



**Universidade do Estado do Rio de Janeiro**  
Centro Biomédico  
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Yasmin Silva Forte

**O efeito de mediadores químicos e vesículas extracelulares secretados pelo tecido adiposo de pacientes obesos sobre a função e diferenciação de osteoblastos humanos**

Rio de Janeiro

2022

Yasmin Silva Forte

**O efeito de mediadores químicos e vesículas extracelulares secretados pelo tecido adiposo de pacientes obesos sobre a função e diferenciação de osteoblastos humanos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mariana Renovato-Martins

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE  
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F737 Forte, Yasmin Silva.

O efeito de mediadores químicos e vesículas extracelulares secretados pelo tecido adiposo de pacientes obesos sobre a função e diferenciação de osteoblastos humanos / Yasmin Silva Forte - 2022.

141 f.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mariana Renovato-Martins

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Obesidade – Teses. 2. Mediadores da inflamação – Química. 3. Vesículas extracelulares – Química. 3. Osteoblastos. 4. Tecido adiposo branco – Fisiopatologia – Teses. I. Barja-Fidalgo, Thereza Christina. II. Renovato-Martins, Mariana. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616.399

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo  
CRB7/7341

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

---

Assinatura

---

Data

Yasmin Silva Forte

**O efeito de mediadores químicos e vesículas extracelulares secretados pelo tecido adiposo de pacientes obesos sobre a função e diferenciação de osteoblastos humanos**

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 15 de dezembro de 2022.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Mariana Renovato-Martins

Universidade Federal Fluminense

Banca Examinadora: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Egberto Gaspar de Moura

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

\_\_\_\_\_  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Sara Gemini Piperni

Universidade Federal do Rio de Janeiro

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Alex Balduino de Souza

Universidade Veiga de Almeida

Rio de Janeiro

2022

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho a todos aqueles que me permitiram realizá-lo. Que este estudo possa contribuir de alguma forma com a disseminação de conhecimento e traga benefícios à sociedade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e toda a espiritualidade de luz que me protege, me guia e me conduz para onde devo ir.

Agradeço a minha família por todo o suporte emocional e financeiro. Especialmente minha mãe por toda a força, incentivo, amor e pela criação que recebi. Tudo que sou hoje agradeço a ela.

Agradeço a minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Christina Barja-Fidalgo por me receber em seu laboratório e depositar em mim sua confiança para trabalhar e desenvolver esta nova linha de pesquisa. Obrigada pela sua amistosidade, generosidade e por todo o apoio.

Agradeço a minha Co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Mariana Renovato-Martins por todos os ensinamentos, apontamentos para a condução deste trabalho e pela disponibilidade de me auxiliar sempre que foi necessário.

Agradeço aos médicos Dr. Luiz Guilherme Kraemer e Dr. Paulo Falcão, bem como a todos os profissionais de saúde vinculados à equipe da cirurgia bariátrica do HUPE e HFI pela colaboração para coleta de amostras dos pacientes.

Agradeço a todos os pacientes que concordaram em participar da pesquisa.

Agradeço muito à bióloga Vany Nascimento da Silva que trabalhou comigo na bancada, me ensinando e auxiliando na padronização dos meus protocolos. Obrigada por estar sempre disponível para me ajudar quando estava com bastante trabalho a fazer.

Agradeço ao biólogo Genilson Rodrigues por todo o suporte técnico e pela convivência sempre amistosa.

Agradeço ao Prof. João Alfredo de Moraes por todo o apoio e incentivo.

Agradeço a Prof.<sup>a</sup> Maria das Graças Henriques por ter aceito ser a revisora deste trabalho e por toda a sua disponibilidade para colaboração.

Agradeço aos membros da minha banca avaliadora Prof. Egberto Moura, Prof.<sup>a</sup> Sara Gemini, Prof. Alex Balduino, Prof. Wallace de Mello e Prof.<sup>a</sup> Maria das Graças Henriques pela disponibilidade e por terem aceito o convite para avaliar minha dissertação.

Agradeço ao Prof. Alex Balduino e ao Prof. Wallace de Mello, que me acompanharam durante a minha graduação, por toda a contribuição para minha formação como biomédica, que certamente refletiu na elaboração deste trabalho. Obrigada por toda a ajuda que recebi de vocês. Fica o meu agradecimento aos demais professores do curso de Biomedicina da UVA.

Agradeço ao Msc. Gustavo Paris por me ajudar a consertar erros de protocolo, o que foi essencial para que eu estabelecesse parte das técnicas usadas neste trabalho. Obrigada também pelas discussões de dados que foram fundamentais.

Agradeço a Dra. Isadora Ramos de Andrade por me auxiliar com o processamento de material biológico das cirurgias, assim como a Dra. Aline Vasques e Dra. Hayandra Cunha.

Agradeço a todos os alunos de Iniciação Científica do LFCM, em especial ao meu aluno Caio Andrade, por todo o auxílio e proatividade.

Agradeço a Prof. <sup>a</sup> Verônica Morandi que foi supervisora em meu estágio à docência e também aos seus alunos Laila e Antônio por me receberem cordialmente na disciplina “Cultura de células animais”, uma excelente experiência dentro de sala de aula que foi importante para minha formação.

Agradeço ao Prof. André Mencialha que me recebeu gentilmente quando eu procurava estágio e que me apresentou as linhas de pesquisa da Prof. <sup>a</sup> Christina, o que foi determinante para que eu começasse a ser orientada por ela.

Agradeço as agências de fomento CAPES, FAPERJ e CNPQ pelo suporte financeiro para a elaboração desta pesquisa.

Agradeço, como sempre, a todos os professores que passaram pela minha vida.

Somos como anões nos ombros de gigantes, pois podemos ver mais coisas do que eles e mais distantes, não devido à acuidade da nossa vista ou à altura do nosso corpo, mas porque somos mantidos e elevados pela estatura de gigantes.

*Bernardo de Chartres*



## RESUMO

FORTE, Yasmin Silva. **O efeito de mediadores químicos e vesículas extracelulares secretados pelo tecido adiposo de pacientes obesos sobre a função e diferenciação de osteoblastos humanos.** 2022. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A obesidade é uma doença multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal. Durante o desenvolvimento da obesidade, o tecido adiposo branco passa por uma expansão patológica na qual os adipócitos hipertrofiados modificam o seu perfil secretor contribuindo para a instalação da inflamação crônica de baixo grau. Desta forma, mediadores pró-inflamatórios interferem no funcionamento de vários órgãos e tecidos, dentre eles o tecido ósseo. Diversos trabalhos demonstram que citocinas pró-inflamatórias induzem a inibição da atividade de osteoblastos, células produtoras de matriz extracelular óssea (MECO); enquanto ativam a diferenciação e atividade de osteoclastos, que realizam a reabsorção do osso, culminando com a perda óssea. Porém, o aumento da carga mecânica, promovida pelo ganho de peso, é um fator que estimula a formação óssea. Por conta disso, o efeito da obesidade sobre o remodelamento ósseo ainda é um tema que gera discordâncias. Adicionalmente, o papel das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo obeso sobre a atividade de osteoblastos é um assunto pouco explorado, justificando a investigação. Neste trabalho, células da linhagem de osteoblastos humanos SAOS-2 foram tratadas com o meio condicionado derivado do tecido adiposo subcutâneo de indivíduos obesos (MCO) e eutróficos (MCE), durante sua maturação *in vitro*. Além disso, avaliamos a interferência das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo obeso (VEO) e eutrófico (VEE) para avaliação da sua interferência no processo de diferenciação dos osteoblastos. Foi observado que o MCO induziu o aumento da proliferação celular, modificação morfológica para uma conformação fibroblástica, diminuição da calcificação de MECO, redução da expressão de marcadores osteogênicos e aumento de marcadores mesenquimais, aumento da degradação de  $\beta$ -Catenina, redução da expressão de integrina  $\beta$ 1 e diminuição da ativação de FAK. Estes dados não foram observados com a adição apenas das vesículas extracelulares. Devido ao MCO apresentar maiores concentrações de TGF- $\beta$ 1, foi investigada a participação deste fator no efeito proporcionado por MCO nos osteoblastos. O tratamento com TGF- $\beta$ 1 nas células produziu resultados similares ao tratamento com MCO. O bloqueio de TGF- $\beta$  no MCO reverteu a modificação morfológica, alterou a proliferação mas não foi capaz de reestabelecer a calcificação. Como conclusão, o tratamento com MCO induz uma regressão de fenótipo de osteoblastos maduros para um perfil de osteoprogenitor, sendo parte desses efeitos provocados pela maior liberação de TGF- $\beta$ 1.

Palavras-chave: Obesidade. Diferenciação de osteoblasto. Tecido adiposo. Inflamação sistêmica. Vesículas extracelulares de tecido adiposo. Desdiferenciação. TGF- $\beta$ 1.

## ABSTRACT

FORTE, Yasmin Silva. *The effect of chemical mediators and extracellular vesicles derived from obese subjects adipose tissue on human osteoblast function and differentiation*. 2022. 141 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Obesity is a multifactorial disease characterized by excessive body fat accumulation. During obesity development, white adipose tissue undergoes a pathological expansion in which hypertrophied adipocytes modify their secretory profile contributing to low-grade chronic inflammation establishment. Obesity-derived pro-inflammatory mediators interfere with the functions of various organs and tissues, and those obese-adipose tissue products can also affect bone tissue. Many works have demonstrated that pro-inflammatory cytokines induce an inhibition of osteoblasts activity, cells that produce bone extracellular matrix (BECM); while activating the differentiation and activity of osteoclasts, which promotes bone resorption; resulting in bone loss. However, the increase in mechanical load is a factor that stimulates bone formation. Because of this, the effect of obesity on bone remodeling is still a topic that generates disagreements. Additionally, the role of extracellular vesicles released by obese adipose tissue on osteoblast activity is poorly explored, justifying the investigation. In this work, the cells SAOS-2 human osteoblast lineage were treated with conditioned media of the cultures of subcutaneous adipose tissue from obese (OCM) and eutrophic (ECM) patients during the maturation of these cells *in vitro*. Furthermore, we isolated the extracellular vesicles in adipose tissue conditioned media of obese (EVO) and eutrophic (EVE) subjects to assess their interference in the osteoblast differentiation process. It was observed that OCM increased cell proliferation, promoted a morphological modification to a spindle-shaped form, decreased BECM calcification, and reduced the expression of osteogenic markers. OCM also increased mesenchymal markers, promoting  $\beta$ -Catenin degradation, reducing integrin  $\beta$ 1 expression, and decreasing FAK activation. These alterations were not observed after treatment with isolated extracellular vesicles. Because OCM has higher concentrations of TGF- $\beta$ 1, the role of this factor in its effects on osteoblasts was further investigated. Treatment with TGF- $\beta$ 1 produced similar results as OCM treatment. Blockade of TGF- $\beta$  in OCM reversed the morphological modification and altered proliferation but did not reestablish calcification. The data indicate that mediators released by the adipose tissue during obesity can induce cellular regression of mature osteoblast phenotype towards an osteoprogenitor-like profile, partly caused by increased release of TGF- $\beta$ 1 produced by obese-adipose tissue.

Keywords: Obesity. Osteoblast differentiation. Adipose tissue. Systemic inflammation. Adipose tissue-derived extracellular vesicles. Dedifferentiation. TGF- $\beta$ 1.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Achados arqueológicos: Registros históricos da obesidade ao longo do tempo.....	21
Figura 2 –	A obesidade como um padrão de beleza feminino.....	22
Figura 3 –	Desenvolvimento da obesidade no Rei Henrique VIII.....	23
Tabela 1 –	Estimativa da prevalência da obesidade global entre adultos até 2030 .....	26
Figura 4 –	Dados epidemiológicos de obesidade entre adultos e crianças brasileiros até 2030.....	27
Tabela 2 –	Associação entre o grau de escolaridade e o excesso de peso entre adultos nas 27 capitais brasileiras.....	28
Tabela 3 –	Associação entre o grau de escolaridade e a obesidade entre adultos nas 27 capitais brasileiras.....	29
Gráfico 1 –	Percentual de homens com obesidade nas 27 capitais brasileiras.....	29
Gráfico 2 –	Percentual de mulheres com obesidade nas 27 capitais brasileiras.....	30
Figura 5 –	Expansão patológica do tecido adiposo obeso.....	35
Figura 6 –	Organização do osso cortical.....	40
Figura 7 –	Organização do osso trabecular .....	40
Figura 8 –	Distribuição do osso cortical e trabecular nos ossos longos e chatos.....	41
Figura 9 –	Localização do perióstio e endóstio.....	42
Figura 10 –	As etapas da ossificação endocondral.....	43
Figura 11 –	As etapas da ossificação intramembranosa.....	44
Figura 12 –	O remodelamento ósseo.....	46
Figura 13 –	A polarização de osteoclasto e a sua atividade reabsortiva .....	47
Figura 14 –	A mineralização da matriz extracelular óssea pelas vesículas extracelulares de osteoblasto.....	49
Figura 15 –	A diferenciação de osteoblastos.....	51
Figura 16 –	Combinações de subunidades $\alpha$ e $\beta$ de integrinas e seus ligantes .....	52
Figura 17 –	Ativação de integrinas e vias de sinalização associadas a estes receptores.....	53
Figura 18 –	Comparação entre as vias de sinalização ativadas por TGF- $\beta$ (18A) e	

	BMP (18B) .....	57
Figura 19 –	Mecanismos de perda óssea associados à obesidade.....	65
Figura 20 –	Classificação das vesículas extracelulares.....	67
Figura 21 –	Processamento do tecido adiposo subcutâneo humano para obtenção do meio condicionado.....	74
Figura 22 –	Protocolo de obtenção do Meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano.....	75
Figura 23 –	Protocolo de isolamento de vesículas extracelulares meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano.....	76
Figura 24 –	O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso aumenta a proliferação de osteoblastos.....	82
Figura 25 –	O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso induz mudança morfológica em osteoblastos .....	83
Figura 26 –	O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso reduz a expressão de marcadores osteogênicos.....	84
Figura 27 –	O Meio Condicionado derivado de Tecido adiposo Obeso inibe a calcificação de Matriz extracelular óssea <i>in vitro</i> .....	85
Figura 28 –	O Meio Condicionado derivado de Tecido adiposo Obeso aumenta a expressão de marcadores mesenquimais em osteoblasto.....	87
Figura 29 –	O Meio condicionado derivado de tecido adiposo Obeso modifica o perfil de expressão de Integrinas.....	89
Figura 30 –	O Meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso interfere na sinalização mediada por P-FAK(Tyr 397) e promove a degradação de $\beta$ -Catenina.....	90
Figura 31 –	O pré-tratamento com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso em osteoblastos favorece a formação de células <i>adipocyte-like</i> quando cultivadas em meio de diferenciação adipogênica.....	92
Figura 32 –	As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não alteram a proliferação de osteoblastos.....	92
Figura 33 –	As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo Obeso não modificam a morfologia de osteoblastos.....	94
Figura 34 –	As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não	

	interferem na expressão de marcadores osteogênicos.....	95
Figura 35 –	As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não comprometem a calcificação de matriz extracelular óssea <i>in vitro</i> .....	96
Figura 36 –	TGF- $\beta$ 1 induz um aumento na proliferação de osteoblastos .....	98
Figura 37 –	TGF- $\beta$ 1 induz mudança morfológica para um formato alongado em osteoblastos de forma dose dependente .....	99
Figura 38 –	TGF- $\beta$ 1 inibe a calcificação de matriz extracelular óssea <i>in vitro</i> .....	100
Figura 39 –	TGF- $\beta$ 1 induz o aumento da degradação de $\beta$ -Catenina e redução da expressão de osteopontina em osteoblastos.....	101
Figura 40 –	A neutralização de TGF- $\beta$ no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso altera os seus efeitos sobre a proliferação e morfologia celular .....	102
Tabela 4 –	O meio condicionado de tecido adiposo obeso é enriquecido com TGF- $\beta$ 1.....	102
Figura 41 –	A neutralização de TGF- $\beta$ no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso não interfere na inibição da calcificação de matriz extracelular.....	103
Figura 42 –	As células SAOS-2 não são capazes de promoverem a calcificação de matriz extracelular em meio de diferenciação com 1 ou 0% de SFB.....	110
Figura 43 –	O meio condicionado de tecido adiposo obeso induz uma regressão de fenótipo em osteoblastos maduros para um perfil similar ao de osteoprogenitor .....	112

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A.C.	Antes de Cristo
ABESO	Associação brasileira para o estudo de obesidade e síndrome metabólica
ALA	Ácido $\alpha$ -Linolênico
ALP	<i>Alkaline phosphatase</i>
APOE	<i>Apolipoprotein E</i>
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
BCRJ	Banco de células do Rio de Janeiro
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>Basic multicellular unit</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSP	<i>Bone sialoprotein</i>
CA	Circunferência abdominal
CEBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CMV	Corpos multivesiculares
COLI	<i>Type I Collagen</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CTX	<i>Carboxy-terminal collagen crosslinks</i>
DC-STAMP	<i>Dendritic cell-specific transmembrane protein</i>
DEXA	Absorciometria de dupla energia de raios X
DKK1	<i>Dickkopf WNT Signaling Pathway Inhibitor 1</i>
DLX5	<i>Distal-Less Homeobox 5</i>
DMO	Densidade mineral óssea
DMP1	<i>Dentin matrix protein 1</i>
DP	Desvio Padrão
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
ENPP1	Ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodi esterase 1
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FABP4	<i>Fatty acid-binding protein 4</i>

FAK	<i>Focal adhesion kinase</i>
FGF-23	<i>Fibroblast growth factor 23</i>
FTO	<i>Fat mass and obesity associated gene</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GSK3 $\beta$	<i>Glycogen Synthase Kinase 3 Beta</i>
HDAC	<i>Histone deacetylases</i>
HEPES	<i>N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane sulfonic acid</i>
HFI	Hospital Federal de Ipanema
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IFN	Interferon
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleucina
ILK	<i>Integrin-linked kinase</i>
IMC	Índice de massa corporal
IMG	Índice de massa gorda
ITG	Integrina
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
LEPR	<i>Leptin receptor</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
LRP5/6	<i>LDL Receptor Related Protein 5/6</i>
M.DIF.	Meio de diferenciação osteogênica
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCE	Meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos
MCO	Meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos
MCP- 1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulation factor</i>
MECO	Matriz extracelular óssea
MEPE	<i>Matrix extracellular phosphoglycoprotein</i>
MIF	<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>
MKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLCK	<i>Myosin light-chain kinase</i>
MMP-9	<i>Metalloproteinase 9</i>
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>

NEDD2-4	<i>E3 ubiquitin-protein ligase 2-4</i>
NFATc1	<i>Nuclear Factor Of Activated T Cells 1</i>
NOX2	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NAPDH) oxidase 2</i>
OCN	<i>Osteocalcin</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
OPN	<i>Osteopontin</i>
OSCAR	<i>Osteoclast-associated receptor</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PIB	Produto interno bruto
PKA	<i>Protein kinase A</i>
PKC	<i>Protein Kinase C</i>
PLIN6	<i>Perilipin 6</i>
PMG	Percentual de massa gorda
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl fluorid</i>
PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	Fosfato
PPAR-γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
PPI	Pirofosfato
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados (Poli-unsaturated fatty acids)
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappa beta</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor-kappa beta ligand</i>
RGD	<i>Arginylglycylaspartic acid</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROCK	<i>Rho-associated protein kinase</i>
RUNX2	<i>Runt-related transcription factor 2</i>
SAOS-2	<i>Sarcoma osteogenic 2</i>
SBEM	Sociedade Brasileira de Endocrinologia e metabolismo
SBTI	<i>Soybean trypsin inhibitor</i>
SFB	Soro fetal bovino
SMAD	<i>Suppressor of Mothers against Decapentaplegic</i>
SMURF	<i>Smad ubiquitin regulatory factor</i>



SNAREs	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptors</i>
SOST	Esclerostina
TAB	Tecido adiposo branco
TAB1	<i>TAK1-binding protein 1</i>
TAK1	<i>Transforming growth factor-<math>\beta</math>-activated kinase 1</i>
TAM	Tecido adiposo marrom
TAS	Tecido adiposo subcutâneo
TCF/LEF	<i>T cell factor/lymphoid enhancer factor family</i>
TCQ	Tomografia computadorizada quantitativa
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor Beta</i>
TLR8	<i>Toll like receptor 8</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math></i>
TRAP	<i>Tartrate resistant acid phosphatase</i>
TSG101	<i>Tumor Susceptibility 101</i>
TTBS	Tween Tris-buffered saline
UCP	<i>Uncoupling protein</i>
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UnOC	<i>Uncarboxylated osteocalcin</i>
UVA	Universidade Veiga de Almeida
VEE	Vesículas extracelulares de tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VEO	Vesículas extracelulares de tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos
VIGITEL	Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico
VIM	Vimentina
WWP1	<i>WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1</i>
$\alpha$ -SMA	<i><math>\alpha</math> smooth muscle actin</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
β	Beta
α	Alfa
A	Ampere
g	Gramma
G	Gravidade
Kg/m <sup>2</sup>	Quilogramas por metro quadrado
kDa	Quilodalton
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
° C	Graus Celcius
V	Volts
μL	Micro litro
μm	Micrômetro
ω	Ômega

