



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

REGIANE MARQUES CASTRO OLIMPIO

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

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

Orientadora: Profa. Adjunta Célia Regina Nogueira

Botucatu

2017

REGIANE MARQUES CASTRO OLIMPIO

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

Orientadora: Profa. Adjunta Célia Regina Nogueira

Botucatu

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Olímpio, Regiane Marques Castro.

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

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

Orientador: Célia Regina Nogueira
Capes: 20700008

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

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

Agradecimentos

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

Ao meu marido Juliano pelo apoio e incentivo.

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

À minha sogra pelas constantes orações.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ao Deus justo e fiel

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

Resumo

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

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

Abstract

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

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

Sumário

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

Referências	83
Conclusão	86

Introdução

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

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

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

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

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

1.1 Osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais

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

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

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

1.2 Ação da via OPG/RANK/RANKL

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

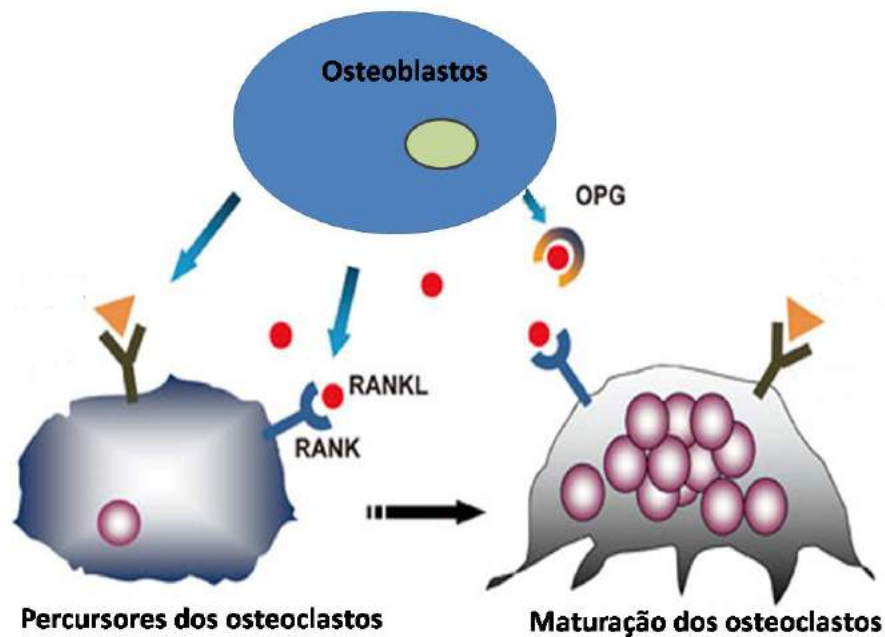


Figura 1. Sistema RANKL/RANK/OPG: Osteoblastos regulam a diferenciação dos osteoclastos. A ligação RANKL/RANK ativa a diferenciação e maturação dos osteoclastos. A OPG liga-se ao RANKL e impede a ligação RANKL/ RANK e consequentemente a maturação dos osteoclastos e a reabsorção óssea. Adaptada de Na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

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

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

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

1.3 Papel do hormônio Tireoidiano no remodelamento ósseo

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

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

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

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

1.4 Papel do Estrógeno na remodelação óssea

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

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

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

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

2. Hipótese

Diferentes concentrações de T3 e E2 alteram a expressão gênica e síntese proteica de RANKL, OPG e c-FOS em cultura celular de osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais humanas.

3. Objetivos

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desse estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de T3 e E2 sobre a expressão gênica de RANKL, OPG e c-FOS em osteoblastos derivados de células-tronco mesenquimais humanas.

3.2 Objetivos Específicos

- Especificamente, objetivou-se caracterizar as células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo por meio da expressão de marcadores positivos CD90, CD105, Nanog, Sox-2, Stro-1 e negativos CD45RO e CD117.
- Caracterizar linhagem osteoblástica derivada de células-tronco mesenquimais por análise qualitativa colorimétrica para fosfatase alcalina e osteocalcina e quantitativa morfométrica utilizando a matriz mineralizada na presença de diferentes concentrações de T3 e E2.

- Verificar a expressão gênica e proteica de marcadores da estimulação osteoclástica: RANKL, OPG e c-FOS por meio de PCR quantitativo em tempo real (RT-PCR) em osteoblastos tratados com T3 e E2.

Referências Bibliográficas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4. Resultados

4.1 Manuscrito 1

Submetido para publicação na Journal of Bone and Mineral Metabolism (JBMM)

Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) and alkaline phosphatase are involved in the maturation of osteoblasts from mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue

Regiane Marques Castro Olimpio¹, m.regianemarques@gmail.com. Miriane de Oliveira¹, email address: miriane.deoliveira@yahoo.com.br. Maria Teresa De Sibio¹, email address: mt_bio@yahoo.com.br. Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, email address: fer_fontesbtu@hotmail.com. Igor Carvalho Depra¹, email address: igordepra@gmail.com. Durvanei Augusto Maria², email address: durvaneiaugusto@yahoo.com.br. Gláucia Maria Ferreira da Silva Mazeto¹, email address: gmazeto@fmb.unesp.br. Fausto Viterbo de Oliveira Neto¹, email address: viterbo@fmb.unesp.br. Gilberto Paz-Filho³, email address: Gilberto.PazFilho@anu.edu.au. Patrícia Pinto Saraiva¹, email address: ppbau@uol.com.br. Célia Regina Nogueira¹, email address: nogueiracelia57@gmail.com.

Affiliations:

1- Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, Univ Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970.

2- Laboratory Biochemistry and Biophysics, Butantã Institute, 1500, Avenue Vital Brazil, São Paulo, Brazil.

3- Department of Genome Sciences, The Australian National University, Canberra, ACT, Australia

Corresponding Author:

Gilberto Paz-Filho

131 Garran Rd

Acton, ACT 2612, Australia

Phone +61-6125-2380

Keywords: Human Adipose Tissue, Mesenchymal Stem Cells, Osteoblasts, Osteogenic Differentiation.

Abstract

Introduction: Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue (hASC) have been subjected to extensive investigation due to their self-renewal properties and potential to restore damaged tissues such as cartilage and bone. Those cells can differentiate into osteoblasts, which express RANKL - a cytokine that is important for bone remodelling. **Methods:** hASC were isolated from the subcutaneous adipose tissue of patients submitted to abdominoplasty, and characterized by flow cytometry and marking of vimentin. Those cells were differentiated into osteoblasts through osteoinduction for 7, 16 or 21 days. Microscopy and flow cytometry were performed to characterize the differentiated cells. Alkaline phosphatase levels in the culture medium, mineralized matrix deposit, and RANKL mRNA expression were assessed. **Results:** Fluorescence microscopy and flow cytometry showed that hASC expressed markers of classical mesenchymal stem cells, including Nanog, Stro-1, Sox2, CD105 and CD90, but not CD117 and CD45RO. Deposition of calcium, alkaline phosphatase levels, and RANKL mRNA expression were highest after 16 days of osteoinduction. Confocal microscopy revealed the expression of RANKL, Nanog, CD 105, and Stro-1, but not CD45RO, in osteoblasts after 16 days of differentiation. **Conclusions:** The fact that the expressions of alkaline phosphatase and of RANKL peak after 16 days and decrease

after 21 days of differentiation suggests that osteoblast activity also varies during osteoinduction. The culture model of osteoblasts at different stages of maturation contributes to research on tissue engineering. Furthermore, it can contribute to the understanding of bone physiology and pathophysiology, and might lead to clinical applications.

Introduction

The use the adipose-derived stem cells (ASC) has contributed to clinical and experimental research in a variety of biological and organ systems [1]. Adipose tissue is derived from the mesodermal germ layer, similar to bone marrow, and contains a supportive stroma that can be easily isolated from tissue cells, including ASC [2]. Furthermore, it is well documented that fat is an endocrine organ that releases numerous hormones involved in body physiology, called adipokines, which are important for sustained maintenance of healthy ASC [3]. Human ASC (hASC) have been subjected to extensive investigation due to their self-renewal properties and potential to restore damaged tissues with reduced self-regenerative properties, such as cartilage and bone [4–5].

Bone remodeling is an important process during which the existing bone matrix is replaced [6]. This process has a major role in the physiology of adult bone, and occurs in two stages: bone resorption by osteoclasts, followed by bone formation by osteoblasts [7]. Osteoblasts stimulate the expression of receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), important for bone remodeling. This cytokine is responsible for stimulating the formation of osteoclasts, favoring bone resorption in health and in disease [8]. Preclinical studies are of great importance, as they help to investigate the system that regulates bone metabolism and the cytokines involved in this process, and enable better understanding of diseases that compromise the quality of bone tissue and bone function [9].

hASC have the ability to differentiate into osteoblasts [10] when cultured in osteogenic differentiation media [11]. This osteoinduction behavior results in a final product of mineralized matrix that determines a key parameter in bone tissue engineering [12]. This property to differentiate into osteoblasts make hASC a useful

experimental model that allows the understanding of the behavior of osteoblasts during different stages of osteoinduction [13]. This knowledge is necessary not only for enhancement of SC differentiation techniques, but also for its use in the development of SC-based therapies against bone diseases [14].

Hence, the present study describes an osteoblast cell culture model derived from hASC. We evaluated the mineralized matrix deposit, culture medium, and osteoblasts 7, 16 and 21 days after osteoinduction. Our data showed after 16 days of osteoinduction, alkaline phosphatase levels and RANKL mRNA expression were increased, which the concomitant expression of osteoblast markers.

Materials and Methods

Human participants

This study was approved by the Ethics Committee of the Botucatu School of Medicine, Brazil (protocol 3216-2009). Adipose tissue was obtained from six patients undergoing abdominoplasty after weight loss induced by bariatric surgery, at the Plastic Surgery Department of the Botucatu Medical School. Abdominoplasty patients were included in the study if they were younger than age 50, and if their erythrocyte sedimentation rate (ESR) results were normal. All patients included in this research study provided written informed consent.

hASC isolation

Subcutaneous adipose tissue samples were subjected to enzymatic digestion. Briefly, 2 g tissue, 4 mg type I collagenase and 8 ml of PBS were combined. Initially, cells were seeded at a density of 2×10^5 in a T25 flask, and grown in complete medium, defined as Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% Fetal Bovine

Serum (FBS) with 1% penicillin-streptomycin (10,000 g/mL-10,000 μ /mL, Invitrogen, USA) and 0.1% gentamicin (10 mg/mL; Invitrogen). Upon reaching 70% confluency, cells were trypsinized and transferred to a T75 flask for cell expansion. Once 70% confluency was reached again, cells were trypsinized and transferred to 6-well plates, petri dishes, and coverslips for differentiation into osteoblasts. All cell cultures were maintained at 37°C in a humidified atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂. hASC aliquots were separated during the second passage and frozen in liquid nitrogen until the time of analysis for cell characterization.

hASC Flow Cytometry

Aliquots of $\sim 2 \times 10^5$ hASC were resuspended in PBS and centrifuged for 10 min at 274 *g*. Then, cells were stained with each antibody at a concentration of 1 mg/ml at 4°C for 30 min. Used antibodies were CD105 (AbD AbD Serotec, Raleigh, NC, USA), CD45RO (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA), and CD90, CD117, Nanog, STRO-1, and Sox-2 (Abcam Cambridge, MA, USA).

The corresponding isotype antibody was used as a negative control, and the secondary antibody used was goat anti-mouse IgG (H/L)-FITC (AbD Serotec). Cells were pelleted, washed twice with PBS, and fixed with 1% paraformaldehyde. Cell fluorescence was analyzed on a FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) using Cell Quest 2.9 software and Vit MDI, which were employed for acquisition and histogram analysis. Autofluorescence was measured through the acquisition of cells by flow cytometry, without incubation with fluorochrome-labeled antibodies. The expression of the surface antigen was determined using the antibodies described above, and labeling was performed according to the supplier's recommendations.

Vimentin staining in hASC

hASC were cultured in round cover slips (12 x 0.11 mm). First, samples were fixed with acetone for 10 min, and thereafter washed with ice-cold PBS and incubated for 30 min in 1% BSA solution. After this period, cells were incubated with specific antibodies for 1 hour. To label hASC, anti-vimentin was used (Monoclonal mouse - Clone Vim 3B4 -Dako Denmark). After 1 hour, cells were washed again with PBS and incubated with a secondary antibody (DyLight) for 1 hour. Lastly, cells were incubated for 1 min with DAPI for nuclear staining, and immunofluorescence was visualized using an Olympus microscope (UTV063XC/SNJ41986).

Osteoblasts culture

Freshly-isolated hASC were cultured in DMEM containing 10% FBS with 1% penicillin-streptomycin (10,000 g/mL-10,000 µ/mL, Invitrogen, USA) and 0.1% gentamicin (10 mg/mL; Invitrogen). For hASC differentiation into osteoblasts, complete DMEM medium plus 0.1 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich), 50 µM ascorbic acid (Gibco), and 10 mM β-glycerophosphate were used (Sigma-Aldrich). Cells were maintained in this medium for a period of 7, 16, and 21 days. The culture medium was replaced three times per week with fresh medium with the same osteogenic components. hASC were used as a negative control for osteogenic induction, and were cultured in DMEM in the absence of osteogenic compounds. Cell morphology was evaluated every 3 days, coinciding with the exchange of culture medium, using an inverted microscope, and all images were obtained using a digital camera.

Formation of mineralized matrix

The cell monolayer present in the petri dish was washed with PBS; 1X paraformaldehyde was used to fix the cells (20 min). After the removal of paraformaldehyde, cells were washed with distilled water. For staining of the mineralized matrix, cells were stained with Alizarin Red for 5 minutes at room temperature. After this period, cells were washed several times with distilled water to remove the dye, and were subsequently photographed in the inverted microscope.

Alkaline phosphatase assay

After 7, 16 or 21 days of osteoinduction, 2 mL of the culture media were collected, and alkaline phosphatase assays were performed by the immunometric assay method according to the manufacturer's instructions (Cat. No KAQ1381, Linco Research Inc., USA).

Fluorescence microscopy for osteoblast markers

After 16 days of osteoinduction, osteoblasts were photographed using confocal microscopy, and immunofluorescence was visualized using an Olympus microscope (UTV063XC/SNJ41986). Cells were plated on glass coverslips and fixed with 4% formaldehyde. Subsequently, the cover slips were washed and incubated at 50 nM NH_4Cl in PBS. After this period, cells were washed three times with PBS and permeabilized with 0.1% saponin in PBS. Cells were incubated with primary antibody, followed by incubation with DyLight 488-conjugated secondary antibody (1:200), and mounted with media containing DAPI. Antibodies used were anti-RANKL, anti-Stro1,

anti-Nanog, anti-CD105, and anti-CD45RO. Fluorescence was measured for each protein using NIS Elements AR 3.2 software.

Gene expression of RANKL on osteoblasts

Total mRNA was extracted from osteoblasts using Trizol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit for Real-Time PCR (RT-PCR)[®] (Invitrogen, São Paulo, Brazil) was used for the synthesis of 20 µL of complementary DNA (cDNA) from 1,000 ng total RNA. The expression levels of RANKL (Applied Biosystems TNFRSF11--Hs00243522_m1 assay) were analyzed by real-time quantitative PCR (RT-qPCR). The analysis was performed on the Applied Biosystems StepOne Plus detection system using the TaqMan commercial qPCR kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The amplification conditions were as follows: enzyme activation at 50°C for 2 min, denaturation at 95°C for 10 min amplification of the cDNA products by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/extension at 60°C for 1 min. After normalization to the internal control GAPDH (Applied Biosystems 02758991_g1 test Hs) (19) by the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method, as previously described [15], RANKL mRNA expression was determined in control hASC and osteoblasts after 7, 16 and 21 days.

Statistical Analysis

Analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey test were used. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The level of significance was set at value $p < 0.05$.

Results

Morphology of hASC

After the first passage, hASC showed the presence of fat droplets (Fig. 1A), which disappeared after the second and third passages (Fig. 1B and 1C, respectively). hASC exhibited fibroblastoid morphology a few days after being isolated from adipose tissue, which remained after the later passages.

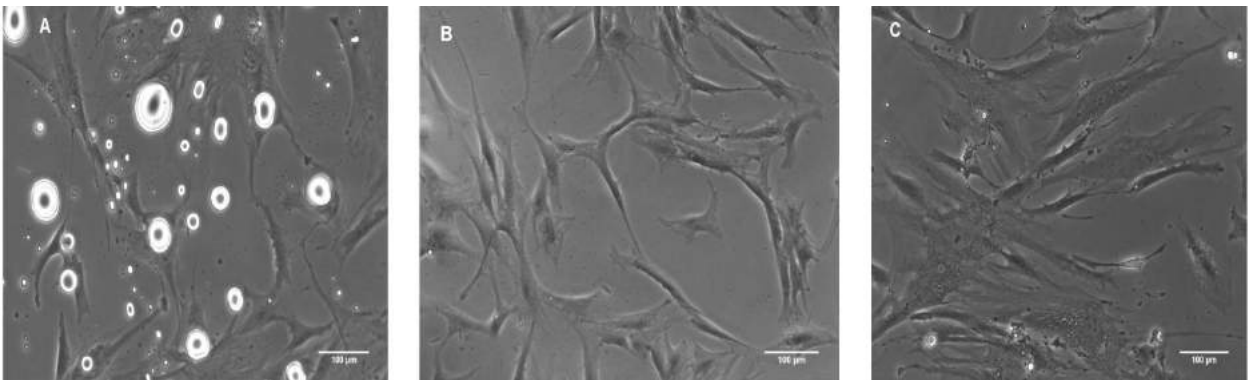


Figure 1. Morphology of hASC. **A:** hASC adhered on the first passage after isolation; the presence of fat droplets is represented by the arrows. **B** and **C:** The hASC in the second and third passages, respectively. In all observed passages, the cells show adhesion to plastic and a morphology similar to fibroblasts.

Expression of markers in hASC

The expression of the positive (CD90, CD105, Nanog, Sox-2, and STRO-1) and negative markers (CD45RO and CD117) was analyzed by flow cytometry. The differences in expression of positive and negative markers in hASC are shown in Figure 2. The expression of Nanog and Sox-2 in hASC demonstrates that the cells remained undifferentiated, and thus establishes the conservation of pluripotency of these cells. All positive markers had significantly higher expression compared to the negative markers ($P < 0.001$).

