

Triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratas

Triiodothyronine does not increase osteogenic differentiation reduced by age in bone marrow mesenchymal stem cells of female rats

Jankerle Neves Boeloni¹, Natalia Melo Ocarino¹,
Alfredo Miranda Goes², Rogéria Serakides¹

RESUMO

Objetivo: Avaliar se a adição de T3 aumenta o potencial osteogênico das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de ratas adultas normais comparado ao de ratas jovens.

Materiais e métodos: CTM-MO foram cultivadas em meio osteogênico e separadas em seis grupos: 1) CTM-MO de ratas jovens; 2) CTM-MO de ratas adultas; 3, 4, 5 e 6) CTM-MO de ratas adultas com T3 nas concentrações de 0,01; 1; 100 e 1000 nM, respectivamente. Foram avaliados: atividade da fosfatase alcalina, conversão do dimetiltiazol (MTT) e síntese de colágeno aos sete, 14 e 21 dias e celularidade e número de nódulos de mineralização aos 21 dias de diferenciação.

Resultados: T3 reduziu significativamente a conversão do MTT, a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de colágeno e a formação dos nódulos de mineralização em pelo menos uma das doses e dos períodos estudados ($p < 0,05$). Os valores foram menores quando comparados aos das CTM-MO de ratas jovens e adultas sem T3 ($p < 0,05$). **Conclusão:** T3 apresenta efeitos negativos sobre os fatores envolvidos na diferenciação osteogênica das CTM-MO de ratas adultas.

Arq Bras Endocrinol Metab. 2013;57(1):62-70

Descritores

Células-tronco mesenquimais; medula óssea; diferenciação osteogênica; triiodotironina; ratas

ABSTRACT

Objective: To examine if triiodothyronine (T3) increases osteogenic differentiation in bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) of adult rats compared with young rats. **Materials and methods:** BMMSCs were cultured in osteogenic medium and distributed into six groups: 1) BMMSCs of young rats; 2) BMMSCs of adult rats; 3, 4, 5 and 6) BMMSCs of adult rats with T3 (0.01, 1, 100 to 1000 nM). We analyzed alkaline phosphatase activity, dimethylthiazol (MTT) conversion, and collagen synthesis at 7, 14, and 21 days, and percentage of cells per field and number of mineralized nodules at 21 days of differentiation. **Results:** T3 reduced MTT conversion, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis, and the synthesis of mineralized nodules in at least one of the doses and periods studied ($p < 0.05$). Values were lower when compared with young and adult rats BMMSCs ($p < 0.05$) without T3. **Conclusion:** T3 has a negative effect on the factors involved in osteogenic differentiation of BMMSC from adult rats. Arq Bras Endocrinol Metab. 2013;57(1):62-70

Keywords

Mesenchymal stem cells; bone marrow; osteogenic differentiation; triiodothyronine; female rats

¹ Núcleo de Células-tronco e Terapia Celular, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil

² Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

Correspondência para:

Rogéria Serakides
Núcleo de Células-tronco e Terapia Celular, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias, Escola de Veterinária, UFMG
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627
30161-970 – Belo Horizonte, MG, Brasil
serakidesufmg@gmail.com

Recebido em 12/Abr/2012
Aceito em 27/Nov/2012

INTRODUÇÃO

A diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) está sob o comando de diversos fatores que se traduzem em estímulos celulares e moleculares essenciais durante o processo de diferenciação para osteoblasto (1). Esses fatores são representados por fatores de transcrição gênica e de crescimento, citocinas, densidade celular, contato físico com as células vizinhas, estímulo físico (2,3) e mecânico (2-4) e por hormônios representados pelo estrógeno, glicocorticoides, vitamina D, leptina e pelos hormônios tireoidianos (5-10).

Contudo, tanto em animais quanto em seres humanos a diferenciação osteogênica das CTM-MO pode ser comprometida pela idade ou por doenças como a osteoporose e as disfunções tireoidianas, entre outras (11-18). Assim, o efeito da idade poderia limitar o uso da terapia com células-tronco autólogas em pacientes adultos ou idosos.

Alguns estudos têm demonstrado o aumento do potencial osteogênico das CTM-MO com a adição de triiodotironina no meio de cultivo. Resultados recentes demonstram que a adição de triiodotironina (T3) *in vitro* aumenta a diferenciação osteogênica das CTM-MO de ratas jovens saudáveis (8,10) e também de ratas com osteoporose (17). No entanto, ainda não se sabe qual o efeito da T3 na redução da diferenciação osteogênica de CTM-MO decorrente da idade.