## SUMÁRIO

	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
1	<b>OBJETIVOS</b> .....	71
1.1	<b>Geral</b> .....	71
1.2	<b>Específicos</b> .....	71
2	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	72
2.1	<b>Células</b> .....	72
2.2	<b>Cultura celular</b> .....	72
2.3	<b>Recrutamento de pacientes obesos e eutróficos</b> .....	73
2.4	<b>Obtenção do meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano</b> .....	73
2.5	<b>Obtenção das vesículas extracelulares do meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano</b> .....	75
2.6	<b>Grupos experimentais e dose de meio condicionado e vesículas extracelulares para os experimentos</b> .....	76
2.7	<b>Ensaio de Proliferação e viabilidade – MTT</b> .....	76
2.8	<b>Obtenção de extratos celulares proteicos</b> .....	77
2.9	<b>Dosagem de proteínas dos extratos celulares e desnaturação das amostras</b> ....	77
2.10	<b>Ensaio de Calcificação de matriz extracelular óssea – coloração com vermelho de Alizarina 2%</b> .....	78
2.11	<b>Avaliação da morfologia celular – coloração com azul de metileno</b> .....	78
2.12	<b>Imunofluorescência</b> .....	79
2.13	<b>Western Blotting</b> .....	79
2.14	<b>Ensaio de transdiferenciação celular – indução de adipogênese em osteoblastos</b> .....	80
2.15	<b>Avaliação do efeito de TGF-<math>\beta</math>1 sobre as células SAOS-2</b> .....	80
2.16	<b>Análise estatística</b> .....	81
3	<b>RESULTADOS</b> .....	82
3.1	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso aumenta a proliferação de osteoblastos</b> .....	82
3.2	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso induz mudança morfológica em osteoblastos</b> .....	83

3.3	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso reduz a expressão de marcadores osteogênicos.....</b>	84
3.4	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso inibe a calcificação de Matriz extracelular óssea <i>in vitro</i> .....</b>	85
3.5	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso aumenta a expressão de marcadores mesenquimais em osteoblastos.....</b>	86
3.6	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso modifica o perfil de expressão de integrinas.....</b>	87
3.7	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso interfere na sinalização mediada por P-FAK(Tyr 397) e promove a degradação de <math>\beta</math>-Catenina.....</b>	89
3.8	<b>O pré-tratamento com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso em osteoblastos favorece a formação de células <i>adipocyte-like</i> quando cultivadas em meio de diferenciação adipogênica.....</b>	91
3.9	<b>As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não alteram a proliferação de osteoblastos.....</b>	92
3.10	<b>As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não modificam a morfologia de osteoblastos .....</b>	93
3.11	<b>As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não interferem na expressão de marcadores osteogênicos.....</b>	94
3.12	<b>As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não comprometem a calcificação de matriz extracelular óssea <i>in vitro</i>.....</b>	95
3.13	<b>O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso é enriquecido com TGF-<math>\beta</math>1.....</b>	96
3.14	<b>TGF-<math>\beta</math>1 induz um aumento na proliferação de osteoblastos .....</b>	97
3.15	<b>TGF-<math>\beta</math>1 induz mudança morfológica para um formato alongado em osteoblastos de forma dose dependente .....</b>	98
3.16	<b>TGF-<math>\beta</math>1 inibe a calcificação de matriz extracelular óssea <i>in vitro</i> .....</b>	99
3.17	<b>TGF-<math>\beta</math>1 induz o aumento da degradação de <math>\beta</math>-Catenina e redução da expressão de osteopontina em osteoblastos .....</b>	100
3.18	<b>A neutralização de TGF-<math>\beta</math> no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso reverte parte dos seus efeitos sobre a proliferação e morfologia celular.....</b>	101

3.19	<b>A neutralização de TGF-<math>\beta</math> no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso não interfere na inibição da calcificação de matriz extracelular.....</b>	103
4	<b>DISCUSSÃO .....</b>	104
	<b>CONCLUSÃO .....</b>	112
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	113
	<b>ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa (Hospital Federal de Ipanema) .....</b>	133
	<b>ANEXO B – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa (Hospital Universitário Pedro Ernesto) .....</b>	136

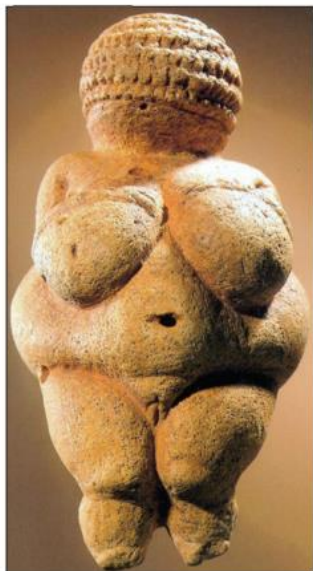
## INTRODUÇÃO

### A obesidade: definição e relatos históricos

A obesidade é uma doença multifatorial inflamatória crônica que, por conta da rapidez e alta difusão a nível mundial, tornou-se uma pandemia. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define a condição de obesidade e sobrepeso como um acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que apresenta riscos à saúde (OMS). Nas últimas décadas, órgãos de saúde pública demonstraram preocupação com a alta prevalência de pessoas com obesidade, principalmente pelo fato desta doença estar associada ao surgimento de outros distúrbios como doenças cardiovasculares, diversos tipos de cânceres, diabetes e distúrbios hepáticos e renais; além da direta associação do excesso de peso com o aumento da mortalidade (SHETZ *et al.*, 2019).

Apesar de ser muito mais frequente desde os últimos 30 anos, relatos e objetos históricos confirmam a existência de pessoas inseridas no perfil de obesidade desde a pré-história. Como é possível observar na figura 1, a estátua denominada “Venus de Willendorf”, encontrada perto da cidade de Willendorf na Áustria, possui cerca de 24.000 A.C. e representa uma mulher com obesidade da era paleolítica (SHESHADRI, 2012). Devido às difíceis condições de vida, levantou-se a hipótese de que mulheres supernutridas viraram um símbolo de sobrevivência, fertilidade e beleza durante o período. (JOHNSON *et al.*, 2020). Outras sociedades como a do antigo Egito também possuíam evidências da ocorrência da obesidade. Em uma obra de arte em relevo encontrada em uma tumba egípcia, produzida em 2.350 A.C., um homem nobre com sobrepeso é ilustrado sendo alimentado por um servo. A escultura de “Venus de Willendorf” e a arte em relevo egípcia são apresentadas na figura 1A e 1B, respectivamente.

Figura 1 – Achados arqueológicos: Registros históricos da obesidade ao longo do tempo

**14A****14B**

Fonte: Adaptado de SHESHADRI, 2012 (14A); Adaptado de BRAY, 2009 (14B).

Adicionalmente, através da reconstrução e avaliação de múmias de membros da realeza egípcia, foi sugerido que as rainhas Inhapy, Hatshepsut e o rei Ramsés III apresentavam sobrepeso (BRAY, 2009). Importantes relatos também foram registrados pelas sociedades greco-romanas. O físico e professor grego Hipócrates (460–377 A.C.) observou que a morte prematura era mais comum em pessoas obesas do que em pessoas magras. Além disso, sugeriu que “era prejudicial à saúde ingerir mais alimentos do que se poderia suportar, ao mesmo tempo que não se usa nenhum exercício para levar este excesso” (HASLAM, 2016). Posteriormente, o filósofo e cirurgião romano Galen (129–200 D.C) identificou dois estágios de obesidade: a moderada e mórbida (BRAY, 2009). Nomeou a condição de obesidade mórbida como *polysarkos* (*poly* – muito) (*sarkos* – carne) e descreveu que o indivíduo *polysarkos* “não pode caminhar sem suar, não consegue alcançar a mesa quando sentado por causa da massa de seu estômago, não pode respirar facilmente, não consegue dar à luz e não pode limpar-se” (PAPAVRAMIDOU *et al.*, 2004).

No período da ascensão do Cristianismo, a obesidade passou a ser mais prevalente entre membros da elite e estava associada às condições abastadas. Mulheres com maior corpulência estavam de acordo aos padrões de beleza femininos, retratados por pintores como Rubens (EKNOYAN, 2006) e Tiziano. Apesar disso, o excesso de peso era mal visto pela sociedade,

principalmente pelos membros da Igreja católica que apontavam que a condição era fruto do pecado da gula (HASLAM, 2016). Na figura 2, são representadas as pinturas “Vênus e Adonis” de Rubens datada de aproximadamente 1640 (Figura 2A), e “Vênus e o cupido com o organista” de Tiziano Vecellio de 1548 (Figura 2B) retratando o padrão de beleza feminino.

Figura 2 - A obesidade como um padrão de beleza feminino

**15A**



**15B**



Fonte: (15A) The Metropolitan museum of art. Disponível em: <https://www.metmuseum.org/art/collection/search/437535>

(15B) Museu de reproduções. Disponível em [https://pt.wahooart.com/@/8YE74Y-Tiziano-Vecellio-%28Titian%29-Vênus-e-Cupido-com-um-organista](https://pt.wahooart.com/@/8YE74Y-Tiziano-Vecellio-%28Titian%29-V%C3%AAnus-e-Cupido-com-um-organista)

Outro relato histórico do desenvolvimento da doença é o caso do Rei Henrique VIII. Após um acidente, o rei adquiriu uma ferida na perna que dificultou sua mobilidade, favorecendo um perfil sedentário. Além da pouca atividade física e do próprio envelhecimento, os hábitos alimentares do Rei Henrique VIII o conduziram para a obesidade (CHALMERS; CHALONET, 2009). Abaixo, na figura 3, estas fotografias das armaduras do rei em 1515 (3A) e anos depois em 1540 (3B), evidenciando o aumento da massa corporal.



Figura 3 – Desenvolvimento da obesidade no Rei Henrique VIII.



Fonte: Adaptado de CHALMERS; CHALONET, 2009.

A partir do século XVIII, mediante a uma mudança de mentalidade principalmente de estudiosos da época, atitudes contrárias à obesidade começaram a ser empregadas. Assim, medidas como a prática de exercícios e alterações dietéticas com consumo mais elevado de proteínas e vegetais, e redução de carboidratos foram incentivadas (HASLAM, 2016).

Nos dias de hoje, diferentemente do que se observava até então, a obesidade deixou de ser uma condição de poucos e passou a ser abundante na população mundial. Se antes o escasso acesso aos alimentos tornava o ganho de peso um “privilégio” de burgueses e nobres (EKNOYAN, 2006), atualmente a obesidade é crescente entre os segmentos de pior condição socioeconômica (NEWTON; BRAITHWAITE; AKINYEMIJU, 2017).

### **Critérios para a classificação de obesidade:**

A classificação de pessoas em situação de sobrepeso ou obesidade pode ser realizada através de diferentes metodologias. A forma amplamente utilizada nos dias de hoje e reconhecida pela Organização Mundial de Saúde é o cálculo do Índice de massa corporal

(IMC). Neste caso, o valor da massa em quilogramas de um indivíduo adulto é dividido pelo quadrado de sua altura em metros. Segundo as diretrizes da OMS, valores de IMC inferiores a 18,5 representam pessoas abaixo do peso. Entre 18,5 e 24,9, encontram-se os indivíduos com peso considerado saudável. Do contrário, valores de IMC variando de 25 até 29,9 classificam o adulto em sobrepeso e, a partir de 30 Kg/m<sup>2</sup> os indivíduos são classificados como obesos. Dentro da classificação de obesidade, existem as categorias que indicam o grau de severidade da doença. De 30 até 34,9 estão as pessoas com obesidade grau I; de 35 a 39,9 a obesidade grau II e por fim, indivíduos com IMC acima de 40 Kg/m são classificados em obesidade grau III (OMS).

O IMC como critério de classificação de sobrepeso e obesidade apresenta muitas vantagens como a possibilidade de ser aplicado tanto a mulheres como homens, se correlaciona com percentual de gordura corporal, e é de fácil obtenção e baixo custo levando em consideração a necessidade do diagnóstico de obesidade em locais com baixa assistência de saúde (GUTIN, 2018). Os valores altos de IMC estão associados ao maior risco do desenvolvimento de comorbidades (LIEBEDOWSKA *et al.*, 2021) Apesar disso, existe um consenso de que esta metodologia é imprecisa. Isso se deve ao fato do valor do IMC não distinguir a massa magra da massa gorda. Assim, pessoas com peso considerado normal porém com maior adiposidade corporal, poderiam não ser inclusas como obesas. No contexto oposto, indivíduos com muita massa muscular poderiam ser erroneamente classificados como obesos (WONG *et al.*, 2021). Outro fato importante, é que não existem valores de referência de IMC correspondentes as variações da composição corporal de diferentes etnias (KELLY; WILSON; HEYMSFIELD 2009).

Dessa forma, outros tipos de medidas antropométricas são utilizadas para a classificação de ganho de peso. Um deles é o percentual massa gorda (PMG), que pode ser obtido através da Impedância bioelétrica e da Absorciometria de dupla energia de raios X (DEXA). Este método, similarmente ao IMC, apresenta limitações sobre a contribuição de massa magra. O status de hidratação do indivíduo também pode influenciar o resultado, no caso da análise com Impedância (WONG *et al.*, 2021).

O Índice de massa gorda (IMG) é um método que apresenta acurácia para a classificação de obesidade e sobrepeso. É obtido através da razão do total de gordura corporal pelo quadrado da altura. A quantificação da gordura corporal é acessada por meio do exame de DEXA de corpo inteiro, que difere o percentual de massa gorda, massa magra e massa óssea. Além disso, o IMG apresenta a vantagem de possuir diferentes valores de referência para raças e sexo. Neste

critério, homens com valores superiores a 9 e mulheres com valores superiores a 13 são considerados obesos (PETAK *et al.*, 2013).

Diferente dos métodos listados acima, que dependem de equipamentos muitas vezes pouco acessíveis, a aferição da Circunferência abdominal (CA) reúne a facilidade de aplicação a realidade clínica, com satisfatória quantificação de adiposidade abdominal e posterior associação dos valores obtidos com a mortalidade por várias causas e com a mortalidade por distúrbios cardiovasculares. Recentemente, a Sociedade internacional de Aterosclerose reconheceu que o IMC isoladamente não é o suficiente para avaliar o risco cardiometabólico associado ao aumento de adiposidade, devendo ser complementado com a aferição da CA (ROSS *et al.*, 2020).

Apesar das críticas a imprecisão do IMC, esta medida antropométrica não é invalidada. A tendência de vários autores da área é associar o IMC a outro tipo de avaliação para melhor a acurácia do diagnóstico de obesidade, e assim trazer um panorama mais fidedigno sobre a realidade de cada indivíduo com excesso de peso, sem generalizações.

Nesse contexto, a Sociedade brasileira de Endocrinologia e metabolismo (SBEM) juntamente a Associação brasileira para o estudo de obesidade e síndrome metabólica (ABESO) propuseram uma alternativa para a classificação de pacientes com obesidade, baseado em suas trajetórias do peso, acrescentando novas categorias para as classes do IMC. Neste modelo, pacientes de 18 a 65 anos, com IMC variando de 30 a 50 Kg/m<sup>2</sup>, sem níveis endógenos elevados de cortisol ou que não façam uso de corticóides, e que não apresentem doenças terminais; receberiam os títulos “inalterado”, “reduzido” ou “controlado” ao lado do valor do IMC (HALPERN *et al.*, 2022).

Assim, tendo como referência o maior bil peso atingido na vida pelo indivíduo, seria quantificado o percentual de perda de peso atingido pelo mesmo. Para obesidade classe I e II, o título de “reduzido” seria dado àqueles pacientes com perda de peso de 5 a 10%, enquanto “controlado” seriam os pacientes com perda superior a 10%. De forma análoga, os pacientes obesos grau III receberiam os mesmos títulos porém, “reduzido” equivaleria a uma perda mínima de 10% até 15% e “controlado” com perda de peso acima de 15%. Esta metodologia ainda precisa ser validada para sua ampla utilização, mas promete ser uma ferramenta útil para o tratamento de indivíduos com diferentes perfis de obesidade dentro de uma mesma categoria de IMC (HALPERN *et al.*, 2022).

## Dados epidemiológicos da obesidade no Brasil e no mundo:

Devido a mudanças no estilo de vida nas últimas décadas, a prevalência da obesidade mundial triplicou desde 1975 até 2016 (OMS). Segundo dados do Atlas Mundial de Obesidade de 2022, a prevalência global de pessoas adultas obesas passou de 511 milhões de indivíduos em 2010 para 764 milhões em 2020. De acordo com a tendência de aumento da população obesa ao longo dos anos, a previsão é que até 2030 este valor aumente para 1,025 bilhão de pessoas, o equivalente a 17,5% da população adulta do planeta. Observando as projeções estabelecidas para 2030, são estimados que 1 a cada 5 mulheres e 1 a cada 7 homens tornem-se obesos, somando 1 bilhão de pessoas com obesidade no mundo (ATLAS MUNDIAL DE OBESIDADE, 2022). Estes e os demais dados obtidos nesta previsão, podem ser observados da tabela 1 abaixo.

Tabela 1 – Estimativa da prevalência da obesidade global entre adultos até 2030

### Prevalência global e número estimado de pessoas com obesidade e obesidade severa em 2010, 2020, 2025 e 2030

Prevalência da obesidade definida por IMC	2010		2020		2025		2030	
	%	n	%	n	%	n	%	n
<b>Mulheres</b>								
Obesidade (I, II e III) $\geq 30\text{kg/m}^2$	14	304m	17	445m	18	512m	20	586m
Obesidade severa (II e III) $\geq 35\text{kg/m}^2$	4	100m	6	159m	7	188m	7	219m
Obesidade severa (III) $\geq 40\text{kg/m}^2$	1	32m	2	54m	2	65m	3	77m
<b>Homens</b>								
Obesidade (I, II e III) $\geq 30\text{kg/m}^2$	9	207m	13	324m	14	380m	15	439m
Obesidade severa (II e III) $\geq 35\text{kg/m}^2$	2	44m	3	79m	3	96m	4	114m
Obesidade severa (III) $\geq 40\text{kg/m}^2$	0.5	11m	1	22m	1	28m	1	34m
<b>Todos</b>								
Obesidade (I, II e III) $\geq 30\text{kg/m}^2$	11	511m	15	764m	16	892m	18	1,025m
Obesidade severa (II e III) $\geq 35\text{kg/m}^2$	3	143m	5	238m	5	284m	6	333m
Obesidade severa (III) $\geq 40\text{kg/m}^2$	1	42m	2	77m	2	93m	2	111m

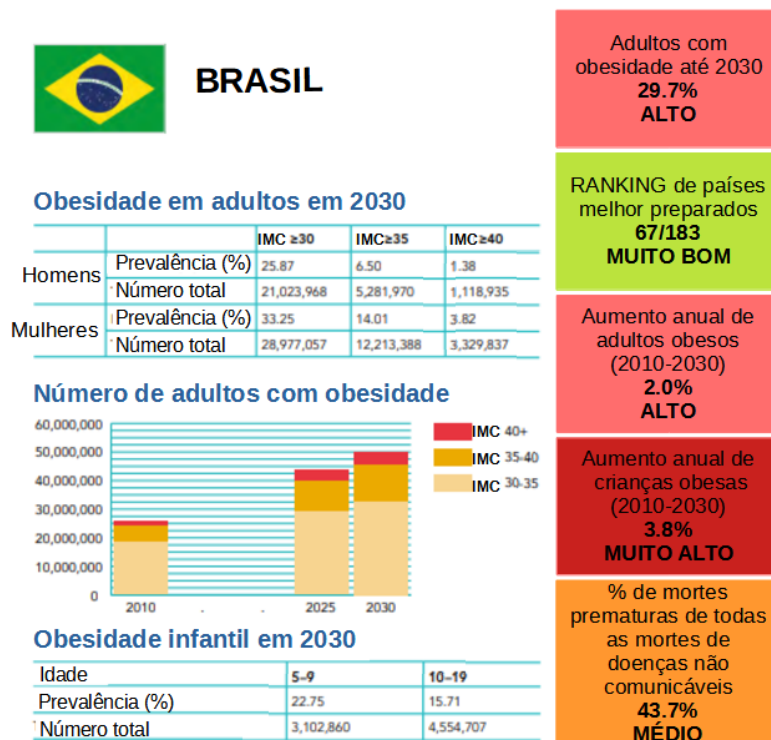
Fonte: Adaptado do Atlas mundial de obesidade, 2022.

O Brasil ocupa o 4º lugar dos 20 países com maior quantitativo de adultos obesos até 2030, perdendo para Estados Unidos, China e Índia (ATLAS MUNDIAL DE OBESIDADE, 2022). Similarmente à tendência mundial, a população brasileira obesa aumentou cerca de 72% desde 2006 até 2019 (ABESO, 2019). De acordo com a estimativa para 2030, cerca de 21 milhões de homens e 29 milhões de mulheres brasileiros serão inclusos no perfil de obesidade.

Neste cenário, a população de obesos brasileiros na classe III, estágio mais severo de obesidade, corresponderia a 1,38% da população masculina e 3,82% da população feminina. Contabilizando os casos desde 2010 até 2030, a taxa anual do crescimento em número de pessoas com obesidade no Brasil é de 2%, o que é considerado um valor alto pela Colaboração do fator de risco de doenças não-comunicáveis (NCD Risk Factor Collaboration). Esta acelerada disseminação da doença é de fato alarmante, já que cerca de 43,7% do total de mortes prematuras provocadas por doenças não-comunicáveis estão associadas à obesidade (ATLAS MUNDIAL DE OBESIDADE, 2022).

Outro fato de grande relevância para esta problemática é o número de crianças e adolescentes brasileiros de 5 a 19 anos que entrarão para a classificação de obesidade. A taxa anual de crescimento da população obesa infantil desde 2010 até 2030 é de 3,8%, valor avaliado como muito alto. Baseado no total de crianças de 5 a 9 anos e adolescentes de 10 a 19 anos, o percentual de jovens obesos será de, respectivamente, 22,75% e 15,71% até 2030; correspondente a 7,7 milhões de brasileiros (ATLAS MUNDIAL DE OBESIDADE, 2022). Este conjunto de dados pode ser observado na figura 4, disposta abaixo.

