de animais com 12 meses foi detectado taxa de mineralização no 14º dia e na cultura das células dos animais com 24 meses, foi verificado taxa de mineralização no 17º dia. Além disso, nossos resultados sugerem dependência de OT para a mineralização das células de animais senis.

Com a não ocorrência da mineralização no grupo das células de animais com 24 meses, mantidas por 28 dias em MO, decidimos realizar a coloração com *Oil Red O*, que cora vesículas intracelulares de triacilgliceróis (Fig.13). Foi verificada a ocorrência de vesículas lipídicas nas células cultivadas no MO e MOO, em diferentes

quantidades. Esse resultado pode ser decorrente da característica destas células provenientes de ratas com 24 meses. Sabe-se que o potencial adipogênico sofre alterações após o envelhecimento em vários tecidos, inclusive na medula óssea, e que esse potencial de diferenciação das CTMs em adipócitos possivelmente está mais relacionado ao metabolismo e sinais hormonais do que a propriedades das CTMs (KNAWA, *et al.* 2013). E com o envelhecimento o equilíbrio de diferenciação das CTMs é aumentado a favor à adipogênese (BETHEL *et al.*, 2013). Porém nossos resultados de mineralização e expressão gênica de proteínas de matriz no grupo MOO demonstram que os estímulo de OT foi capaz de induzir a osteogênese, mesmo este grupo apresentando maior marcação de triacilgliceróis.

Elabd e colaboradores (2008) apresentam conjunto de resultados que concluem que as concentrações de OT plasmática pode ser marcador de dano ósseo, onde menores concentrações de OT são encontradas em fêmeas Wistar de 11 meses após ovariectomia. Nossos resultados demonstraram que com o envelhecimento ocorre aumento nas concentrações de OT no plasma, o que não alterou de maneira benéfica o metabolismo das CTMs provenientes dos animais de 24 meses, onde não foi constatado mineralização biológica no grupo MO, concluindo que a OT plasmática é dependente da idade do animal e que pode não estar relacionada com o déficit no metabolismo ósseo que acompanha o envelhecimento. Esses dados corroboram com dados anteriores de nosso laboratório (COLLI, 2012), onde maiores concentrações de OT são encontradas nos animais de 24 meses, e esses animais apresentam menor formação óssea quando comparados aos animais de 12 meses, sem administração de OT exógena.

CONCLUSÃO

6- CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo demonstram ação anabólica da ocitocina no processo de diferenciação de osteoblastos provenientes de ratas Wistar de 12 e 24 meses, chamando a atenção nas ações da OT estimulando as células de animais com esqueleto maduro a aumento do conteúdo ósseo, constatados pela mineralização e proteínas de matriz. E também para o fato de induzir a diferenciação de osteoblastos para fenótipo mineralizante nas células dos animais senis. Nossos resultados reafirmam a OT como promessa de terapia potencial para controle da osteoporose, porém investigações dos mecanismos de sinalização celular são necessários, para elucidar os efeitos da OT na diferenciação de osteoblastos provenientes de organismos naturalmente envelhecidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

AMADEI, S.U.; SILVEIRA, V.A.S.; PEREIRA, A.C.; CARVALHO, Y.R.; ROCHA, R.F. 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.

AMLING, M.; POGODA, P.; BEIL, F.T.; SCHILLING, A.F.; HOLZMANN, T.; PRIEMEL, M.; BLICHARSKI, D.; CATALÀ-LEHNEN, P.; RUEGER, J.M.; DUCY, P.; KARSENTY, G. Central control of bone mass: brainstorming of the skeleton. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v.496,p.85-94, 2001.

ASUMDA, F. Z.; CHASE, P. B. Age-related changes in rat bone-marrow mesenchymal stem cell plasticity. **BMC Cell Biol.**, v. 12, p. 44, Oct. 2011.

BERANGER, G.E.; PISANI, D.F.; CASTEL, J.; DJEDAINI, M.; BATTAGLIA, S.; AMIAUD, J.; BOUKHECHBA, F.; AILHAUD, G.; MICHIELS, J.F.; HEYMANN, D.; LUQUET, S.; AMRI, E.Z. Oxytocin reverses ovariectomy-induced osteopenia and body fat gain. **Endocrinology**,v.155, n.4, p.1340-1352, Apr. 2014.

BARLOW, D.H.; BOUCHARD, P.; BRANDI, M.L.; EVERS, J.L.; GLASIER, A.; NEGRI, E.; PAPAPOULOS, S.E.; RALSTON, S.H.; RIZZOLI, R.; BAIRD, D.T.; COLLINS, J.; BENAGIANO, G.; CROSIGNANI, P.G.; LA VECCHIA, C.; VOLPE, A.; COLLINS, J.; CROSIGNANI, P.G. Bone fractures after menopause. **Hum. Reprod. Update.**, v. 16, n.6, p. 761-773, Nov 2010.