Sabe-se que a inoculação de células-tronco do próprio paciente adulto ou idoso poderia surtir melhor efeito por não haver risco de rejeição pelo sistema imune. Mas, como esse paciente apresenta redução do potencial osteogênico das CTM-MO, a hipótese inicial deste estudo foi de que a adição de T3 *in vitro* poderia aumentar a diferenciação osteogênica das CTM-MO antes de seu uso no tratamento de doenças ou defeitos ósseos. Por isso, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito do tratamento *in vitro* com triiodotironina sob o potencial osteogênico reduzido das células-tronco mesenquimais de ratas adultas e compará-lo ao potencial osteogênico de CTM-MO de ratas jovens.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas 12 ratas Wistar, sendo seis ratas com um mês de idade e seis ratas com cinco meses de idade, que foram submetidas à eutanásia com sobredose de anestesia (associação de 40 mg/kg de quetamina com 10 g/kg de xilazina). Em seguida, seus ossos longos

(fêmur e tibia) foram colhidos para a determinação do potencial osteogênico das células-tronco mesenquimais, avaliado por meio de cultivo celular. Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (protocolo nº 134/2008).

As CTM-MO das ratas adultas (5 meses de idade) e jovens (1 mês de idade) foram cultivadas em meio de indiferenciação (DMEM) e de diferenciação osteogênica, acrescido ou não de 3,3',5-triiodo-L-tironina (T3), dependendo do grupo. Foram constituídos seis grupos experimentais de CTM-MO cultivadas em meio osteogênico: 1) CTM-MO de ratas jovens; 2) CTM-MO de ratas adultas sem T3; 3) CTM-MO de ratas adultas tratadas com T3 (0,01 nM); 4) CTM-MO de ratas adultas tratadas com T3 (1 nM); 5) CTM-MO de ratas adultas tratadas com T3 (100 nM) e 6) CTM-MO de ratas adultas tratadas com T3 (1000 nM). Foram avaliados: a atividade da fosfatase alcalina, a conversão do substrato dimetiltiliazol (MTT) em cristais de formazan e a síntese de colágeno aos sete, 14 e 21 dias de diferenciação, a porcentagem de células por campo e o número de nódulos de mineralização aos 21 dias de diferenciação. Todos os ensaios *in vitro* foram realizados com seis repetições em cada grupo e em cada período, como descrito detalhadamente a seguir.

Extração e cultivo de células-tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea

A extração das CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (8,16,19-21). Os fêmures foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção da medula óssea da diáfise. No fluxo laminar, a medula óssea foi lavada com DMEM enriquecido com gentamicina (60 µg/L), penicilina (100 U/ml), estreptomomicina (100 µg/ml) e anfotericina (25 µg/L) (Sigma, USA). Após centrifugação por 10 minutos a 1.400 g, as células foram cultivadas em garrafas T75 (TPP, Switzerland, Germany) contendo DMEM enriquecido com antibióticos e antimicóticos e 10% de soro fetal bovino (LGC Biotecnologia, São Paulo, Brasil) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. Após quatro repiques e confluência de 80% a 90% das células, foi realizada a caracterização fenotípica das CTM por citometria de fluxo. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microrganismos.

Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea

Após o cultivo das CTM por quatro passagens em garrafas T75 em DMEM e obtenção de confluência de 80% a 90%, as células de cada grupo experimental foram tripsinizadas, contadas em câmara de Neubauer e distribuídas em placas de 96 poços de fundo redondo (TPP, Switzerland, Germany) com concentração de 1×10^6 células/poço, sendo dois poços para cada anticorpo e dois poços para o controle sem marcação para cada grupo experimental (jovem e adulto). Posteriormente, foi realizada a centrifugação da placa por 10 minutos a 1.400 g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante (DMEM) e adição do anticorpo primário com diluição de 1:50. A placa foi agitada em vórtex e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se 150 µL de PBS (solução tampão de fosfato padrão) 0,15M/poço para lavagem e a placa foi novamente agitada em vórtex. A placa foi então centrifugada por 10 minutos a 1.400 g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante e de nova lavagem com 150 µL de PBS 0,15M/poço, agitação em vórtex e centrifugação por 10 minutos a 1.400 g e 10°C. Adicionou-se o anticorpo secundário (Alexa Flúor 488, Molecular Probes, Oregon, USA) com diluição de 1:200. A placa foi envolta por papel alumínio e incubada por 30 minutos a 4°C. Adicionaram-se então 150 µL de PBS 0,15M/poço para lavagem e agitação em vórtex. A placa foi centrifugada por 10 minutos a 1.400 g e 10°C, seguida da retirada do sobrenadante, de nova lavagem com 150 µL de PBS 0,15M/poço e centrifugação por 10 minutos a 1.400 g e 10°C. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS 0,15M e 100 µL/poço de formaldeído a 4%. A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Immunocytometry, San Jose, CA, USA) empregando o *software* Cell Quest (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA), com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros FSC (Forward scatter) e SSC (Side scatter) em escala linear e FL1 (fluorescência relativa) em escala logarítmica que detecta luz de comprimento de onda de 530 nm, que corresponde à fluorescência verde, para análises pelo programa WinMDI 3.0 (Windows Multiple Document Interface for Flow Cytometry 3.0) por gráficos de *dot plot* e histogramas (20,22). Os anticorpos primários (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) conjugados com FITC (isotiocianato de fluoresceína) utilizados foram: anti-CD45 (clone 69 mouse), anti-

CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse) e anti-CD54 (clone 1A29 mouse).

Teste de viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação, as CTM de todos os grupos foram avaliadas quanto à viabilidade celular pelo azul de tripán. Inicialmente, as CTM de todos os grupos foram cultivadas em garrafas T75 (1×10^4 células/cm²) com DMEM e, no momento do teste, foram lavadas com PBS (0,15M) e tripsinizadas. As células foram colhidas, centrifugadas a 1.400 g por 10 minutos, ressuspensas em meio e coradas pelo azul de Tripán. As células inviáveis (coradas de azul) e viáveis (transparentes) de cada grupo foram quantificadas em câmara de Neubauer.

Cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea em meio de diferenciação osteogênico

Após o cultivo em DMEM e obtenção de confluência das células de 80% a 90%, o meio foi substituído por meio osteogênico, que é enriquecido com ácido ascórbico (50 µg/mL), β-glicerofosfato (10 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e dexametasona (0,1 µM) (Aché, Guarulhos, SP, Brasil), acrescido de 10% de soro fetal bovino, sendo que as células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Assim, as CTM-MO das ratas adultas e jovens foram cultivadas em uma densidade previamente padronizada (1×10^4 células/cm²), em seis repetições, em garrafas T25 e em placas de 6 e 24 poços (TPP, Switzerland, Germany) durante sete, 14 e 21 dias de acordo com cada ensaio realizado e descrito a seguir. As CTM-MO de ratas adultas foram cultivadas ainda com diferentes doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina (0,01; 1,0; 100 e 1000 nM). As doses de 3,3',5-triiodo-L-tironina foram estabelecidas conforme estudos realizados por Ishida e cols. (23) e por Boeloni e cols. (8). Após sete, 14 e 21 dias, foram realizados: teste do MTT, atividade da fosfatase alcalina e síntese de colágeno e, aos 21 dias de cultivo, foram avaliados a porcentagem de células por campo e o número de nódulos de mineralização.

Teste de conversão do MTT em cristais de formazan

Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de 24 poços, foram submetidas ao teste de conversão do MTT [brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazolium]] em cristais de formazan. O meio foi

substituído por 210 μL de meio osteogênico com soro fetal bovino em cada poço e 170 μL de MTT (5 mg/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210 μL de SDS (dodecil sulfato de sódio) -10% HCl que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Posteriormente, 100 μL /poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595 nm.

Avaliação da atividade da fosfatase alcalina (BCIP/NBT)

Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), as células de todos os grupos, cultivadas em placas de 24 poços, foram lavadas com PBS 0,15M. Em cada poço, foram acrescentados 200 μL de solução de BCIP/NBT (Zymed Laboratories, CA, USA) (1 mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4 μL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3 μL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt*}). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Em seguida, adicionaram-se 210 μL de solução detergente SDS 10% HCl para incubação *overnight*. Posteriormente, 100 μL /poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595 nm.

Dosagem de colágeno

Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), as culturas foram lavadas com PBS 0,15M. Em seguida, adicionaram-se 4 mL de Bouin em cada poço, para incubação por uma hora a 37°C sob agitação. As placas foram lavadas em água corrente por 15 minutos para posterior coloração pelo Sirius Red durante 30 minutos a 37°C sob agitação. O excesso de corante foi removido e, em seguida, as células foram lavadas abundantemente com 0,01N de HCl. Posteriormente, foram adicionados 300 μL de NaOH 0,5M por 30 minutos sob agitação. Foram removidos 100 μL para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540 nm.

Determinação da porcentagem de células/campo

Após 21 dias de cultivo, as células de todos os grupos, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas (22 x 22 mm) estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M e

fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas e coradas pela hematoxilina-eosina (24). Posteriormente, foi determinado o número de células/campo com o auxílio de uma ocular micrométrica, contendo uma gráticula com 121 pontos em 40 campos tomados em toda a extensão da lamínula e objetiva de 20x.