Figura 4 – Dados epidemiológicos de obesidade entre adultos e crianças brasileiros até 2030



Fonte: Adaptado do Atlas mundial de obesidade, 2022.

Adicionalmente, segundo os dados obtidos em 2021 pela VIGITEL, o percentual de pessoas com excesso de peso nas 27 capitais brasileiras é de 57,2%, sendo 59,9% de homens e

55% de mulheres. A pesquisa demonstrou que a frequência de indivíduos com excesso de peso aumenta com o decorrer da idade, desde 18 até 54 anos; e que quanto maior o grau de escolaridade dos participantes desta categoria, menor a frequência de pessoas acima do peso ideal (VIGITEL, 2021). Estes dados são disponibilizados na tabela 2.

Tabela 2 – Associação entre o grau de escolaridade e o excesso de peso entre adultos nas 27 capitais brasileiras

Percentual\* de indivíduos com excesso de peso (IMC  $\geq 25$  kg/m<sup>2</sup>) no conjunto da população adulta ( $\geq 18$  anos) das capitais dos estados brasileiros e do Distrito Federal, por sexo, segundo idade e anos de escolaridade. Vigitel, 2021

Variáveis	Sexo					
	Total		Masculino		Feminino	
	%	IC 95%	%	IC 95%	%	IC 95%
<b>Idade (anos)</b>						
18 a 24	35,7	31,5 - 40,0	39,3	33,6 - 45,0	31,7	25,5 - 37,9
25 a 34	54,4	50,4 - 58,5	63,4	57,7 - 69,1	46,6	41,1 - 52,0
35 a 44	62,4	59,0 - 65,8	62,9	57,3 - 68,6	61,9	57,7 - 66,1
45 a 54	64,4	61,5 - 67,2	67,2	62,6 - 71,9	61,9	58,5 - 65,3
55 a 64	64,1	61,4 - 66,7	61,9	57,2 - 66,7	65,7	62,7 - 68,6
65 e mais	60,7	58,8 - 62,6	60,7	57,2 - 64,2	60,7	58,6 - 62,9
<b>Anos de escolaridade</b>						
0 a 8	63,3	60,7 - 66,0	61,9	57,6 - 66,2	64,6	61,3 - 67,9
9 a 11	56,0	53,6 - 58,5	57,1	53,4 - 60,9	55,0	51,8 - 58,2
12 e mais	53,8	51,2 - 56,5	61,8	57,9 - 65,6	47,8	44,2 - 51,5
<b>Total</b>	<b>57,2</b>	<b>55,7 - 58,8</b>	<b>59,9</b>	<b>57,6 - 62,2</b>	<b>55,0</b>	<b>53,0 - 57,0</b>

\*Percentual ponderado para ajustar a distribuição sociodemográfica da amostra Vigitel à distribuição da população adulta de cada cidade projetada para o ano de 2021 (ver Aspectos Metodológicos).  
Nota: IC = Intervalo de Confiança.

Fonte: Adaptado de VIGITEL, 2021.

Similarmente aos dados relativos ao sobrepeso, o desenvolvimento da obesidade é crescente até 64 anos, e é inversamente correlacionado à escolaridade entre as mulheres avaliadas. Entre os homens, ocorre uma tendência de redução da frequência de obesidade conforme o maior número de anos de estudo (VIGITEL, 2021). Estes dados podem ser observados na tabela 3 e nos gráficos 1 e 2 abaixo.

Tabela 3 - Associação entre o grau de escolaridade e a obesidade entre adultos nas 27 capitais brasileiras

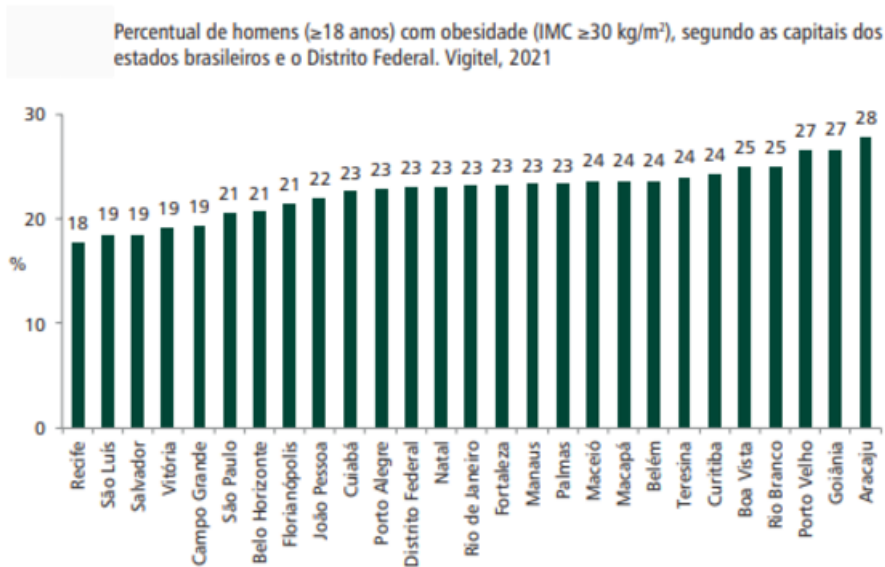
Percentual\* de indivíduos com obesidade (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) no conjunto da população adulta ( $\geq 18$  anos) das capitais dos estados brasileiros e do Distrito Federal, por sexo, segundo idade e anos de escolaridade. Vigitel, 2021

Variáveis	Sexo					
	Total		Masculino		Feminino	
	%	IC 95%	%	IC 95%	%	IC 95%
<b>Idade (anos)</b>						
18 a 24	12,2	9,2 - 15,3	13,1	9,3 - 17,0	11,2	6,4 - 16,0
25 a 34	20,8	17,4 - 24,1	25,5	19,9 - 31,1	16,6	12,8 - 20,4
35 a 44	25,5	22,5 - 28,4	25,1	20,7 - 29,6	25,7	21,9 - 29,5
45 a 54	26,2	23,7 - 28,8	24,3	20,3 - 28,3	27,9	24,7 - 31,2
55 a 64	26,2	23,8 - 28,7	22,1	18,3 - 26,0	29,3	26,2 - 32,5
65 e mais	21,8	20,2 - 23,4	16,8	14,1 - 19,5	25,3	23,4 - 27,2
<b>Anos de escolaridade</b>						
0 a 8	25,8	23,4 - 28,3	23,2	19,2 - 27,3	28,2	25,3 - 31,0
9 a 11	22,8	20,8 - 24,8	22,2	19,2 - 25,2	23,4	20,8 - 26,0
12 e mais	19,0	17,0 - 21,1	20,8	17,4 - 24,2	17,7	15,2 - 20,3
<b>Total</b>	<b>22,4</b>	<b>21,1 - 23,6</b>	<b>22,0</b>	<b>20,0 - 24,0</b>	<b>22,6</b>	<b>21,1 - 24,2</b>

\*Percentual ponderado para ajustar a distribuição sociodemográfica da amostra Vigitel à distribuição da população adulta de cada cidade projetada para o ano de 2021 (ver Aspectos Metodológicos).  
Nota: IC = Intervalo de Confiança.

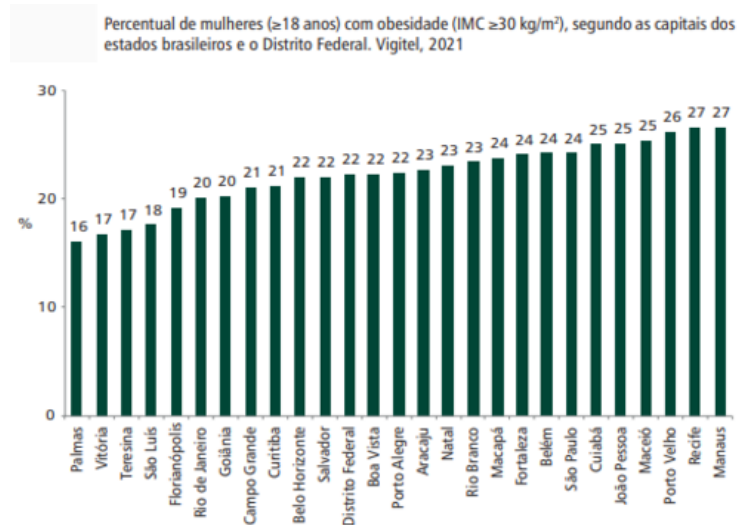
Fonte: Adaptado de VIGITEL, 2021.

Gráfico 1 – Percentual de homens com obesidade nas 27 capitais brasileiras



Fonte: Adaptado de VIGITEL, 2021.

Gráfico 2 – Percentual de mulheres com obesidade nas 27 capitais brasileiras



Fonte: Adaptado de VIGITEL, 2021.

Condições socio-econômicas como grau de escolaridade e a renda são fatores determinantes para o estabelecimento da obesidade. Em um levantamento bibliográfico de estudos conduzidos em países desenvolvidos e em desenvolvimento desde 1990 até 2015, Newton e colaboradores observaram uma consistente associação entre a obesidade e o menor status socio-econômico em mulheres, tanto através da correlação com o IMC quanto com a CA (NEWTON; BRAITHWAITE; AKINYEMIJU, 2017).

De todo modo, os dados a nível mundial revelam a real consequência do incisivo crescimento da população obesa sobre a piora da qualidade de vida quanto dos custos necessários para arcar com a sobrecarga dos sistemas de saúde. O impacto econômico do sobrepeso e da obesidade em 2019 foram estimados em 2,19% do produto interno bruto global. De acordo com a tendência de aumento da obesidade e sobrepeso até 2060, é estimado que o impacto econômico aumente para 3,29% do produto interno bruto global (OKUNOGBE *et al.*, 2022).

Em 2019, o Brasil apresentou um impacto econômico de 39 bilhões de dólares, cerca de 2,11% do PIB devido ao desenvolvimento do sobrepeso e obesidade. Em 2060, o impacto econômico deste distúrbio no Brasil será de 181 bilhões de dólares, valor correspondente a 4,54% do PIB (ATLAS MUNDIAL DE OBESIDADE, 2022).



### **Etiologia da obesidade:**

Quando se pensa na origem da obesidade, imediatamente vem ao pensamento a composição da dieta e a quantidade de alimentos ingeridos por uma pessoa obesa. De fato, o ganho de peso provém de um desbalanço entre a maior quantidade de energia obtida através dos alimentos e o reduzido gasto calórico. O saldo final destes dois fatores é uma grande quantidade de energia em excesso que passa a ser estocada sob a forma de triglicerídeos no interior de adipócitos. Este evento é um dos principais responsáveis pela expansão patológica do tecido adiposo branco nos indivíduos com obesidade (BLÜHER, 2019).

Outro fato importante é que esse excesso de energia não deriva apenas da ingestão de um grande volume de alimentos, mas especialmente ao tipo de alimentação usualmente consumida por pessoas com obesidade. Nesse contexto, as sociedades modernas aderiram a chamada “Dieta Ocidental”, que é caracterizada pelo consumo de alimentos com alta densidade energética como os carboidratos e lipídios (ROGERO; CALDER, 2018). Adicionalmente, o perfil de ácidos graxos que constituem essa dieta contribui para o desenvolvimento da obesidade. Os ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega 6 (PUFA  $\omega 6$ ) e ômega 3 (PUFA  $\omega 3$ ) são essenciais para a dieta de mamíferos, mas devem obedecer a uma proporção  $\omega 6/\omega 3$  equilibrada para a manutenção de uma resposta anti-inflamatória. (SIMPOULOS; DICOLANTONIO, 2016).

Estudos antropológicos demonstraram que a razão da ingestão de  $\omega 6/\omega 3$  na era paleolítica era de aproximadamente 1:1, por conta da presença de frutos do mar e vegetais na dieta. Após a revolução industrial, com o advento dos alimentos ultraprocessados, essa razão passou a ser de 10:1 (ROGERO; CALDER, 2018). Quanto maior o valor de  $\omega 6/\omega 3$ , maior a adiposidade, CA e maior risco de desenvolver síndrome metabólica (TORRES-CASTILLO *et al.*, 2017; NEGI *et al.*, 2022). O fato de serem alimentos de baixo custo, de fácil ou nenhum preparo e com paladar atrativo explicam a sua alta disseminação e impacto sobre a obesidade (MONTEIRO *et al.*, 2013; BLÜHER, 2019).

O baixo gasto energético é justificado pela tendência cada vez maior do perfil sedentário mundialmente. Segundo a OMS, 1 em cada 4 adultos e 81% dos adolescentes não praticam atividade física o suficiente, e, conforme o avanço econômico dos países, os níveis de inatividade podem chegar a 70% por conta do aumento do uso de tecnologias no trabalho e nos lares, e mudanças comportamentais (OMS, 2016). Dados da VIGITEL de 2021 mostram que no Brasil, na avaliação da população adulta das 27 capitais brasileiras, 48,2% não alcançaram

o nível suficiente de prática de atividade física. Similarmente a obesidade, o perfil de inatividade reduz conforme o aumento da escolaridade em mulheres (VIGITEL, 2021).

Apesar do estilo de vida influenciar fortemente o desenvolvimento da obesidade, a alimentação e os exercícios não são os únicos responsáveis pelo ganho de peso, como é amplamente difundido no conhecimento popular. Como uma doença multifatorial, o histórico familiar, polimorfismos, alterações hormonais e a mudança de microbiota intestinal são fatores adicionais (LIN; LI, 2021). Um trabalho conduzido por Romero-Ibarguengoitia e colaboradores (2018), através de modelagem de equações estruturais, observou que o histórico familiar é um grande preditor da ocorrência obesidade, efeito associado a anormalidades metabólicas envolvendo acilcarnitinas e aminoácidos (ROMERO-IBARGUENGOITIA *et al.*, 2018).

Alterações genéticas como o surgimento de polimorfismos em genes chave para a regulação do tecido adiposo e metabolismo energético também já foram descritos como agentes promotores de obesidade (GOODARZI, 2017). Exemplos destas variações genéticas são descritas no gene ADIPOQ, (LU *et al.*, 2014), FTO (gene associado a obesidade e massa gorda), LEPR (gene do receptor de leptina) (ALI *et al.*, 2019), PLIN6 (TOKGOZ *et al.*, 2017), UCP2 (BRONDONI *et al.*, 2014), PPAR- $\gamma$  (YAO *et al.*, 2015) e APOE\* $\epsilon$ 2 (GALAL *et al.*, 2020).

A obesidade pode ter origem em alterações hormonais promovidas ou não por distúrbios ou síndromes endócrinas. O hipotireoidismo, Síndrome de Cushing (produção elevada de cortisol), Síndrome do ovário Policístico e a menopausa são condições que favorecem a doença (PODDAR; CHETTY; CHETTY, 2017; JOHEM; PALOBA; HART, 2016; KO; KIM, 2020). Além disso, a programação metabólica ou a plasticidade fenotípica tem impacto relevante sobre o desenvolvimento da doença (MAROUSEZ; LESAGE; EBERLÉ, 2019).

A composição da microbiota intestinal tem uma participação significativa na promoção da inflamação associada à obesidade e no ganho de peso. A disbiose e alteração da integridade da barreira intestinal é melhor caracterizada em modelos animais de roedores alimentados com dieta obesogênica (MOREIRA-JÚNIOR *et al.*, 2021; PEI-SHENG *et al.*, 2018). Apesar da variação entre determinados gêneros de bactérias encontrados na microbiota de camundongos e humanos obesos, alguns grupos de microorganismos são comuns aos dois modelos. A razão dos filos *Firmicutes/Bacteroidetes* apresenta uma correlação positiva com o IMC em humanos (KOLIADA *et al.*, 2017). Adicionalmente, revisões sistemáticas sobre as diferenças da constituição de microbiota intestinal de pacientes obesos e eutróficos mostraram um aumento da frequência de bactérias *Firmicutes* e *Proteobacteria*, que estão associadas a piora do quadro inflamatório; e redução das bactérias *Bacteroidetes*, *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus paracasei* e *Bifidobacterium spp*; microorganismos que contribuem com a melhora metabólica

e perda de peso (CROVERSY; MASTERSON; ROSADO, 2020; AMABEBE *et al.*, 2020; DU *et al.*, 2021).

Desta forma, devido aos altos custos e doenças associadas, o ganho de peso muitas vezes é combatido com o objetivo de combater a doença através da reeducação alimentar, prática de exercícios e, em alguns casos, intervenções cirúrgicas (cirurgia bariátrica) e farmacológicas (WEICHERT; HOLZAPFEL, 2022).

### **Alterações promovidas pela obesidade no tecido adiposo:**

O tecido adiposo é um tecido conjuntivo especializado e, por muito tempo, foi visto apenas como um tecido reservatório de energia sob a forma de triglicerídeos no interior dos adipócitos. Hoje em dia, sabe-se que o tecido adiposo desempenha não só a função de armazenamento e suporte energético, mas também de isolamento térmico, geração de calor, amortecimento de impactos mecânicos sobre as articulações, solas de pés e palmas das mãos; e produção de hormônios (ZWICK *et al.*, 2019, VADDE; GUPTA; NAGARAJU, 2019). Este tecido é formado por adipócitos, pré-adipócitos, pericitos, macrófagos, linfócitos T reguladores, células-tronco mesenquimais, progenitores e células endoteliais; células musculares lisas, entre outras células (BORA; MAJUMDAR, 2017).

Existem duas classificações quanto a constituição do tecido adiposo: o tecido adiposo branco (TAB) e o tecido adiposo marrom (TAM), cujos adipócitos são formados por precursores diferentes. O TAB é formado por adipócitos brancos, que possuem uma gotícula de gordura em seu interior, núcleo achatado e deslocado além de poucas mitocôndrias. O TAB é o tipo de tecido adiposo especializado no armazenamento de energia, com atividade endócrina e mecânica; e que pode ser encontrado em depósitos subcutâneos (infra e supra-abdominais, gluteofemorais) e viscerais (omental, mesentérico, retroperitoneal, gonadal e pericardial) (CHENG *et al.*, 2021, ZWICK *et al.*, 2019). Já o TAM é formado por adipócitos marrons que são multiloculares, com alta expressão de proteína desacopladora 1 (UCP1) e numerosas mitocôndrias. Devido a esta composição dos adipócitos marrons, o TAM é especializado na conversão de energia para geração de calor e é encontrado em depósitos supraclaviculares e axilares (CHENG *et al.*, 2021).

Durante a obesidade, comparado ao TAB, o TAM é menos suscetível para desenvolver uma resposta inflamatória. Porém, os quadros de obesidade severa podem alterar a atividade termogênica do TAM. Ao mesmo tempo, a obesidade interfere na capacidade do TAB de ganhar

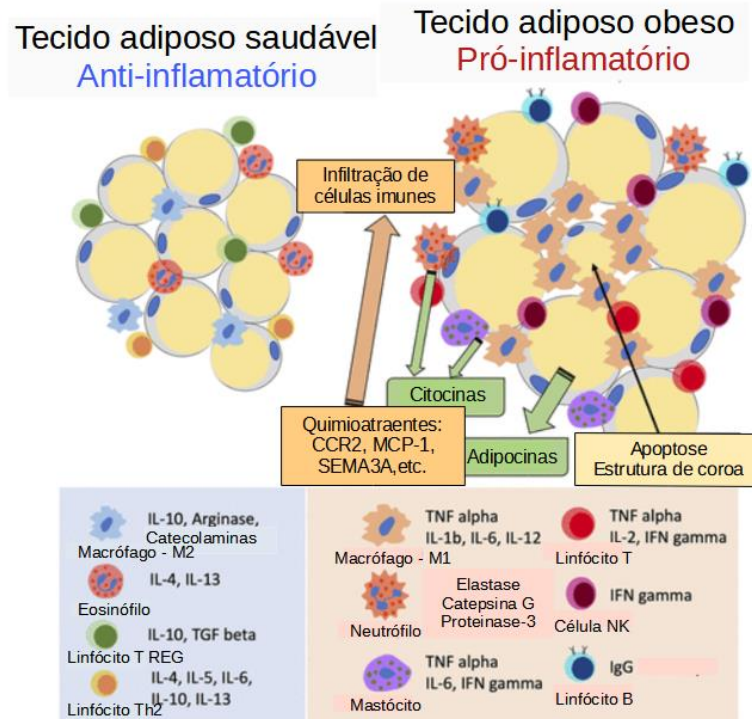
características do TAM, processo denominado de “Browning” que auxilia no gasto de energia e consequente emagrecimento (VILLAROYA *et al.*, 2020).

Já no TAB, a obesidade apresenta efeitos mais contundentes. O TAB, em indivíduos eutróficos, apresenta adipócitos com um volume de gordura condizente a um estado fisiológico. Além disso, o tecido apresenta vasos sanguíneos que suprem a necessidade de nutrientes e oxigênio para todas as células. As células imunes presentes no tecido adiposo saudável, que são macrófagos com perfil M2, linfócitos T reguladores, eosinófilos e linfócitos T auxiliares tipo 2 (TH2), garantem a predominância da resposta anti-inflamatória. Os fatores secretados por esse tecido como IL-4, IL-10, IL-5, IL-13 e adiponectina auxiliam para a manutenção deste perfil e também para a responsividade do tecido à insulina (DENG *et al.*, 2016).

Porém com o desenvolvimento da obesidade e a sobrecarga crônica de nutrientes, os adipócitos do TAB passam por hipertrofia e hiperplasia para serem capazes de compensar o excesso de energia. Essa reprogramação dos adipócitos implica em uma condição de estresse que eleva a expressão de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6, leptina, resistina e da proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1), caracterizando a instalação da inflamação crônica de baixo grau (LONGO *et al.*, 2019). Concomitante à expansão patológica do tecido, o processo da angiogênese é diminuído resultando em uma quantidade insuficiente de aporte sanguíneo que leva à hipóxia e morte de adipócitos. A presença de padrões associados ao dano bem como de quimiocinas, atraem um grande quantitativo de macrófagos polarizados em perfil M1, que se depositam ao redor de adipócitos necróticos, formando as chamadas “estruturas em forma de coroa” (KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021).