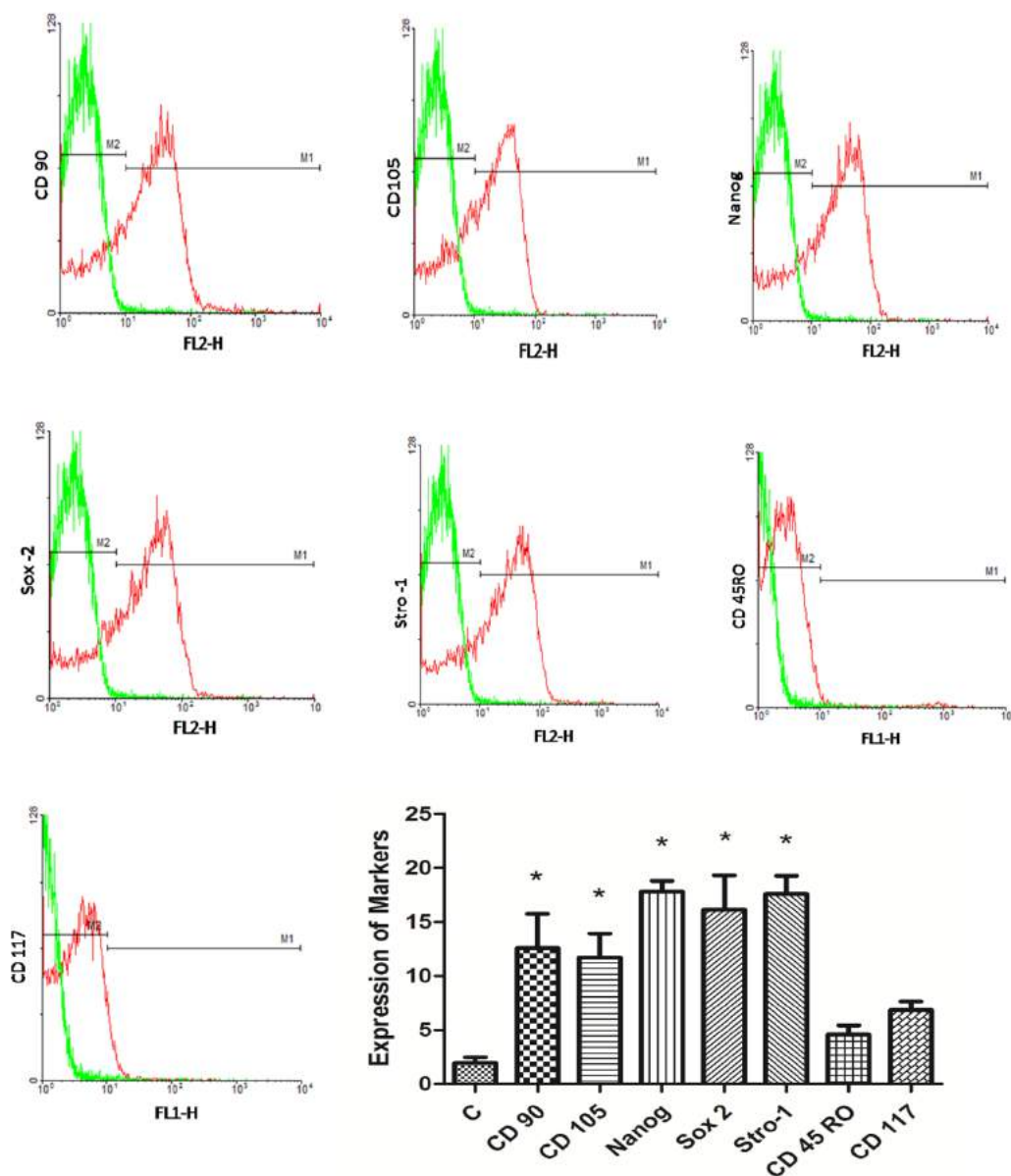


Figure 2. Analysis of the markers of hASCs: Are demonstrating the expression of different markers in hASC. The expression of the markers was performed by flow cytometry by means of the intensity of the emitted fluorescence (FL1 and FL2). The results represent the correlation between expression of the positive markers (CD90, CD105, Nanog, Sox-2, and Stro-1) compared to negative markers (CD45RO and CD117). The difference between expression of positive and negative markers was statistically significant. Results are represented as mean $\pm$ standard deviation. The statistical analyses were obtained using ANOVA followed by Tukey test (* $p < 0.001$).

Presence of vimentin in hASC

Figure 3 shows staining for vimentin, a mesenchymal marker, along with DAPI staining for nuclei. The cytoplasmic labeling of vimentin in hASC reveals that this protein is present in mesodermal cells originated from SC.

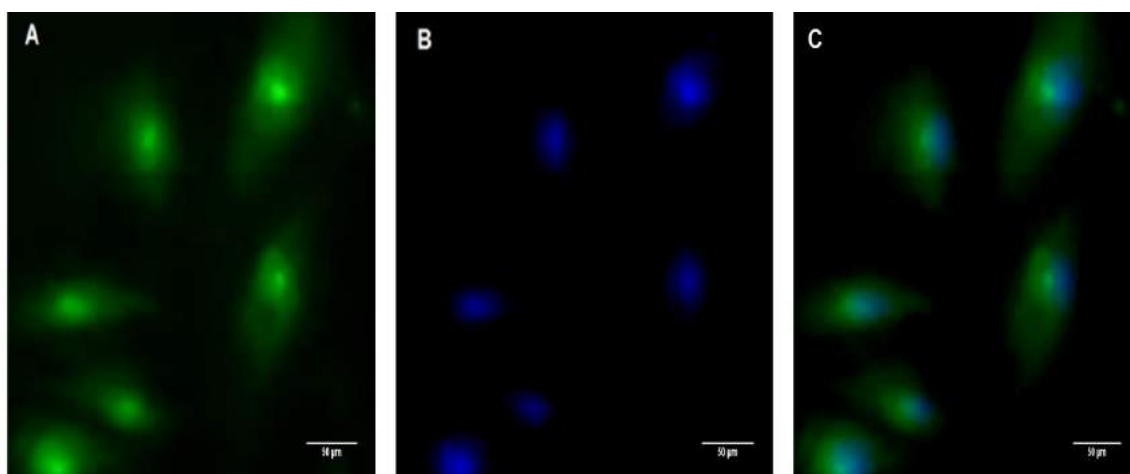


Figure 3. Presence of vimentin in hASC. A: Vimentin expression is often used as a marker for cells and tissues derived from mesoderm. Presence of this protein

determined the mesenchymal phenotype of the cells. **B:** Images of nuclear staining performed with DAPI. **C:** Overlapping images.

Osteogenic differentiation of the hASC

Cells were exposed to osteogenic medium for 7, 16, or 21 days, and their respective morphology during osteogenic differentiation is shown in Figures 4A, B and C. Cells were fibrotic in character, and also showed a cubic morphology. At all timepoints, cells showed good adhesion to plastic, and grew well in the culture environment.

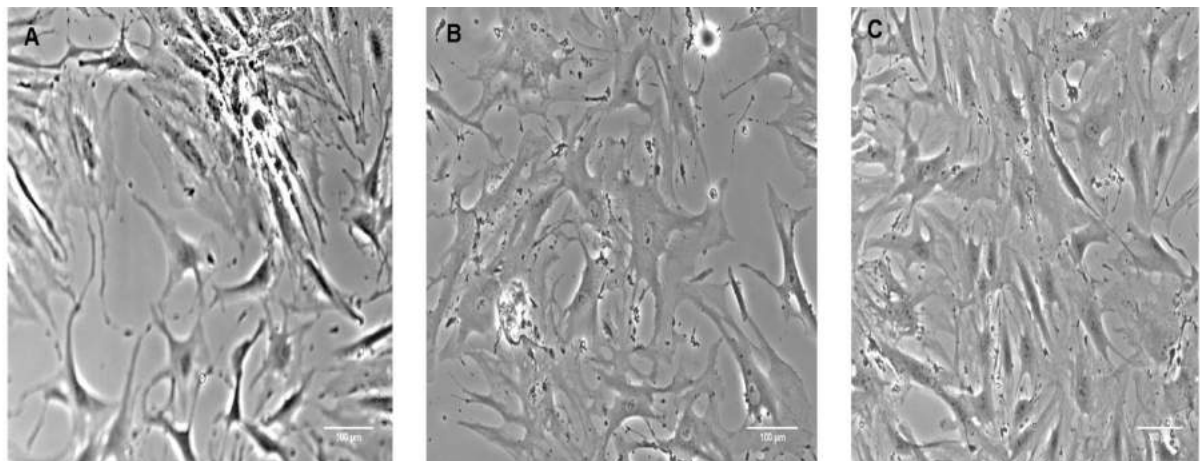


Figure 4. hASC cultured on different days in osteogenic medium. Cells were observed in an inverted microscope on days 7, 16, and 21 (Figures **A**, **B**, **C**, respectively). In the final stage of osteoinduction, cells had an epithelial appearance with a cubic shape. Cell growth remained constant at all times, revealing that osteoinduction does not affect the confluency of mature osteoblasts.

Gradual increase of alkaline phosphatase post-osteinduction

Figure 5 shows the quantification of alkaline phosphatase culture levels at 7, 16, or 21 days post-osteinduction. The presence of this protein was confirmed in pre-osteoblasts and mature osteoblasts. There was a gradual increase in the expression of

this protein between 7 and 16 days after the start of differentiation. The levels of this enzyme in early stages of differentiation may contribute to the onset of bone mineralization.

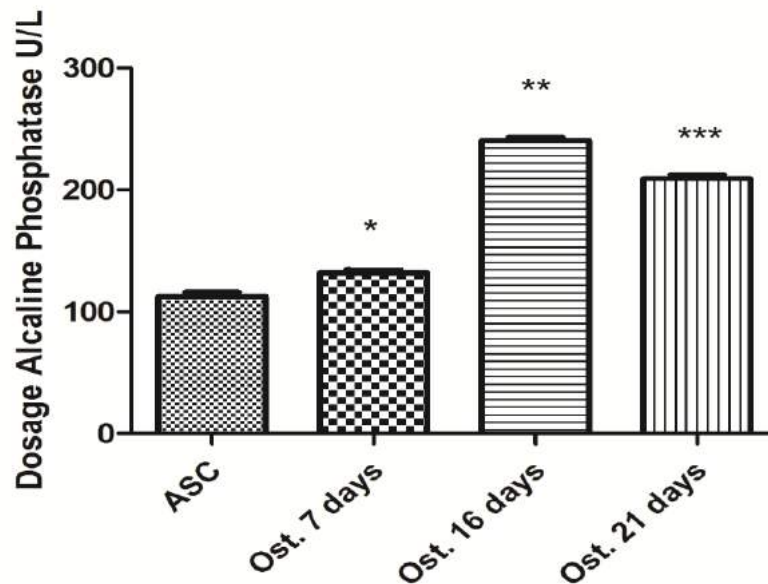


Figure 5. Gradual increase of alkaline phosphatase post-osteinduction. Cells were cultured for 7 (Ost.07D), 16 (Ost.16D), or 21 (Ost.21D) days in osteogenic medium. The level of alkaline phosphatase was highest 16 days after initiation of cell differentiation. Data are expressed as mean $\pm$ standard deviation. ANOVA complemented by Tukey test was used (* $p < 0.001$, ** $p < 0.005$).

Mineralized matrix at different days of osteoinduction

It has been shown that cells cultured in osteogenic medium for a longer period give rise to mature osteoblasts. These mature osteoblasts deposit mineralized matrix forming calcium nodules because they are constantly active. This was observed in this study, over a period of 7, 16, and 21 days after osteogenic induction from pre-osteoblasts to mature osteoblasts (Figure 6). After 7 days in osteogenic media, the onset

of matrix mineralization was clear compared to that of untreated hASC at the same timepoint (Figures 6B and 6A, respectively). However, no calcium nodules were visible on day 7. Cells cultured in osteogenic medium for 16 days were rich in calcium nodules, when compared to untreated hASC (Figures 6D and 6C, respectively). The mineralized matrix was also more visible at day 16 compared to day 7 (Suppl. Fig. 1). After 21 days, some calcium nodules remained, and the mineralized matrix was more prevalent than at previous time points. All negative controls of untreated hASC showed no mineral deposition, mineralized matrix, or calcium nodules (Figures 6A, 6C, and 6E).

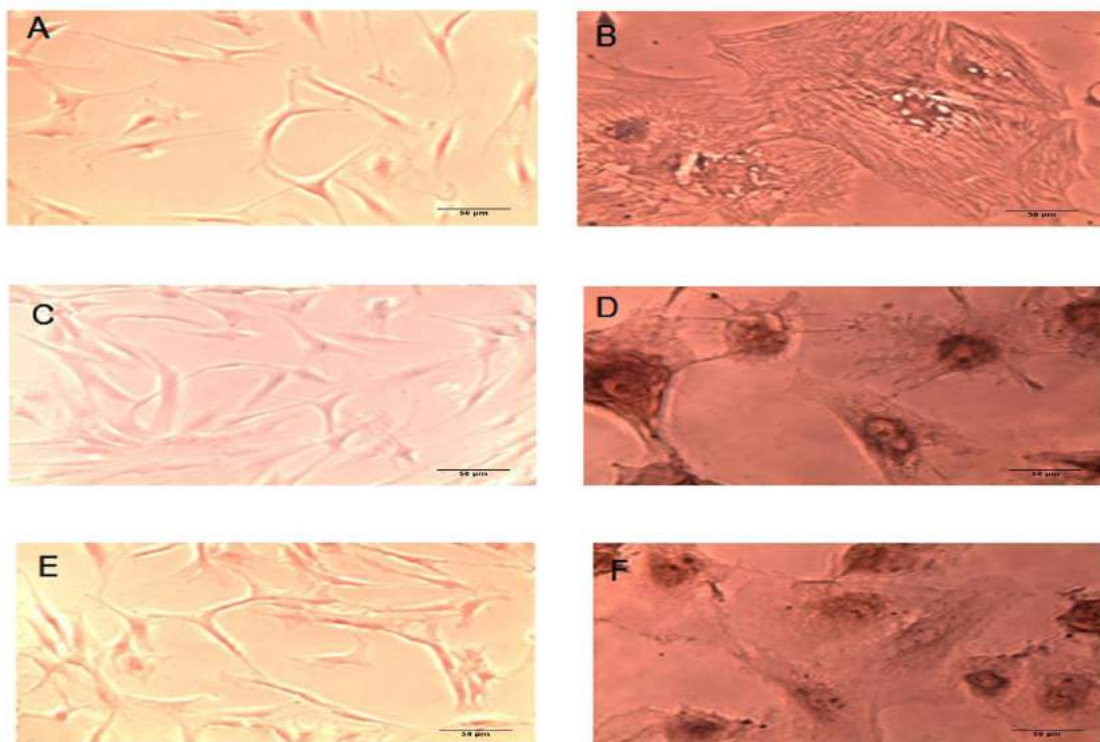


Figure 6. Presence of mineralized matrix in mature osteoblasts Macroscopically, cells cultured for 7 days, a time point that is in the middle of osteoinduction, exhibited less intense coloring (**B**). Images of the cells cultured for 16 days are shown in **D**, where the most intense color and the presence of a mineralized matrix with the

accumulation of calcium nodules were observed. **F:** The matrix and calcium nodules remain 21 days post-osteoiduction. Figures **A**, **C**, and **E** show the hASC which were used as negative controls and showed no osteoinductive matrix deposit.

Evaluation of the mature osteoblast markers

Figure 7 shows the images of different markers expressed by osteoblasts. The quantification of cells markers was done after 16 days of osteogenic induction, and images were captured at the same time. The expression of RANKL protein was increased (relative to positive and negative markers). The expression of Nanog was higher than that of STRO-1, CD105, and the negative marker CD45RO.

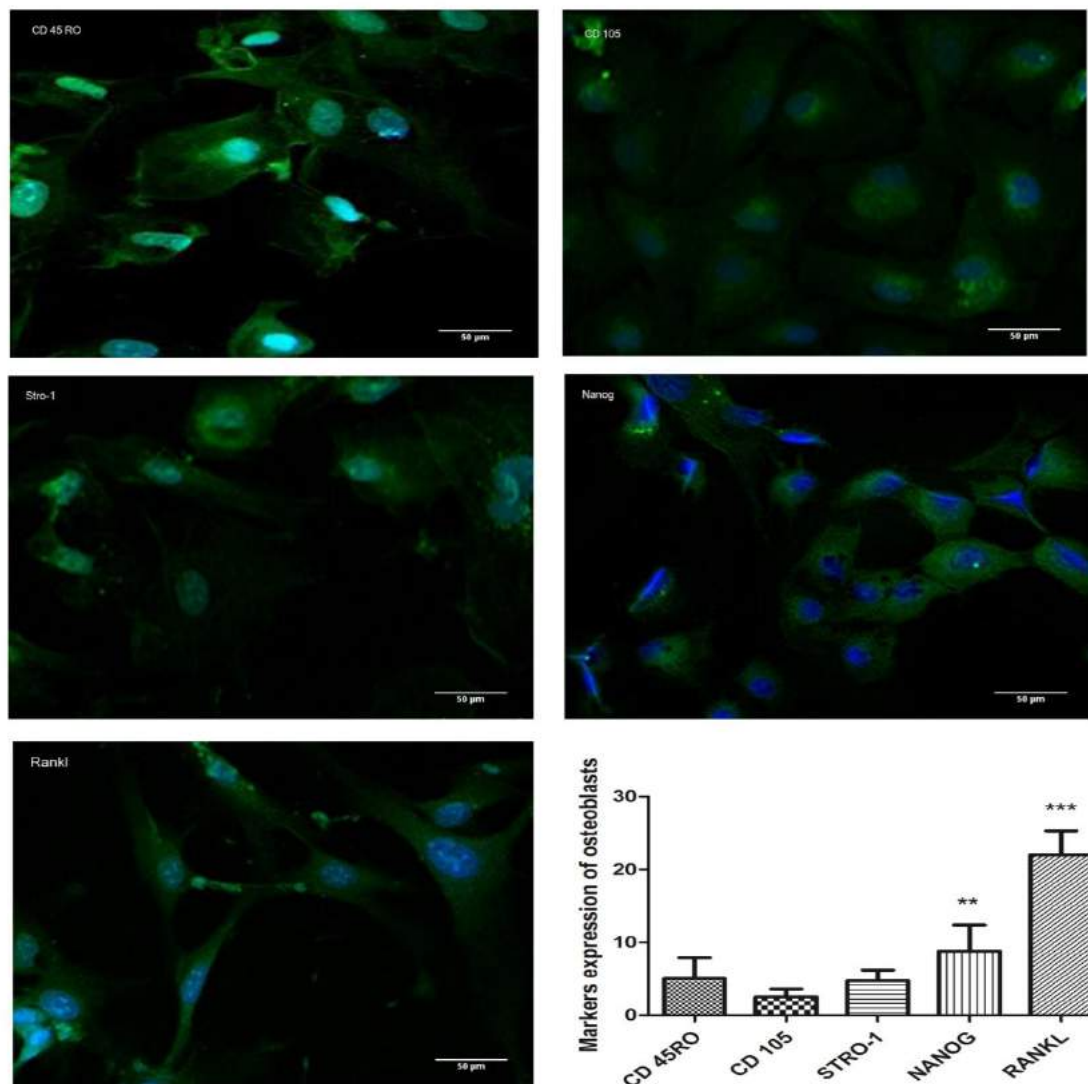


Figure 7. Analysis of the markers present in mature osteoblasts. Images of the cells show the different markers (Rankl, Nanog, CD 105 e Stro-1) for osteoblasts cultured in osteogenic medium in a 16-day period.

RANKL expression is more evident in mature osteoblasts derived from hASC

RANKL mRNA expression was increased after 7, 16, and 21 days of osteogenic induction, compared to that of undifferentiated cells (Figure 8).

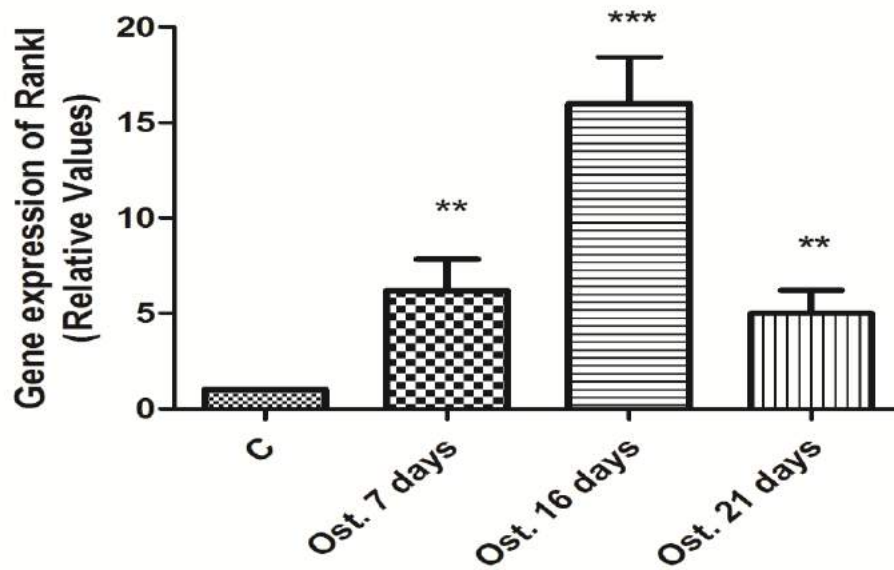


Figure 8. Gene expression of RANKL after varying times of osteoinduction. C is control hASC, and Ost.07D, Ost.16D, and Ost.21D are cells cultured for 7, 16 and 21 days, respectively, in osteogenic medium. Increased gene expression of RANKL was highest after 16 days. ANOVA was used complemented by Tukey's test. Results are represented as mean $\pm$ standard deviation (* $P < 0.001$, ** $P < 0.05$).