Quantificação dos nódulos de mineralização

Após 21 dias de cultivo, as células de todos os grupos, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas (22 x 22 mm) estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M e fixadas com álcool etílico 70% por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa (adaptado de 24) para avaliação do número de nódulos/campo. Somente os nódulos de coloração marrom ou negra foram quantificados e determinou-se o número de nódulos/campo em 50 campos em objetiva de 20x.

Análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso com fatorial 6 x 2 (seis grupos e três períodos). Realizou-se análise de variância (ANOVA) e, para cada variável, foram determinados a média e o desvio-padrão. As médias foram comparadas pelo teste de SNK (Student Newman Keuls) utilizando o programa Graphpad Instat 3 (San Diego, USA). Diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$ (25).

RESULTADOS

Caracterização fenotípica das células-tronco mesenquimais indiferenciadas da medula óssea

As células-tronco mesenquimais da medula óssea de todos os grupos experimentais apresentaram caracterização fenotípica semelhante, demonstrando expressão de CD45 em no máximo 3,06% das células e expressão de CD54, CD73 e CD90 acima de 84,27% das células conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Caracterização fenotípica pela expressão de CD45, CD54, CD73 e CD90 por citometria de fluxo em células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos jovens e adultos normais, cultivadas em DMEM após quatro repiques e confluência de 80% a 90%

| Grupos | Expressão de moléculas de superfície (%) | | | |
|---------------------------|--|-------|-------|-------|
| | CD45 | CD54 | CD73 | CD90 |
| Jovem (1 mês de idade) | 3,06 | 95,10 | 93,99 | 86,77 |
| Adulto (5 meses de idade) | 1,09 | 96,94 | 84,27 | 95,93 |

Viabilidade celular pelo azul de Tripán

Após a caracterização fenotípica e antes do cultivo em meio de diferenciação osteogênico, as CTM de ratas jovens e adultas apresentavam 100% de viabilidade.

Conversão do MTT em cristais de formazan

Este teste baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs ativa em mitocôndrias viáveis, de converter o sal de tetrazolium (MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarela, em cristais de formazan, que são insolúveis em água e de cor azul-escuro. Essa capacidade, que somente as células viáveis possuem, indica a atividade mitocondrial (26,27).

Em comparação às CTM-MO das ratas jovens, as células das ratas adultas normais apresentaram maior conversão do MTT em formazan aos sete dias (Figura 1A). Mas esse resultado foi diferente aos 14 e 21 dias, quando as CTM-MO das ratas adultas apresentaram menor conversão do MTT em formazan quando comparadas às CTM-MO das ratas jovens (Figuras 1B e 1C). Em comparação às células das ratas adultas normais, o tratamento hormonal com T3 somente aumentou a conversão do MTT em formazan na dose de

1 nM aos sete e 21 dias (Figuras 1A e 1C). As demais doses de T3 (0,01, 100 e 1000 nM) reduziram a atividade do MTT aos sete dias de cultivo (Figura 1A).

Atividade da fosfatase alcalina (BCIP/NBT)

Este teste é um modo indireto de detecção da atividade da fosfatase alcalina, visto que se baseia no princípio de que os cromógenos BCIP e NBT reagem com a fosfatase alcalina. Inicialmente, a fosfatase alcalina cliva o grupo fosfato do BCIP produzindo uma coloração azulada e um próton, que, por sua vez, reduz o NBT e essa redução produz um precipitado insolúvel de cor púrpura (28).

O efeito da idade sob a atividade da fosfatase alcalina pode ser observado em todos os períodos estudados, uma vez que as CTM-MO das ratas adultas apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao das CTM-MO de ratas jovens aos sete, 14 e 21 dias (Figuras 2A, 2B e 2C). Em comparação às células das ratas adultas, o tratamento hormonal com T3 reduziu a atividade da fosfatase alcalina na dose de 1 nM aos sete dias (Figura 2A), enquanto as doses de 0,01 e 1000 nM reduziram a atividade da fosfatase alcalina aos 21 dias de cultivo (Figura 2C).