Estima-se que cerca de 40% do volume de tecido adiposo em condição de obesidade seja de macrófagos (WEISBERG *et al.*, 2003). Estes macrófagos juntamente a neutrófilos, linfócitos TCD8+, células *natural-killer*, células dendríticas, linfócitos T auxiliares Tipo 1 (TH1) infiltrados no tecido colaboram com a exacerbação da inflamação no tecido adiposo e consequente disseminação de mediadores pró-inflamatórios sistemicamente. O TAB obeso é caracterizado também pela presença de fibrose, disfunção mitocondrial e secreção alterada de adipocinas (UNAMUNO *et al.*, 2018). As alterações provocadas pela obesidade no TAB são ilustradas na figura 5.

Figura 5 – Expansão patológica do tecido adiposo obeso



Fonte: Adaptado de KAWAI; AUTIERI; SCALIA, 2021.

Em indivíduos obesos, o TAB aumenta a expressão e liberação de leptina e resistina que promovem o aumento da lipólise dos adipócitos e do quadro inflamatório além de induzir resistência à insulina no tecido. Ao mesmo tempo, ocorre a redução na produção de Adiponectina pelo TAB, um hormônio anti-inflamatório, anti-aterosclerótico que estimula a sensibilidade à insulina, a  $\beta$ -Oxidação de ácidos graxos no músculo esquelético e redução da gliconeogênese no fígado (FUNCKE; SCHERER, 2019). Além da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 e IL-1 $\beta$ , pelo TAB obeso, caracteriza-se também a secreção elevada de TGF- $\beta$ , fator também associado à resistência à insulina, fibrose do tecido adiposo, inflamação e transição epitélio-mesênquima em alguns tipos de células tumorais (FUNCKE; SCHERER, 2019); KATSUNO; DERYNCK, 2021).

Os danos promovidos pela obesidade não se limitam às disfunções no tecido adiposo. Uma vez que os mediadores secretados pelo tecido adiposo obeso difundem-se pela corrente sanguínea, diferentes órgãos e tecidos são afetados pelos mesmos. Os sítios com o maior número de estudos que comprovam o impacto deletério promovido pela obesidade são o sistema nervoso central, o músculo esquelético, o fígado, o pâncreas, o coração e os vasos sanguíneos (KARCZEWSK *et al.*, 2018).

O efeito destes mediadores pró-inflamatórios e demais alterações promovidas pela obesidade sobre o remodelamento ósseo é um tema alvo de muitas discussões. Ao mesmo tempo que a inflamação associada à obesidade induz o aumento da perda óssea, o aumento do impacto mecânico promovido pelo ganho de peso poderia ser um fator osteoprotetor (GKASTARIS *et al.*, 2020). Os diversos mecanismos envolvidos no *crosstalk* entre o tecido adiposo obeso e o tecido ósseo são detalhados a seguir.

### **O Tecido ósseo:**

O tecido ósseo por definição é um tecido conjuntivo especializado cuja matriz extracelular encontra-se mineralizada. Juntamente às cartilagens, os ossos formam o sistema esquelético dos mamíferos (SABATER GONZÁLEZ, 2019). Apesar da errônea ideia de que o tecido ósseo é um tecido inerte, os ossos desempenham muitas funções como a estruturação física corporal; locomoção em conjunto com a musculatura esquelética; armazenamento de minerais como o cálcio, fosfato e magnésio e o estoque de gordura; suporte para a hematopoiese e proteção de órgãos, como o coração, os pulmões, medula espinhal e encéfalo (MANZINI *et al.*, 2021).

Além das clássicas funções atribuídas ao tecido ósseo, este tecido apresenta atividade endócrina sendo responsável pela liberação de hormônios como a osteocalcina não-carboxilada (UnOC), o FGF-23 e a lipocalina 2 que têm ações em vários órgãos (KARSENTY; MERA, 2018). A Lipocalina 2 induz a saciedade, reduz a massa gorda e melhora o metabolismo da glicose (MOSIALOU *et al.*, 2019), o FGF23 tem ação sobre os túbulos renais reduzindo a reabsorção de fosfato no filtrado glomerular, enquanto a UnOC promove a melhora da função cognitiva, aumenta a produção de testosterona pelas células de Leydig, estimula a secreção de insulina, melhora a sensibilidade à insulina no tecido adiposo branco, eleva a captação de nutrientes e catabolismo pelo músculo esquelético (KARSENTY; MERA, 2018) e promove a perda de peso em modelos de obesidade induzida por dieta (MIZOKAMI; KAWAKUBO; HIRATA, 2017). Devido a todas essas importantes atividades desempenhadas pelos ossos, a manutenção de seu estado saudável e funcional é fundamental para a homeostase (WALLACE *et al.*, 2010).

O tecido ósseo é formado por muitos tipos celulares: o osteoblasto, o osteócito, a célula osteoprogenitora e a *bone lining cell*, e o osteoclasto; sendo as quatro primeiras de origem mesenquimal e a última de origem hematopoiética. Seguindo a ordem de estágio de

diferenciação, as células osteoprogenitoras são derivadas de células-tronco mesenquimais e estão na etapa inicial de comprometimento; além disso, possuem maior capacidade proliferativa, mas não têm atividade de síntese de matriz (LOPES *et al.*, 2018).

Já os osteoblastos, originados a partir das células osteoprogenitoras, são responsáveis pela produção dos elementos da matriz extracelular óssea orgânica e pela posterior calcificação da mesma. São células encontradas ao longo da superfície óssea e representam de 4 a 6% das células que formam o osso. Devido à intensa atividade de síntese proteica, apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi proeminentes. As *Bone lining cells* são osteoblastos mais achatados e com baixa atividade que recobrem a superfície óssea e impedem que os osteoclastos reabsorvam a matriz (FLORÊNCIO-SILVA *et al.*, 2015). Diferentemente das células osteoprogenitoras, são células mais amadurecidas e, conseqüentemente, com menor capacidade proliferativa.

Após a deposição de matriz extracelular óssea, alguns osteoblastos são totalmente envolvidos por esta matriz calcificada e tornam-se os osteócitos. Os osteócitos são as células mais abundantes no osso contabilizando de 90 a 95% das células totais, além de possuírem uma sobrevivência de aproximadamente 25 anos (FLORÊNCIO-SILVA *et al.*, 2015). Estas células são encontradas dentro de lacunas na matriz extracelular óssea e perdem a elevada capacidade de síntese proteica presente nos osteoblastos. Ao mesmo tempo, desenvolvem a habilidade de reconhecer os impactos mecânicos aplicados sobre o osso através de mecanorreceptores. Os osteócitos possuem uma morfologia dendrítica e seus prolongamentos comunicam-se com os prolongamentos de outros osteócitos. Cada lacuna se conecta com outra a partir dos canalículos, onde os prolongamentos dessas células ficam abrigados. É a partir dessa rede de comunicação que os osteócitos difundem os nutrientes vindos dos vasos sanguíneos para as demais células, já que a matriz calcificada reduz esta difusão. Apesar dos mecanismos envolvidos neste processo não serem muito bem elucidados, os osteócitos convertem os estímulos mecânicos que recebem em sinais bioquímicos, caracterizando o efeito Piezoelétrico (KATSIMBRI, 2017). Por conta disso, a aplicação de forças mecânicas sobre o tecido ósseo é essencial para a formação e renovação óssea. Desta maneira, o osteócito orchestra a ativação e inibição das outras células presentes no tecido ósseo pela liberação de fatores de crescimento e outras proteínas (FLORÊNCIO-SILVA *et al.*, 2015).

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da fusão de monócitos/macrófagos que são especializadas na reabsorção da matriz extracelular óssea. Estas células são diferenciadas a partir dos fatores M-CSF e RANKL, que são produzidos por osteoblastos, osteócitos e células estromais. Enquanto o M-CSF, no início da diferenciação, promove a

proliferação e sobrevivência dos precursores, o RANKL induz a expressão do fator transcricional NFATc1, regulador mestre da diferenciação osteoclastogênica. A partir da ativação deste fator transcricional, são expressos genes-chave para a diferenciação como DC-STAMP e OSCAR, que medeiam a fusão celular entre os precursores; e Catepsina K, Fosfatase ácida resistente ao Tartarato (TRAP) e metaloprotease 9 (MMP-9), enzimas que promovem a reabsorção óssea. A proteína osteoprotegerina (OPG) também produzida por osteoblastos inibe a ação de RANKL, regulando negativamente a diferenciação de osteoclastos (GRABOWSKY, 2009).

Tão importante quanto as células que compõem este tecido é a matriz extracelular óssea. Além de proporcionar o suporte físico para a disposição das células, os componentes que formam a matriz extracelular óssea são responsáveis pelas propriedades mecânicas do tecido e afetam diretamente a diferenciação e atividades das células ósseas (GU *et al.*, 2021). A matriz extracelular óssea é dividida entre a porção orgânica, que confere as habilidades de flexibilidade e absorção de impactos, e a porção inorgânica, que garante a resistência à deformação, rigidez e força dos ossos (ALCORTA-SEVILLANO *et al.*, 2020).

Formam a porção orgânica, também denominada como osteóide, as fibras de Colágeno do Tipo I (predominantemente), glicoproteínas como a osteocalcina, osteopontina, osteonectina, fibronectina e sialoproteína óssea; proteoglicanos como a decorina, osteoaderina e biglicana, além dos fatores de crescimento IGF-1, TGF- $\beta$  e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). (FLORÊNCIO-SILVA *et al.*, 2015; MANZINI *et al.*, 2021). As fibras de Colágeno do Tipo I correspondem de 85 a 90% do conteúdo proteico da matriz extracelular óssea e são fundamentais para a organização tecidual e propriedades mecânicas. Devido a modificações pós-traducionais como as glicosilações, as fibras colágenas aumentam a sua afinidade com a hidroxiapatita, possibilitando a futura calcificação do osteóide (ALCORTA-SEVILLANO *et al.*, 2020; TERAJIMA *et al.*, 2014). As glicoproteínas produzidas pelos osteoblastos também realizam a ligação entre as fibras colágenas e os cristais de fosfato de cálcio (GRABOWSKY, 2009; NIKEL *et al.*, 2018).

É estimado que 50 a 70% da massa óssea seja determinada pelo seu conteúdo mineral. A porção inorgânica do tecido ósseo é constituída majoritariamente pelos cristais de hidroxiapatita  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ , formados pela combinação de íons cálcio e fosfato. Outros tipos de minerais também são armazenados na matriz óssea como o magnésio, carbonato, citrato, potássio e Zinco, porém em menor abundância (GRABOWSKY, 2009; FLORÊNCIO-SILVA *et al.*, 2015).

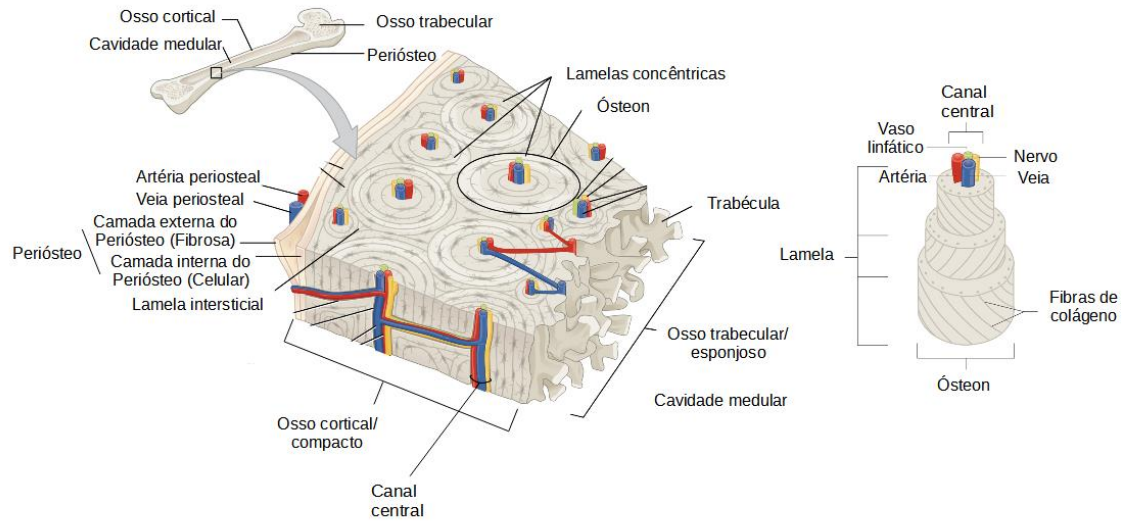


### **Estrutura e classificação dos ossos:**

Ao todo, o esqueleto de um adulto é formado por 206 ossos que podem ser classificados de acordo com a sua morfologia. Segundo o critério de formato, os ossos são divididos entre os ossos longos, como o rádio, metacarpo, tíbia e fêmur; ossos curtos, como o tarso e o carpo; ossos chatos, que são os ossos que formam o crânio, o esterno e as costelas; e os ossos irregulares são representados pelas vértebras, cóccix e o sacro (LOPES *et al.*, 2018).

A estrutura óssea é constituída por uma combinação de 2 tipos de ossos: o osso compacto ou cortical e o osso esponjoso ou trabecular. O osso compacto é tipo de osso mais denso e resistente que é formado por um conjunto de ósteons, a unidade funcional do osso. O ósteon, também denominado Sistema de Havers, é constituído por um canal central (canal de Harveys) onde passam uma artéria, uma veia, um vaso linfático e um nervo; e ao redor desse canal o osso é depositado em camadas de anéis chamadas lamelas. Diferentemente do osso compacto, o osso esponjoso é formado por uma rede de espículas ósseas, denominadas trabéculas. Esta rede de trabéculas auxilia na dispersão dos impactos aplicados sobre o osso em direção ao osso cortical, que é mais resistente. Além disso, torna o osso mais leve facilitando a movimentação e serve de abrigo para a medula óssea vermelha (WALMSLEY *et al.*, 2016, OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY). As imagens representativas da organização do osso cortical e trabecular são dispostas abaixo nas figuras 6 e 7, respectivamente.

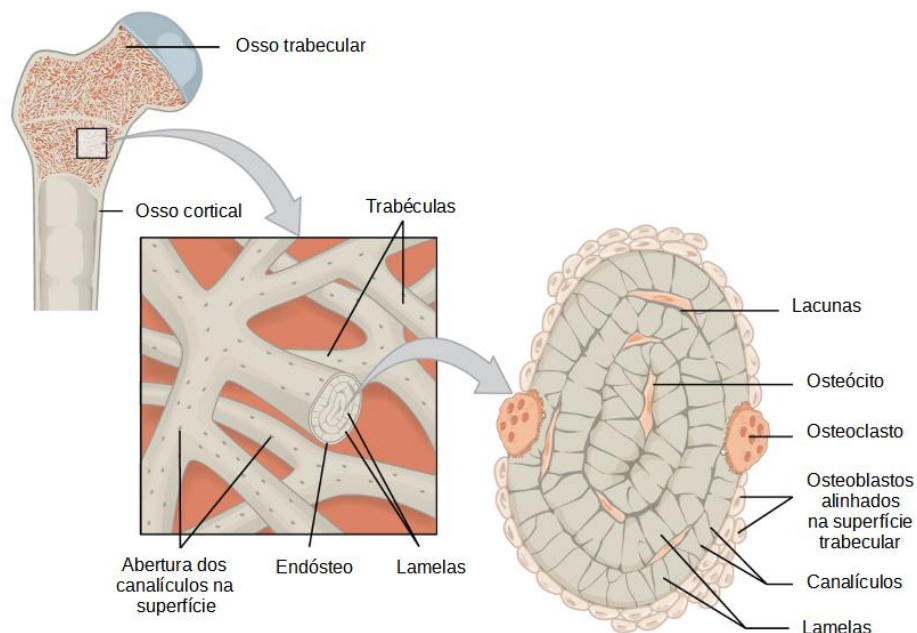
Figura 6 – Organização do osso cortical



Fonte: Adaptado de Oregon State Education.

Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>

Figura 7 – Organização do osso trabecular



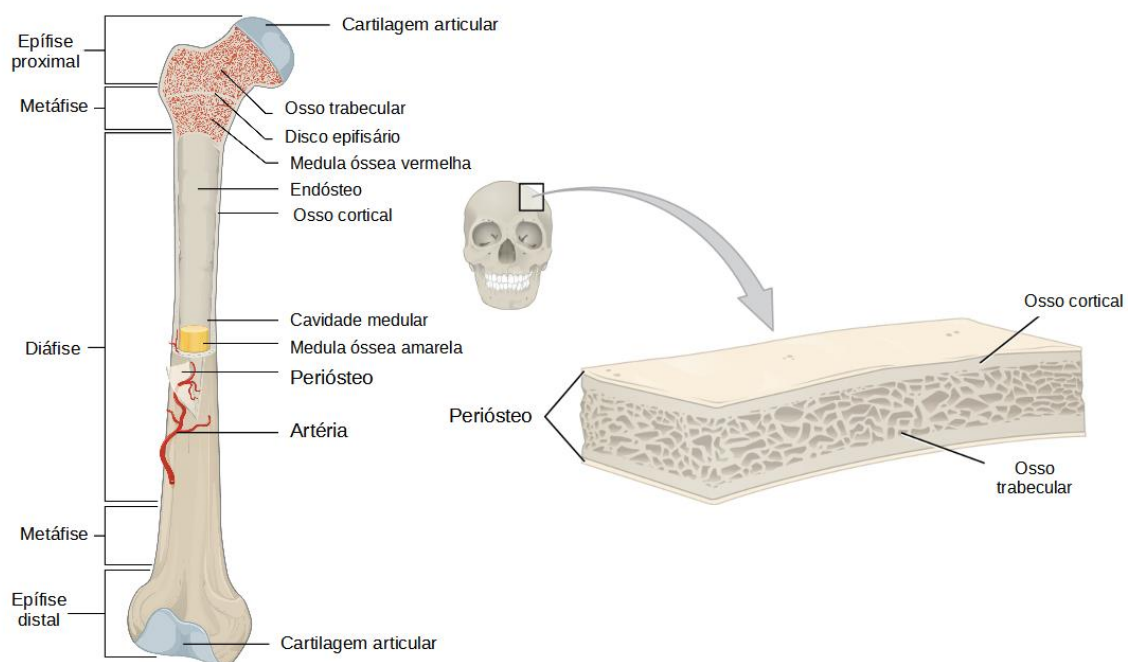
Fonte: Adaptado de Oregon State Education.

Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>

Anatomicamente, os ossos longos são divididos em três partes. A diáfise compreende a porção média do osso, que é formada por osso compacto no qual encontra-se o canal medular

preenchido pela medula óssea amarela. As epífises são as extremidades, que são preenchidas pelo osso trabecular e também são revestidas externamente pelo osso compacto (MANZINI *et al.*, 2021). Entre a diáfise e as epífises estão as metáfises. No caso dos ossos chatos, existe uma camada de osso trabecular que é intercalada por duas camadas de osso cortical (OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY). A distribuição do osso cortical e trabecular nos ossos longos e chatos é ilustrada na figura 8.

Figura 8 – Distribuição do osso cortical e trabecular nos ossos longos e chatos



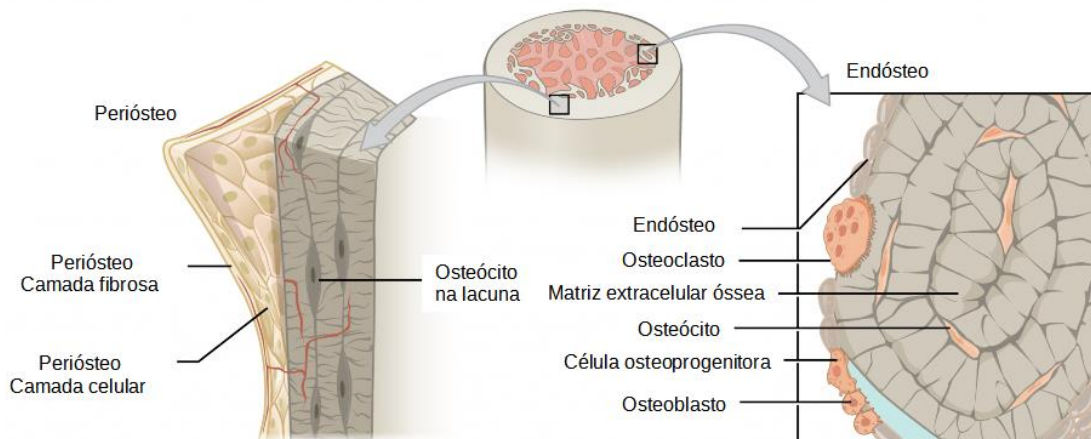
Fonte: Adaptado de Oregon State Education.

Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>

Externamente, os ossos são revestidos por uma dupla membrana chamada perióstio. É o perióstio que possui os vasos sanguíneos, linfáticos e os nervos que suprem as necessidades do tecido. A camada mais externa do perióstio é formada por tecido conjuntivo e as estruturas mencionadas anteriormente. Já a camada interna do perióstio é formada por células osteoprogenitoras que servem de fonte para novos osteoblastos. O perióstio é ancorado ao osso pelas fibras de Sharpey que são formadas de colágeno. Todos os ossos possuem perióstio em sua extensão com exceção das superfícies articulares. Internamente, os ossos são revestidos por outra membrana celular que é o endóstio. O endóstio é formado pelas células osteoprogenitoras, osteoblastos e osteoclastos, e envolve o canal medular nos ossos longos e a

superfície das trabéculas (LOPES *et al.*, 2018, OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY). Além de permitir a formação óssea, as células que formam o endóstio sustentam vias de sinalização fundamentais para a manutenção do estado quiescente de células-tronco hematopoéticas (ARAI; SUDA, 2007). O perióstio e endóstio são ilustrados na figura 9.