Discussion

Studies have shown that human adipose tissue is a major source of SC, which could potentially be used for research purposes [16]. For the use of SC from any source, it is of critical importance to assess their potential with respect to viability, proliferation and differentiation capacity [17]. In our study, we exposed hASC to osteogenic medium and observed normal cell attachment, fibroblastoid characteristics similar to mesenchymal stem cells, and the presence of vimentin protein, which is a mesenchymal marker and has the function of controlling the motility of cells [18].

Cytometry tests confirmed the identity of hASC, since they did not express hematopoietic surface markers, such as CD45RO and CD117, but were positive for STRO-1, CD90, CD105, Nanog, and Sox2. [16]. These positive markers are present in the mesenchymal tissue. The expression of Sox-2 and Nanog this study indicates the presence of pluripotent, undifferentiated cells [19-20].

Osteoblasts derived from human hASC begin to express alkaline phosphatase and to deposit an extracellular matrix rich in calcium [21]. The increase in alkaline phosphatase occurs between the pre-osteoblast and mature osteoblast stages. This expression is related to the onset of cell proliferation and extracellular matrix formation during the transition period. Therefore, the expression of this protein is frequently used as a marker of osteoblasts [22,23]. Obtained osteoblasts showed epithelial morphology and gradually expressed alkaline phosphatase. Furthermore, the formation of a mineralized matrix, one of the main features of mature osteoblasts [24], was demonstrated. Thus, our findings show that when hASC are cultured in osteoinductive medium, they differentiate into osteoblasts and are able to deposit mineralized matrix. Our results illustrate the different markers visualized by immunofluorescence present in osteoblasts after 16 days of osteoinduction. Although Nanog is expressed in undifferentiated cells, our results suggest that this protein may be present in differentiated cells of mesodermal origin, such as osteoblasts derived from hASC [25]. We also demonstrated the expression of STRO-1, a protein that is expressed at various levels in pre-osteoblasts and mature osteoblasts [26], and of CD105, a marker also described in osteoblastic cells derived from human adipose tissue [27].

Our results provide as a reproducible model for studying the differentiation of hASC into osteoblasts, which can be used as the basis for a variety of preclinical studies. The increased levels of RANKL mRNA expression and alkaline phosphatase 16

days osteogenic induction can be attributed to the differentiation of pre-osteoblast to mature, functional osteoblasts. The decrease in RANKL and in alkaline phosphatase expression after 21 days suggests a reduction in osteoblast activity at that timepoint [28]. Data on *RANKL* gene expression in hASC is scarce in the literature. This cytokine, secreted by osteoblasts, actively participates in the bone remodeling process. Its action is essential since it determines the equilibrium between osteoblasts and osteoclasts [28]. The analysis of this cytokine is important to understand the local factors in bone remodeling and pathways leading to osteoporosis.

Conclusions

This study provides important data on the maturation of osteoblasts, and on the expression of their markers at different times. The analysis of hASC *RANKL* gene expression is the start for understanding the pathophysiology of bone and can contribute to studies on tissue engineering and future clinical applicability.

List of abbreviations

hASC- Stem Cells from human adipose tissue

RANKL- Receptor activator of nuclear factor kappa-b ligand

ESR- Erythrocyte Sedimentation Rate

ANOVA- Analysis of variance

FBS- Fetal Bovine Serum

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

Declarations:

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Research Ethics Committee of the Botucatu Medical School and its protocol number: 3216-2009.

Consent for publication

Not applicable in this section.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its additional files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Funding

This research work was funded by the foundation support research in the state of São Paulo (FAPESP). National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) funded the student RMCO.

Acknowledgements

We are grateful to Dra. Denise Fecchio for providing your cell culture lab, Dra. Elenice Deffume, Prof. Dr. Carlos Roberto Padovani by statistical analysis. We would also like to thank Editage for its high-quality translation of the manuscript into English.

References

- [1] Tsuji W, Rubin J P, Marra KG. Adipose-derived stem cells: Implications in tissue regeneration. World J Stem Cells 2014; 3: 312-321.
- [2] Nollet M, Darmanin S S, Breuil V, AlSahlanee R, Cros C, Topi M, et al. Autophagy in osteoblasts is involved in mineralization and bone homeostasis. Autophagy 2014; 11: 1965-1977.

- [3] Halvorsen YD, Wilkison WO, Briggs MR. Human adipocyte proteomics a complementary way of looking at fat Human adipocyte proteomics--a complementary way of looking at fat. *Pharmacogenomics* 2000; 2:179-85.
- [4] Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LA. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. *J Appl Oral Sci* 2007; 15: 442-447.
- [5] Kassem M, Abdallah BM, Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 183-187.
- [6] Zygmunt M, Wiesława E N, Jolanta K L C Chyczewski L. Bone as a source of organism vitality and regeneration. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 14: 558-569.
- [7] Delaisse, J.M. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep* 2014; 3: 561.
- [8] Brendan F B, Lianping X. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*. 2007; doi:10.1186/ar2165.
- [9] Dempster, DW, Lianping CL, Kostenuik PJ, Grauer A. Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: A review of preclinical and clinical data. *Clin Ther* 2012; 34: 521-536.
- [10] Bourin P, Bunnell BA, Casteilla L, Dominici M, Katz AJ, March KL, et al. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT). *Cytotherapy* 2013; 6:641-8.
- [11] Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC, Auchter C, Boskey AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001; 7: 729-741.
- [12] Ramoshebi LN, Matsaba TN, Teare J, Renton L, Patton J, Ripamonti U. Tissue engineering: TGF-beta superfamily members and delivery systems in bone regeneration. *Expert Rev Mol Med* 2002; 4: 1-11.
- [13] Togashi AY, Cirano FR, Marques MM, Pustiglioni FE, Lima LA. Characterization of bone cells obtained from the calvaria of neonatal rats (osteo-1) after serial subculture. *J Appl Oral Sci* 2007; 15: 442-447.
- [14] Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-317.

- [15] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$ Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- [16] Luna ACL, Madeira MEP, Conceição TO, Moreira JALC, Laiso RAN, Maria DA. Characterization of adipose-derived stem cells of anatomical region from mice. *BMC Res Notes* 2014; 7: 552.
- [17] Wagner W, Ho AD. Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 2007; 3: 239-248.
- [18] Huang L, Niu C, Willard B, Zhao W, Liu L, He W, et al. Proteomic analysis of porcine mesenchymal stem cells derived from bone marrow and umbilical cord: implication of the proteins involved in the higher migration capability of bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 2015; 6: 77.
- [19] Liu TM, Wu YN, Guo XM, Hui JH, Lee EH, Lim B. Effects of ectopic Nanog and Oct4 overexpression on mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2009; 18: 1013-1022.
- [20] Yoon D, Kim Y, Jung H, Paik S, Lee J. Importance of Sox2 in maintenance of cell proliferation and multipotency of mesenchymal stem cells in low-density culture. *Cell Prolif* 2011; 44: 428-440.
- [21] Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 845-853.
- [22] Calle JD, Sañudo C, Verde LS, Renedo RJG, Arozamena J, Riancho JA. Epigenetic regulation of alkaline phosphatase in human cells of the osteoblastic lineage. *Bone* 2011; 49: 830-838.
- [23] Weizhuo W, Olson D, Cheng B, Guo X, Wang K. Sangui Draconis resin stimulates osteoblast alkaline phosphatase activity and mineralization in MC3T3-E1 cells. *J Ethnopharmacol* 2012; 142: 168-174.
- [24] Mariscal ME, Costa CAS, Tavares HS, Bianchi J, Hebling J, Machado JPB. Osteoblast differentiation is enhanced by a nano-to-micro hybrid titanium surface created by Yb:YAG laser irradiation. *Clin Oral Invest* 2015; Jul 30. Epub ahead of print.
- [25] Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S. Functional expression cloning of Nanog a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 2003; 5: 643-655.
- [26] Gronthos S, Zannettino AC, Graves SE, Ohta S, Hay SJ, Simmons PJ. Differential cell surface expression of the STRO and alkaline phosphatase antigens on discrete developmental stages in primary cultures of human bone cells. *J Bone Miner Res* 1999; 1: 47-56.

[27] Yamamoto M, Hidemi N, Hao J, Chou J, Kasugai. Osteogenic potencial of mouse adipose derived stem cells sorted for CD90 and CD105 in vitro. *Stem Cells* 2014;17.

[28] Gori F, Hofbauer LC, Dunstan CR, Spelsberg TC, Sundeep K, Riggs L. The expression of osteoprotegerin and RANK ligand and the support of osteoclast formation by stromalosteoblast lineage cells is developmentally regulated. *Endocrinology* 2000; 12: 4768-4776.

4.2 Manuscrito 2

Triiodotironina (T3) eleva os níveis de mRNA e proteína de RANKL, OPG mas diminui de c-Fos em osteoblastos humanos: influência do estrógeno?

Authors:

Regiane Marques Castro Olimpio¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Maria Teresa De Sibio¹, Miriane de Oliveira¹, Bianca Mariani Gonçalves¹, Lucas Solla Mathias, Igor Carvalho Deprá¹, Sarah Maria Barneze Costa¹, Bruna Moretto Rodrigues¹ Durvanei Augusto Maria², Fausto Viterbo de Oliveira Neto¹, Gilberto Paz Filho³, Patrícia Pinto Saraiva¹, Célia Regina Nogueira¹.

Affiliations:

1- Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, UnivEstadualPaulista - UNESP, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970.

2- Laboratory Biochemistry and Biophysics, Butantã Institute, 1500, Avenue Vital Brazil, São Paulo, Brazil.

3- Department of Genome Sciences, the Australian National University, Canberra, ACT, Australia.

Corresponding Author:

Célia Regina Nogueira

Botucatu Medical School, São Paulo State University - UNESP Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP, Brazil, 18618-000. Telephone: (55)1438816213 Fax: (55)1438816424.

E-mail: nogueiracelia57@gmail.com

Triiodotironina (T3) eleva os níveis de mRNA e proteína de RANKL, OPG mas diminui de c-Fos em osteoblastos humanos: influência do estrógeno?

As ações do triiodotironina (T3) no tecido ósseo são complexas e ainda parcialmente compreendidas. Atualmente, sabe-se que ele age por vias diretas e indiretas e é essencial para a manutenção da integridade do esqueleto, visto que possui efeito nos processos de formação e reabsorção óssea. Embora o hormônio tireoidiano aumente a atividade de osteoblastos e osteoclastos *in vivo* e em cultura de células, pouco é conhecido sobre seus efeitos na transcrição de genes alvo, tais como RANKL, osteoprotegerina (OPG) e c-Fos nestas células, e pouco conhecida a ação do estrógeno (E2) sobre o efeito do T3 nesses genes alvos. O E2 também regula o metabolismo ósseo, visto que se liga aos osteoblastos induzindo-os a aumentar a produção de OPG e suprimir a produção de RANKL. Com isso o objetivo de nosso trabalho foi avaliar a ação das diferentes concentrações de T3 em culturas de osteoblastos isolados de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano, e posteriormente, a influência do E2 sobre a ação do T3 na expressão gênica e proteica de RANKL, OPG e c-FOS. Os osteoblastos foram tratados com doses infrafisiológica (T3I/ 10^{-10} M); fisiológica (T3F/ 10^{-9} M) e suprafisiológica (T3S/ 10^{-8} M) de T3 por 72 horas, na presença ou ausência de E2 infrafisiológico (E2I/ 10^{-9} M) ou fisiológico (E2F/ 10^{-8} M). Para análise de mRNA e proteína, foram utilizadas as técnicas de RT-qPCR e Western Blotting. O T3 (T3I, T3F e T3S) elevou os níveis de mRNA de RANKL comparado ao grupo C. A dose administrada ao grupo T3F elevou os níveis de OPG em relação ao C, porém as outras doses não surtiram efeito sobre a expressão de mRNA desse gene. Para c-Fos os níveis de mRNA estão elevados em T3I e diminuídos em T3F e T3S quando comparados ao C. O western blotting confirmou o efeito de T3 a nível proteico na síntese de RANKL, OPG e c-Fos. Ao associarmos tanto o E2I e E2S ao T3S observamos uma supressão na expressão de RANKL. Enquanto que os grupos T3I e T3F tiveram sua expressão de RANKL aumentada. Na expressão de OPG, a associação foi capaz de elevar os níveis de T3I e T3S, anteriormente inalterados e potencializou o aumento dessa expressão no

grupo T3F. Em relação ao c-Fos, a associação potencializou a expressão gênica aumentando os níveis de mRNA do grupo T3I e nos grupos T3F e T3S, anteriormente diminuídos. Em resumo, podemos afirmar que as doses analisadas de T3, principalmente em suas associações, são eficazes em aumentar ou modular os níveis gênicos e proteicos de RANKL, OPG e c-Fos.

Palavra-chave: Células-tronco mesenquimais; Triiodotironina; RANKL; OPG e c-Fos e osteoblastos.

Abstract

The actions of triiodothyronine (T3) on bone are complex and not completely understood. Currently, T3 is known to act through direct and indirect pathways, and that it is essential to keeping skeleton integrity, due to its effect on bone formation and reabsorption. Although thyroid hormone increases the activity of osteoblasts and osteoclasts in vivo and in vitro, little is known about its effects on the transcription of target genes, such as RANKL, osteoprotegerin (OPG), and c-FOS in these cell types, and also about estrogen (E2) modulation of these effects. E2 is also a regulator of bone metabolism, binding to osteoblasts and leading to an induction in OPG and a suppression of RANKL production. The objective of our work was to evaluate the action of different T3 concentrations on osteoblast cultures obtained from mesenchymal stem cells isolated from human adipose tissue and, subsequently, the influence of E2 over the action of T3 on RANKL, OPG, and c-FOS gene and protein expression. The osteoblast cultures were treated with infra-physiological (T3I, 10⁻¹⁰M), physiological (T3F, 10⁻⁹M), and supra-physiological (T3S, 10⁻⁸M) doses of T3, for 72 hours, alone or together with E2 at infra-physiological (E2I, 10⁻⁹ M) or physiological (E2F, 10⁻⁸ M) doses. For mRNA and protein analysis, we performed RT-PCR and Western blotting. T3, at all doses, increased RANKL gene expression, compared to the control group. OPG expression was found to be elevated only by T3F, while for c-FOS gene expression was elevated by T3I, and decreased by higher doses. Western blotting confirmed these effects of T3 at the protein level. E2I and S suppressed RANKL gene expression caused by T3S, but increased its expression with T3I and F. OPG expression was increased in all E2 groups, compared to the corresponding groups with only T3. The expression of c-FOS was increased by the addition of E2 in all groups. Briefly, we show that the given doses of T3, especially in association with E2, can increase gene and protein levels of RANKL, OPG, and c-FOS.

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

Introdução

As ações da triiodotironina (T3) no osso são complexas e apenas parcialmente compreendidas. Esse hormônio age por meio de vias diretas e indiretas, durante todas as fases do ciclo do remodelamento ósseo, apresentando efeitos tanto sobre a reabsorção como sobre a formação óssea sendo, influenciando assim na manutenção da integridade do esqueleto. Além disso, aumenta a expressão do mRNA do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa β (RANKL) em células pré-osteoblásticas, ativando a osteoclastogênese [1].

A interação da atividade dos osteoblastos com osteoclastos diminui na vida adulta e pode se agravar com a ocorrência do hipotireoidismo [2], predispondo ao retardo na remodelação óssea, principalmente na fase de mineralização [3]. Já no hipertireoidismo, ocorre aumento na atividade osteoblástica e osteoclástica, com predomínio de reabsorção óssea, acarretando em risco para a osteoporose [4].

Contudo, alguns estudos demonstram que a reabsorção óssea osteoclástica estimulada pelo T3 ocorre somente na presença de co-culturas de osteoblastos, mas nunca em sua ausência [5,6]; indicando que o alvo primário da ação do T3 são os osteoblastos e demonstrando a possível interação com RANKL para que o processo de diferenciação induzida pelo hormônio ocorra. Entretanto, Kanatani *et al.*[7], demonstraram que T3 estimulou a formação osteoclástica de maneira dose-dependente, e aumentou a osteoprotegerina (OPG), mas não a expressão do RANKL, sugerindo que o efeito estimulatório do T3 na formação de osteoclastos não foi mediado pelo sistema RANKL/OPG.

Outros fatores, como o fator de transcrição c-Fos poderiam regular a diferenciação osteoblástica e osteoclástica independentemente do sistema RANK/RANKL. Embora o hormônio tireoidiano aumente a atividade de osteoblastos e

osteoclastos *in vivo* e em cultura de células, tão pouco é conhecida a ação sobre seus efeitos na transcrição de genes alvo nestas células [8], e tão pouco conhecida é a ação de diferentes concentrações de estrógeno (E2) no efeito do T3 sobre esses genes alvos, visto que o E2 também regula o metabolismo ósseo, se ligando aos osteoblastos e induzindo-os a aumentar a produção de OPG e suprimir a produção de RANKL, uma combinação de sinais que impede a formação de osteoclastos, mantendo o controle sobre a perda óssea [9].

Visto a importância sobre a integridade óssea [10] e a possível ação desse hormônio sobre fatores envolvidos na osteoclastogênese [11,10], o nosso trabalho avaliou o efeito do T3 em concentrações infrafisiológica, fisiológica e suprafisiológica sobre a expressão gênica e proteica de RANKL, OPG e c-Fos e posteriormente, verificou o efeito do E2 (nas concentrações infrafisiológica e fisiológica) sobre a ação do T3 nessa expressão gênica desses genes, em osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais humanas provenientes do tecido adiposo.

Pacientes e Métodos

1.1. Cultura de osteoblastos humanos

Para obtenção da linhagem osteoblástica utilizou-se células- tronco mesenquimais (CTMs) provenientes de tecido adiposo de 3 doadoras. A diferenciação de CTMs em osteoblastos foi realizada com meio DMEM completo mais 0,1 μ M de dexametasona (Sigma-Aldrich), 50 μ M de ácido ascórbico (Gibco) e 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas neste meio durante 16 dias. O meio de cultura foi substituído três vezes por semana, mantendo os mesmos componentes osteogênicos. CTMs indiferenciadas foram utilizadas como controle para comprovar a indução osteogênica.

1.3 Tratamento com diferentes doses de T3 e associações com E2

Após o período de diferenciação, os osteoblastos foram submetidos a uma depleção hormonal durante 12 horas e mantidos em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino Charcoal Stripped (Sigma®). As células foram então divididas em grupos tratados com doses infrafisiológica (T3I / 10^{-10} M), fisiológicas (T3P / 10^{-9} M) e suprafisiológicas (T3S / 10^{-8} M) de T3, além de osteoblastos na ausência de tratamento como controle (C). Posteriormente, os grupos previamente isolados foram associados a diferentes doses de E2, sendo: T3I+E2I, T3I+E2F, T3F+E2I, T3F+E2F, T3S+E2I e T3S+E2F. Os tratamentos foram realizados em triplicata no tempo de 72 horas conforme descrito por Saraiva *et al* [8], sendo o meio de tratamento substituído a cada 24 horas.

1.2. Ensaio de Fosfatase Alcalina e Osteocalcina

Após 16 dias de osteoindução, foi coletado 2 mL dos meios de cultura e realizaram-se ensaio de fosfatase alcalina e osteocalcina pelo método de ensaio imunométrico, de acordo com as instruções do fabricante (Cat. No. KAQ1381, LincoResearch Inc., EUA). Como controle negativo da osteoindução, foi utilizado o meio de cultura das CTMs indiferenciadas.