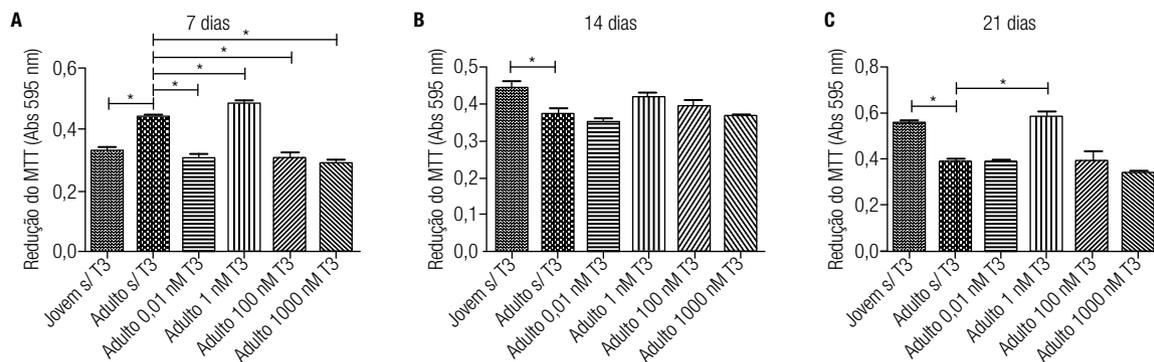


Figura 1. Conversão do MTT em cristais de formazan (média ± desvio-padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênica aos sete e 14 dias de cultivo. * p < 0,05.

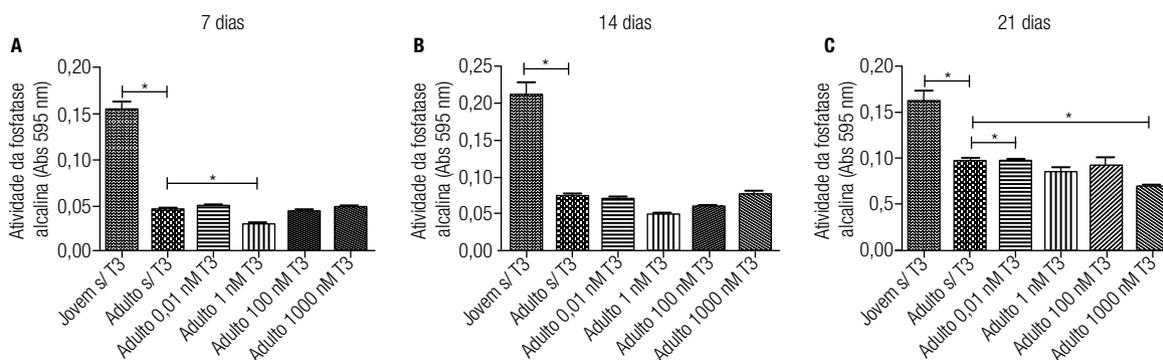


Figura 2. Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio-padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênica aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. * p < 0,05.

Síntese de colágeno

Com relação à síntese de colágeno, o efeito da idade também foi marcante em todos os períodos estudados, uma vez que as CTM-MO das ratas adultas apresentaram síntese de colágeno significativamente menor em comparação ao das CTM-MO de ratas jovens aos sete, 14 e 21 dias (Figuras 3A, 3B e 3C). Em comparação às CTM-MO das ratas adultas não tratadas, o tratamento hormonal com T3 aumentou significativamente a síntese de colágeno na dose de 1nM aos sete dias (Figura 3A). Aos 14 dias, a T3 aumentou significativamente a síntese de colágeno nas doses de 0,01 e 1000 nM e diminuiu nas doses de 1 e 100 nM (Figura 3B), enquanto aos 21 dias as doses de 0,01 e 100 nM aumentaram significativamente a síntese de colágeno (Figura 3C).

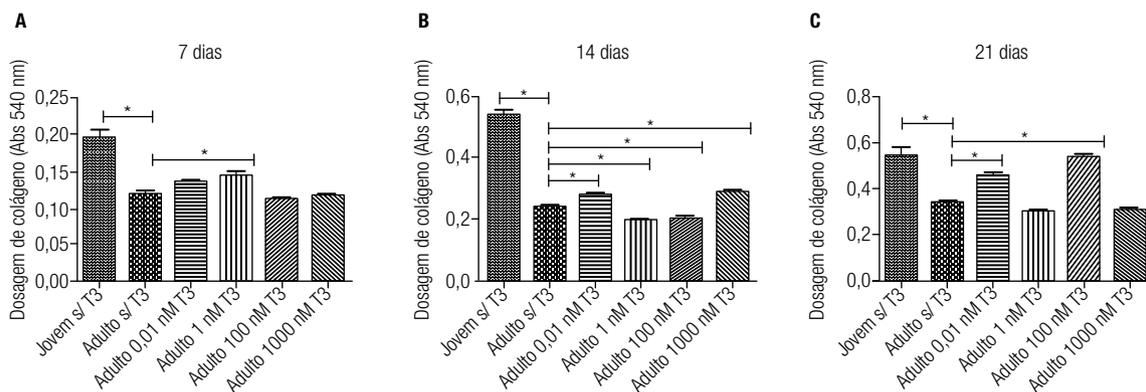


Figura 3. Síntese de colágeno (média \pm desvio-padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênica aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. * $p < 0,05$.