Figura 9 – Localização do perióstio e endóstio



Fonte: Adaptado de Oregon State Education.

Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>

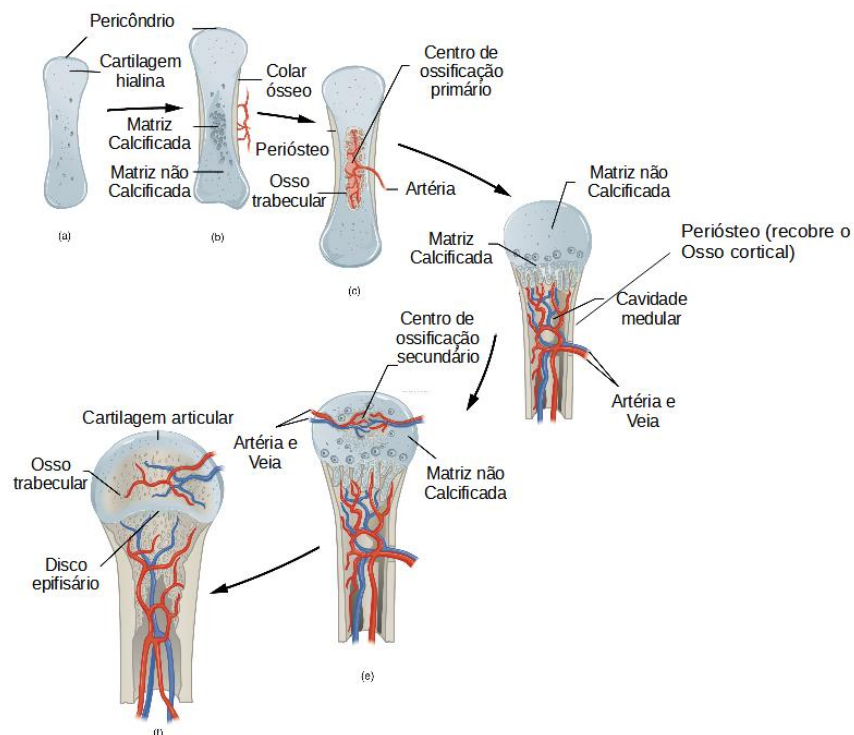
### Processos de ossificação:

Quanto à sua origem, os ossos podem ser formados a partir de 3 tipos de tecidos conjuntivos. Os ossos longos são formados a partir de estruturas modelo de cartilagem hialina, que são substituídas por tecido ósseo no processo de ossificação endocondral. Além de promover o desenvolvimento dos ossos longos na embriogênese, a ossificação endocondral permite o crescimento longitudinal destes ossos a partir do disco epifisário, um anel de cartilagem hialina encontrada na metáfise. Este processo ocorre até aproximadamente os 21 anos de idade. (LOPES *et al.*, 2018).

A ossificação endocondral é iniciada por volta da 6ª a 8ª semana de desenvolvimento embrionário, quando células mesenquimais se diferenciam em condroblastos, pela sinalização mediada por BMPs e TGF- $\beta$ , que produzem o molde cartilaginoso dos ossos (LONG; ORNITZ, 2013). Conforme a cartilagem é formada, os vasos sanguíneos presentes no pericôndrio trazem

células osteoprogenitoras e osteoblastos que se depositam ao redor da cartilagem e começam a sintetizar um colar ósseo que dará origem a diáfise. Este colar dificulta a difusão de nutrientes do pericôndrio para o centro da cartilagem, o que induz a hipertrofia dos condrócitos e liberação de fatores angiogênicos como o VEGF (ROLIAN, 2020). Após a morte dos condrócitos e formação de novos vasos que invadem o modelo cartilaginoso, células osteoprogenitoras ocupam as lacunas dos condrócitos, se diferenciam em osteoblastos e iniciam a substituição da cartilagem por matriz extracelular óssea, dando origem ao primeiro centro de ossificação. A ossificação se alastra em direção às epífises enquanto a porção central é remodelada por osteoclastos trazidos pelos vasos para a formação do canal medular. No esqueleto fetal as epífises ainda são formadas por cartilagem, após o nascimento o mesmo processo de ossificação ocorre nestas extremidades formando o segundo centro de ossificação. Ao final, toda a cartilagem é substituída com exceção do disco epifisário e da cartilagem articular na extremidade da epífise (OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY). O processo da ossificação endocondral é representado na figura 10.

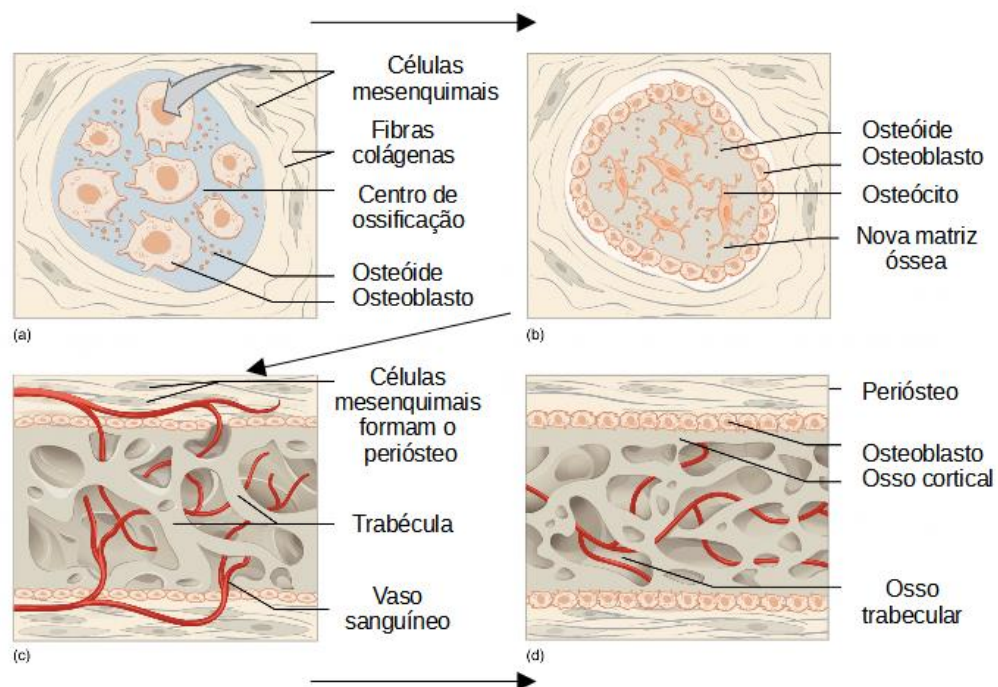
Figura 10 – As etapas da ossificação endocondral



Fonte: Adaptado de Oregon State Education. Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>

Já outros tipos de ossos como as clavículas e os ossos da face e do crânio são formados a partir de tecido conjuntivo mesenquimal que sofre a ossificação intramembranosa (RUTKOVSKIY; STENSLOKKEN; VAAGE, 2016). Células mesenquimais presentes no tecido inicial se agregam e começam a se especializar em células osteoprogenitoras, osteoblastos e células vasculares. Os osteoblastos recém-formados começam a depositar a matriz extracelular orgânica que é mineralizada ao longo do processo, formando o centro de ossificação. Os osteoblastos aprisionados na matriz dão origem aos osteócitos enquanto as células osteoprogenitoras ao redor do centro de ossificação se diferenciam nos novos osteoblastos. A matriz óssea é depositada ao redor dos vasos formando as trabéculas enquanto os osteoblastos presentes no perióstio formam a camada de osso cortical. Osteoclastos são diferenciados e auxiliam no remodelamento do novo osso (OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY). As etapas da ossificação intramembranosa são ilustradas na figura 11.

Figura 11 – As etapas da ossificação intramembranosa



Fonte: Adaptado de Oregon State Education. Disponível em: <https://open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>

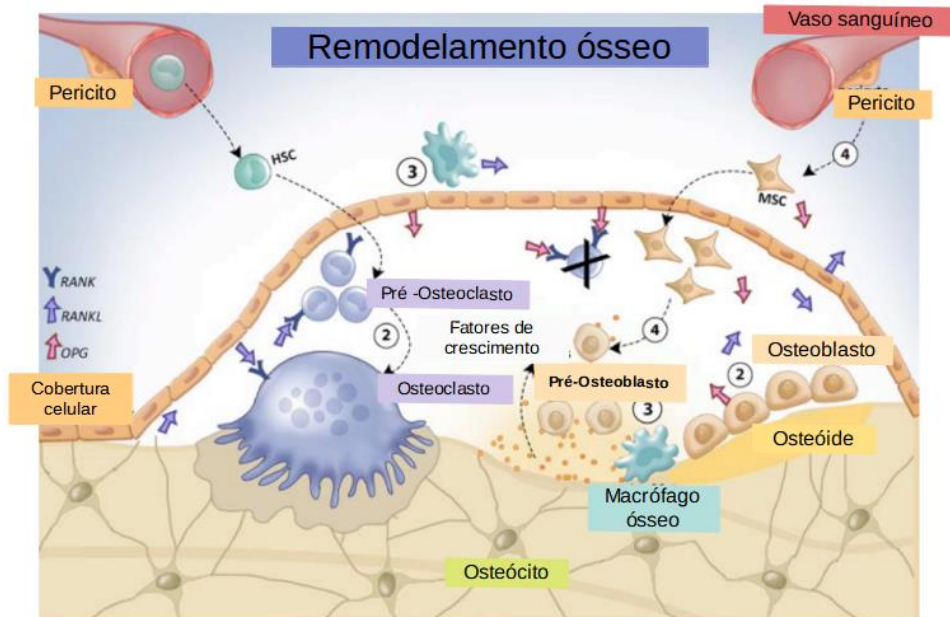
Por último, alguns poucos ossos são formados no interior de tendões como é o caso da patela, originada no tendão do quadríceps femoral; e o par de ossos sesamóides formados no tendão do músculo flexor curto do hálux (Abdala, 2019; Taylor, 2014).

## **O remodelamento ósseo:**

Diferentemente da ideia de que o tecido ósseo é um tecido estático, os ossos passam por uma constante renovação desde o momento em que são formados, caracterizando sua dinamicidade. A remoção da matriz extracelular óssea mais velha e com danos para a deposição de uma nova matriz é denominada de remodelamento ósseo. É através do remodelamento ósseo que os ossos mantêm a sua força, resistência e flexibilidade; além de garantir a homeostase mineral do organismo (MATSUMOTO *et al.*, 2016). O remodelamento ósseo é um evento bastante controlado que depende da ação conjunta de todas as células que formam o tecido ósseo. Porém, a ativação de cada uma delas ocorre em momentos diferentes, dividindo o processo em etapas. Em cada etapa existe o “protagonismo” de um determinado tipo celular, mas ao final este evento é definido pelas proporções equilibradas entre as atividades de reabsorção e formação ósseas. O remodelamento ósseo saudável renova o tecido, sem aumentar ou diminuir a massa do mesmo. Em contextos patológicos, este equilíbrio pode ser perturbado gerando a osteoporose, quando ocorre a perda de massa óssea; ou a osteopetrose, com a geração de um osso muito denso (KATSIMBRI, 2017).

As cinco etapas que constituem o remodelamento ósseo são a ativação, reabsorção, fase reversa, formação e mineralização. O resumo com todas etapas é ilustrado na figura 12.

Figura 12 – O remodelamento ósseo



Fonte: Adaptado de MATSUMOTO *et al.*, 2016.

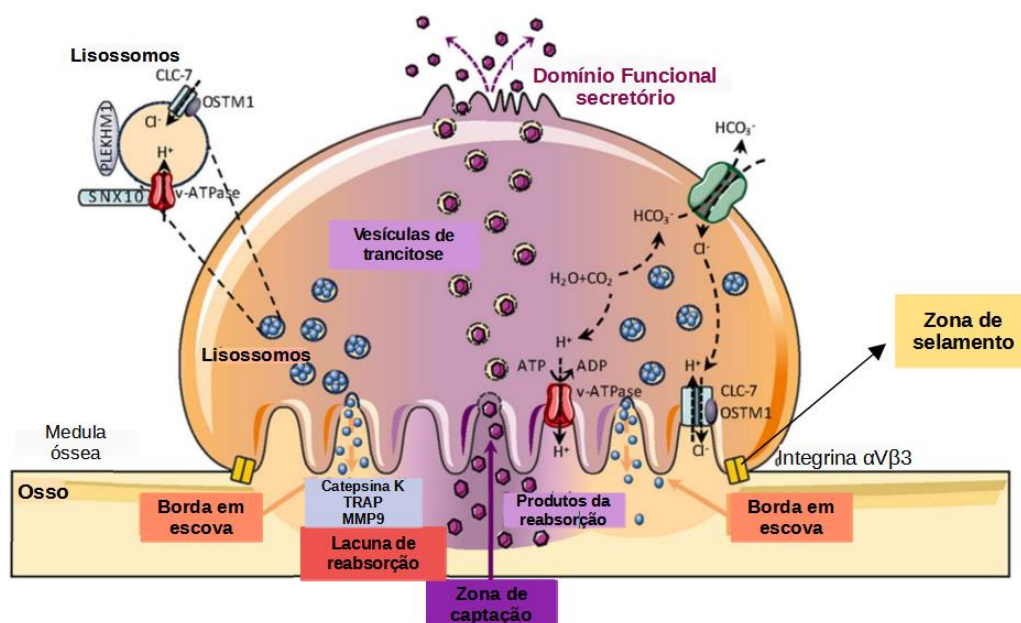
O início do remodelamento ocorre a partir de ações químicas e físicas. Na fase de ativação, os impactos mecânicos e os danos na matriz extracelular óssea são reconhecidos pelos osteócitos (CURREY; DEAN; SHAHAR, 2016). Os osteócitos induzem a retração das células osteoprogenitoras que revestem a superfície óssea, formando uma espécie de bolha onde o remodelamento ocorrerá. Essa estrutura é denominada unidade multicelular básica (BMU), uma unidade anatômica temporária. Ao mesmo tempo, precursores mononucleares de osteoclastos são recrutados da circulação para a BMU. A liberação de Paratormônio, produzido pela paratireóide, sinaliza o aumento da expressão dos fatores de diferenciação de osteoclastos RANKL e MSCF pelos osteócitos e osteoblastos. Ao mesmo tempo, os impactos físicos induzem a liberação de Esclerostina pelo osteócitos, que estimulam a reabsorção óssea e inibem a atividade de osteoblastos (KATSIMBRI, 2017).

Após a diferenciação dos osteoclastos, inicia-se a fase de reabsorção. Os osteoclastos aderem à matriz extracelular óssea e se polarizam. O osteoclasto ativado possui um domínio secretório voltado para a cavidade medular, e a zona de selamento e borda em escova, voltados para a superfície óssea. A reorganização do citoesqueleto dos osteoclastos com a formação do anel de actina filamentosa, e de outras proteínas como a vinculina, talina e paxilina, permitem a formação da zona de selamento, local de forte adesão do osteoclasto à matriz óssea. A integrina  $\alpha V\beta 3$  é a principal forma de integrina expressa pelos osteoclastos e media a adesão com a osteopontina, fibronectina e com a sialoproteína óssea. Uma vez aderido, é pela borda



em escova que os osteoclastos secretam uma grande concentração de íons  $H^+$ , através da bomba  $H^+$  ATPase vacuolar, e de íons cloreto para a matriz óssea, com o objetivo de acidificar o microambiente e desmineralizar o osso. A atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) também auxilia na descalcificação. Ao mesmo tempo, é pela borda em escova que são liberadas vesículas extracelulares contendo enzimas como a Catepsina K e MMP-9 que digerem a porção orgânica da matriz óssea (FLORÊNCIO-SILVA *et al.*, 2015). Os fragmentos de colágeno e cálcio são endocitados e liberados no domínio secretório do osteoclastos para serem captados pelos vasos sanguíneos (KATSIMBRI, 2017). A reabsorção dura em média de 2 a 4 semanas (WITTKOWSKE *et al.*, 2016). Os diferentes domínios do osteoclasto ativado são ilustrados na figura 13.

Figura 13 – A polarização de osteoclasto e a sua atividade reabsortiva



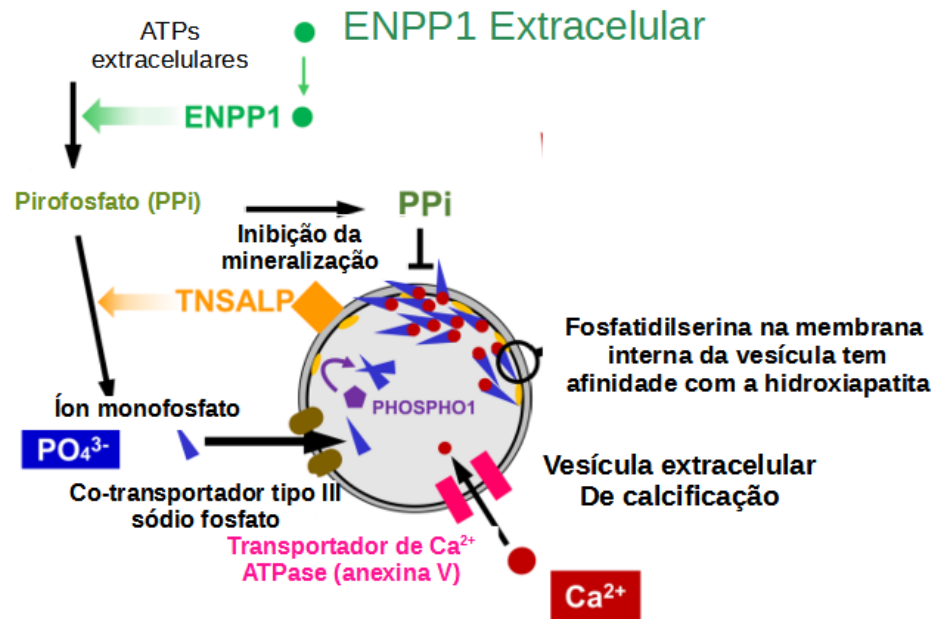
Fonte: Adaptado de MADEL *et al.*, 2019.

Após a reabsorção, ocorre a liberação de fatores de crescimento que se encontravam associados aos elementos da matriz extracelular. Os fatores  $TGF-\beta$ , IGF-1, FGF e BMPs tornam-se solúveis e começam a orquestrar a fase reversa. É nessa etapa que, por meio da ação destes fatores, os osteoclastos sofrem apoptose dando lugar aos osteoblastos (MANZINI *et al.*, 2021). Os pericitos e células osteoprogenitoras são recrutados e se diferenciam em osteoblastos maduros. Osteócitos liberam  $PGE_2$  e óxido nítrico que estimulam os osteoblastos. Ao mesmo tempo, macrófagos ósseos realizam a fagocitose dos produtos da reabsorção e dos corpos apoptóticos dos osteoclastos (MATSUMOTO *et al.*, 2016).

Os osteoblastos, na etapa de formação, produzem o osteóide ao longo de toda a extensão reabsorvida. É estimado que esta fase dure de 4 a 6 meses. Após a deposição do osteóide, os osteoblastos que foram recrutados têm três destinos: cerca de 70% das células sofrem apoptose, enquanto o restante se converte em células osteoprogenitoras que permanecem na superfície óssea ou se diferenciam em osteócitos, no caso das células que foram totalmente envolvidas pela matriz (KATSIMBRI, 2017).

Na última fase, ocorre a mineralização do osteóide. O processo de mineralização é mediado pela liberação de vesículas extracelulares pelos osteoblastos. É dentro das vesículas que é encontrado o microambiente ideal para a geração e aglomeração dos cristais de hidroxiapatita. Apesar de não muito bem elucidado, a mineralização se inicia com a ativação da enzima ecto-nucleotídeo pirofosfatase/fosfodi esterase 1 (ENPP1) presente na membrana plasmática e no citosol do osteoblasto, que gera o pirofosfato. No caso da enzima citoplasmática, o pirofosfato é exportado da célula pela proteína Ankylosis. O pirofosfato é inibidor da calcificação mas é fonte para a obtenção do monômero fosfato ( $\text{PO}_4^-$ ). As vesículas liberadas pelos osteoblastos possuem em sua membrana a fosfatase alcalina, que cliva o pirofosfato em ( $\text{PO}_4^-$ ). Ao mesmo tempo, na vesícula de mineralização é encontrado um canal de cálcio, pelo qual ocorre a entrada do íon na vesícula. Após a entrada do ( $\text{PO}_4^-$ ) na vesícula, pelo co-transportador III de sódio/fosfato, o cálcio e o ( $\text{PO}_4^-$ ) interagem e formam a hidroxiapatita. A membrana interna da vesícula é enriquecida com fosfatidilserina, que possui grande afinidade pelo cálcio. Por conta disso, é gerado um complexo estável formado pelo cálcio, fosfato e fosfatidilserina na membrana interna da vesícula. Conforme a maior entrada de íons, a vesícula é preenchida pelos cristais de hidroxiapatita, até o ponto que estes cristais se expandem além da membrana vesicular, formando os nódulos de mineralização. Estes nódulos se depositam sobre as fibras colágenas ósseas, especialmente nos sítios glicosilados, possibilitando a mineralização do osteóide (HASEGAWA, 2018). Na figura 14, é ilustrado o mecanismo de formação da hidroxiapatita nas vesículas extracelulares de osteoblastos.