1.4 Análise da matriz mineralizada nas diferentes concentrações de T3

Após o período de 16 dias de indução osteogênica e tratamento com as diferentes concentrações de T3, os osteoblastos foram lavados com PBS 1vez. Em seguida, a monocamada foi fixada com paraformaldeído por 20min. Após a fixação, as células foram lavadas com água destilada e coradas com Alizarin Red durante 5min à

temperatura ambiente para coloração da matriz mineralizada. Posteriormente, as células foram lavadas 5 vezes com água destilada para remover o corante. A diferenciação celular foi avaliada pela presença de matriz mineralizada e o efeito das diferentes doses de E2 sobre sua formação. Quinze campos aleatórios de cada placa foram fotografados com microscópio de contraste de fase e as imagens foram analisadas usando o programa Image J. As imagens foram convertidas em imagens de fundo branco para visualizar a matriz mineralizada e marcar com área percentual do campo.

1.5 Expressão Gênica

O RNA total foi extraído dos osteoblastos pelo método do Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O kit High Capacity cDNA de transcrição reversa para RT-PCR® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a síntese de 20µl de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000ng de RNA total. Os níveis de mRNA de RANKL, OPG e c-Fos foram determinados por RT-qPCR. As medições quantitativas foram realizadas no sistema de detecção "Applied Biosystems Step One Plus" utilizando o kit comercial TaqMan para qPCR (Applied Biosystems) de acordo com as instruções do fabricante. As condições de amplificação foram como se segue: ativação da enzima a 50°C durante 2min, desnaturação a 95°C durante 10min, o cDNA foi amplificado durante 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15min e a extensão a 60°C durante 1min. Todas as análises foram realizadas em duplicata. A expressão gênica foi quantificada em relação aos valores do grupo Controle, após normalização por um controle interno, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (Mm00434759_m1), pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como descrito anteriormente [12].

1.6 Western Blot

A síntese proteica de RANKL, OPG e c-Fos foi analisada por Western Blotting (WB). As proteínas foram lisadas com tampão Ripa (Radio Immuno Precipitation Assay: 150 mM cloreto de sódio, 1% NP-40 ou Triton X-100, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS e 50 mM Tris, pH 8.0) e o homogeneizado centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 12000 rpm. A quantificação foi realizada segundo o método BRADFORD, de acordo com o protocolo padronizado em nosso laboratório e utilizamos as amostras contendo 50ng de proteína. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida na concentração de 15%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot utilizando-se tampão de transferência. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de bloqueio à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário nas concentrações: anti-RANKL 1: 5000, OPG 1: 1000 e c-FOS 1: 1000 sob agitação constante em temperatura 2 a 8°C overnight. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário, conjugados a peroxidase (IgG anti-mouse ou anti coelho) utilizados na titulação de 1: 1000 e 1: 10000 respectivamente. Por fim, a imuno-deteção foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instruções do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). As análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo software Carestream Molecular Imaging 5.0 (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

2 Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo D'Agostino & Pearson omnibus normality test. Para as variáveis fosfatase alcalina, os dados foram submetidos ao teste T de student. Para as variáveis de expressão gênica e síntese protéica, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA com teste pos hoc de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% e o software utilizado foi o GraphPad Prism version 5.0.

Resultados

2.3 Presença da fosfatase alcalina e osteocalcina nos osteoblastos

Os níveis da fosfatase alcalina (Figura 1A) e osteocalcina (Figura 1B) mostram-se elevados nos osteoblastos comparado com as CTMs indiferenciadas, caracterizando a diferenciação celular.

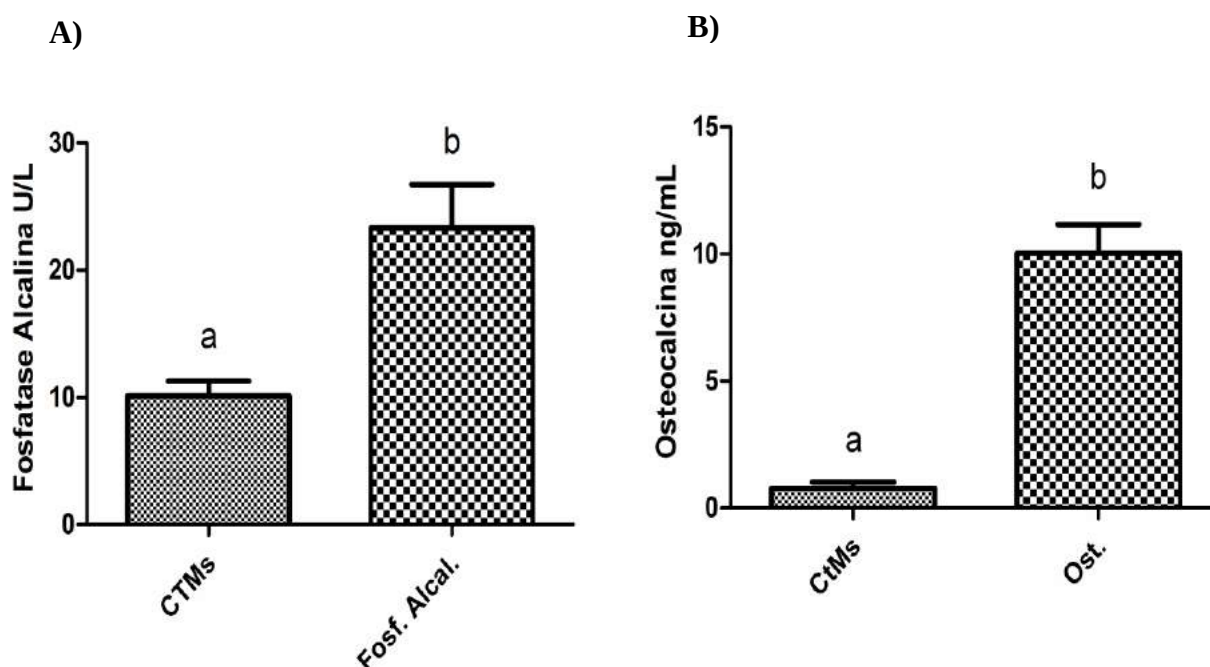


Figura 1. Níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina nos osteoblastos após 16 dias cultivadas em meio de osteoindução (B). CTMs foram cultivadas pelo mesmo período de tempo (A). Os dados foram expressos em média $\pm$ desvio padrão. Foi utilizado o teste t ($p < 0,0001$).

2.4 T3 diminui a quantidade de matriz mineralizada nas concentrações fisiológicas e suprafisiológica nos osteoblastos

A matriz mineralizada dos osteoblastos foi quantificada a fim de verificar o efeito do T3. Na figura 2A estão representadas as imagens das CTMs indiferenciadas com ausência de matriz mineralizada. Na figura 2B estão representadas as imagens da matriz mineralizada dos osteoblastos sem T3 e em C, D e E tratados com doses infrafisiológica, fisiológica e suprafisiológica, respectivamente, por um período de 72 horas. A figura 2F mostra que a quantidade de matriz mineralizada no grupo T3I foi semelhante ao C e nos grupos T3F e T3S apresentaram diminuídas.

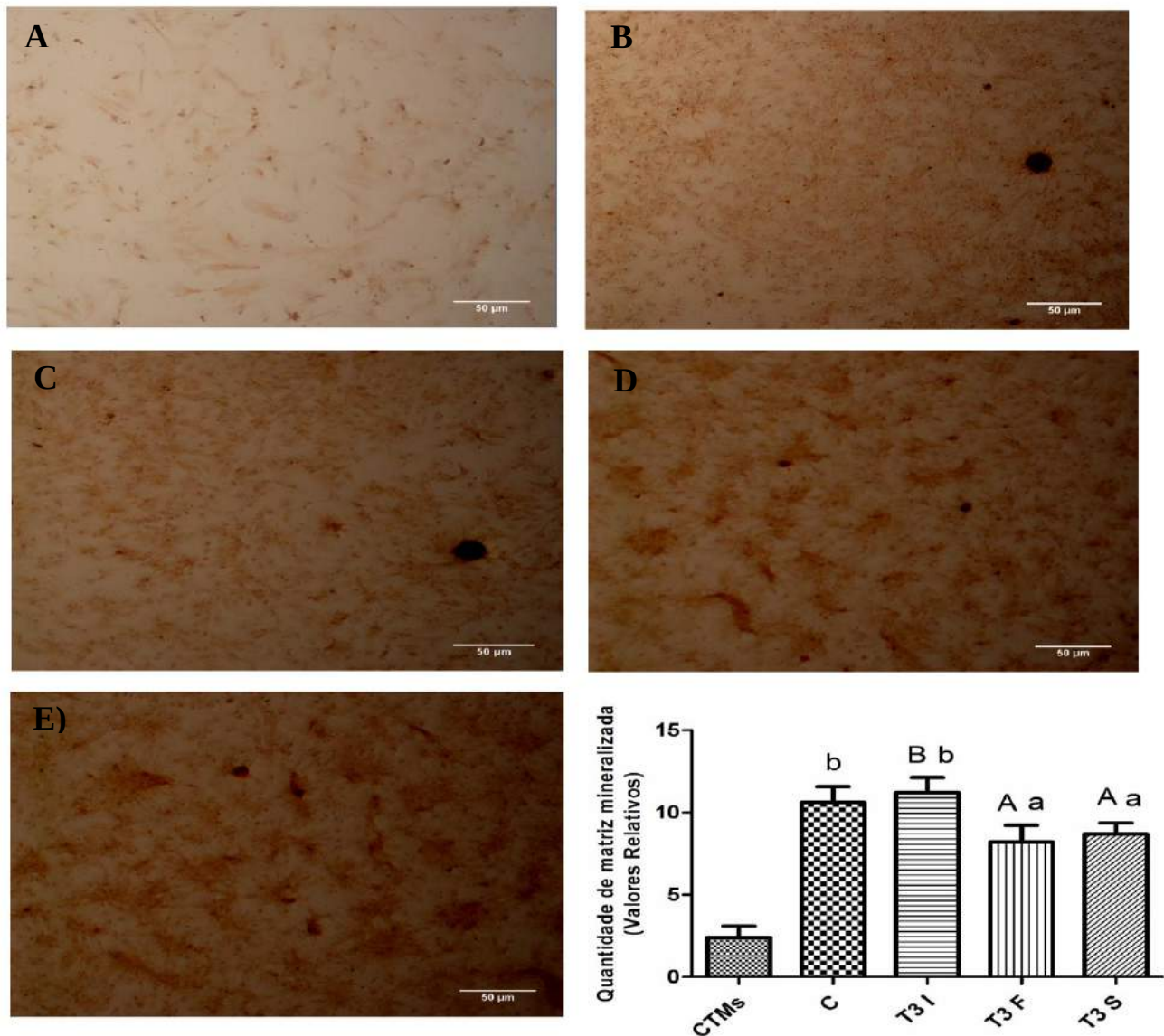


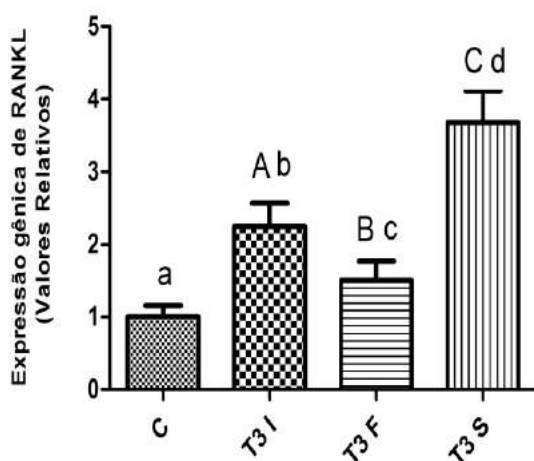
Figura 2. Coloração da matriz mineralizada e efeito de diferentes doses de T₃ sobre a acumulo de matriz. A) CTMs indiferenciadas, sem matriz mineralizada. B) osteoblastos na ausência de T₃. C, D e E) osteoblastos na presença de T₃I, T₃F e T₃S, respectivamente. F) Gráfico quantitativo da matriz mineralizada das CTMs e dos osteoblastos na presença e ausência de T₃. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA) complementada pelo

teste de Tukey. Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (T3I, T3F, T3S x C). Letras maiúsculas diferentes= diferença estatística entre os tratamentos (T3I x T3P x T3S). Letras minúscula e maiúscula iguais = não apresentam diferença estatística.

2.5 Concentrações infra fisiológica e supra fisiológica de T3 aumentam a expressão gênica e síntese proteica de RANKL.

As concentrações utilizadas nos grupos T3I, T3F e T3S elevaram os níveis de mRNA e proteína de RANKL em relação ao controle. Observou-se também aumento da expressão gênica do grupo T3I e T3S em relação ao T3F e dos níveis de proteína dos grupos T3F e T3S comparado ao T3I.

A)



B)

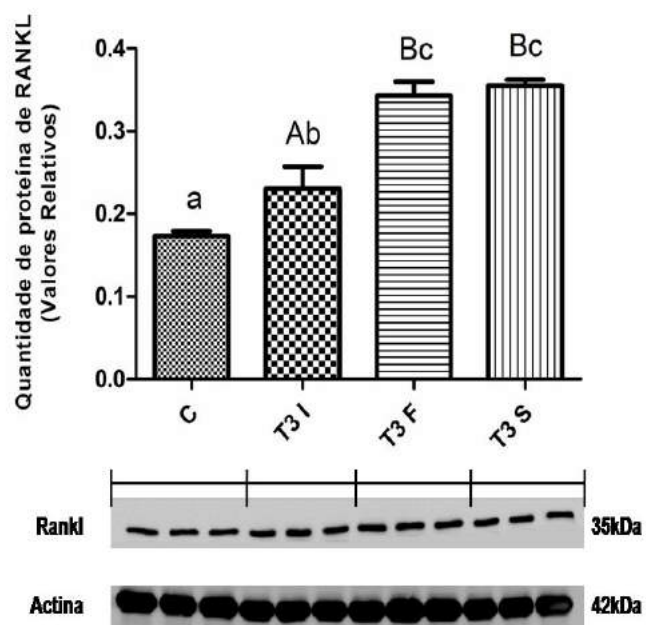


Figura 3. Efeito de diferentes doses de T_3 sobre a expressão gênica e síntese proteica de RANKL. T3I (dose infra fisiológica), T3F (dose fisiológica), T3S (dose

suprafisiológica) e C (Controle). Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (T3I, T3F, T3S x C). Letras maiúscula diferentes= diferença estatística entre os tratamentos (T3I x T3F x T3S). Letras minúscula e maiúscula iguais = não apresentam diferença estatística.

2.6 Aumento da expressão de RANKL pelas diferentes concentrações de T3 é afetado pela presença de E2 .

O grupo T3I, T3F e T3S foram utilizados como controle para as diferentes associações com E2. Nossos dados mostram que as diferentes concentrações de E2 (potencializam a ação do T3 aumentando os níveis de mRNA de RANKL (Figura 4A e B). Entretanto, as diferentes concentrações de E2 quando associadas ao T3S levam a diminuição da expressão gênica de RANKL (Figura 4C).

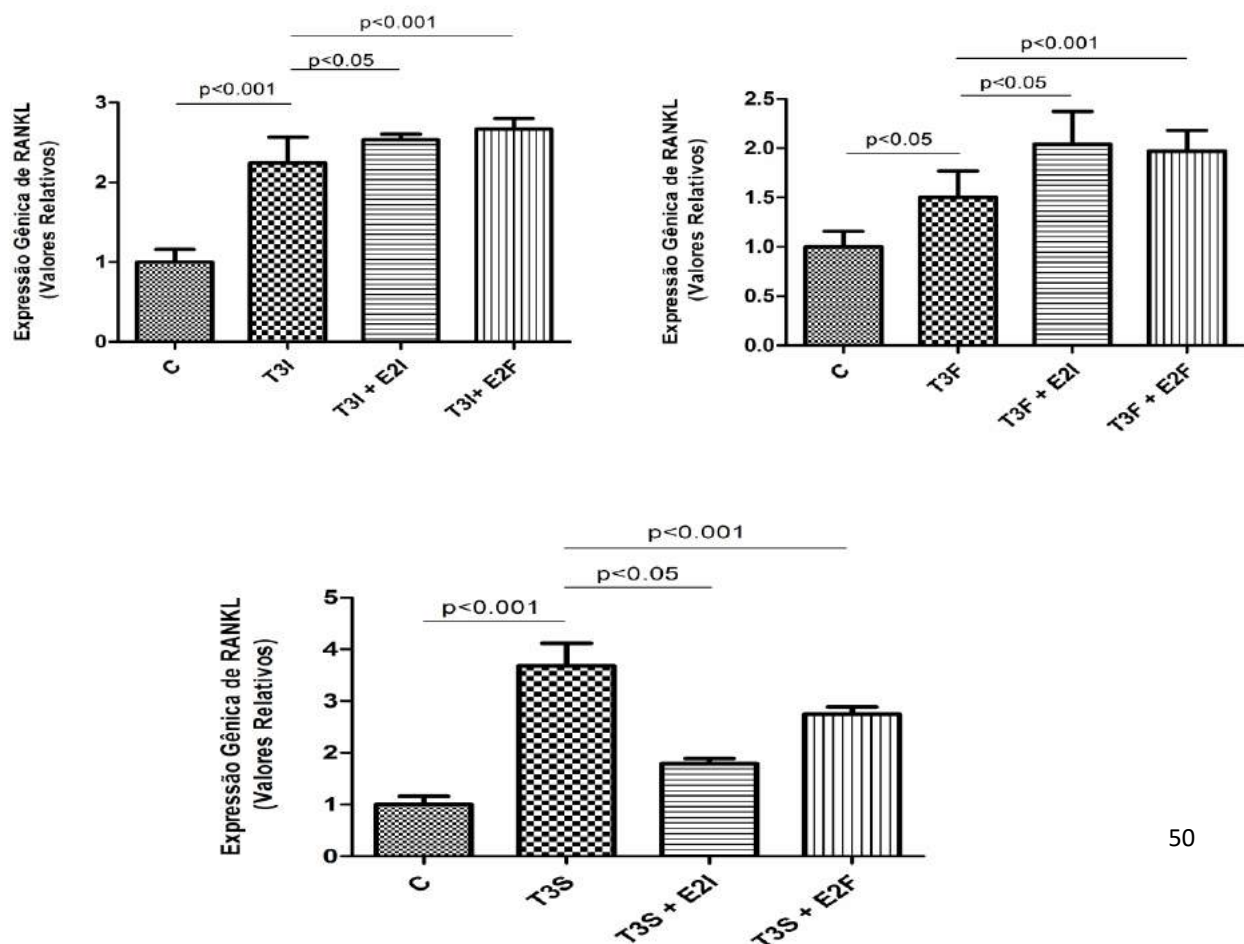
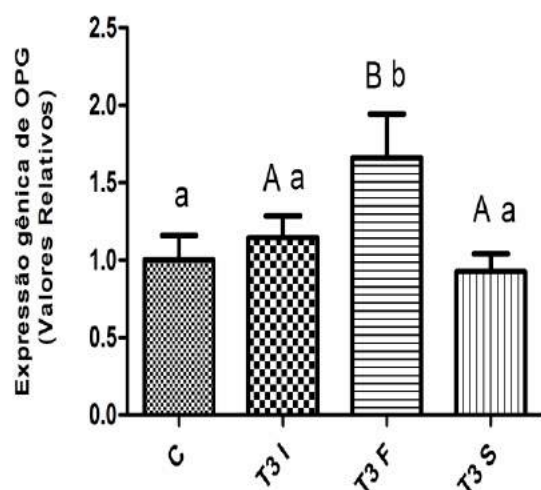


Figura 4. Efeito do T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-10} M) associado ao E2I (10^{-9} M) e E2F (10^{-8} M) sobre a expressão gênica de RANKL, T3I: dose infrafisiológica; T3F: dose fisiológica; T3S: dose suprafisiológica; E2I: dose infrafisiológica; E2F: dose fisiológica. Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA complementada pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ considerado significativo).

2.7 Concentração fisiológica de T3 aumentam a expressão de mRNA e de proteína de OPG em osteoblastos humanos.

Na figura 5 foi demonstrado aumento da expressão gênica e proteica de OPG na dose T3F em relação ao C (Figura 5A e B) e nas doses T3I e T3S não apresentaram efeito. Entre os grupos foi observado aumento da expressão gênica de T3F em relação ao T3I e T3S.