BETHEL, M.; CHITTETI, B.R.; SROUR, E.F.; KACENA, M.A. The changing balance between osteoblastogenesis and adipogenesis in aging and its impact on hematopoiesis. **Curr. Osteoporos. Rep.**, v.11, n 2, p.99-106, Jun. 2013.

BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. **Clin. Sci.**, v.98, n.2, p.217-240, Feb. 2000.

CANALIS, E.; ECONOMIDES, A. N.; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. **Endocr. Rev.**, v. 24, n. 2, p. 218-235, Apr. 2003.

CARDOSO NETO, C.; FRANCO, M.; CUNHA, M.S.C.A.; MIYASAKA, C.K. Efeitos da ovariectomia experimental no metabolismo ósseo de ratas wistar adultas: um modelo para estudo da osteoporose. **Rev. Cienc. Med. Biol.**, v.5, n.3, p.231-238, Dec. 2006.

CLOWES, J.A.; RIGGS, B.L.; KHOSLA, S. The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. **Immunol. Rev.**, v.208, p.207–227, Dec. 2005.

COLAIANNI, G.; DI BENEDETTO, A.; ZHU, L.L.; TAMMA, R.; LI, J.; GRECO, G.; PENG, Y.; DELL'ENDICE, S.; ZHU, G.; CUSCITO, C.; GRANO, M.; COLUCCI, S.; IQBAL, J.; YUEN, T.; SUN, L.; ZAIDI, M.; ZALLONE, A. Regulated production of the pituitary hormone oxytocin from murine and human osteoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.411, n.3, p. 512-515, Aug. 2011.

COLLI, V.C. **Análise da ação da ocitocina sobre a remodelação óssea alveolar em ratas wistar de 12, 18 e 24 meses.** 2012.70p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

COLLI, V.C.; OKAMOTO, R.; SPRITZER, P.M.; DORNELLES, R.C. Oxytocin promotes bone formation during the alveolar healing process in old acyclic female rats. **Arch. Oral Biol.**, v.57, n.9, p. 1290-1297, Apr. 2012.

COLUCCI, S.; COLAIANNI, G.; MORI, G.; GRANO, M.; ZALLONE, A. Human osteoclasts express oxytocin receptor. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.297, n.3, p.442-445, Sep. 2002.

COPLAND, J.A.; IVES, K.L.; SIMMONS, D.J.; SOLOFF, M.S. Functional oxytocin receptors discovered in human osteoblasts. **Endocrinology**, v.140, n.9, p. 4371-4374, Sep. 1999.

CROWLEY, W. R.; ARMSTRONG, W. E. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. **Endocrine Rev.** v.13, n.1, p.33-65, Feb. 1992.

DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A.; TUCK, S.P.; VARANASI, S.S. The cell biology of bone metabolism. **J. Clin. Pathol.**, v.61, n.5, p.577-587, May 2008.

DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V.; RIDALL, A.L.; KARSENTY, G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**, v.89, n.5, p.747-754, May 1997.

ELABD, S.K.; SABRY, I.; HASSAN, W.B.; NOUR, H.; ZAKY, K. Possible neuroendocrine role for oxytocin in bone remodeling. **Endocr. Regul.**, v.41, n.4, p.131–141, Nov. 2007.

ELABD, C.; BASILLAIS, A.; BEAUPIED, H.; BREUIL, V.; WAGNER, N.; SCHEIDELER, M.; ZARAGOSI, L.E.; MASSIÉRA, F.; LEMICHEZ, E.; TRAJANOSKI, Z.; CARLE, G.; EULLER-ZIEGLER, L.; AILHAUD, G.; BENHAMOU, C.L.; DANI, C.; AMRI, E.Z. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. **Stem Cells**, v.26, n.9, p.2399-2407, Sep. 2008.

ERNST, M.; SCHMID, C.; FROESCH, E.R. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.85, n.7, p.2307-2310, Apr.1988.

FERREIRA, E.; PORTER, R.M.; WEHLING, N.; O'SULLIVAN, R.P.; LIU, F.; BOSKEY, A.; ESTOK, D.M.; HARRIS, M.B.; VRAHAS, M.S.; EVANS, C.H.; WELLS, J.W. Inflammatory cytokines induce a unique mineralizing phenotype in mesenchymal stem cells derived from human bone marrow. **J Biol Chem**, v. 288, n. 41, p. 29494-29505, Oct. 2013.