Figura 14 – A mineralização da matriz extracelular óssea pelas vesículas extracelulares de osteoblasto



Fonte: Adaptado de HASEGAWA, 2018.

### A diferenciação osteogênica:

Os osteoblastos diferenciam-se a partir de células-tronco mesenquimais. Estas células são definidas pela capacidade de autorrenovação e pela habilidade de se diferenciar em diferentes tipos celulares como osteoblastos, condroblastos, adipócitos e miócitos. Estas células podem ser encontradas no tecido adiposo, polpa dentária, endométrio, cordão umbilical e na medula óssea (MISHRA *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2020).

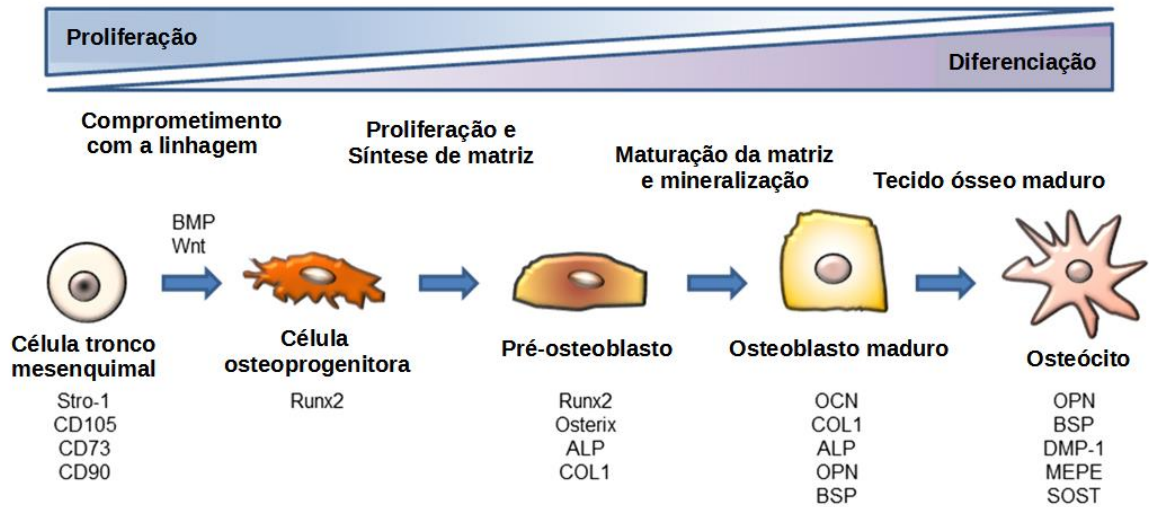
Durante a diferenciação osteogênica, as células-tronco mesenquimais são ativadas por proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs). A interação desses ligantes com seu receptor promove a migração do fator transcricional SMAD para o núcleo, culminando com a expressão de um dos fatores transcricionais mestre para a diferenciação osteogênica, o Runx2. Este fator transcricional impede a diferenciação das células-tronco mesenquimais nas linhagens adipogênica e condrogênica. É a partir da translocação de Runx2 para o núcleo das células-tronco mesenquimais que os genes dos marcadores de osteoblastos começam a ser expressos. Além disso, o Runx2 possibilita a expressão de outro fator transcricional osteogênico que é o osterix (ALMAKI; AGRAWAL, 2016). Estes dois fatores são essenciais para a formação óssea (HUANG; OLSEN, 2015). A participação de outros fatores transcricionais como ATF4 e dlx5

neste evento também já foi descrita (FRANCESCHI; GE, 2017). A partir desses fatores, são transcritos genes como o do colágeno do tipo I, fosfatase alcalina, osteopontina, osteocalcina entre outros marcadores (ALMAKI; AGRAWAL, 2016).

Adicionalmente, a ativação via canônica de Wnt/ $\beta$ -Catenina também promove a diferenciação osteogênica. Os ligantes Wnts interagem com o receptor Frizzled que encontra-se acoplado ao seu correceptor LRP5/6. Na ausência de Wnts, um complexo enzimático que contém a enzima GSK3 $\beta$  promove a fosforilação da  $\beta$ -Catenina nos resíduos serina 33 e 37 e no resíduo treonina 41, induzindo a sua ubiquitinação, degradação no proteossoma e consequente não acumulação no citoplasma. Ao contrário, quando ocorre a ativação do receptor por Wnt, a atividade de GSK3 $\beta$  é inibida, a  $\beta$ -Catenina não é degradada e é translocada para o núcleo da célula. Uma vez no núcleo, a  $\beta$ -Catenina forma um complexo com outros fatores transcripcionais como TCF/LEF e CREB possibilitando a expressão dos genes osteogênicos. Fatores como o DKK1 e a esclerostina, produzida pela osteócito, inibem a ativação da via (MAEDA *et al.*, 2019). A ativação da via não-canônica por wnt5a promove o aumento da expressão de LRP5 que resulta na maior expressão de Runx2 e osterix. (OKAMOTO *et al.*, 2014). O ligante não canônico wnt7b também auxilia na diferenciação osteogênica pela ativação de PKC (TU *et al.*, 2007).

Desse modo, as células-tronco mesenquimais ativadas por estímulos vindos do microambiente iniciam o comprometimento tornando-se células osteoprogenitoras. Este progenitor possui elevada atividade mitótica, expressa Runx2 e apresenta morfologia fibroblástica. O próximo estágio de diferenciação é o pré-osteoblasto, que mantém a expressão de Runx2 e passa a expressar o fator osterix além de marcadores iniciais da diferenciação como o Colágeno do Tipo I e a Fosfatase alcalina a níveis baixos. Essas células apresentam uma morfologia mais arredondada, ao contrário do osteoprogenitor. Após prolongada exposição aos fatores de diferenciação osteogênica, os osteoblastos maduros apresentam alta expressão dos marcadores iniciais e de marcadores tardios como a osteopontina, osteocalcina e sialoproteína óssea. Os osteoblastos maduros são células grandes e cuboides, com limitada proliferação e capazes de promover a calcificação da matriz extracelular óssea (ROSSI *et al.*, 2021). No último estágio de diferenciação, os osteócitos ganham morfologia dendrítica, reduzem a expressão de proteínas de matriz extracelular e passam a expressar os marcadores específicos esclerostina, FGF-23 e DMP1 (TRESGUERRES *et al.*, 2019). As etapas da diferenciação osteogênica estão ilustradas na figura 15.

Figura 15 – A diferenciação de osteoblastos



Fonte: Adaptado de ROSSI *et al.*, 2021.

Fora de um organismo, a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais é obtida através da suplementação do meio de cultura com soro fetal bovino a 10% do volume final, ácido ascórbico, dexametasona e  $\beta$ -Glicerofosfato de sódio. A plena diferenciação dos osteoblastos ocorre ao final de aproximadamente 21 dias em contato com o meio de diferenciação osteogênico. A característica deposição de matriz extracelular óssea mineralizada pode ser confirmada com colorações de vermelho de alizarina ou von Kossa (LANGENBACH; HANDSCHEL, 2013).

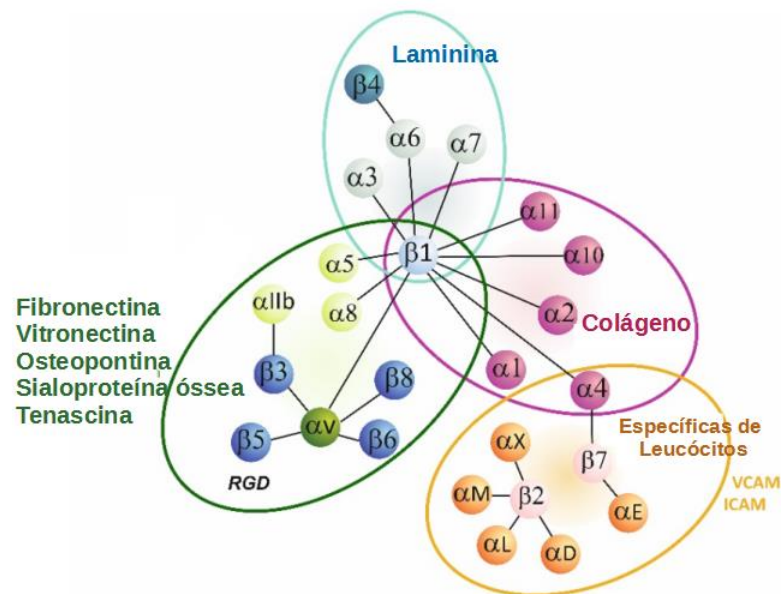
#### A atividade de integrinas na diferenciação osteogênica:

Além de moléculas como fatores de crescimento e de diferenciação, a osteoblastogênese é proporcionada pela ativação de proteínas de adesão celular como as integrinas (MARIE, 2013). As integrinas são receptores formados pela associação de uma subunidade de cadeia  $\alpha$  com outra subunidade de cadeia  $\beta$ , que são heterodimerizados de forma não covalente ainda no retículo endoplasmático e transportados para a membrana plasmática na sua composição final (BACHMAN *et al.*, 2019). Já foram descritos 18 tipos de subunidade  $\alpha$  e 8 exemplares de subunidade  $\beta$ , o que garante uma variedade de combinações de cadeias resultando no reconhecimento de diferentes tipos de proteínas. As integrinas são receptores responsáveis pela adesão/comunicação de células com outras células e de células com a matriz extracelular. Através de sua ativação, as integrinas regulam processos biológicos como a sobrevivência,

proliferação, adesão, diferenciação e migração (KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSASHS, 2019).

As integrinas são receptores não-específicos capazes de reconhecer mais de um ligante. Um tipo de integrina pode ser ativado por mais de um ligante. Assim como diferentes integrinas podem ser ativadas por um mesmo ligante. Dessa maneira, as integrinas são agrupadas entre as que reconhecem as fibras colágenas (Subunidade  $\beta 1$  combinada às subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 10$  e  $\alpha 11$ ); a laminina (Subunidade  $\beta 1$  combinada às subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$  e  $\alpha 7$ , e Subunidade  $\beta 4$  combinada a  $\alpha 6$ ); o motivo ácido arginilglicilaspártico (RGD) (Subunidade  $\beta 1$  combinada às subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 4$ ,  $\alpha V$ ,  $\alpha 8$ , subunidade  $\alpha V$  combinada a  $\beta 3$ ,  $\beta 5$ ,  $\beta 6$ ,  $\beta 8$ , e subunidade  $\beta 3$  combinada a  $\alpha IIb$ ) e as integrinas específicas de leucócitos (Subunidade  $\beta 2$  combinada às subunidades  $\alpha M$ ,  $\alpha L$ ,  $\alpha X$ ,  $\alpha D$ ; Subunidade  $\beta 7$  combinada às subunidades  $\alpha E$  e  $\alpha 4$ , e subunidade  $\alpha 4$  combinada a  $\beta 1$ ) (BACHMAN *et al.*, 2019). Os diferentes ligantes para cada tipo de dimerização de subunidades de integrinas são ilustrados na figura 16.

Figura 16 – Combinações de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  de integrinas e seus ligantes

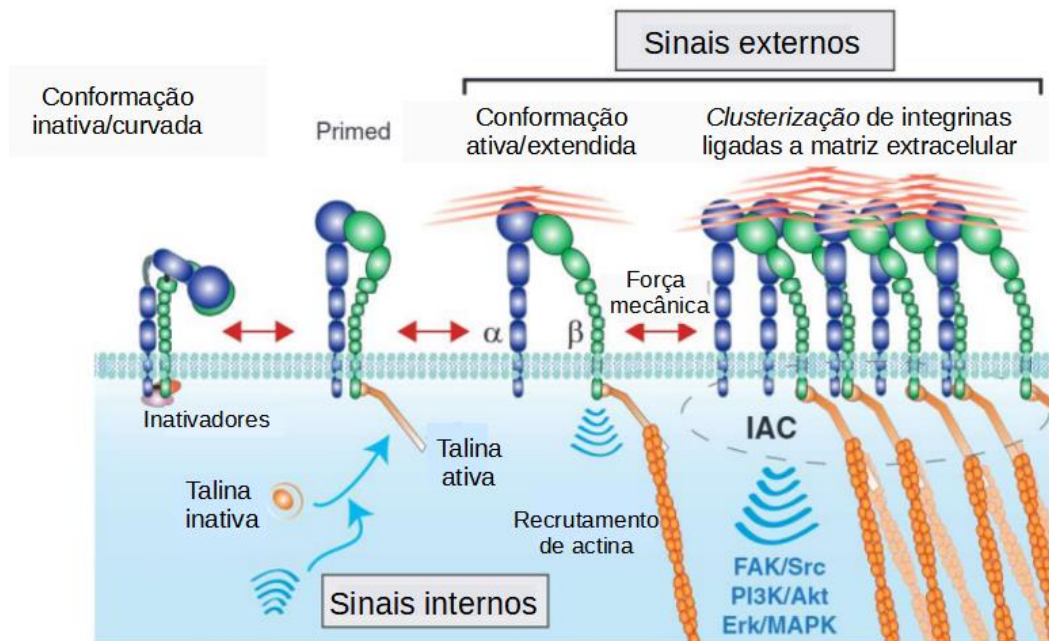


Fonte: Adaptado de ELLERT-MIKLASZEWSKA *et al.*, 2020.

Tanto a interação com ligantes intracelulares como extracelulares ativam estes receptores gerando sinais bidirecionais. Ligantes intracelulares podem modificar a conformação dos domínios extracelulares aumentando a afinidade do receptor aos ligantes

extracelulares. Já a ligação com proteínas extracelulares induz uma modificação para a conformação estendida no domínio intracelular, permitindo a formação de *clusters* de integrinas e ativando cascatas de sinalização intracelular. Sítios de ligação intracelular de actina presentes nas caudas intracelulares do receptor são formados por proteínas como talina, paxilina, vinculina e  $\alpha$ -actinina que permitem a ativação de outras proteínas como a quinase de adesão focal (FAK), a proteína homóloga de RAS (Rho) GTPases e a quinase ligada à integrina (ILK) (MARIE, 2013). Desta forma, as integrinas são capazes de reconhecer a composição, grau de rigidez e forças mecânicas aplicadas sobre a matriz extracelular levando a uma resposta biológica (KECHAGIA; IVASKA; ROCA-CUSASHS, 2019). A estrutura das integrinas e sua conformação ativa podem ser observadas na figura 17 a seguir.

Figura 17 – Ativação de integrinas e vias de sinalização associadas a estes receptores



Fonte: Adaptado de CHASTNEY, CONWAY, IVASKA, 2020.

No contexto da regulação de vias de sinalização no tecido ósseo, a ativação de FAK por intermédio das integrinas é a principal via que estimula a diferenciação de osteoblastos. A FAK é um não-receptor intracelular tirosina kinase que pode ser fosforilado em diferentes sítios de ativação levando à migração, proliferação e respostas celulares. A FAK ativada se autofosforila no resíduo Y397, servindo como um sítio de ancoragem para a ligação do domínio SH2 da Kinase Src, que em contrapartida fosforila a FAK nos resíduos Y576 e Y577 aumentando a

atividade catalítica da mesma (ACEBRÓN *et al.*, 2020; MARTINEZ, LÓPEZ; LIETHA, 2020). A deleção de FAK em células Osterix+ de roedores leva a osteopenia por conta da redução da proliferação e da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos através da atividade de  $\beta$ -Catenina. Além disso, estas células silenciadas apresentam um perfil favorável à diferenciação adipogênica. Este efeito porém, não foi observado em estágios de diferenciação osteogênica mais maduros (SUN *et al.*, 2016). Corroborando estes dados, outros grupos observaram que a fosforilação de FAK em Y397 permite a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (XIE *et al.*, 2019; SALASZNYK *et al.*, 2007), regulando, em especial, estágios iniciais da diferenciação (QI *et al.*, 2020). A fosforilação de FAK leva à ativação de duas principais vias de sinalização em osteoblastos, a via de PI3K-AKT e via da ERK1/2. A via PI3K-AKT interfere no processo pois possibilita a maior translocação de  $\beta$ -catenina para o núcleo (SAIDAK *et al.*, 2015), enquanto a via de ERK1/2 promove o aumento da proliferação celular e ativação de Runx2 (HAMIDOUCHE *et al.*, 2009).

As principais integrinas expressas pelas células mesenquimais, osteoprogenitoras e osteoblastos são as integrinas reconhecedoras de colágeno  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$ , e as integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$ , e  $\alpha V\beta 1$ , que se ligam à glicoproteínas como a osteopontina e a fibronectina, principalmente. Nos osteoclastos a integrina mais expressa é a  $\alpha V\beta 3$ , sendo responsável pela adesão à osteopontina, fibronectina e sialoproteína óssea possibilitando a formação das zonas de selamento com a matriz durante a reabsorção. No caso da diferenciação osteogênica, a ativação dessas integrinas está relacionada ao melhor estabelecimento da célula mesenquimal no osso e posterior direcionamento para o perfil osteogênico (MARIE, 2013). Presente em todos os receptores acima mencionados, a integrina  $\beta 1$  tem um papel fundamental na percepção de forças mecânicas em pré-osteoblastos, convertendo a aplicação dos impactos mecânicos na ativação de ERK e de  $\beta$ -catenina, possibilitando a diferenciação osteogênica (YAN *et al.*, 2012; YAN *et al.*, 2016).

Os receptores  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  estão associados à promoção dos estágios iniciais da diferenciação osteogênica, principalmente pelo fato do colágeno do tipo I ser um dos primeiros marcadores a serem expressos, mas não são os únicos. Um dos estudos pioneiros sobre este tema demonstrou que o bloqueio das integrinas  $\alpha 1\beta 1$  e  $\alpha 2\beta 1$  e do ligante colágeno I durante a fase inicial da diferenciação osteogênica reduz a expressão de marcadores iniciais e posterior calcificação de matriz extracelular, ao passo que o bloqueio destes receptores e do colágeno na etapa final de diferenciação provocou efeitos reduzidos em comparação a fase inicial (JIKKO *et al.*, 1999). Um outro estudo associou a baixa proliferação de diferenciação de células-tronco mesenquimais de pacientes osteoporóticos com idade avançada à reduzida expressão da



integrina  $\alpha 2$ . Porém, a superexpressão de integrina  $\alpha 2$  nas células mesenquimais destes pacientes aumentou a expressão de RUNX2 e Osterix através da sinalização mediada por ERK1/2, restabelecendo a proliferação e potencial de diferenciação osteogênica nestas células (HU *et al.*, 2013).

Apesar disso, estes dois receptores não são exclusivos para o estágio de diferenciação inicial. A ativação da integrina  $\alpha 5\beta 1$  em células mesenquimais também promove o processo de diferenciação ao ativar a FAK que em seguida, ativa a via de PI3K-AKT. A ativação desta via induz a inibição de GSK-3 $\beta$ , responsável pela condução da  $\beta$ -catenina à degradação. A consequência da ativação de PI3K-AKT neste caso é o aumento da translocação nuclear de  $\beta$ -Catenina e o aumento da expressão de RUNX2 (SAIDAK *et al.*, 2015). Além disso, foi demonstrado que a superexpressão da integrina  $\alpha 4$  em células-tronco mesenquimais transplantadas em roedores imunocompetentes facilitou o estabelecimento dessas células nos ossos dos animais e contribuiu para a formação de novos osteoblastos (KUMAR; SELVARANGAN, 2007). Outro trabalho descreveu a participação da integrina  $\alpha V\beta 1$  que quando ativada por osteoactivina (glicoproteína com motivo RGD) induz a maior atividade de fosfatase alcalina em osteoblastos murinos primários, contribuindo para sua maturação. Em linhagem de pré-osteoblastos, o osteoactivina induziu o aumento da ativação da via FAK-ERK (MOUSSA *et al.*, 2014). A ativação de integrinas por biomateriais contendo motivos RGD também promove o aumento da diferenciação de pré-osteoblastos, sendo por isso uma promissora estratégia farmacológica para a regeneração óssea (VERSTAPPEN *et al.*, 2020).

### **O papel duplo de TGF- $\beta$ durante a diferenciação osteogênica:**

O TGF- $\beta$  é um fator de crescimento que faz parte da superfamília de TGF- $\beta$ , que compreende as BMPs, as actininas e as isoformas TGF- $\beta 1$ , TGF- $\beta 2$  e TGF- $\beta 3$ , totalizando 33 genes nos mamíferos (MORIKAWA; DERENCK; MIYAZONO, 2016). Este fator recebeu o nome de fator de crescimento transformador pela natureza de sua atividade, que juntamente à EGF, era capaz de provocar modificações fenotípicas na proliferação de linhagens fibroblásticas (ROBERTS *et al.*, 1981). Observando seus efeitos sistêmicos, o TGF- $\beta$  regula processos fisiológicos como a proliferação celular, diferenciação, reparo tecidual e modulação da resposta imune. Porém, o desbalanço com a elevada produção e atividade deste fator leva a eventos patológicos como diabetes; distúrbios cardiovasculares, neurodegenerativos, renais e

hepáticos; doenças no sistema esquelético e desenvolvimento de cânceres (MORIKAWA; DERENCK; MIYAZONO, 2016; CABELLO-VERRUGIO, 2018).