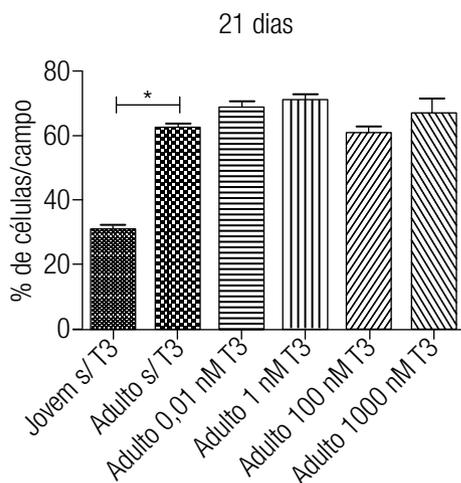


Figura 4. Porcentagem de células/campo (média \pm desvio-padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênica aos 21 dias de cultivo. * $p < 0,05$.

Porcentagem de células/campo

A porcentagem de células/campo foi significativamente maior nas culturas de células de ratas adultas em comparação à cultura de células de ratas jovens. O tratamento com triiodotironina não alterou a celularidade (Figura 4).

Síntese dos nódulos de mineralização

O efeito da idade também foi significativo na síntese de nódulos de mineralização, já que a cultura de CTM-MO de ratas adultas apresentou número de nódulos de mineralização significativamente menor aos 21 dias em comparação às culturas de células de ratas jovens. Surpreendentemente, o tratamento com T3 reduziu significativamente o número de nódulos de mineralização em todas as doses estudadas (0,01; 1; 100 e 1000 nM) em comparação às CTM-MO de ratas adultas sem T3 (Figura 5).

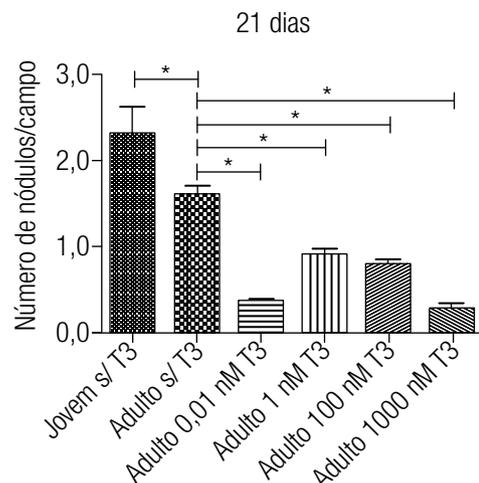


Figura 5. Número de nódulos de mineralização/campo (média \pm desvio-padrão) em culturas de CTM da medula óssea de ratas jovens e adultas tratadas ou não com T3 em meio de diferenciação osteogênica aos 21 dias de cultivo. * $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A caracterização fenotípica das células antes da diferenciação é fundamental para informar sobre o grau de pureza da cultura, pois a medula óssea pode apresentar CTM, células hematopoéticas (2,29) e fibroblastos (30). As células hematopoéticas expressam, entre outras moléculas, CD45 (2,31) que também pode ser expressa em fibroblastos (30). A molécula CD73 pode ser expressa tanto em fibroblastos (2) quanto em CTM (30). Mas as moléculas CD90 e CD54 expressas em mais de 86% das células deste estudo são expressas nas CTM, não sendo expressas em fibroblastos e em células hematopoéticas (2,32,33). O resultado da caracterização fenotípica das células deste estudo está de acordo com as características de CTM propostas pelo *Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy* (34).

Como esperado, o efeito da idade reduziu a diferenciação osteogênica das CTM-MO de ratas adultas saudáveis, caracterizada por redução da conversão do MTT, da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e da formação de nódulos de mineralização em pelo menos um dos períodos estudados. Esse resultado foi semelhante ao observado por outros estudos (11-15,17,18). Segundo Hell e cols. (18), as CTM-MO de ratas com cinco meses de idade, semelhantes às ratas deste estudo, apresentam redução significativa na expressão de telomerase reverse transcriptase (TERT), o que reduz a proliferação das CTM-MO. Entretanto, neste estudo as culturas de células das ratas adultas apresentaram maior celularidade. Contudo, a despeito disso, houve redução da síntese de matriz mineralizada provavelmente em decorrência da redução da atividade da fosfatase alcalina e da síntese de colágeno.