A)



B)

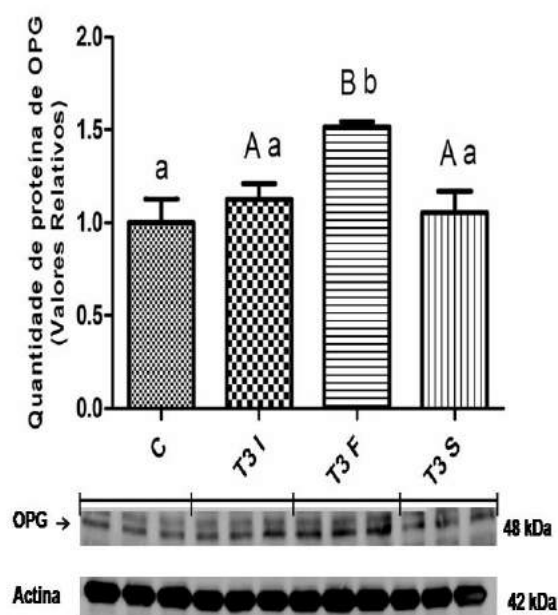
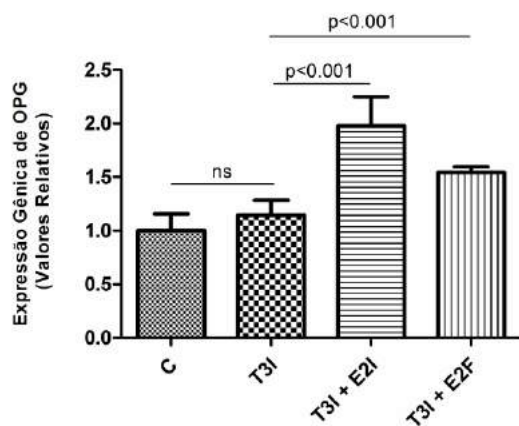


Figura 5. Efeito de diferentes doses de T3 sobre a expressão gênica e proteica de OPG. C (Controle); T3I (10^{-10} M); T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-8} M). Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado significativo). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (T3I, T3F, T3S x C). Letras maiúsculas diferentes = diferença estatística entre os tratamentos (T3I x T3F x T3S). Letras minúscula e maiúscula iguais = não apresentam diferença estatística.

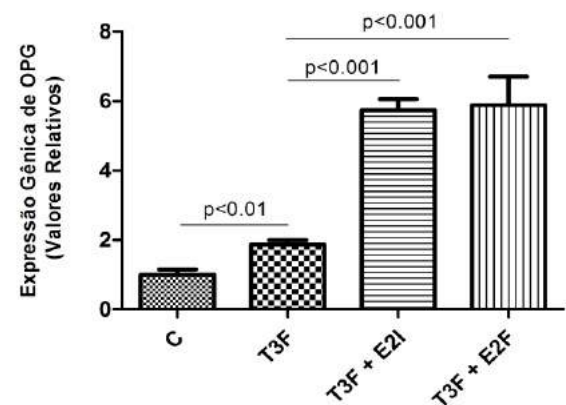
2.8 Diferentes concentrações de E2 aumentaram o mRNA de OPG quando associado às outras concentrações de T3

As diferentes concentrações de E2 potencializaram a ação do T3 (T3I, T3F, T3S) aumentando a expressão gênica de OPG (Figura 6 A, B e C), respectivamente.

A)



B)



C)

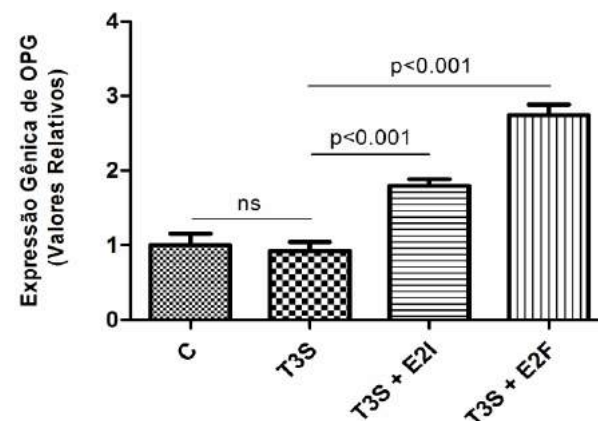


Figura 6. Efeito do T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-10} M) associado ao E2I (10^{-9} M) e E2F (10^{-8} M) sobre a expressão gênica de OPG. T3I: dose infra-fisiológica; T3F: dose fisiológica; T3S: dose supra-fisiológica; E2I: dose infra-fisiológica; E2F: dose fisiológica. Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA) com teste pos hoc de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado significativo).

2.9 Concentrações fisiológica e supra-fisiológica de T3 diminuem a expressão gênica e síntese proteica de c-Fos

Na Figura 7 observamos que na dose T3I houve aumento da expressão gênica em relação ao C (Figura 7 A e B). Entretanto, a expressão de mRNA e síntese proteica no grupo T3F e T3S apresentaram diminuídos em relação ao C. Entre os grupos tratados houve diminuição progressiva de mRNA e da síntese proteica de T3I, T3F e T3S, respectivamente.

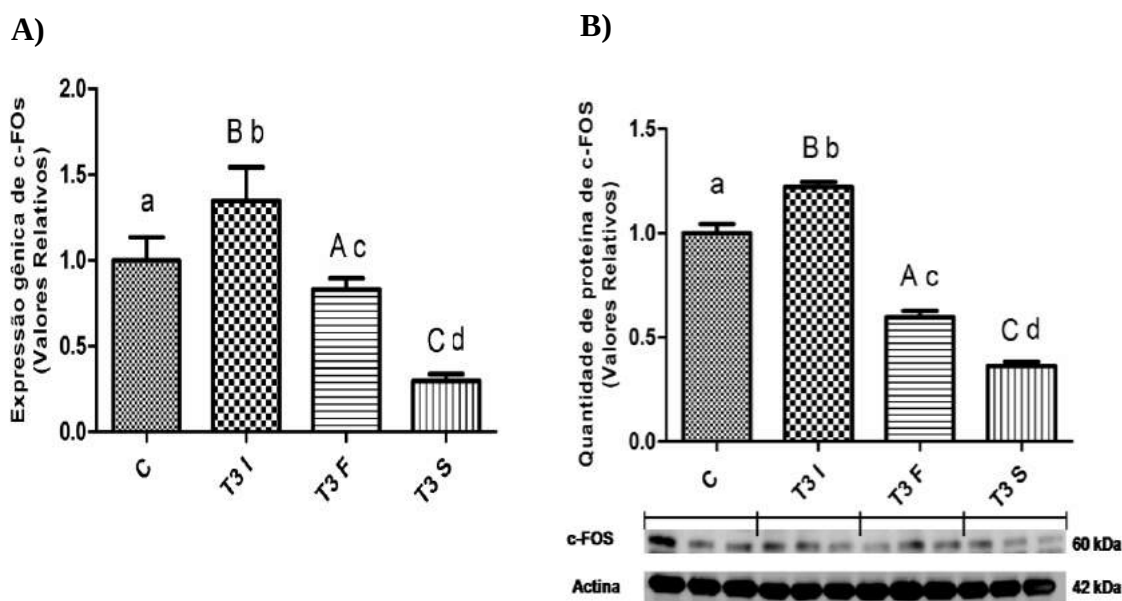


Figura 7. Efeito de diferentes doses de T3 sobre a expressão gênica e proteica de c-Fos. T3I (10^{-10} M); T3F (10^{-9} M); T3S (10^{-8} M) e C (Controle). Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado significativo). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (T3I, T3F, T3S x C). Letras maiúsculas diferentes = diferença estatística entre os tratamentos (T3I x T3F x T3S). Letras minúscula e maiúscula iguais = não apresentam diferença estatística.

2.10 Diferentes concentrações de E2 aumentaram a expressão de mRNA de c-Fos quando associadas às outras concentrações de T3.

Foi demonstrado que as concentrações de E2 potencializaram a ação do T3 e aumentou a expressão de mRNA de c-Fos (Figura 6 A, B, C), respectivamente.

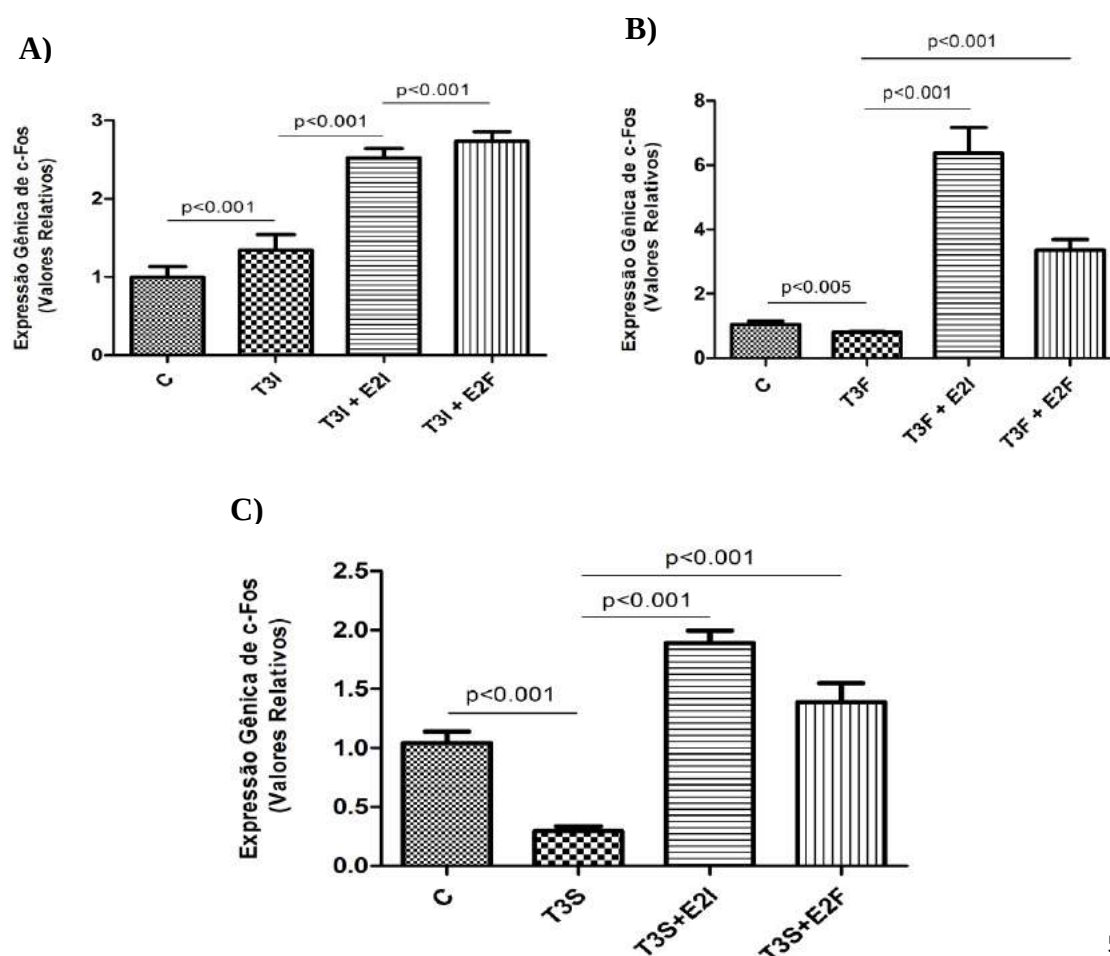


Figura 8. Efeito do T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-10} M) associado ao E2I (10^{-9} M) e E2F (10^{-8} M) sobre a expressão gênica de c-Fos. T3I: dose infrafisiológica; T3F: dose fisiológica; T3S: dose suprafisiológica; E2I: dose infrafisiológica; E2F: dose fisiológica. Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA complementada pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado significativo).

Discussão

Os efeitos do hormônio tireoidiano sobre a proliferação osteoblástica têm sido relatados [13], entretanto, esse tema ainda é controverso. Detectamos a ação das diferentes doses de T3 nos osteoblastos, demonstrando a importância deste hormônio no processo de remodelação óssea, em situações normais, de queda ou excesso hormonal.

Inicialmente, e conforme descrito por Blair et al [14], detectamos que as células sintetizaram grandes quantidades de fosfatase alcalina e osteocalcina comprovando que as mesmas haviam-se diferenciado em osteoblastos (Figura 1 A e B) respectivamente. Dessa forma, foram capazes de realizar a deposição da matriz mineralizada. Sabemos que o T3 pode reduzir a síntese de proteínas não colagênicas e a produção da fosfatase alcalina e osteocalcina, que são importantes no processo da mineralização da matriz, visto que são substâncias produzidas pelos osteoblastos maduros [14].

Nesse estudo, notamos que essa matriz foi reduzida quando administrado T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-8} M), (Figura 2F), demonstrando que o efeito do T3 nessas concentrações gera um efeito negativo na matriz óssea, o que já é sabido em relação a concentração suprafisiológica, semelhante ao que ocorre no hipertireoidismo *in vivo*, que reduz a quantidade de massa óssea por indução da reabsorção, podendo induzir a

osteoporose [4,10]. Todavia, o efeito negativo do hormônio tireoideano em concentrações fisiológicas é compensado pela ação de outros hormônios. Baqi L *et al* [15] detectaram que no período pré-menopausa, a densidade mineral óssea foi maior em mulheres que apresentavam TSH normal (0,35-6,3 mU / L). De fato, foi verificado que o aumento do TSH parece compensar o efeito negativo do T3 mais elevado sobre a matriz óssea [16].

Observamos aumento na expressão gênica e síntese proteica de RANKL, nas concentrações de T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-8} M) em relação ao C nos osteoblastos, semelhante aos resultados encontrados por Miura *et al.*[17], onde observaram que o T3 nas concentrações suprafisiológicas (10^{-8} M e 10^{-5} M) induziu a expressão de mRNA de RANKL em cultura primária de células osteoblásticas de rato (Figura 3A e B).

Na concentração fisiológica os níveis gênicos de RANKL produzido pelos osteoblastos não necessitam estar aumentados para estimular a osteoclastogênese (Figura 3A) [18]. Nessa concentração houve aumento considerável dos níveis protéicos (Figura 3B). Provavelmente o T3 pode estar regulando a expressão de genes pelo “splicing” e controlando os processos de tradução e pós tradução [19,20], porém, os mecanismos envolvidos nesses processos não estão completamente compreendidos [21].

A expressão de OPG mostrou que a dose fisiológica de T3 aumentou os níveis de mRNA e proteína (Fig.5 A e B) respectivamente. Kanatani *et al.* [7] relataram que, quando administrado T3 em osteoclastos de rato, houve aumento dos níveis de mRNA de OPG, e diminuição dos níveis de mRNA de RANKL de maneira dose dependente. Verificamos que no grupo T3F houve aumento da síntese protéica de OPG e RANKL em comparação aos outros grupos (Figura 3B e Figura 5B) respectivamente. De fato, a OPG exerce seu efeito protetor na reabsorção óssea, agindo como um receptor

antagonista aos efeitos de RANKL, principalmente em situações fisiológicas. Porém, quando administrada a dose T3S, os níveis de expressão de mRNA e síntese proteica de OPG diminuem, tornando-se semelhantes aos níveis apresentados pelo controle (Figura 5A e 5B) respectivamente. Desse modo, na presença da dose suprafisiológica, os osteoblastos podem reduzir a produção de OPG, proporcionando maiores chances de ligação do RANKL ao seu receptor, ativando a osteoclastogênese [22]. Esse dado nos mostra a importância do efeito protetor da OPG no tecido ósseo em situações normais.

A menopausa é um fator preditivo para o balanço negativo entre reposição osteoblástica e degeneração osteoclástica devido à deficiência estrogênica, independente da presença ou ausência de alteração dos hormônios tireoidianos [23].

Visando compreender melhor a ação do hormônio estrógeno (E2) sobre os osteoblastos, após o tratamento prévio com T3, associamos diferentes doses deste hormônio, mimetizando situações como o hipotireoidismo, o eutireoidismo e o hipertireoidismo, associados à menopausa. Observamos, que os tratamentos concomitantes com T3 e E2, nas diferentes situações supracitadas, foram capazes de modular a expressão de mRNA de RANKL e OPG, comprovando que o E2I e E2F é capaz de intensificar a ação do hormônio tireoidiano (Figura 4 A, B e C) e (Figura 6 A, B e C). Mesmo que o RANKL tenha aumentado com a associação estrogênica, detectamos que houve aumento na expressão de mRNA da OPG em todos os grupos associados. Esses achados reforçam que um dos mecanismos pelos quais o E2 exerce sua função protetora sobre o osso é via o aumento da OPG. Isso ocorreu principalmente, nos grupos em que a expressão de RANKL favoreceu a reabsorção (grupos infrafisiológico e suprafisiológico), De fato, a OPG apresenta papel protetor importante antireabsorção, visto que age inibindo as fases terminais da diferenciação osteoclástica e induz a apoptose dessas células [24].

O tratamento com T3S associado com as diferentes doses de E2 foram capazes de promover redução significativa nos níveis de mRNA de RANKL e aumento nos níveis de OPG (Figura 4 C e Figura 6 C) comprovando a restrita interação RANKL/OPG no controle da remodelação óssea [24]. Em situações de hipertireoidismo, a presença estrogênica é crucial para a proteção óssea. Alguns autores explicam que nessa situação, a OPG parece agir induzindo a apoptose osteoclástica ao se ligar com RANKL, impedindo sua ligação com o RANK e a reabsorção óssea [25,26].

O fator de transcrição c-Fos é essencial para ativação da osteoclastogênese. No entanto, ainda não é totalmente esclarecido a especificidade desse fator de transcrição nos osteoblastos [27]. Estudo de Kanatani *et al.* [7] relata que o hormônio tireoidiano estimula a osteoclastogênese por meio da ativação de c-Fos nos osteoclastos. O nosso resultado foi divergente, pois verificamos que a expressão gênica e síntese proteica de c-Fos aumentou na dose T3I e foi diminuindo gradativamente com as doses de T3F e T3S (Figura 7A e B) respectivamente, sugerindo que o mecanismo responsável pela diferenciação e maturação dos osteoclastos em situações com presença de níveis fisiológicos e suprafisiológicos de T3 possa não envolver o c-Fos.

Apesar de ser evidente que o T3 regula a diferenciação dos osteoblastos, esse hormônio pode deprimir genes como c-Fos e histona H4, relacionados à especificidade e proliferação celular, e induzir a expressão de outros genes como a osteocalcina [28]. Baseado nisso, o T3 quando administrado pode estar agindo na via intracelular dos osteoblastos, impedindo a ação da via adenil-ciclase (Ac), proteína-quinase A (PKA) e AMPC, genes primordiais para a ativação do c-Fos [29].

Sabemos que o c-Fos é importante para a maturação osteoclástica [30], sendo assim, em nosso estudo foi demonstrado que o T3 quando associado ao E2, aumenta o mRNA de c-Fos (Figura 8 A, B e C). Arai *et al* [30] detectaram regulação positiva de

RANK pela ativação de c-Fos, que causou sinais induzidos por RANKL mas não foi capaz de induzir a osteoclastogênese, concluindo que a proteína c-Fos desempenha um importante papel na regulação positiva de RANK em precursores de osteoclastos no tecido ósseo.

Apesar do nosso estudo ser restrito pela ausência de osteoclastos para análise de fatores locais e sistêmicos, nossa pesquisa fornece informações importantes para melhor entendimento das proteínas envolvidas na remodelação óssea nos osteoblastos na presença de T3 associado ou não ao E2. Visto que os osteoblastos participam da formação óssea e indiretamente podem controlar a reabsorção do osso e que ainda é pouco entendido o mecanismo de ação do T3 e E2 no metabolismo ósseo.