GARCIA, C.T.S. **Influência do treinamento resistido e do raloxifeno no metabolismo ósseo de ratas wistar**. 2012. 54 f. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2012.

GIACOMINI, D.R.; MELLA, E.A.C. Reposição hormonal: vantagens e desvantagens. **Semina. Cienc. Biol. Saude**, v.27, n.1, p.71-92, Jun. 2006.

GREGORY, C. A.; GUNN, W.G.; PEISTER, A.; PROCKOP, D.J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Anal Biochem**, v. 329, n. 1, p. 77-84, Jun. 2004.

KANAWA, M.; IGARASHI, A.; RONALD, V.S.; HIGASHI, Y.; KURIHARA, H.; SUGIYAMA, M.; SASKIANTI, T.; PAN, H.; KATO, Y. Age-dependent decrease in the chondrogenic potential of human bone marrow mesenchymal stromal cells expanded with fibroblast growth factor-2. **Cytotherapy**, v.15, n.9, p 1062-1072, Sep. 2013.

KASSEM, M.; MARIE, P. J. Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. **Aging Cell**, v. 10, n. 2, p. 191-197, Apr. 2011.

KARSENTY, G. The genetic transformation of bone biology. **Genes Dev.**, v.13, n.23, p.3037-3051, Dec. 1999.

KIM, M.; KIM, C.; CHOI, Y.S.; KIM, M.; PARK, C.; SUH, Y. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: implication to age-associated bone diseases and defects. **Mech. Ageing Dev.**, v. 133, n. 5, p. 215-225, May 2012.

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.

KNOTHE-TATE, M.L.; ADAMSON, J.R.; TAMI, A.E.; BAUER, T.W. The osteocyte. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v.36, n.1, p.1-8, Jan. 2004.

KOMORI, T. Requisite roles of Runx2 and Cbfb in skeletal development. **J. Bone Miner. Metab.**, v.21, n.4, p.193-197, Apr. 2003.

KONG, Y.Y.; PENNINGER, J.M. Molecular control of bone remodeling and osteoporosis. **Exp. Gerontol.**, v.35, n.8, p.947-956, Oct. 2000.

KWAN TAT, S.; PADRINES, M.; THEOLEYRE, S.; HEYMANN, D.; FORTUN, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 15, n.1, p. 49-60, Feb. 2004.

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.

LIAN, J.B.; STEIN, G.S. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanisms mediating osteoblast growth and differentiation. **Iowa Orthop. J.**, v.15, p.118-140, 1995.

LONG, J.A.; EVANS, H.M. **The oestrus cycle in the rat and its related phenomena.** Berkeley: Univ. of California Press, 1922.

LOWRY, O.H. ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v.193, n.1, p.265-275, Nov. 1951.

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.

MANOLAGAS, S.C.; KOUSTENI, S.; JILKA, R.L. Sex steroids and bone. **Recent Prog. Horm. Res.**, v.57, p.385-409, 2002.

MARKS JUNIOR, S.C.; POPOFF, S.N. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. **Am. J. Anat.**, v.183, n.1, p.1-44, Sep. 1988.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **Br. Dent. J.**, v. 172, n. 6, p. 235-242, Mar. 1992.

MELTON, L.J. III. Who has osteoporosis? A conflict between clinical and public health perspectives. **J. Bone Miner. Res.**, v.15, n.12, p.2309-2314, Dec. 2000.

MENZIES, F.M.; COOKSON, M.R.; TAYLOR, R.W.; TURNBULL, D.M.; CHRZANOWSKA-LIGHTOWLERS, Z.M.; DONG, L.; FIGLEWICZ, D.A.; SHAW P.J. Mitochondrial dysfunction in a cell culture model of familial amyotrophic lateral sclerosis. **Brain**, v.125, p.1522-1533, 2002.

MINKIN, C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcif. Tissue Int.**, v. 34, n.3, p.285-290, May 1982.

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.

NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G.; ZHANG, Z.; DENG, J.M.; BEHRINGER, R.R.; DE CROMBRUGGHE, B. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**, v.108, n.1, p.17-29, Jan. 2002.

NAJJAR, T.; KAHN, D. Comparative study of healing and remodeling in various bones. **J. Oral Surg.**, v. 35, n. 5, p. 375-379, May 1977.

ONOE, Y.; MIYAURA, C.; ITO, M.; OHTA, H.; NOZAWA, S.; SUDA, T. Comparative effects of estrogen and raloxifene on B lymphopoiesis and bone loss induced by sex steroid deficiency in mice. **J. Bone Miner. Res.**, v.15, n.3, p.541-549, Mar. 2000.