Os resultados da adição de T3 no meio osteogênico padrão foram surpreendentes e interessantes, pois, ao contrário do que se esperava, demonstraram que a T3 não aumenta a diferenciação osteogênica de CTM-MO de ratas adultas, chegando até a reduzir a conversão do MTT, a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de colágeno e a formação de nódulos de mineralização em pelo menos um dos períodos e em uma das doses estudadas. Algumas doses de T3 aumentaram significativamente a síntese de colágeno em comparação à das CTM-MO das ratas adultas sem tratamento. Apesar disso, contrariamente o número de nódulos de mineralização foi reduzido com o tratamento hormonal independentemente da dose de T3. A síntese dos nódulos de mineralização depende, além do colágeno, também

das proteínas não colagênicas representadas pela osteocalcina, osteopontina, sialoproteína, entre outras, e até da fosfatase alcalina. Como o tratamento com T3 não alterou a celularidade, esse efeito negativo não está relacionado à redução do número de células e sim à redução da atividade de síntese dessas células, uma vez que algumas doses de T3 reduziram a atividade da fosfatase alcalina, o que pode ter contribuído para a redução do número de nódulos de mineralização. Mas é provável que esse tratamento também tenha efeito negativo sobre a expressão das proteínas não colagênicas que têm papel importante na mineralização da matriz e que merecem ser investigadas.

Um fato intrigante é que o efeito da adição de T3 na cultura nos diversos parâmetros avaliados não seguiu uma curva dose-resposta clássica (monotônica). Uma curva dose-resposta não é monotônica quando a inclinação da curva muda dentro de uma gama de doses estudadas. Essas curvas são muitas vezes em forma de U (com respostas máximas observadas com doses baixas e altas) ou em forma de U invertido (com respostas máximas observadas com as doses intermediárias) como as curvas observadas em alguns parâmetros avaliados. Exemplos de curva dose-resposta não monotônica são observados em cultura de células, em modelos animais e também em ensaios epidemiológicos. Vários hormônios, além dos estrogênios e androgênios, podem produzir respostas não monotônicas, o que sugere que essa é uma característica geral dos hormônios (35).

Vários mecanismos pelos quais os hormônios produzem respostas não monotônicas em células, tecidos e animais já foram identificados. Esses mecanismos estão relacionados com o tipo celular, com a presença de receptores específicos e cofatores, regulação e dessensibilização do receptor e com a afinidade ao receptor, entre outros. A afinidade ao receptor pode determinar por que curvas em forma de U podem ocorrer. Em doses baixas, alguns hormônios ligam-se quase exclusivamente a um tipo de receptor ou família de receptores, mas, em doses elevadas, podem também ligar-se fracamente a múltiplos receptores hormonais (35).

Alguns pesquisadores sugerem que as curvas não monotônicas são artefatos da cultura de células, no entanto, um grande número dessas curvas é observado em modelos animais após a administração de hormônios, refutando a hipótese de que esse é um fenômeno exclusivamente observado em culturas celulares. Os mecanismos responsáveis por esses fenômenos *in vivo* podem ser semelhantes aos encontrados em sistemas de

cultura de células, embora mecanismos adicionais possam operar *in vivo*, tais como os *feedbacks* positivo e negativo do sistema endócrino (35).

Ao contrário desse resultado, em que a T3 não aumentou a diferenciação osteogênica reduzida pela idade de células-tronco mesenquimais, estudos recentes já haviam demonstrado que a T3 apresenta efeito benéfico sobre a diferenciação osteogênica das CTM-MO de ratas jovens (8) e das CTM-MO de ratas com osteoporose (17). No entanto, esse efeito positivo da triiodotironina sob a diferenciação osteogênica não foi observado em células-tronco mesenquimais do tecido adiposo de ratas com osteoporose (17). Assim, fica demonstrado que o efeito da triiodotironina pode variar de acordo com a fonte de célula-tronco, com a idade e com o estado de saúde do doador da célula. O efeito diferenciado do tratamento com T3 pode estar relacionado com variações do número de receptores para esse hormônio, mas essa é uma assertiva que também necessita ser investigada.

Conclui-se que a triiodotironina não aumenta a diferenciação osteogênica das CTM-MO reduzida pela idade e que, ao contrário, pode reduzir alguns dos fatores envolvidos na diferenciação osteogênica. Sendo assim, a adição de T3 na cultura de CTM-MO de ratas adultas é contraindicada antes do seu uso em defeitos ou doenças ósseas.