Conclusão

Em resumo, concentrações de T3 estimularam o aumento da expressão gênica e síntese proteica de RANKL e OPG e diminuíram os de c-Fos. Além disso, o T3 nas concentrações 10^{-9}M e 10^{-8}M diminuíram a quantidade da matriz óssea mineralizada. A associação de T3 e E2 potencializou a expressão gênica de RANKL, OPG e c-Fos, com excessão de situações com doses suprafisiológica de T3. O presente trabalho forneceu conhecimentos sobre a ação molecular do T3, bem como a interação T3 e E2, sobre os osteoblastos, células fundamentais para o remodelação óssea. Esses conhecimentos podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na diminuição da massa óssea observada no hipertireoidismo.

Referências Bibliográficas

1. Nicholls JJ, Brassill NJ, Williams GR, Bassett JHD. The skeletal consequences of thyrotoxicosis. *J Endocrinol.* 2012;213:209-21.
2. Mundy GR, Oyajobi BO. Bone remodeling. In: Favus MJ, editor. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism.* 5th ed. Washington, DC: American Society for Bone and Mineral Research; 2003. p. 28-31.
3. Vestergaard P, Bassett L. Fractures in patients with hyperthyroidism and hypothyroidism: a nationwide follow-up study in 16,249 patients. *Thyroid.* 2002; 12:411-9.
4. Freitas FR, Moriscot AS, Jorgetti V, Soares AG, Passarelli M, Scanlan TS, et al. Spared bone mass in rats treated with thyroid hormone receptor TR β -selective compound GC-1. *Am J Physiol Endocrinol.* 2003;285:1135-41.
5. Beederman M, Farina EM, Reid RR. Molecular basis of cranial suture biology and disease: osteoblastic and osteoclastic perspectives. *Genes Dis.* 2014;1:120-5.
6. Ikeda K, Takeshita S. Factors and mechanisms involved in the coupling from bone resorption to formation: how osteoclasts talk to osteoblasts. *J Bone Metab.* 2014; 21:163-7.
7. Kanatani M, Sugimoto T, Sowa H, Kobayashi T, Kanzawa M, Chihara K. Thyroid hormone stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of RANKL /RANK interaction. *J Cell Physiol.* 2004; 201:17-25.
8. Saraiva PP, Teixeira SS, Conde SJ, Nogueira CR. The importance of hormone receptor analysis in osteosarcoma cells growth submitted to treatment with estrogen in association with thyroih hormone. *Cell Biochem Funct.* 2008; 26 :107-10.
9. Silha JV, Mishra S, Rosen CJ, Beamer WG, Turner RT, Powell DR, et al. Perturbations in bone formation and resorption in insulin-like growth factor binding protein-3 transgenic mice. *J Bone Miner Res.* 2003; 18:1834-41.
10. Bassett JH, Williams GR. The molecular actions of thyroid hormone in bone. *Trends Endocrinol Metab.* 2003; 14:356-64.
11. Mencej-Bedrač S, Zupan J, Mlakar SJ, Zavratnik A, Preželj J, Marc J. Raloxifene pharmacodynamics is influenced by genetic variants in the

- RANKL/RANK/OPG system and in the Wnt signaling pathway. *Drug Metabol Drug Interact.* 2014;29:111-4.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001; 25:402-8.
 13. Yen PM. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.* 2001; 81:1097-142.
 14. Blair HC, Zaid M, Schlesinger PH. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J.* 2002; 364 Pt 2:329-41.
 15. Baqi L, Payer J, Killinger Z, Hruzikova P, Cierny D, Susienkova K, et al. Thyrotropin versus thyroid hormone in regulating bone density and turnover in premenopausal women. *Endocr Regul.* 2010; 42:57-63.
 16. Kim TH, Joung JY, Kang M, Choi SK, Kim K, Jang JY, et al. A modest protective effect of thyrotropin against bone loss is associated with plasma triiodothyronine levels. *PLoS One.* 2015; 10(12):e0145292.
 17. Miura M, Tanaka K, Komatsu Y, Suda M, Yasoda A, Sakuma Y, et al. A novel interaction between thyroid hormones and 1,25(OH)₂D₃ in osteoclast formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 291:987-94.
 18. Baud'huin M, Lamoureux F, Duplomb L, Rédin F. I, Heymann D, R.A.N.K. Rankl osteoprotegerin: key partners of osteoimmunology and vascular diseases. *Cell Mol Life Sci.* 2007; 64: 2334–2350
 19. Liu D, Waxman DJ Post-transcriptional regulation of hepatic NADPH-cytochrome P450 reductase by thyroid hormone: independent effects on poly(A) tail length and mRNA stability. *Mol Pharmacol.* 2002; 61: 1089-1096.
 20. Baas D, Puymirat J, Sarlieve LL. Posttranscriptional regulation of oligodendroglial thyroid hormone (T3) receptor beta 1 by T3. *Int J Dev Neurosci.* 1998; 16: 461-467.
 21. Nunes MT. Thyroid hormones: mechanism of action and biological significance *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2003; 47.
 22. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, et al. RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97:1566-71.

23. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000; 21:115-37.
24. J.H. Kang, H.M. Ko, J.S. Moon, H.I. Yoo, J.Y. Jung, M.S. Kim, J.T. Koh, W.J. Kim, and S.H. Kim Osteoprotegerin Expressed by Osteoclasts. *J Dent Res.* 2014; 11: 1116–1123
25. Schoppet M, Preissner KT, Hofbauer LC. RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 22: 549-553.
26. Amato G, Mazziotti G, Sorvillo F, Piscopo M, Lalli E, Biondi B et al High serum osteoprotegerin levels in patients with hyperthyroidism: effect of medical treatment. *Eur Cell Mater.* 2006; 11: 8-15.
27. Karsenty G, Wagner EF. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev Cell.* 2002; 2: 389-406.
28. Varga F, Rumpler M, Luegmayr E, Fratzl-Zelman N, Glantschnig H, Klaushofer K. Triiodothyronine, a regulator of osteoblastic differentiation: depression of histone H4, attenuation of c-fos/c-jun, and induction of osteocalcin expression. *Calcif Tissue Int.* 1997;61:404-11.
29. Goltzman D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res.* 1999;14:173-7.
30. Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Hyasuda H, et al Fos plays an essential role in the up-regulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci.* 2012;25 Pt 12:2910-7.

4.3 Manuscrito 3

Estrógeno (E2) eleva os níveis de mRNA de RANKL, OPG e c-FOS em osteoblastos humanos derivados de células-tronco mesenquimais.

Authors:

Regiane Marques Castro Olimpio¹, Maria Teresa De Sibio¹, Fernanda Cristina Fontes Moretto¹, Miriane de Oliveira¹, Lucas Sollas Mathias, Bianca Mariani Gonçalves¹, Igor Carvalho Deprá¹, Sarah Maria Barneze Costa¹, Bruna Moretto Rodrigues¹ Durvanei Augusto Maria², Fausto Viterbo de Oliveira Neto¹, Gilberto Paz Filho³, Patrícia Pinto Saraiva¹, Célia Regina Nogueira¹.

Affiliations:

1. Department of Internal Medicine, Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Botucatu, SP, Brazil, 18618-970.
2. Laboratory of Biochemistry and Biophysics, Butantan Institute, 1500, Avenida Vital Brazil, São Paulo, Brazil.
3. Department of Genome Sciences, John Curtin School of Medical Research, The Australian National University, Canberra, ACT, Australia

Corresponding Author:

Célia Regina Nogueira

Botucatu Medical School, Universidade Estadual Paulista – UNESP Distrito de Rubião Jr s/n, Botucatu, SP, Brazil, 18618-000 Telephone: + (55) 14-3881-6213

Fax: + (55) 14-3881-6424

E-mail: nogueiracelia57@gmail.com

Resumo

O osso é um tecido conjuntivo mineralizado cuja homeostase está sob a influência de diversos fatores sistêmicos e locais. Entre os fatores sistêmicos, sabe-se que o estrógeno (E2) é um hormônio que inibe a reabsorção óssea e, por essa razão, tem sido amplamente utilizado no tratamento e na prevenção da osteoporose. Os mecanismos de ação do E2 na reabsorção óssea não estão completamente esclarecidos, portanto, há um interesse considerável para esclarecer as vias pelas quais o seu efeito protetor exerce sobre o osso. A associação de E2 e triiodotironina (T3) gera uma resposta complexa no tecido ósseo devido a esses hormônios controlarem a maturação e a atividade dos osteoblastos e a síntese de alguns genes como RANKL, OPG e c-FOS primordiais para a formação e reabsorção óssea. Baseado nisso, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar o efeito do E2 isoladamente e associado ao T3 sobre a expressão de mRNA de RANKL, OPG e c-FOS em osteoblastos diferenciados a partir de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo. Os osteoblastos foram incubados por 72 horas com as concentrações infra-fisiológica (E2I/10⁻⁹M); fisiológicas (E2F/10⁻⁸M) de E2, separadamente e em diferentes associações com o T3 nas doses infra-fisiológica (T3I/ 10⁻¹⁰M); fisiológica (T3F/10⁻⁹M) ou supra-fisiológica (T3S/10⁻⁸M), formando os seguintes grupos de tratamentos associados E2I+T3I, E2I+T3F, E2I+T3S, E2F+T3I, E2F+T3 e E2F+T3S, o grupo sem nenhum tratamento foi considerado controle (C). RT-qPCR foi utilizado para analisar a expressão dos genes estudados. A dose de E2 administrada ao grupo E2F elevou os níveis de RANKL, OPG e c-Fos em relação ao C, porém a expressão de RANKL mostrou-se aumentada no grupo E2I enquanto a expressão de OPG estava diminuída e não causou nenhum efeito sobre c-Fos. Ao associar o T3 aos tratamentos de E2, observamos que a presença de T3 aumenta os níveis gênicos de RANKL, OPG e c-FOS quando comparados aos grupos o E2I ou E2F. Em resumo, podemos afirmar que as doses analisadas de E2, principalmente em suas associações com o T3, tendem a aumentar os níveis dos genes alvos estudados.

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

Abstract

Bone is a mineralized connective tissue whose homeostasis is under the influence of many systemic and local factors. Among the systemic factors, estrogen (E2) is known to inhibit bone reabsorption and, for this reason, has been widely used to treat and prevent osteoporosis. The mechanisms of action of E2 on bone reabsorption are not completely clarified, therefore much interest exists in the study of the pathways by which it exerts its protector effect on bone. Association of E2 and triiodothyronine (T3) generates a complex response in bone tissue, due to the control of both hormones on the maturation and activity of osteoblasts and the synthesis of some genes such as RANKL, OPG, and c-FOS, essential in the bone matrix formation and reabsorption process. Based on that, the goal of our study was to evaluate the effect of E2, alone or associated to T3, on the expression of these three genes, in osteoblasts derived from mesenchymal stem cells obtained from human adipose tissue. The osteoblasts were incubated, for 72h, with infra-physiologic (E2I, 10-9M) and physiologic (E2F, 10-8M) doses of E2, alone or in combination with T3 in supra- (T3S, 10-8M), infra- (T3I, 10-10M), and physiologic (T3F, 10-9M) doses, resulting in six associated treatment groups, E2I+T3I, E2I+T3F, E2I+T3S, E2F+T3I, E2F+T3, and E2F+T3S. Gene expression was assayed by RT-qPCR. The E2 dose administered to the E2F group elevated RANKL, OPG, and c-FOS levels compared to the untreated control (C), while in E2I RANKL expression was also elevated, but OPG showed decreased expression, and there was no effect on c-FOS. Associating E2 to T3, expression of all genes was elevated, compared to treatment with E2, only. In conclusion, the tested doses of E2, especially associated with T3, show a trend to increase the levels of the genes in this study.

Key-words: Mesenchymal stem cells; Estrogen; RANKL; OPG; c-FOS; Osteoblast

Introdução

O estrógeno (E2) é um hormônio esteróide que inibe a reabsorção óssea [1,2]. A deficiência estrogênica causa perda óssea, resultando na osteopenia e posteriormente na osteoporose. A perda de massa óssea ocorre devido ao desequilíbrio na remodelação óssea, com maior reabsorção em relação à neoformação óssea [3]. Os mecanismos celulares e moleculares de ação do E2 sobre o tecido ósseo ainda não estão completamente elucidados, apesar de algumas vias de ação desse hormônio já serem conhecidas, como a via RANK/RANKL/OPG, relacionada à formação e ativação de osteoclastos [4,5]. A presença de receptores de estrógeno (RE) foi demonstrada em osteoblastos [6,7]. Ao agir sobre células mesenquimais osteoprogenitoras/osteoblastos, o E2 promove redução dos níveis de RANKL (ligante de RANK) e aumento da produção de OPG (competidor de RANK) [6]. Assim, a OPG, em níveis aumentados [8], liga-se ao RANKL e impede a interação deste com o RANK, inibindo, conseqüentemente, a fusão dos precursores de osteoclastos [9]. Outro fator que participa da remodelação, secretado pelos osteoblastos é a proteína c-Fos que quando elevada favorece a maturação e proliferação dos osteoblastos *in vitro* [10]. Essa proteína tem ação importante tanto nos osteoblastos como nos osteoclastos, porém, ainda não é totalmente elucidada a função de c-Fos nos diferentes processos de remodelação óssea [11].

Além de atuar sobre os osteoblastos, inibindo a osteoclastogênese, o E2 também estimula a síntese de matriz óssea [12,13] e induz essas células a produzirem e liberarem fatores como, por exemplo, o TGF- β (Fator de transformação de crescimento- β). Esses fatores atuam paracrinamente sobre os osteoclastos [14], estimulando sua morte e inibindo a reabsorção óssea [15]. A paracrinia entre osteoblastos e osteoclastos é considerada a principal via de diminuição da formação e/ou da atividade dos

osteoclastos, e conseqüentemente, de controle da remodelação óssea [16]. Porém, alguns autores têm demonstrado que o E2 pode agir diretamente sobre os osteoclastos [7,17,18]. Uma vez que *in vitro*, observou-se a apoptose em osteoclastos tratados com 17 β -estradiol [19].

O T3 é essencial para o desenvolvimento, crescimento e metabolismo ósseo, estimulando tanto a formação quanto a reabsorção óssea por meio da regulação da atividade de osteoblastos e osteoclastos. O excesso de hormônio tireoidiano (HT) estimula mais a atividade osteoclástica do que a osteoblástica, o que resulta em aumento da calcemia e redução da massa óssea [20].

A interação entre E2 e T3 tem sido relacionada a vários mecanismos envolvidos em adaptações metabólicas, uma vez que existem respostas provocadas pelo E2 que são dependentes de T3, como o controle dos triglicérides, do crescimento e da massa óssea [16].

Considerando o controle rigoroso sobre o qual se encontram os osteoblastos e osteoclastos exercido por hormônios, tais como o E2 e o T3, o intuito desse trabalho foi avaliar o efeito do E2 em concentrações infrafisiológica e fisiológica sobre a expressão gênica e síntese proteica de RANKL, OPG e c-FOS e posteriormente, verificou o efeito do T3 (nas concentrações infrafisiológica, fisiológica e suprafisiológico) sobre a ação do E2 na expressão gênica desses genes, em osteoblastos derivados de células tronco mesenquimais humanas provenientes do tecido adiposo.

1. Pacientes e Métodos

1.1. Cultura de osteoblastos humanos

Para obtenção da linhagem osteoblástica utilizou-se células-tronco mesenquimais (CTMs) provenientes de tecido adiposo de 3 doadoras. A diferenciação

de CTMs em osteoblastos foi realizada com meio DMEM completo mais 0,1 μ M de dexametasona (Sigma-Aldrich), 50 μ M de ácido ascórbico (Gibco) e 10 mM de β -glicerofosfato (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas neste meio durante 16 dias. O meio de cultura foi substituído três vezes por semana, mantendo os mesmos componentes osteogênicos. CTMs indiferenciadas foram utilizadas como controle para comprovar a indução osteogênica.

1.2. Tratamento com diferentes doses de E2 e associações com T3

Após o período de diferenciação, os osteoblastos foram submetidos a uma depleção hormonal durante 12 horas e mantidos em meio DMEM suplementado com soro fetal bovino Charcoal Stripped (Sigma®). As células foram então divididas em grupos tratados com doses infrafisiológica (E2I / 10^{-9} M), fisiológicas (E2F / 10^{-8} M) de E2. Osteoblastos na ausência de tratamento foram utilizados como controle (C). Posteriormente, os grupos previamente isolados de E2 foram associados a diferentes doses de T3 infrafisiológico (10^{-10} M), fisiológico (10^{-9} M) e suprafisiológico (10^{-8} M) e formaram os seguintes grupos: E2I+T3I, E2I+T3F, E2I+T3S, E2F+T3I, E2F+T3F e E2F+T3S. Os tratamentos foram realizados em triplicata no tempo de 72 horas, sendo o meio de tratamento substituído a cada 24 horas.

1.3. Ensaio de Fosfatase Alcalina e Osteocalcina

Para a comprovação da diferenciação osteoblástica, após 16 dias de osteoindução, foi coletado 2 mL dos meios de cultura e realizaram-se ensaios de fosfatase alcalina e osteocalcina pelo método de ensaio imunométrico, de acordo com as instruções do fabricante (Cat. No. KAK1381, LincoResearch Inc., EUA). Como

controle negativo da osteoindução, foi utilizado o meio de cultura das CTMs indiferenciadas.

1.4. Análise da matriz mineralizada nas diferentes concentrações de E2

Após o período de 16 dias de indução osteogênica e tratamento com as diferentes concentrações de E2, os osteoblastos foram lavados com PBS 1X. Em seguida, a monocamada foi fixada com paraformaldeído por 20min. Após a fixação, as células foram lavadas com água destilada e coradas com Alizarin Red durante 5min à temperatura ambiente para coloração da matriz mineralizada. Posteriormente, as células foram lavadas 5X com água destilada para remover o corante. A diferenciação celular foi avaliada pela presença de matriz mineralizada e o efeito das diferentes doses de E2 sobre sua formação. Quinze campos aleatórios de cada placa foram fotografados com microscópio de contraste de fase e as imagens foram analisados usando o programa Image J. As imagens foram convertidas em imagens de fundo branco para visualizar a matriz mineralizada e marcar com área percentual do campo.

1.5. Expressão Gênica

O RNA total foi extraído dos osteoblastos pelo método do Trizol (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O kit High Capacity cDNA de transcrição reversa para RT-PCR® (Invitrogen, São Paulo, Brasil) foi utilizado para a síntese de 20µl de DNA complementar (cDNA) a partir de 1000ng de RNA total. Os níveis de mRNA de RANKL, OPG e c-Fos foram determinados por RT-qPCR. As medições quantitativas foram realizadas no sistema de detecção "Applied Biosystems Step One Plus" utilizando o kit comercial TaqMan para qPCR (Applied Biosystems) de acordo com as instruções

do fabricante. As condições de amplificação foram como se segue: ativação da enzima a 50°C durante 2min, desnaturação a 95°C durante 10min, o cDNA foi amplificado durante 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15min e a extensão a 60°C durante 1min. Todas as análises foram realizadas em duplicata. A expressão gênica foi quantificada em relação aos valores do grupo Controle, após normalização por um controle interno, o gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) (Mm00434759_m1), pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, como descrito anteriormente [21].

1.6. Western Blot

A síntese proteica de RANKL, OPG e c-Fos foi analisada por Western Blotting (WB). As proteínas foram lisadas com tampão Ripa (Radio Immuno Precipitation Assay: 150 mM cloreto de sódio, 1% NP-40 ou Triton X-100, 0.5% deoxicolato de sódio, 0.1% SDS e 50 mM Tris, pH 8.0) e o homogeneizado centrifugado a 4°C durante 20 minutos a 12000 rpm. A quantificação foi realizada segundo o método BRADFORD, de acordo com o protocolo padronizado em nosso laboratório e utilizamos as amostras contendo 50ng de proteína. A corrida eletroforética foi realizada em gel de poliacrilamida na concentração de 15%. Em seguida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose em sistema Mini-Trans Blot utilizando-se tampão de transferência. Os sítios inespecíficos de ligação do anticorpo primário à membrana foram bloqueados mediante incubação com solução de bloqueio à temperatura ambiente sob constante agitação. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário nas concentrações: anti-RANKL 1: 5000, OPG 1: 1000 e c-FOS 1: 1000 sob agitação constante em temperatura 2 a 8°C overnight. Após a incubação com o anticorpo primário, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário, conjugados a peroxidase (IgG anti-mouse ou anti coelho) utilizados na titulação de 1: 1000 e 1: 10000

respectivamente. Por fim, a imuno-deteccão foi realizada por meio do método de quimioluminescência de acordo com as instru es do fabricante (Enhancer Chemi-Luminescence, Amersham Biosciences, NJ-USA). As análises quantitativas das bandas proteicas (blots) foram realizadas pelo software Carestream Molecular Imaging 5.0 (Carestream Health, Rochester, NY, USA).