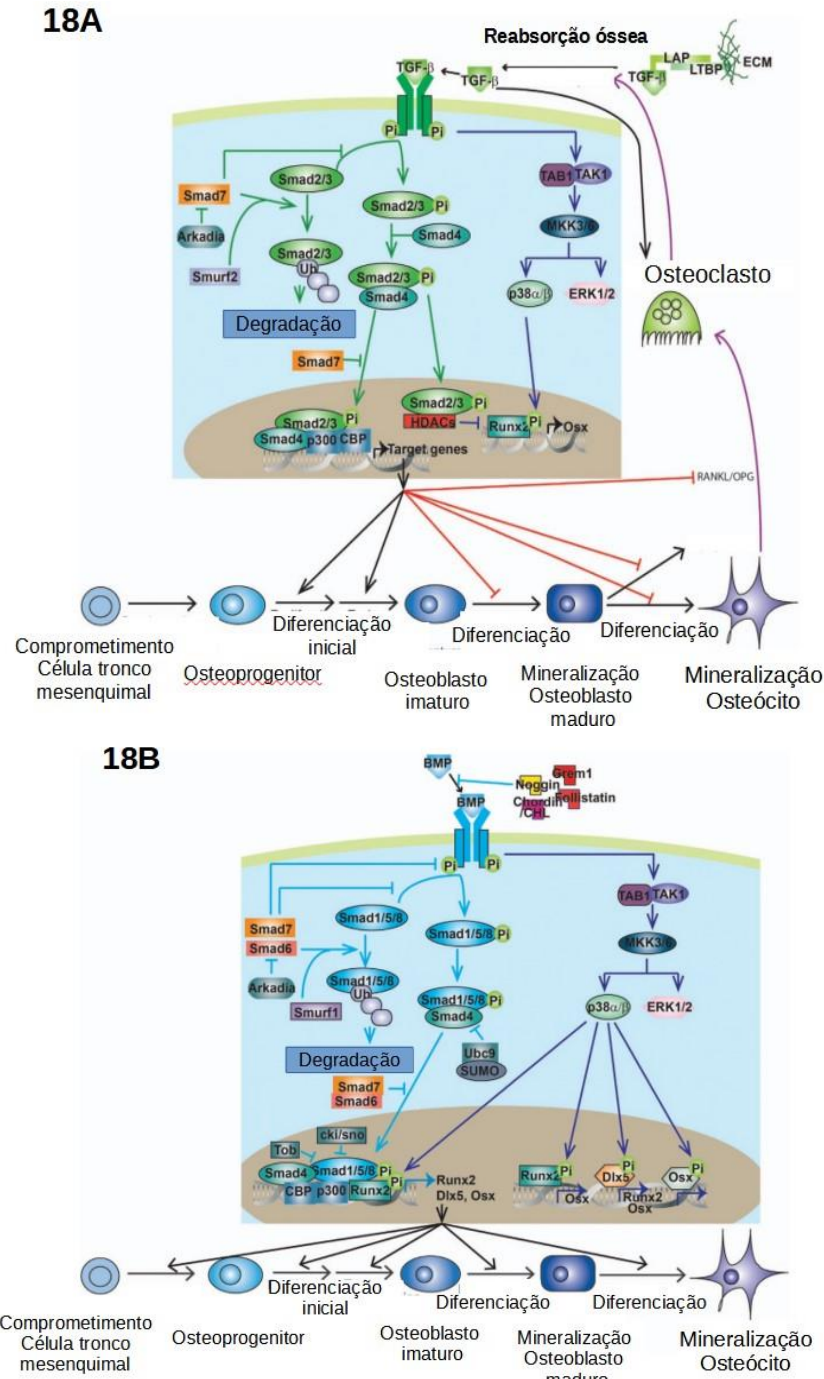
Existem três receptores de TGF- $\beta$  localizados na membrana plasmática que disparam vias de sinalização canônica e não-canônicas. Na via canônica, uma das três isoformas de TGF- $\beta$  se ligam ao TGF- $\beta$ R2, culminando no recrutamento e fosforilação de TGF- $\beta$ R1. Uma vez ativado, TGF- $\beta$ R1 promove a fosforilação das proteínas SMAD2 e SMAD3 em resíduos serina da porção carboxi-terminal, que recrutam a SMAD4 para promover a transcrição de genes associados a resposta de TGF- $\beta$ . Esta via pode ser inibida pela ativação de SMAD7 recrutada tanto por TGF- $\beta$ R quanto pelo complexo SMAD2/3. Na via não-canônica, a ligação de TGF- $\beta$  em seus receptores promove a ativação de várias quinases como MAPK, ERK, P38, JNK, PI3K e ROCK. Estas quinases podem gerar efeitos de forma independente de SMAD2/3, ou podem favorecer a ativação deste complexo. O receptor TGF- $\beta$ R3 foi inicialmente descrito como um co-receptor que capturava seu ligante para apresentá-lo a TGF- $\beta$ R2, mas seu mecanismo de ação ainda não é plenamente estabelecido. Alguns indícios apontam que TGF- $\beta$ R3 pode contribuir com a ativação da via Não-canônica. A degradação destes receptores e outras proteínas efetoras é mediada por ubiquitina E3 ligases como SMURF1, SMURF2, NEDD2-4 e WWP1, que regulam negativamente a ativação das vias canônica e não canônica de TGF- $\beta$  (VANDER ARK; CAO; LI, 2018).

Assim como as BMPs, TGF- $\beta$  tem um papel relevante promovendo a ossificação endocondral e intramembranosa nos estágios de desenvolvimento embrionário e crescimento dos ossos pós-nascimento (LOPES *et al.*, 2018). Apesar disso, estes dois grupos de fatores têm ações distintas quando se trata da regulação dos estágios terminais de diferenciação osteogênica. A ligação de BMP (BMP 2,4,5,6,7 ou 8) ao seu receptor induz a ativação do complexo de SMAD1/5/8 que junto a SMAD4 promovem o recrutamento dos fatores transcricionais osteogênicos RUNX2, Osterix e DLX5 para promover a diferenciação. Em via independente de SMAD, o complexo formado por TAK1 e TAB1 ativa as vias MKK-P38 e MKK-ERK que culminam com a translocação nuclear dos fatores osteogênicos. Em todos os estágios da diferenciação osteogênica, a ativação das vias de sinalização por BMP regulam positivamente o processo (WU; CHEN; LI, 2016).

De maneira diferente, TGF- $\beta$  induz a ativação de SMAD2/3 que forma o complexo com SMAD4. Durante a transição do progenitor mesenquimal até o estágio de pré-osteoblasto, TGF- $\beta$  promove vias de sinalização que culminam com a diferenciação inicial, por via dependente ou não de SMAD. Porém, vale ressaltar o papel duplo do TGF- $\beta$ , uma vez que o complexo SMAD2/3 recruta as enzimas histona deacetilase classe II (HDACs) reprimindo a atividade de

RUNX2 a partir do estágio de maturação até a diferenciação do osteócito, reprimindo o estágio terminal (WU; CHEN; LI, 2016). As vias ativadas por TGF- $\beta$  e BMP são comparadas na figura 18A e 18B, respectivamente.

Figura 18 – Comparação entre as vias de sinalização ativadas por TGF- $\beta$  (18A) e BMP (18B)



Fonte: Adaptado de WU, CHEN, LI, 2016.

A administração de TGF- $\beta$  durante a diferenciação osteogênica de pré-osteoblastos MC3T3-E1 e osteoblastos primários reduz a expressão dos marcadores osteogênicos e mineralização (FREUDE *et al.*, 2012; FANG *et al.*, 2010, SUN *et al.*, 2018). Parte dos efeitos

inibitórios de TGF- $\beta$  foram justificados pela inibição de nefronectina, proteína de matriz extracelular que induz diferenciação osteogênica (FANG *et al.*, 2010); e pela ativação de SMURF1 que degrada SMAD1 e Runx2 (SUN *et al.*, 2018). O tratamento de células-tronco mesenquimais com TGF- $\beta$  induz o aumento da expressão de marcadores iniciais como ALP e RUNX2, enquanto reduz os marcadores tardios osteocalcina e sialoproteína óssea (IGARASHI *et al.*, 2016). Apesar disso, alguns dados apontam o efeito inibitório de TGF- $\beta$  também sobre as etapas mais iniciais da diferenciação, como foi observado com a redução da atividade de fosfatase alcalina em uma linhagem celular mesenquimal (SUN *et al.*, 2018) e ativação de JNK, PKA e ALK5 reduzindo a diferenciação de células-tronco mesenquimais (ZHOU, 2011). Os efeitos prejudiciais de TGF- $\beta$  são estabelecidos com o desbalanço que leva a uma produção elevada do fator, como ocorre em contextos patológicos como o câncer e a obesidade.

### **Impactos da obesidade sobre o remodelamento ósseo:**

A contribuição do desenvolvimento da obesidade para a regulação do remodelamento ósseo é um tema controverso que gera debates até os dias de hoje. Ainda não existe um posicionamento claro que defina se o ganho excessivo de massa gorda tem efeitos benéficos, prejudiciais ou indiferentes para a homeostase óssea. Essa incerteza se dá por conta de diferentes tipos de interferência associados à obesidade, dentre eles podemos destacar a elevada produção de mediadores inflamatórios pelo tecido adiposo patológico e o aumento da massa do indivíduo obeso (FASSIO *et al.*, 2018).

Como elucidado anteriormente, o tecido ósseo é regulado através de sinalizações estabelecidas por fatores químicos, como citocinas e fatores de crescimento, mas também por estímulos mecânicos (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). A força da gravidade e o impacto promovido pela movimentação do organismo são variáveis essenciais para a formação óssea (KOKKINIAS; KOKKINIAS 2017), e em condições de ausência dessas forças, como acontece com astronautas em viagem (AXPE *et al.*, 2020) e em pacientes por muito tempo acamados, ocorre a perda óssea (PARRY; PUTHUCHEARY, 2015). Desta maneira, a realização de atividade física é um dos mecanismos indutores da renovação tecidual óssea.

Devido ao maior ganho de massa que ocorre em indivíduos com obesidade, e consequente maior impacto mecânico sobre os membros, essa doença passou a ser considerada um fator fomentador do ganho de massa óssea (LEE; LEE; SUNG, 2019). Porém, esta associação não deve ser estabelecida de forma tão simples. É estabelecido que pessoas com

obesidade comumente apresentem perfil sedentário ou pouco ativo, além de, em casos de obesidade severa, terem a locomoção reduzida. Com esta conduta inativa, o aumento de peso corporal em pessoas obesas não seria um fator estimulante de formação óssea (KIRK; ZANKER; DUQUE, 2020; ROUSEN; BOUXSEIN, 2006, OKIFUJI; HARI, 2015).

Contudo, alguns estudos apontam uma correlação positiva entre o IMC e a densidade mineral óssea (DMO), como foi observado em uma população adulta obesa mista (QIAO *et al.*, 2015) e em mulheres obesas com dinapenia (CHAIN *et al.*, 2020), indicando que a obesidade tem efeito protetor contra a osteoporose. Na maior parte destes estudos, a DMO é obtida através de densitometria de dupla emissão de raios X (DEXA). Apesar da DEXA ser uma metodologia amplamente utilizada para o diagnóstico de osteoporose, em indivíduos com obesidade esse exame pode superestimar a DMO, fornecendo resultados não representativos. Por conta disso, outros tipos de avaliações como a ressonância magnética e tomografia computadorizada quantitativa (TCQ), que apresentam melhor acurácia, são alternativas mais adequadas (FINTINI *et al.*, 2020). Evidenciando esta discrepância, um estudo envolvendo 44 mulheres obesas pós-menopausa avaliou a DMO destas voluntárias tanto por DEXA quanto por TCQ. A circunferência abdominal e o índice de obesidade central correlacionaram positivamente com a DMO pela avaliação com DEXA, enquanto os mesmos parâmetros não apresentaram associação pela TCQ (MILISC *et al.*, 2019).

Outro fator relevante nesta análise é o critério utilizado para determinar a obesidade na maior parte destes estudos, que é o IMC. Como mencionado anteriormente, o IMC é uma medida que não diferencia o ganho de massa magra ou gorda (WONG *et al.*, 2021), fator importante para o estabelecimento dessas correlações. Diferentes grupos de pesquisa que detalharam estes valores em suas análises demonstraram que, na verdade, em indivíduos obesos o percentual de massa magra correlaciona-se positivamente com DMO, enquanto a massa gorda apresenta associação inversa (KIM *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2018; KEKARDI *et al.*, 2022).

No estudo de Seo e colaboradores (2021), crianças e adolescentes obesos apresentaram correlação positiva entre a DMO e o índice de massa magra, e negativa entre a DMO e o percentual de massa gorda. De maneira interessante, ao avaliar-se jovens superobesos, a correlação positiva entre DMO e o índice de massa magra foi atenuada (SEO *et al.*, 2021).

Comparando adolescentes com obesidade, os jovens extremante obesos apresentaram *Trabecular bone score* menor do que adolescentes obesos de ambos os sexos. Apesar dos adolescentes com obesidade extrema apresentarem maior DMO de quadril do que os adolescentes obesos, o valor de *Trabecular bone score* apresentou associação inversa com o IMC e com o percentual de massa gorda no sexo masculino (JULIAN *et al.*, 2021).

Além da quantificação da DMO, a susceptibilidade e ocorrência de fratura são indicadores da qualidade do osso. Variações entre os resultados dos estudos são justificadas por diferentes sítios de fratura e heterogeneidade da população amostral. Em uma metanálise, Turcotte e colaboradores observaram que mulheres obesas pós-menopausa em comparação a mulheres magras apresentavam um aumento de 60% no risco de fraturas de tornozelo e uma redução de 25% e 15% do risco de fraturas de quadril e pulso, respectivamente. Em homens, o risco de fraturas de quadril foi reduzido em 41% (TURCOTTE *et al.*, 2021). Em contrapartida, em uma avaliação com 295.674 indivíduos de ambos os sexos com idade variando de 40 a 86 anos, a obesidade abdominal foi positivamente associada a um risco 16 vezes maior de fratura de quadril (SADEGHI *et al.*, 2017).

Adicionalmente, o aumento de DMO em indivíduos com obesidade, não necessariamente é um fato que indique uma formação óssea com as propriedades mecânicas adequadas. Comparando mulheres pré-menopausa com obesidade severa, mórbida e super mórbida, o grupo de obesidade mais grave apresentava um aumento no conteúdo mineral ósseo em comparação com os outros 2 grupos avaliados. Apesar da associação positiva do IMC e da massa gorda com o conteúdo mineral ósseo, o índice de força do osso foi reduzido no grupo de mulheres obesas super mórbidas comparado aos demais grupos (HAMMOUD *et al.*, 2019). Neste caso, a mineralização excessiva representa uma maior fragilidade destes ossos, similarmente ao que ocorre em contextos patológicos como a osteopetrose (BAILEY; TAPSCOTT, 2022).

Por outro lado, o secretoma do tecido adiposo de pessoas com obesidade tem grande influência no desequilíbrio da atividade de osteoblastos e osteoclastos, culminando com a perda óssea. Diferentes mediadores que são superexpressos ou inibidos no estado patológico do tecido adiposo contribuem para este processo (OLIVEIRA *et al.*, 2019). Algumas publicações exemplificam os diferentes mecanismos de perda óssea promovida pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e foram resumidas abaixo.

Em camundongos TNF- $\alpha$ -*knockout* alimentados com dieta hiperlipídica, foi observado um aumento na massa de osso trabecular femoral e no número de trabéculas em comparação a animais selvagens obesos. Além disso, o silenciamento da citocina reduziu o número de osteoclastos femorais em 40% e a concentração plasmática de CTX em 23% no contexto da obesidade (ZHANG *et al.*, 2015). Em camundongos obesos, a produção de TNF- $\alpha$  está associada a maior expressão de esclerostina e consequente redução na formação óssea (BAEK *et al.*, 2014). A administração de TNF- $\alpha$  tanto *in vitro* (SHINOHARA *et al.*, 2015; LUO *et al.*, 2018) como *in vivo* em modelos de roedores (OHORI *et al.*, 2020) é um potente indutor da

osteoclastogênese. Animais obesos apresentam maior frequência de precursores de osteoclastos na medula óssea, que estão relacionados a maior expressão de TNF, RANKL e PPAR- $\gamma$  (SHU *et al.*, 2015). Outro fato relevante é que o TNF- $\alpha$  induz o aumento de RANKL pelos osteócitos, um mecanismo indireto de estímulo a diferenciação de osteoclastos (MARAHLEH *et al.*, 2019). Sobre os osteoblastos e células-tronco mesenquimais expostas à diferenciação osteogênica, esta citocina reduz a expressão de marcadores osteogênicos como fosfatase alcalina, osteocalcina, RUNX2, entre outros (MIN; SON; JANG, 2019; ABUNA *et al.*, 2015; JEONG, 2018; WANG *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2016). Além disso, o TNF- $\alpha$  aumenta a apoptose (BIN *et al.*, 2015) e a expressão de MMP-9 em osteoblastos (TSAI *et al.*, 2014).

Dados sobre o efeito de IL-1 $\beta$  e IL-6 demonstram efeitos similares aos observados com TNF- $\alpha$ . Alguns tipos variações genéticas de IL-1 $\beta$  aumentam a susceptibilidade de osteoporose e são mais frequentes em mulheres chinesas com mais de 60 anos e com IMC maior que 24Kg/m<sup>2</sup> (HE *et al.*, 2020). Esta associação pode ser justificada pelo efeito pró-apoptótico observado sobre linhagens celulares de osteócitos e osteoblastos (QU *et al.*, 2018, OZEKI *et al.*, 2014), e pelo aumento do suporte à formação de osteoclastos. Osteoblastos tratados com IL-1 $\beta$  liberam níveis elevados de IL-6 e RankL (LAZZERINI *et al.*, 2013, OZEKI *et al.*, 2014). De forma direta, IL-1 $\beta$  juntamente a RANKL aumenta a osteoclastogênese *in vitro* (WANG *et al.*, 2018, LEE *et al.*, 2018, CAO *et al.*, 2016, SON *et al.*, 2019, MOON *et al.*, 2019). Adicionalmente, potencializa a migração e atividade reabsortiva de osteoclastos (LEE *et al.*, 2017, CAO *et al.*, 2016, SON *et al.*, 2019).

Demonstrando a contribuição de IL-6 na perda óssea associada à obesidade, Camundongos obesos IL-6 *Knockout* exibem um aumento em parâmetros da microestrutura óssea do fêmur como o volume, número e espessura de trabéculas em comparação aos camundongos obesos selvagens (WANG *et al.*, 2016). A redução da expressão do fator transcricional osteogênico RUNX2 (BAKKER *et al.*, 2014, HE *et al.*, 2020, (WANG *et al.*, 2016) e o aumento da expressão de RANKL também foi observada em osteoblastos e osteócitos tratados com IL-6.

Uma das características do remodelamento patológico do tecido adiposo branco na obesidade é o aumento na produção de leptina e redução da expressão de adiponectina. Assim como as citocinas inflamatórias listadas acima, a modificação na secreção destas adipocinas tem efeito direto sobre o remodelamento do tecido ósseo. Os dados sobre o impacto da adiponectina sobre as células ósseas indicam um consenso de que esta molécula estimula a atividade de osteoblastos, enquanto inibe a formação de osteoclastos. A deficiência de adiponectina reduz a razão do volume ósseo/volume do tecido e número de trabéculas (YANG

*et al.*, 2019). O silenciamento direcionado de adiponectina em adipócitos é responsável pela redução de 15% do volume ósseo da tíbia em modelo de roedores (ABBOTT *et al.*, 2015). A adiponectina é um hormônio que regula o destino de células-tronco mesenquimais, direcionando-as para se diferenciarem em osteoblastos em vez de adipócitos tanto *in vitro* como *in vivo* (LIU *et al.*, 2021). Confirmando o seu potencial pró-osteogênico, o tratamento com adiponectina aumenta a mineralização de matriz extracelular *in vitro* (LIU *et al.*, 2021, HAUGEN *et al.*, 2018) e aumenta a expressão de genes como Osterix e sialoproteína óssea (TU *et al.*, 2011).

Complementar a estes resultados, na ausência de adiponectina a diferenciação de osteoclastos no fêmur de camundongos deficientes é estimulada (WANG *et al.*, 2013, TU *et al.*, 2011). Além disso, o tratamento de precursores de osteoclastos com adiponectina induz apoptose (TU *et al.*, 2011), reduz a formação de células multinucleadas TRAP + e diminui a expressão de seus marcadores como catepsina K, OSCAR e NFAT 2 (TU *et al.*, 2011, CHINA *et al.*, 2017). Transpondo para modelos de pesquisa em humanos, a expressão de gênica de adiponectina correlaciona positivamente com RUNX2 e negativamente com RANKL/osteoprotegerina em pacientes saudáveis e com osteoporose (DRAGOJEVIC *et al.*, 2013).

Ao contrário da adiponectina que apresenta efeitos claros sobre as células do tecido ósseo, a leptina ainda é alvo de discussões nessa temática. Camundongos obesos *knockout* para receptor de leptina exibem maior taxa de formação óssea a aposição mineral comparado a camundongos selvagens (YUE *et al.*, 2017). Em outro estudo, ratos obesos também apresentam redução do número e espessura de trabéculas, simultaneamente ao aumento de leptina sérica, que correlaciona positivamente com RANK (LI *et al.*, 2017). Utilizando um modelo animal de Zebrafish alimentado com dieta hiperlipídica, os animais obesos apresentaram uma maior razão de leptina/adiponectina acompanhando de uma redução de 12,6% de área mineralizada óssea (CARNOVALLI *et al.*, 2017) comparado aos animais controles. Apesar disso, muitos estudos indicam que a Leptina possui ação pró-osteogênica. A administração de leptina em camundongos ob/ob aumenta a formação óssea (PHILBRICK *et al.*, 2017) e acelera o reparo ósseo após fratura cirúrgica (WU *et al.*, 2018). Além disso, o tratamento de células-tronco mesenquimais humanas com leptina aumenta a diferenciação osteogênica e a atividade de fosfatase alcalina (LI *et al.*, 2019).