Agradecimentos: ao apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Declaração: os autores declaram não haver conflitos de interesse científico neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology* 2000. 2006;41:48-72.
- Bobis S, Jarocha D, Majka M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem Cytobiol*. 2006;44:215-30.
- Payushina OV, Domaratskaya EI, Starostin VI. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell Biol*. 2006;33:2-18.
- Ocarino NM, Marubayashi U, Cardoso TGS, Guimarães CV, Silva AE, Torres RC, et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2007;7:84-93.
- Fromigüé O, Marie PJ, Lomri A. Differential effects of transforming growth factor β 2, dexamethasone and 1,25-dihydroxyvitamin D on human bone marrow stromal cells. *Cytokine*. 1997;9:613-23.
- Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burquera B, Riggs BL. Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Endocrinology*. 1999;140:1630-8.
- Hong L, Colpan A, Peptan IA. Modulations of 17- β estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng*. 2006;12:2747-53.
- Boeloni JN, Ocarino NM, Melo AB, Silva JF, Castanheira P, Goes AM, et al. Dose-dependent effects of triiodothyronine on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Horm Res*. 2009;71:88-97.
- Hong L, Sultana H, Paulius K, Zhang G. Steroid regulation of proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a gender difference. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2009;114:180-5.
- Hell RCR, Boeloni JN, Ocarino NM, Silva JF, Goes AM, Serakides R. Efeito da triiodotironina na expressão das proteínas ósseas durante a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais. *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2011;55:339-44.
- Mueller SM, Glowacki J. Age-Related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *J Cell Biochem*. 2001;82:583-90.
- Kretlow JD, Jin YQ, Liu W, Zhang WJ, Hong TH, Zhou G, et al. Donor age and cell passage affects differentiation potential of murine bone marrow-derived stem cells. *BMC Cell Biol*. 2008;9:1-13.
- Roobrouck VD, Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM. Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Exp Cell Res*. 2008;314:1937-44.
- Zhang W, Ou G, Hamrick M, Hill W, Borke J, Wenger K, et al. Age-related changes in the osteogenic differentiation potential of mouse bone marrow stromal cells. *J Bone Miner Res*. 2008;23:1118-28.
- Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, et al. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell*. 2008;7:335-43.
- Ocarino NM, Boeloni JN, Goes AM, Silva JF, Marubayashi U, Serakides R. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*. 2008;19:320-5.
- Boeloni JN. Efeitos *in vivo* e *in vitro* dos hormônios tireoidianos na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo de ratas ovariectomizadas e não ovariectomizadas. (Tese de doutorado em Ciência Animal). Belo Horizonte, Escola de Veterinária, UFMG, 2012. p. 266.
- Hell RCR, Ocarino NM, Boeloni JN, Silva JF, Goes AM, Santos RL, et al. Physical activity improves age-related decline in the osteogenic potential of rats' bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Acta Physiol (Oxf)*. 2012;205(2):292-301.
- Lee HS, Huang GT, Chiang H, Chiou LL, Chen MH, Hsieh CH, et al. Multipotential mesenchymal stem cells from femoral bone marrow near the site of osteonecrosis. *Stem Cells*. 2003;21:190-9.
- Tropel P, Noël D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp Cell Res*. 2004;295:395-406.
- Nadri S, Soleimani M, Hosseni RH, Massumi M, Atashi A, Izadpanah R. An efficient method of isolation of murine bone marrow mesenchymal stem cells. *Int J Dev Bio*. 2007;51:723-9.
- Ishii M, Koike C, Igarashi A, Yamanaka K, Pan H, Higashi Y, et al. Molecular markers distinguish bone marrow mesenchymal stem cells from fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005a;332:297-303.
- Ishida H, Bellows CG, Aubin JE, Heersche JN. Tri-iodothyronine (T3) and dexamethasone interact to modulate osteoprogeni-

- tor cell differentiation in fetal rat calvaria cell cultures. *Bone*. 1995;16:545-9.
24. Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Washington DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1992. p. 278.
 25. Sampaio IBM. *Estatística aplicada à experimentação animal*. Belo Horizonte: FEP/MVZ; 1998. p. 211.
 26. Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65:55-63.
 27. Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*. 1989;119:203-10.
 28. Smejkal GB, Kaul CA. Stability of nitroblue tetrazolium-based alkaline phosphatase substrates. *J Histochem Cytochem*. 2001;49:1189-90.
 29. Bianco P, Riminucci SG, Robey PG. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells*. 2001;19:180-92.
 30. Ishii G, Sangai T, Sugiyama K, Ito T, Hasebe T, Endoh Y, et al. In vivo characterization of bone marrow-derived fibroblasts recruited into fibrotic lesions. *Stem Cells*. 2005b;23:699-706.
 31. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284:143-7.
 32. Covas DT, Siufi JLC, Silva ARL, Orellana MD. Isolation and culture of umbilical vein mesenchymal stem cells. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36:1179-83.
 33. Tocci A, Forte L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. *Hematol J*. 2003;4:92-6.
 34. Schäffler A, Büchler C. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells – basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*. 2007;25:818-27.
 35. Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, Heindel JJ, Jacobs Jr DR, Lee D-H, et al. Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. *Endocrine Reviews*. 2012 (no prelo).