2. Análise estatística

Os dados foram avaliados pelo "D'Agostino & Pearson omnibus normality test". Para as variáveis fosfatase alcalina, os dados foram submetidos ao teste T de student. Para as variáveis de expressão gênica e síntese protéica, os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA com teste pos toc de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5% e o software utilizado foi o GraphPad Prism version 5.0

Resultados

2.1. Presença da fosfatase alcalina e osteocalcina nos osteoblastos.

A tabela 1 mostra os resultados para a fosfatase alcalina e osteocalcina. Ambas as proteínas foram elevadas nos osteoblastos comparado com as CTMs indiferenciadas.

Tabela 1. Quantidade de fosfatase alcalina e osteocalcina nos osteoblastos e CTMs

	Fosfatase alcalina	Osteocalcina
Células		
Osteoblastos	23,33 $\pm$ 3,41 U/L	10,02 $\pm$ 1,13 ng/mL
CTMs	10,12 $\pm$ 1,17 U/L	0,77 $\pm$ 0,24 ng/ml

Tabela 1. Dosagens de fosfatase alcalina e osteocalcina no meio de cultura antes e depois do processo de diferenciação osteoblástica. Valores de referência em humanos: Fosfatase Alcalina=12 a 43U/L; Osteocalcina=2,0 –21ng/mL.

2.2. Concentração infrafisiológica de E2 diminui e fisiológica aumenta a matriz mineralizada nos osteoblastos

A matriz mineralizada dos osteoblastos foi quantificada a fim de verificar o efeito do E2. A figura 1A representa as CTMs indiferenciadas com ausência de matriz mineralizada. A figura 1B representa a imagen da matriz mineralizada nos osteoblastos sem E2 e em C e D tratados com doses infrafisiológica e fisiológica, respectivamente, por um período de 72 horas. A figura 1E mostra que a quantidade de matriz mineralizada na dose E2F é semelhante ao C e diminui na concentração E2I em relação ao C.

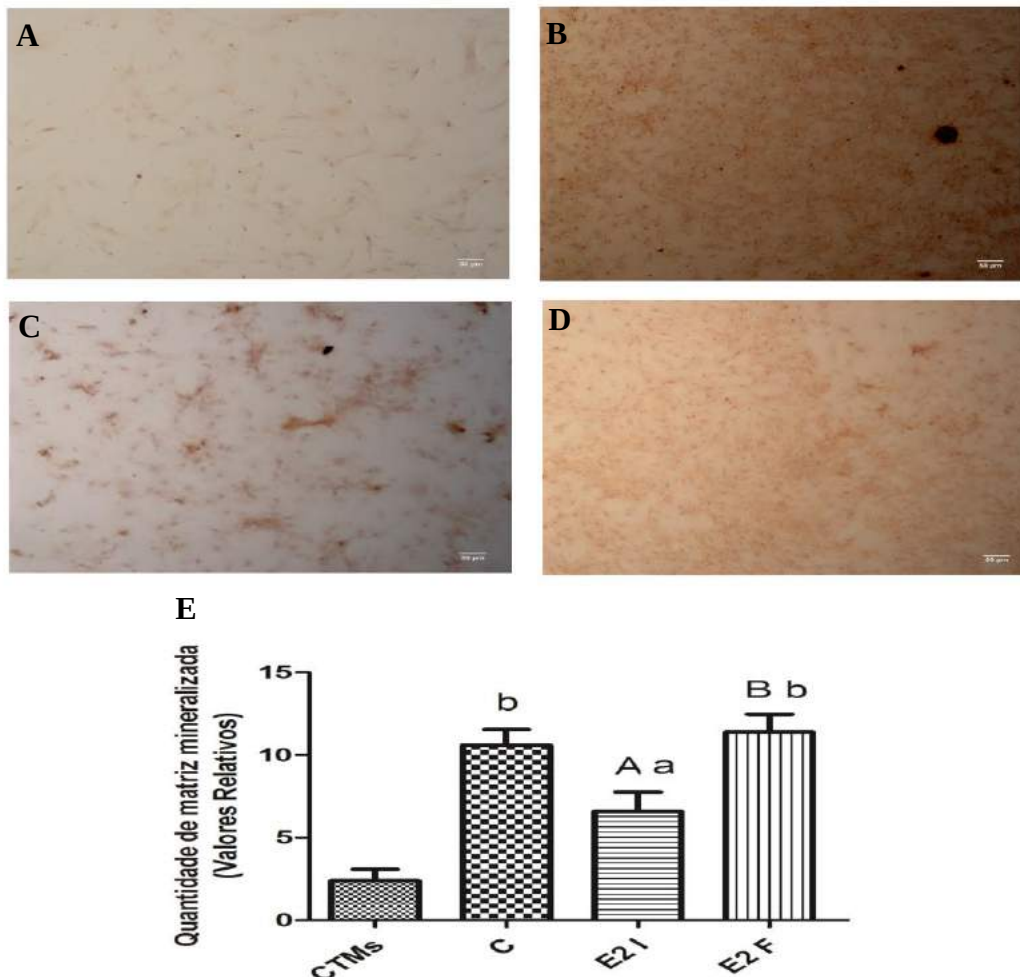


Figura 1: Efeitos de diferentes doses de E2 sobre a matriz mineralizada dos osteoblastos. A) CTMs indiferenciadas; B) osteoblastos na ausência de E2; C e D) osteoblastos na presença de E2I e E2F, respectivamente; E) gráfico quantitativo da matriz óssea dos osteoblastos na presença e ausência de E2. Dados expressos em média $\pm$ desvio padrão (ANOVA) complementada pelo teste de Tukey). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (E2I, E2F x C). Letras maiúsculas diferentes= diferença estatística entre os tratamentos (E2I x E2F). Letras minúsculas e maiúsculas iguais = não apresentam diferença estatística.

2.3. Diferentes concentrações de E2 aumentam a expressão de mRNA e síntese protéica de RANKL em osteoblastos humanos.

Nossos dados revelaram aumento da expressão de mRNA e da síntese proteica de RANKL (Figura 2) em todos os tratamentos analisados em relação ao C.

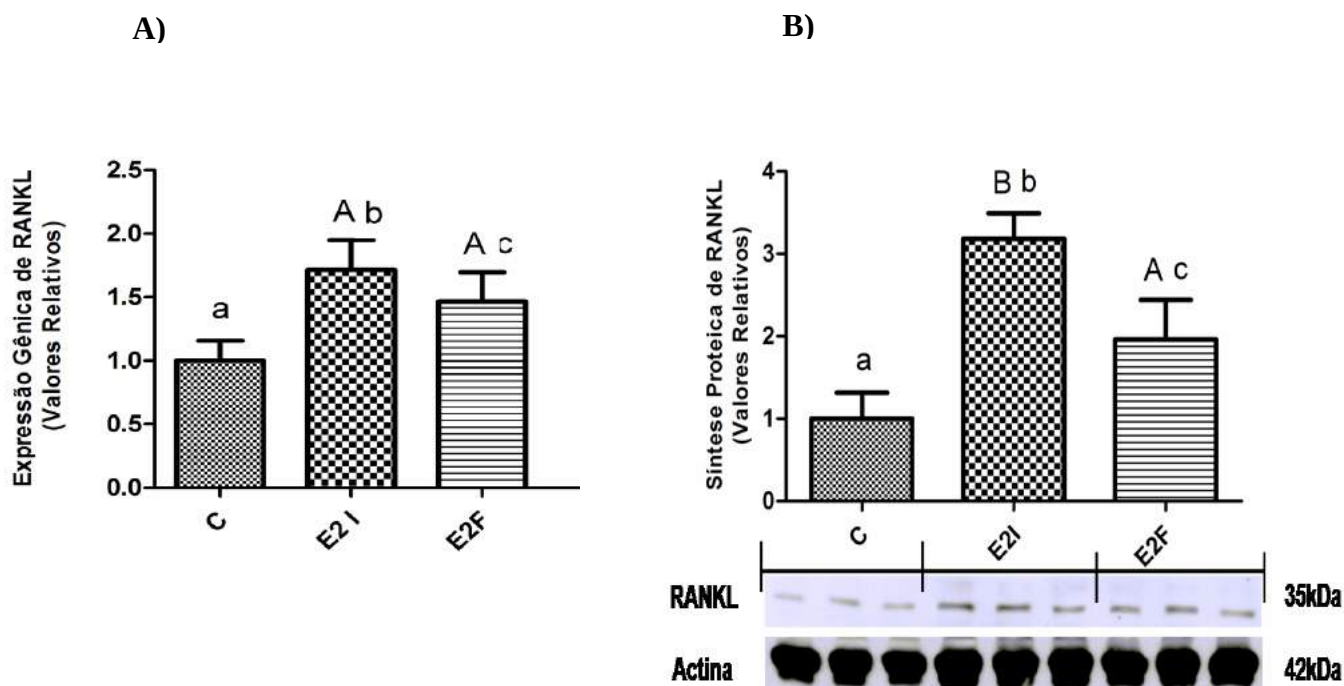


Figura 2. Efeito de diferentes doses de E2 sobre a expressão gênica e síntese proteica de RANKL. E2I (dose infra fisiológica), E2F (dose fisiológica) e C (Controle). Dados expressos em

média e desvio padrão (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (E2I, E2F x C). Letras maiúsculas diferentes = diferença estatística entre os tratamentos (E2I x E2F). Letras minúsculas e maiúsculas iguais = não apresentam diferença estatística.

2.4. Aumento do mRNA de RANKL pelo E2 é afetado por diferentes doses de T3

Em relação ao E2I, nossos dados mostram que associação ao T3I potencializou a ação do E2 aumentando a expressão de mRNA de RANKL, porém nas associações de E2I com T3F e T3S houve diminuição dessa expressão (Figura 3A). Em relação ao E2F podemos observar que o T3I, T3F ou T3S aumentaram ainda mais a expressão de mRNA elevados com E2F (Figura 3B).

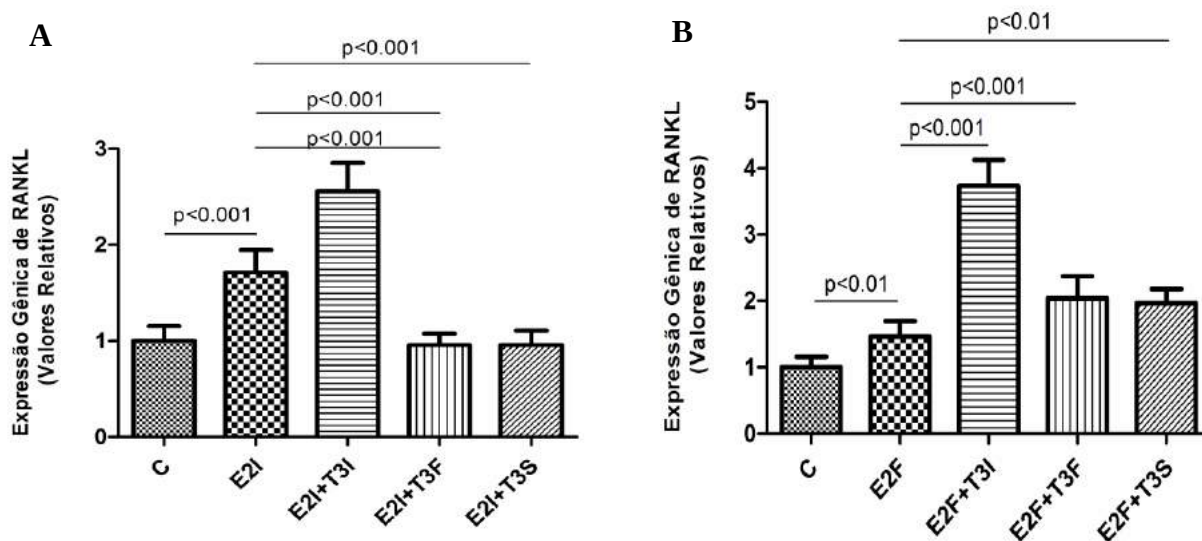


Figura 3. Efeito do E2I (10^{-9} M) e E2F (10^{-8} M) associado ao T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-10} M) sobre a expressão gênica de RANKL. T3I: dose infrafisiológica; T3F: dose fisiológica; T3S: dose suprafisiológica; E2I: dose infrafisiológica; E2F: dose fisiológica. Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA complementada pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado significativo).

2.5. E2 na concentração infrafisiológica e fisiológica modulam a expressão gênica de OPG.

Na figura 4 podemos observar que houve diminuição da expressão de mRNA de OPG (Figura 4A), o contrário ocorreu para a síntese protéica (Figura 4B), quando tratados na concentração E2I comparado ao C. Na dose E2F houve aumento da expressão de mRNA e diminuição da síntese proteica. Entre os tratamentos, houve aumento da expressão de mRNA e diminuição da síntese proteica no grupo E2F comparado ao E2I

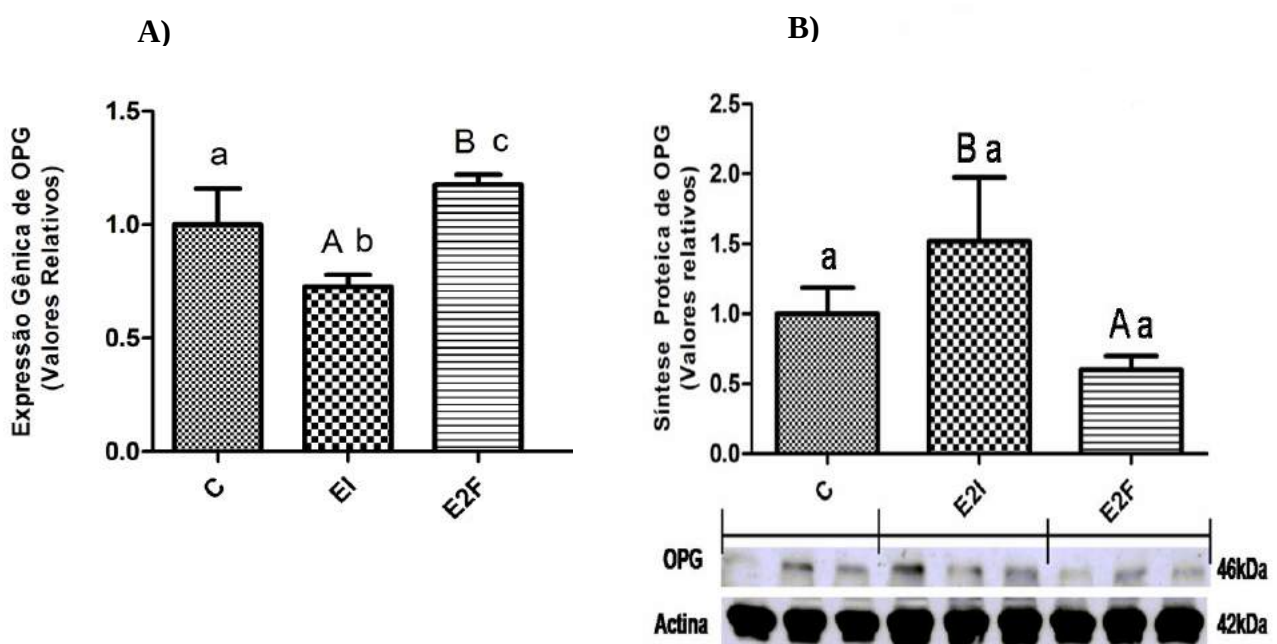


Figura 4. Efeito de diferentes doses de E2 sobre a expressão gênica de OPG. E2I (dose infrafisiológica), E2F (dose fisiológica), C (Controle). Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (E2I, E2F, x C). Letras maiúsculas diferentes = diferença estatística entre os tratamentos (E2I x E2F). Letras minúsculas e maiúsculas iguais = não apresentam diferença estatística.

2.6. Aumento da expressão de mRNA de OPG nas concentrações E2I e E2F associado com as diferentes concentrações de T3 (T3I, T3Fe T3S)

Nossos resultados mostraram que as concentrações de E2I associados às diferentes doses de T3 aumentaram o mRNA de OPG (Figura 5 A). Em relação a concentração de E2F às diferentes doses de T3 aumentaram a expressão de OPG com excessão da associação E2F+T3I (Figura 5B).

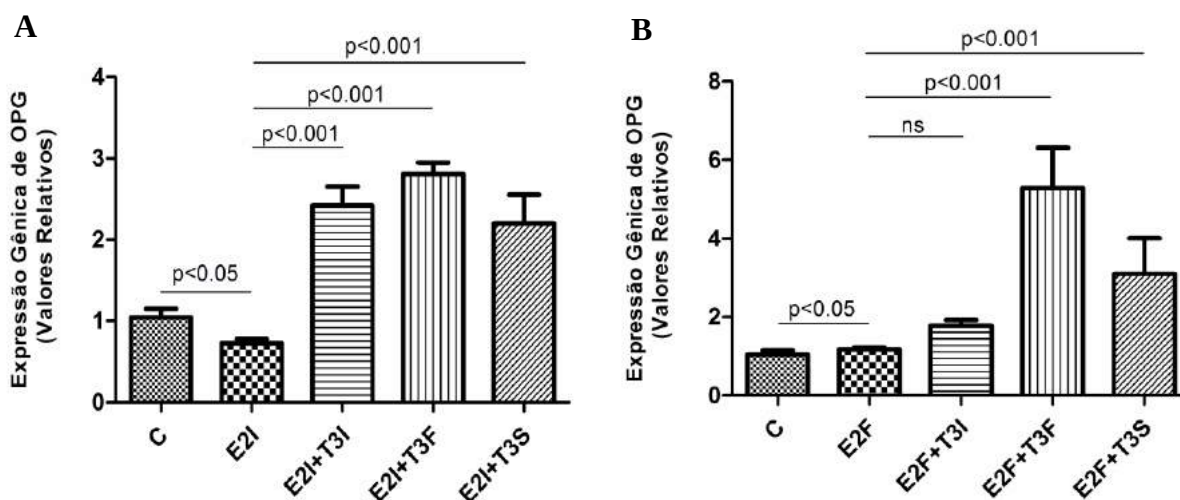


Figura 5. Efeito do E2I (10^{-9} M) e E2F (10^{-8} M) associado ao T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-10} M) sobre a expressão gênica de OPG. T3I: dose infrafisiológica; T3F: dose fisiológica; T3S: dose suprafisiológica; E2I: dose infrafisiológica; E2F: dose fisiológica. Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA complementada pelo teste de Tukey, $p < 0,05$ foi considerado significante).

2.7. Concentração fisiológica de E2 eleva a expressão gênica de c-Fos

Na figura 6 podemos observar que houve aumento da expressão de mRNA e de síntese proteica de c-Fos nos osteoblastos tratados com E2F comparado ao controle e ao E2I.