OURSLER, M.J.; CORTESE, C.; KEETING, P.; ANDERSON, M.A.; BONDE, S.K.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T.C. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17beta-estradiol and parathyroid hormone. **Endocrinology**, v.129, n.6, p.3313-3320, Dec. 1991.

OURSLER, M.J.; PEDERSON, L.; FITZPATRICK, L.; RIGGS, B.L.; SPELSBERG, T. Human giant cell tumors of the bone (osteoclastomas) are estrogen target cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.91, n.12, p.5227–5231, Jun. 1994.

PETERSSON, M.; LAGUMDZIJA, A.; STARK, A.; BUCHT, E. Oxytocin stimulates proliferation of human osteoblast-like cells. **Peptides**, v.23, n.6, p.1121-1126, Jun. 2002.

QU, Q.; PERALA-HEAPE, M.; KAPANEN, A.; KAPANEN, A.; DAHLLUND, J.; SALO, J.; VÄÄNÄNEN, H.K.; HÄRKÖNEN, P. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. **Bone**, v.22, n.3, p.201-209, Mar. 1998.

RAISZ, L.G.; RODAN, G.A. Embryology and cellular biology of bone. In: AVIOLI, L.V., KRANE, S.M.(Ed.). **Metabolic bone disease and clinically related disorders**. 3.ed. New York: Academic Press, 1998. p.1-22.

RIGGS, B.L. Endocrine causes of age-related bone loss and osteoporosis. **Novartis Found Symp.**, v.242, p.247–259, 2002.

ROBINSON, J.A.; HARRIS, S.A.; RIGGS, B.L.; SPELBERG, T.C. Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. **Endocrinology**, v.138, n.7, p.2919-2927, Jul. 1997.

ROSS, S. E.; Hemati, N.; Longo, K.A.; Bennett, C.N.; Lucas, P.C.; Erickson, R.L.; MacDougald, O.A. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 950-953, Aug. 2000.

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.

SETHE, S.; SCUTT, A.; STOLZING, A. Aging of mesenchymal stem cells. **Ageing Res. Rev.**, v. 5, n. 1, p. 91-116, Feb. 2006.

SPELSBERG, T.C.; SUBRAMANIAM, M.; RIGGS, B.L.; KHOSLA, S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. **Mol. Endocrinol.**, v.13, n.6, p.819–828, Jun. 1999.

TAMMA, R.; COLAIANNI, G.; ZHU, L.L.; DIBENEDETTO, A.; GRECO, G.; MONTEMURRO, G.; PATANO, N.; STRIPPOLI, M.; VERGARI, R.; MANCINI, L.; COLUCCI, S.; GRANO, M.; FACCIO, R.; LIU, X.; LI, J.; USMANI, S.; BACHAR, M.; BAB, I.; NISHIMORI, K.; YOUNG, L.J.; BUETTNER, C.; IQBAL, J.; SUN, L.; ZAIDI, M.; ZALLONE, A. Oxytocin is an anabolic bone hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v.106, n.17, p.7149-7154, Apr. 2009.

TOMKINSON, A.; GEVERS, E.S.; WIT, J.M.; REEVE, J.; NOBLE, B.S. The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. **J. Bone Miner. Res.**, v.13, n.8, p.1243-1250, 1998.

VÄÄNÄNEN, K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.57, n.7, p.959-971, May 2005.

WANG, H.; CHEN, Q.; LEE, S.H.; CHOI, Y.; JOHNSON, F.B.; PIGNOLO, R.J. 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.

WATTS, N.B. Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. **Clin. Chem.**, v.45, n.8, p.1359-1368, Aug. 1999.

WEITZMANN, M.N.; PACIFICI, R. Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. **J. Clin. Invest.**, v.116, n.5, p.1186–1194, May 2006.

YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and cbfa1. **Endocr. Rev.**, v.21, n.4, p.393-411, Aug. 2000.

ZINGG, H.H.; LAPORTE, S.A. The oxytocin receptor. **Trends Endocrinol. Metab.**, v.14, n.5 , p. 222-227, Jul. 2003.

ANEXOS

ANEXO A**Parecer de aprovação do comitê de ética no uso de animais:**

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

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Atuação da ocitocina no processo de diferenciação osteoblástica de ratas senis" sob responsabilidade da Pesquisadora RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES e colaboração de Leandro Figueiredo dos Santos e Monique Patrício Singulani está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 00981-2012.

CERTIFICATE

We certify that the research "Action of oxytocin in the process of osteoblast differentiation in senescent rats", process number 00981-2012, under responsibility of RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES and with collaboration of Leandro Figueiredo dos Santos and Monique Patrício Singulani agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Fabiano A. Cadioli", is written over a large, faint, light blue watermark of the UNESP logo.

Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli

CEUA Coordinator