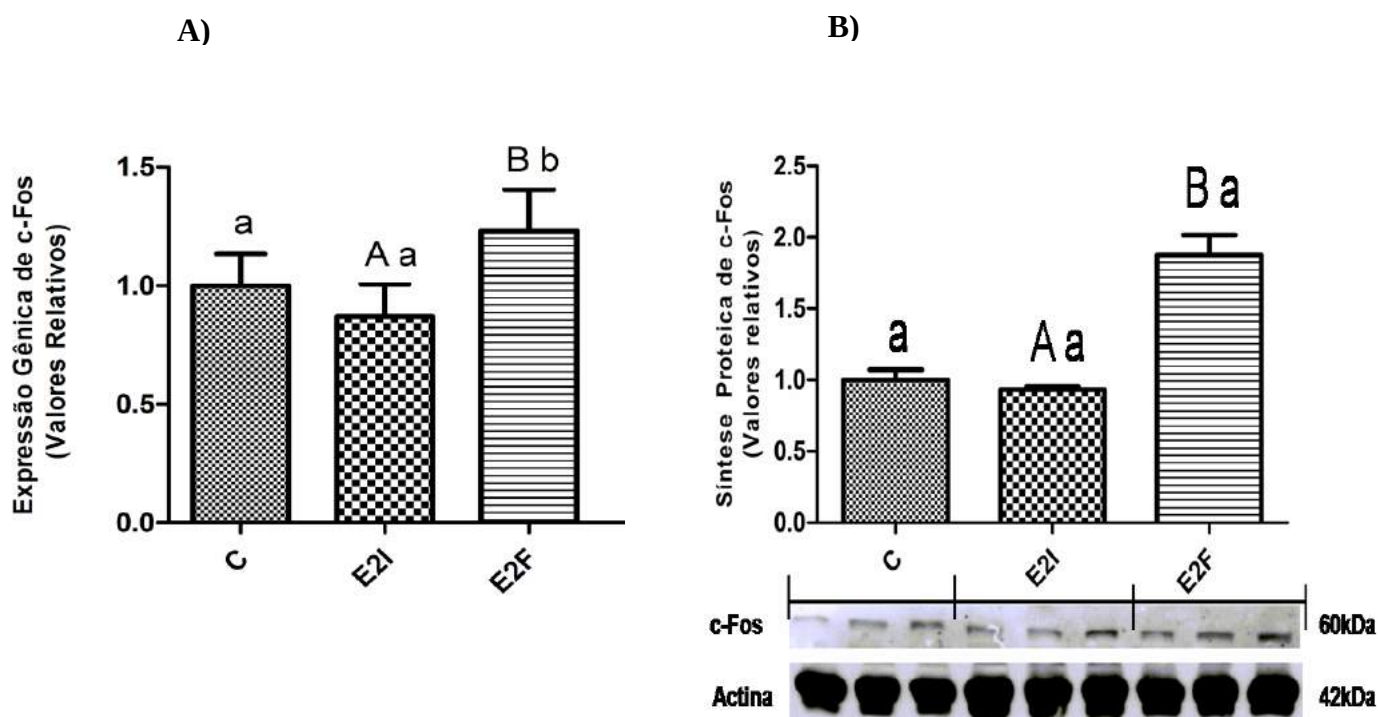


Figura 6. Efeito de diferentes doses de E2 sobre a expressão gênica de c-Fos. E2I (dose infra-fisiológica), E2F (dose fisiológica) e C (Controle). Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA, complementada pelo teste de Tukey). Letras minúsculas diferentes = diferença estatística dos tratamentos em relação ao controle (E2I, E2F x C). Letras maiúscula diferentes= diferença estatística entre os tratamentos (E2I x E2F). Letras minúscula e maiúscula iguais = não apresentam diferença estatística.

2.8. Aumento da expressão do mRNA de c-Fos nas concentrações E2I e E2F associadas com as diferentes concentrações de T3

Na figura 7 observamos que as concentrações de E2I e E2F associadas às diferentes doses de T3 (T3I, T3F e T3S) aumentaram a expressão do mRNA de c-Fos (Figura 7 A e B).

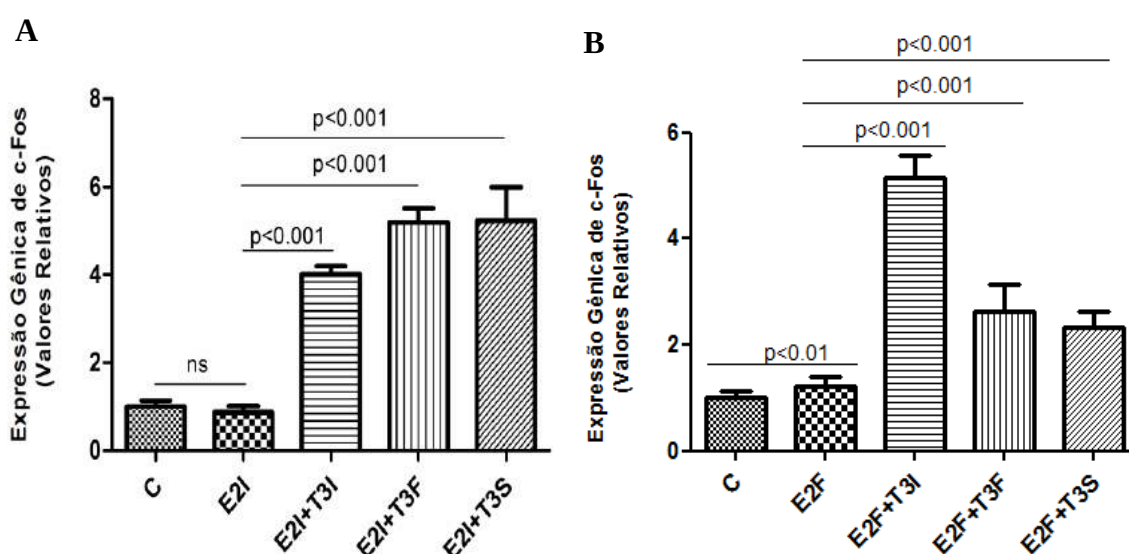


Figura 7. Efeito do E2I (10^{-9} M) e E2F (10^{-8} M) associado ao T3I (10^{-10} M), T3F (10^{-9} M) e T3S (10^{-10} M) sobre a expressão gênica de c-Fos. T3I: dose infra fisiológica; T3F: dose fisiológica; T3S: dose supra fisiológica; E2I: dose infra fisiológica; E2F: dose fisiológica. Dados expressos em média e desvio padrão (ANOVA complementada pelo teste de Tukey, $p<0,05$ foi considerado significante).

Discussão

O mecanismo de ação do E2 sobre o tecido ósseo ainda não está totalmente elucidado [22]. Embora o principal papel do E2 esteja ligado ao crescimento e função dos órgãos sexuais femininos, estudos demonstram seu efeito também sobre o osso, tendo a deprivação desse hormônio sido associada à osteoporose [23]. Alguns autores relatam que a deficiência estrogênica aumenta a quantidade de osteoclastos em diversos compartimentos, assim como aumenta a quantidade de linfócitos B na medula óssea, favorecendo a perda óssea. Sabemos que o RANKL é importante para a formação osteoclástica e que o aumento de linfócitos B decorrente da perda estrogênica pode induzir a osteoclastogênese [25]. Porém, estudo publicado por Fujiwara *et al.* [26] revelaram que é necessário que haja expressão de RANKL pelos osteócitos somado ao aumento de linfócitos B para que ocorra perda óssea.

Tanto o E2 quanto o T3 são responsáveis por várias adaptações metabólicas. Contudo, existem respostas provocadas pelo E2 que são dependentes de T3, tais como o controle do crescimento, a massa óssea e a produção e o armazenamento de triglicerídeos [27].

A presença de E2 no organismo estimula a síntese da matriz óssea regulando a expressão de genes que codificam proteínas colagênicas e não colagênicas [12,13]. Ao avaliar a matriz mineralizada dos osteoblastos do grupo E2F (Figura 1D), notamos que esta apresentou-se mais intensa quando comparada ao grupo E2I (Figura 1C), semelhante à situação de menopausa [28].

O papel fisiológico exato do RANKL nos osteoblastos ainda permanece incerto, visto que alguns estudos recentes demonstraram que os osteócitos são os maiores sítios de RANKL, tanto na osteoclastogênese fisiológica quanto patológica [29]. Contudo,

notamos aumento na expressão gênica e síntese proteica RANKL nos grupos E2I e E2F quando comparados ao grupo controle (Figura 2A e B) respectivamente. Resultados semelhantes aos de Bord *et al* [6] que observaram que a expressão de mRNA de RANKL foi aumentada quando administradas concentrações de E2 fisiológico (10^{-10} M) e suprafisiológico (10^{-7} M) em osteoblastos humanos, postulando que o estrógeno age como fator protetor da perda óssea por aumentar a expressão de OPG e de receptores estrogênicos no tecido ósseo.

Observamos que o aumento de expressão de RANKL e OPG notado no grupo E2I foi potencializado quando associado ao T3I possivelmente caracterizando a reabsorção óssea que ocorre na menopausa que pode ser potencializada pelo hipotireoidismo (Figura 3A e Figura 5A) respectivamente. Quando associamos o E2F à dose fisiológica de T3 houve aumento na expressão de RANKL e OPG, porém, mais acentuada na de OPG o que caracterizaria a proteção óssea que o T3 pode estar conferindo ao E2 (Figura 3B e Figura 5B) respectivamente. A presença do T3S quando associado ao E2F foi capaz de aumentar a expressão gênica de RANKL e OPG na mesma proporção caracterizando a reabsorção óssea que ocorre no hipertireoidismo (Figura 3B e Figura 5B) respectivamente. De forma curiosa quando associamos o T3S ao E2I notamos aumento mais significativo na expressão gênica de OPG do que RANKL o que pode caracterizar o efeito protetor do estrógeno mesmo em baixas concentrações (Figura 3A e Figura 5A) respectivamente.

A presença de E2 no organismo aumenta a produção de OPG pelos osteoblastos e leva à expressão dos genes que codificam o colágeno tipo I, a fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina e osteonectina [30]. As doses administradas aos grupos E2I e E2F diminuíram e aumentaram, respectivamente, a expressão gênica de OPG (Figura 4A). O estudo de Michael *et al* [31] realizado em osteoblastos humanos revelou que o

E2 induziu a produção de OPG. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com o trabalho realizado pelo autor. Portanto, a interação de OPG/RANK/RANKl desempenha um papel importante na osteoclastogênese regulando a remodelação óssea [32]. Entretanto, a síntese proteica de OPG não acompanhou os resultados da expressão gênica (Figura 4B). Isso pode estar relacionado com as alterações nos níveis de transcrição iniciais associados com modificações pós-transcricional dos mRNAs, o que leva a alterações na estabilidade dos transcritos [33,34]. Tais alterações podem estar associados com o microambiente celular, sinais extracelulares e ação de hormônios que afetam a estabilidade e a tradução do mRNA desencadeando vias de sinalização que causam modificações pós traducionais [35,36]. Além disso, o T3 parece ser um dos hormônios envolvidos nessa modificação pós traducional visto que quando associado ao E2 nas concentrações fisiológicas, os níveis de OPG aumentam consideravelmente.

O fator de transcrição c-Fos tem ação importante sobre os osteoclastos e osteoblastos, porém, sua exata função neste processo ainda não está bem esclarecida [11]. Um estudo realizado com osteoclastos demonstrou que em animais transgênicos deficientes de c-Fos, a produção de RANK foi inibida ou resultou na completa ausência dessas células maduras [37,38]. Outro estudo detectou uma super-expressão de RANK em macrófagos modificados para expressar c-Fos, demonstrando que esta regulação foi capaz de causar sinais induzidos por RANKL, mas não induziu a osteoclastogênese, provavelmente pela ausência de osteoclastos maduros na circulação, concluindo que a proteína c-Fos desempenha um importante papel nessa maturação [38].

É importante ressaltar que a super expressão dessa proteína pode induzir a osteossarcoma, um tumor ósseo caracterizado pela transformação de células de linhagem osteoblástica [37,39].

Em nosso trabalho, o grupo E2F aumentou os níveis de expressão gênica e proteína de c-Fos em comparação ao C, nos levando a crer que há necessidade de condições normais de concentração estrogênica para aumento da expressão gênica desta proteína (Figura 6A e 6B) respectivamente. A partir desses resultados *in vitro* podemos observar que o E2 pode ter ação nas vias intracelulares dos osteoblastos intensificando proteínas como quinase A (PKA) e AMPC que são genes essenciais para a ativação de c-Fos [40].

Além disso, nas associações de E2 e T3, o T3 intensificou os níveis de c-Fos (Figura 7A e B) respectivamente, demonstrando que o efeito conjunto desses hormônios nas concentrações *in vitro* analisadas poderia contribuir para a indução do osteossarcoma devido a super expressão de c-Fos nos osteoblastos, como relatado por Wagner, 2002 [11]. O estudo de Wang et al 2016 [41] relata que ao estudar o (miR-101) em linhagens de células de osteoblastos humanos, este micro RNA pode regular o crescimento de osteossarcoma decorrente de metástase por meio da ativação de c-Fos. Essa proteína, também está associada com a síntese de enzimas de fosfolipídeos no retículo endoplasmático que ativa genes relacionados ao crescimento celular [42]. Dessa forma, o c-Fos pode ser alvo de estudos como fatores prognósticos e preditivos do osteossarcoma humano [41].

Nossa pesquisa fornece informações importantes para melhor entendimento das proteínas envolvidas na remodelação óssea nos osteoblastos na presença de E2 associado ou não ao T3, apesar da ausência de uma co-cultura com osteoclastos. Visto que os osteoblastos participam da formação óssea e indiretamente podem controlar a reabsorção do osso e que ainda é pouco entendido o mecanismo de ação do T3 e E2 no metabolismo ósseo.

Conclusão

O presente trabalho forneceu conhecimentos sobre a ação molecular do E2, assim como a interação T3 e E2, sobre os osteoblastos, células fundamentais para a remodelação óssea demonstrando o efeito protetor do estrógeno. Esses conhecimentos podem contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na diminuição da massa óssea observada na menopausa.

Referências

1. Bernick S, Ershoff BH. Histochemical study of bone in estrogen-treated rats. *J Dent Res.* 1963;42:981-9.
2. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med.* 2000;108:153-64.
3. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev.* 2000;21:115-37.
4. Väänänen K. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption – rationale for the design of new therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005;57:959-71.
5. Kanzaki H, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Ther.* 2006;13:678-85.
6. Bord S, Ireland DC, Beavan SR, Compston JE. The effects of estrogen on osteoprotegerin, RANKL, and estrogen receptor expression in human osteoblasts. *Bone.* 2003;32:136-41.
7. Bonnelye E, Kung V, Laplace C, Galson DL, Aubin JE. Estrogen receptor-related receptor α impinges on the estrogen axis in bone: potential function in osteoporosis. *Endocrinology.* 2002;143:3658-70.
8. Rogers A, Saleh G, Hannon RA, Greenfield D, Eastell R. Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002;87:4470-5.
9. Kawamoto S, Ejiri S, Nagaoka E, Ozawa H. Effects of estrogen deficiency on osteoclastogenesis in the rat periodontium. *Arch Oral Biol.* 2002;47:67-73.
10. McCabe LR, Banerjee C, Kundu R, Harrison RJ, Dobner PR, Stein JL, Lian JB, Stein GS. (1996). Developmental expression and activities of specific fos and jun

proteins are functionally related to osteoblast maturation: role of Fra-2 and Jun D during differentiation. *Endocrinology* (137): 4398 - 4408.

11. Wagne EF. Functions of AP1 (Fos/Jun) in bone development. *Ann Rheum Dis.* 2002;61 Suppl 2:ii40-2.

12. Liu CC, Howard GA. Bone-cell changes in estrogen-induced bone-mass, increase in mice: dissociation of osteoclasts from bone surfaces. *Anat Rec.* 1991;229:240-50.

13. Chow JWM, Lean JM, Chambers TJ. 17 β -estradiol stimulates cancellous bone formation in female rats. *Endocrinology.* 1992;30:25-32.

14. Ousler MJ, Cortese C, Keeting P, Anderson MA, Bonde SK, Riggs BL, et al. Modulation of transforming growth factor-beta production in normal human osteoblast-like cells by 17 beta-estradiol and parathyroid hormone. *Endocrinology.* 1991;129:3313-20.

15. Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF. Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF- β . *Nat Med.* 1996;2:1132-6.

16. Pacifici R. Estrogen, cytokines and pathogenesis of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1043-8.

17. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med.* 1997;186:489-95.

18. Hainey L, Batra G, Selby PL, Saunders P, Hoyland JA, Braidman IP. Oestrogen receptor beta in vivo in osteoclasts and other bone cells of adult men and women [abstract]. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1217.

19. Vavidovitch Z. Bone metabolism associated with tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Periodontol.* 1979;50:22-9.

20. Pijl H, de Meijer PH, Langius J, Coenegracht CI, van den Berk AH, Chandie Shaw PK, et al. Food choice in hyperthyroidism: potential influence of the autonomic nervous system and brain serotonin precursor availability. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:5848-53.

21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25:402-8.

22. Chen FP, Wang KC, Huang JD. Effect of estrogen on the activity and growth of human osteoclasts in vitro. *Taiwan J. Obstet Gynecol.* 2009;48:350-5.

23. Burge R., Dawson HB., Solomon DH, et al. : Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005–2025. *J Bone Miner Res* 2007; 22:465–475
24. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2013;9:699-712.
25. Manabe N, Kawaguchi H, Chikuda H, Miyaura C, Inada M, Nagai R, et al. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol*. 2001;167:2625-31.
26. Fujiwara Y, Piemontese M, Liu Y, Thostenson JD, Xiong J, O'Brien CA. RANKL produced by osteocytes is required for the increase in B cells and bone loss caused by estrogen deficiency in mice. *J Biol Chem*. 2016. doi: 10.1074/jbc.M116.742452.
27. Fitts JM, Klein RM, Powers CA. Estrogen and tamoxifen interplay with T3 in male rats: pharmacologically distinct classes of estrogen responses affecting growth, bone, and lipid metabolism, and their relation to serum GH and IGF-1. *Endocrinology*. 2001;142:4223-35.
28. BM Misof, S Gamsjaeger, A Cohen, B Hofstetter, P Roschger, E Stein, et al. Bone material properties in premenopausal women with idiopathic osteoporosis. *J Bone Miner Res*. 2012; (12): 2551–2561.
29. Honma M, Ikebuchi Y, Kariya Y, Suzuki H. Regulatory mechanisms of RANKL presentation to osteoclast precursors. *Curr Osteoporos Rep*. 2014; 12:115-20.
30. Mencej-BS, Zupan J, Mlakar SJ, Zavratnik A, Preželj J, Marc J. Raloxifene pharmacodynamics is influenced by genetic variants in the RANKL/RANK/OPG system and in the Wnt signaling pathway. *Drug Metabol Drug Interact*. 2014; 29:111-4.
31. Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2005;20:2224-32.
32. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008; 473:139-46.
33. Edmonds M. A history of poly A sequences: from formation to factors to function. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2002; 71: 285-389.
34. Meyer S, Temme C, Wahle E Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2004; 39: 197-216.

35. Thapar R, Denmon AP. Signaling pathways that control mRNA turnover. *Cell Signal.* 2013 25 : 1699–1710.
36. Lee SR, Lykke-Andersen J. Emerging roles for ribonucleoprotein modification and remodelling in controlling RNA fate. *Trends Cell Biol.* 2013; 23: 504–510.
37. Wagner EF, Karsenty G. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev.* 2001;11:527-32.
38. Arai A, Mizoguchi T, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Yasuda H, et al. Fos plays an essential role in the upregulation of RANK expression in osteoclast precursors within the bone microenvironment. *J Cell Sci.* 2012;125 (Pt 12):2910-7.
39. Van der Berg S, Rahmsdorf HJ, Herrlich P, Kaina B. Overexpression of c-fos increases recombination frequency in human osteosarcoma cells. *Carcinogenesis.* 1993; 14:925-8.
40. Goltzman D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and with downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. *J Bone Miner Res.* 1999;14:173-7.
41. Wang Z, Rongzhen HE, Hansong X, Wei Y, Sonug W. MicroRNA-101 has a suppressive role in osteosarcoma cells through the targeting of c-FOS. *Exp Ther Med.* 2016;11:1293-9.
42. Caputto BL, Gizzi CAM, Gil GA. c-Fos: an AP-1 transcription factor with an additional cytoplasmic, non-genomic lipid synthesis activation capacity. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841:1241-6.

Conclusão

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

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

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

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

.