Discordâncias também são observadas nos estudos de correlação entre a estrutura óssea e a concentração sérica de leptina em humanos. Enquanto um estudo envolvendo



adolescentes obesos correlacionou positivamente a DMO, com leptina e massa gorda (MAGGIO *et al.*, 2014); enquanto outro trabalho comparando crianças obesas e magras correlacionou negativamente os níveis de leptina com a espessura trabecular de tibia (DIMITRI *et al.*, 2015). Essa diferença pode ser explicada pelas ações diretas e indiretas da leptina sobre o tecido ósseo. O estímulo com Leptina em células-tronco mesenquimais e de linhagem osteogênica favorecem a deposição óssea. De outro modo, a leptina age sobre o sistema nervoso central. No hipotálamo a sinalização mediada pela leptina inibe a liberação do neuropeptídeo Y, que inibe a atividade de osteoblastos (REID; BALDOCK, CORNISH, 2018). Em camundongos obesos *knockout* para neuropeptídeo Y, a perda de massa óssea cortical e ganho de massa gorda é atenuada em comparação a camundongos obesos selvagens, demonstrando a importância desta via de regulação na perda óssea associada à obesidade (WEE *et al.*, 2018). Apesar da maior disponibilidade de leptina sistemicamente em indivíduos obesos, a resistência do receptor de leptina em decorrência da neuroinflamação (IZQUIERDO *et al.*, 2019) pode contribuir para este mecanismo.

Em conjunto a maior liberação de adipocinas pró-inflamatórias pelo tecido adiposo, a obesidade é um fator de risco para o desenvolvimento da Diabetes (COMPOSTON, 2017). Isoladamente, a Diabetes é uma doença promotora de osteoporose (SAITO, MARUMO, 2013) e combinada com o quadro de obesidade a perda óssea é potencializada. Em comparação a homens obesos não-diabéticos, homens obesos portadores de diabetes tipo II apresentam maior espaçamento entre trabéculas e menores carga de falha e rigidez de tibia (VIGEVANO *et al.*, 2021). Indivíduos obesos apresentam maior concentração de produtos de glicação avançada observados em amostras de urina (RAZNY *et al.*, 2017), e osteoblastos desafiados com estes produtos reduzem a expressão de osteocalcina e colágeno do tipo I (YAMAMOTO *et al.*, 2001).

O desenvolvimento do estresse oxidativo na obesidade também afeta o remodelamento ósseo, favorecendo a diferenciação de osteoclastos. Em camundongos obesos, foi observado um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) na medula óssea e TAB, produzido em grande parte pela NOX2, subunidade catalítica da NADPH oxidase altamente expressa em células imunes (MUKHERJEE *et al.*, 2018). Comparado a camundongos obesos selvagens, animais obesos deficientes para NOX2 apresentam menor potencial de geração de osteoclastos (RAHMAN *et al.*, 2018). A NOX2 promove a diferenciação de osteoclastos através da superexpressão de NFATc1 (KANG, KIM, 2016). Por outro lado, a administração de compostos antioxidantes como ácido fólico, polifenóis de chá verde e N-acetilcisteína promovem o ganho de massa óssea em camundongos induzidos a obesidade com dieta (HE *et al.*, 2022, SHEN *et al.*, 2012, CAO, PICKLO, 2013).

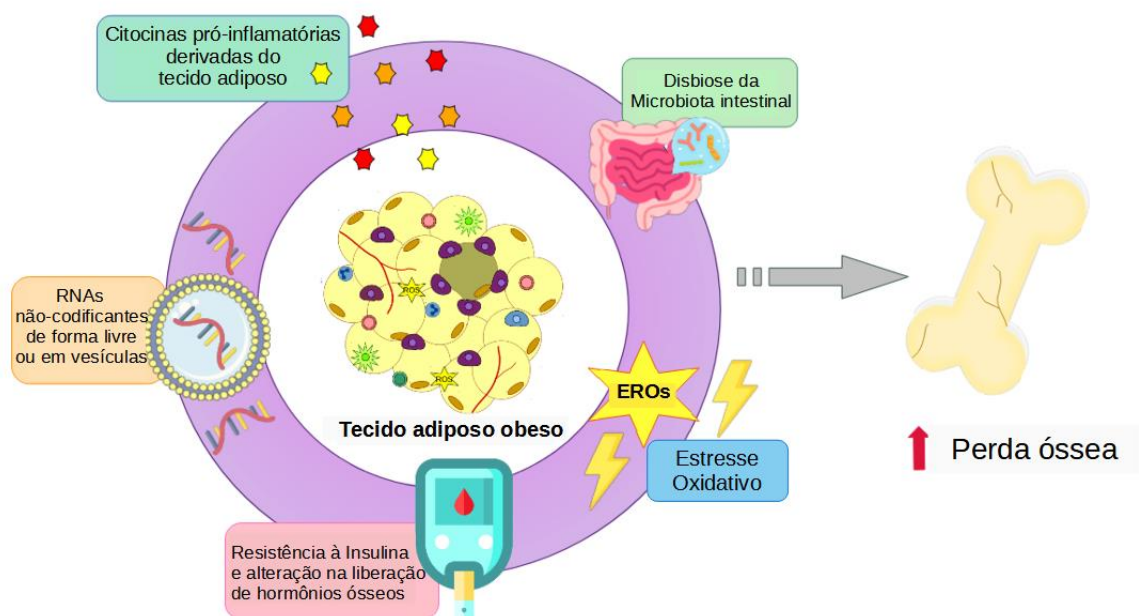
As modificações na microbiota e permeabilidade intestinal que ocorrem na obesidade e que foram anteriormente abordadas são fatores adicionais para o desequilíbrio entre a atividade reabsortiva de osteoclastos e de síntese de matriz óssea por osteoblastos. As alterações mais comuns na composição da microbiota de indivíduos com obesidade são o aumento da razão de bactérias Firmicutes/Bacteroidetes e da frequência de alguns microorganismos do filo Proteobacteria, e redução de bactérias comensais como algumas bactérias dos gêneros *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* e *Akkermansia* spp., entre outras alterações (GOMES; HOFFMAN; MOTA, 2018; MÉNDEZ-SALAZAR *et al.*, 2018, AMABEBE *et al.*, 2020). Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica o aumento da razão de Firmicutes/Bacteroidetes na microbiota intestinal correlaciona negativamente com o volume ósseo (MCCABE *et al.*, 2018). Apesar da ausência de estudos que estabeleçam correlações diretas entre a frequência de bactérias do filo Proteobacteria na obesidade e o efeito das mesmas sobre a homeostasia óssea, um trabalho demonstrou que em amostras fecais de mulheres com menor DMO existe uma maior abundância de bactérias deste filo em comparação a amostras de mulheres com DMO média (PALACIOS-GONZÁLEZ *et al.*, 2020).

Ao mesmo tempo, as bactérias que produzem metabólitos com ação anti-inflamatória e pró-resolutiva e que se encontram em menor frequência na obesidade (SUN *et al.*, 2020) proporcionam uma reversão da perda óssea promovida pelo ganho de peso. As vesículas extracelulares de *Akkermansia muciniphila* em camundongos protegem da obesidade induzida por dieta (ASHRAFIAN *et al.*, 2021), além de exibirem um efeito benéfico estimulando a diferenciação de osteoblastos e reduzindo a formação de osteoclastos (LIU *et al.*, 2021). Em pacientes com osteopenia, a abundância de *Akkermansia muciniphila* tem uma tendência de queda, apesar de não ser observada diferença estatística em comparação a pacientes saudáveis (KESHAVARZ *et al.*, 2021). A administração de probióticos de *Bifidobacterium pseudocatenullatum* em camundongos obesos provocou melhoras em parâmetros trabeculares, aumentou o marcador de formação óssea osteocalcina e reduziu o marcador de reabsorção CTX 1 no soro dos animais tratados em comparação aos animais obesos sem tratamento (FERNANDEZ-MURGA; OLIVARES; SANZ, 2020). Outro probiótico comercial (VLS#3) constituído por diferentes espécies de bactérias dos gêneros *bifidobacterium* e *lactobacillus* aumentou o volume trabecular ósseo e a força mecânica de ossos de camundongos obesos (BEHERA *et al.*, 2021).

Concomitante às alterações de microorganismos da microbiota intestinal, o aumento da permeabilidade intestinal promovido por TNF- $\alpha$  e IFN liberados do tecido adiposo obeso (LIU *et al.*, 2012) resulta em concentrações mais elevadas de LPS sérico (EAIMWORA WUTHIKUL

*et al.*, 2019, RIOS *et al.*, 2019). O tratamento com LPS em administrações locais ou sistêmicas promovem a perda óssea através da maior reabsorção óssea mediada pelos osteoclastos (KIM *et al.*, 2021, GOEL *et al.*, 2019, KISHIKAWA *et al.*, 2019, JIN *et al.*, 2013). Além disso, o LPS reduz a viabilidade de pré-osteoblastos MC3T3-E1 aumentando a expressão de genes pró-apoptóticos e reduz a expressão de marcadores osteogênicos (GUO *et al.*, 2013, GAO *et al.*, 2015, CHANG *et al.*, 2021). A maior parte destes mecanismos são representados na figura 19 a seguir.

Figura 19 – Mecanismos de perda óssea associados à obesidade



Legenda: EROs – Espécies reativas de oxigênio; RNAs – Ácidos ribonucleicos.

Fonte: A autora, 2022.

Apesar de muitos trabalhos elucidarem diferentes mecanismos pelos quais a obesidade interfere na homeostasia óssea, ainda não existe um consenso se a doença proporciona consequências deletérias ou benéficas para a manutenção do tecido ósseo saudável. A participação de vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de pessoas com obesidade na regulação do remodelamento ósseo também é um tema pouco explorado e que requer melhor investigação.

### **As vesículas extracelulares:**

As vesículas extracelulares são estruturas formadas por uma bicamada lipídica e que podem conter em seu interior uma variedade de proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Estas vesículas são produzidas e liberadas por diferentes tipos de células incluindo as células animais, vegetais e bacterianas (SKOTLAND *et al.*, 2020). Inicialmente, quando as vesículas extracelulares foram descritas pela primeira vez por Pan e Johnstone em 1983, pensava-se que estas estruturas serviam apenas como um mecanismo de descarte de moléculas indesejadas para as células (PAN, JOHNSTONE, 1983). Porém, conforme os estudos nessa área avançavam, foi observado que além de uma forma de eliminação de resíduos, as vesículas extracelulares eram capazes de estabelecer a comunicação celular entre diferentes células, permitindo a entrega de diferentes moléculas de uma célula de origem para uma célula recipiente (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018). Devido a esses achados, na última década o interesse pela compreensão dos mecanismos de ação envolvendo as vesículas extracelulares cresceu significativamente (SKOTLAND *et al.*, 2020).

A liberação de vesículas está envolvida com eventos fisiológicos como a resposta imune, reparo tecidual, manutenção de células-tronco, comunicação no sistema nervoso central (GURUNG *et al.*, 2021) e inclusive calcificação de matriz extracelular óssea (HASEGAWA, 2018). Apesar disso, a comunicação intercelular estabelecida pelas vesículas também é responsável pelo desenvolvimento de processos patológicos como a carcinogênese, invasão/metástase, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, resistência à insulina, entre outros eventos (BECKER *et al.*, 2016, SHAH; PATEL; FREEDMAN, 2018; SIMEONE *et al.*, 2020; GURUNG *et al.*, 2021). Esta contundente influência sobre diferentes respostas biológicas se dá pela possibilidade destas vesículas serem entregues tanto dentro do microambiente onde são liberadas agindo de maneira parácrina, quanto pela sua disseminação sistêmica (ABELS; BREAKFIELD, 2016). As vesículas extracelulares já foram identificadas em diferentes fluidos corporais dentre eles o sangue, urina, líquido cefalorraquidiano, saliva, leite materno e líquido amniótico (PULLIERO *et al.*, 2019).

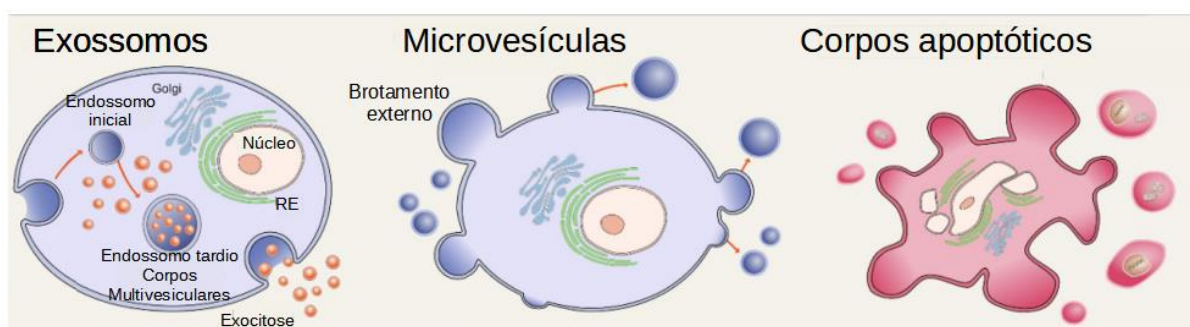
Além disso, as vesículas extracelulares oferecem uma barreira física que protege o seu conteúdo da ação de proteases e nucleases. A internalização de RNAs tanto codificantes como não-codificantes é necessária para a regulação de comportamentos celulares, mas por conta de sua natureza instável e de serem suscetíveis a degradação por endonucleases apresentam meia-vida curta. Logo, a entrega destes ácidos nucleicos através das vesículas extracelulares garante

um melhor aproveitamento dos mesmos (O'BREIN *et al.*, 2020). Estudos já demonstraram que as vesículas extracelulares são estruturas com estabilidade relativamente longa. Quando armazenadas a 37° C, mimetizando a temperatura do organismo humano, as vesículas permanecem preservadas por até 30 dias. Sob refrigeração, a conservação é prolongada para até 90 dias, sendo o melhor estado de integridade encontrado no grupo de vesículas mantidas à -80° C (KALRA *et al.*, 2013).

A parte de sua atividade biológica, a identificação das vesículas extracelulares nos fluidos corporais vem sendo utilizada como opção de biomarcadores para o diagnóstico de diversos cânceres como câncer de ovário, mama e pulmão; e para distúrbios renais, hepáticos, neurológicos, auto-imunes e hematológicos. Esta ferramenta poderia ser útil para a identificação de estágios iniciais destas patologias, facilitando o bom êxito do tratamento. Além disso, a possibilidade de utilizar as vesículas extracelulares como veículo de entrega de medicamentos é uma aposta para o direcionamento destes fármacos a determinados tecidos ou células, e para aumentar a meia-vida dos mesmos (SIMEONE *et al.*, 2020).

As vesículas extracelulares são classificadas quanto ao seu tamanho e origem. As vesículas com diâmetro entre 30 e 150nm são nomeadas exossomos. Estruturas com 100 a 1000nm são chamadas de microvesículas e as maiores vesículas já identificadas são os corpos apoptóticos que apresentam diâmetro acima de 1000nm. Quanto a sua formação, tanto as microvesículas quanto os corpos apoptóticos são formados a partir de brotamentos de membrana plasmática que são excitados da célula. Já os exossomos têm um mecanismo de formação mais complexo que se inicia com o brotamento interno da membrana do retículo endoplasmático e se encerra com a fusão de corpos multivesiculares (CMV) na membrana permitindo a liberação dos exossomos contidos no CMV (GURUNATHAN *et al.*, 2019). Os tipos de vesículas extracelulares são ilustrados na figura 20, abaixo.

Figura 20 – Classificação das vesículas extracelulares



Legenda: RE – Retículo Endoplasmático.

Fonte: Adaptado de GURUNATHAN *et al.*, 2019.

Os exossomos são formados quando os endossomos iniciais, provenientes da invaginação da membrana plasmática da célula, se fusionam com vesículas endocíticas, formando os endossomas tardios. Da membrana desses endossomas novas invaginações ocorrem englobando proteínas, lipídios e ácidos nucleicos que estavam presentes no citosol. Este acúmulo de várias vesículas intraluminais dentro do endossoma tardio forma o CMV, que ao final do processo pode ser degradado em lisossomos ou fusionado com a membrana celular para a exocitose das vesículas (ABELS; BREAKFIELD, 2016).

A geração de microvesículas está associada ao surgimento de balsas lipídicas e domínios caveolares. Condições de estresse celular promovem o influxo de cálcio que ativam enzimas como a floppase que induz a translocação da fosfatidilserina para a membrana externa da célula (SIMEONE *et al.*, 2020). Com mecanismos de geração similares ao das microvesículas, os corpos apoptóticos também podem ser marcados por anexina. Porém, são diferenciados pelo maior tamanho e pela presença de caspases em seu interior (SIMEONE *et al.*, 2020).

O conteúdo das vesículas extracelulares depende dos estímulos que receberam do microambiente bem como das condições de cultivo, no caso estudos *in vitro*. As diferentes metodologias de isolamento e os vários tipos de células secretoras de vesículas dificultam o estabelecimento do conteúdo proteico, lipídico e de ácidos nucleares comum entre todas as vesículas. Em uma análise geral, normalmente todas as vesículas possuem macromoléculas relacionadas à sua biogênese como RABGTPases, TSG101, ARF6, CD63, CD81, CD9, fosfatidilserina, ceramidas e diferentes tipos de RNAs codificantes ou não codificantes (ABELS; BREAKFIELD, 2016).

Uma vez liberadas, as vesículas extracelulares vão interagir com as células receptoras. Esse reconhecimento e internalização da vesícula na maior parte das vezes é mediado por um tropismo, o que faz a entrega dos conteúdos ocorrer de forma específica. A entrega dos conteúdos dentro da célula recipiente pode ocorrer por meio da macropinocitose, fagocitose, mecanismos “chave-fechadura”, endocitose mediada por clatrin, caveolinas e balsas lipídicas e a fusão da membrana plasmática com a membrana das vesículas. É possível também que o conteúdo da vesícula não seja entregue na célula receptora, mas que a interação com ligantes na membrana da vesícula dispare cascatas de sinalização na célula (GURUNG *et al.*, 2021). Em alguns casos, interação da vesícula com a célula receptora pode promover o rompimento da vesícula na superfície celular e seu conteúdo pode se ligar aos seus respectivos receptores na membrana plasmática ou ser endocitado (MAAS; BREAKFIELD; WEAVER, 2017).

## As vesículas extracelulares na obesidade: o papel no remodelamento ósseo

Como visto anteriormente, as vesículas extracelulares têm influência sobre o desenvolvimento de eventos fisiológicos e patológicos. De forma interessante, boa parte das interferências sistêmicas provocadas pela obesidade podem ser mediadas pela liberação de vesículas extracelulares pelo tecido adiposo obeso. O microambiente inflamatório encontrado no tecido adiposo de pessoas obesas e o *status* hipertrófico do adipócito refletem no conteúdo das vesículas extracelulares liberadas (KWAN *et al.*, 2021). Dessa maneira, as vesículas de tecido adiposo na obesidade contribuem com a resistência à insulina, regulação do apetite, exacerbação da inflamação do tecido adiposo, e desenvolvimento de cânceres associados à obesidade. As principais alterações encontradas nas vesículas liberadas por adipócitos hipertróficos derivados de tecido subcutâneo e visceral são o aumento de TGF- $\beta$ 1, MMPs, Leptina, perilipina e FABP4. Fatores pró-inflamatórios como IL-6, MIF e MCP-1 são mais abundantes nas vesículas de tecido adiposo visceral. (CAMINI *et al.*, 2020).

Em um estudo do nosso grupo de pesquisa, foi observado que ocorre um aumento na liberação de microvesículas circulantes derivadas de pré-adipócitos e leucócitos em pacientes obesos. Adicionalmente, foi identificado que explantes de tecido adiposo omental de pacientes obesos liberam mais microvesículas do que os explantes de tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos. As microvesículas liberadas de explantes de tecido adiposo obeso permitem a entrega de TLR8 para monócitos, favorecendo a maior infiltração destas células no tecido adiposo (RENOVATO-MARTINS *et al.*, 2017). Além disso, induzem um perfil mais agressivo em células tumorais de mama (RAMOS *et al.*, 2020).

Porém são escassos os trabalhos que abordam a comunicação entre o tecido adiposo e o tecido ósseo através das vesículas extracelulares, e nenhum retrata o efeito das vesículas liberadas no contexto da obesidade. Já foi demonstrado que vesículas extracelulares de adipócitos diferenciados *in vitro* entregam RNAs mensageiros adipogênicos como PPAR- $\gamma$ , CEBP- $\delta$  e leptina além de micro-RNAs anti-osteogênicos para osteoblastos também diferenciados *in vitro*. O tratamento com estas vesículas reduziu a expressão de osteopontina e osteocalcina nos osteoblastos (MARTIN *et al.*, 2015). De fato, as vesículas extracelulares de células maduras podem possuir fatores instrutivos para regular a diferenciação de progenitores. Foi descrito que exossomos liberados de osteoblastos são enriquecidos com RUNX2 e osterix, enquanto exossomos de adipócitos possuem PPAR- $\gamma$  e CEBP- $\alpha$ . Quando células mesenquimais

são incubadas com estes exossomos, favorecem a diferenciação para suas respectivas linhagens (NARAYAN *et al.*, 2018).

Já foi descrito que vesículas extracelulares derivadas ou não do tecido adiposo obeso podem carrear RNAs não codificantes que tem ação sobre a diferenciação de osteoblastos. O miR34a-5p é um ácido nucleico que se encontra superexpresso na obesidade e foi observado em exossomos de adipócitos derivados de tecido adiposo obeso (XU *et al.*, 2019). Outro estudo descreveu que o miR34a-5p inibe a diferenciação osteogênica tendo como alvo Wnt1 (GURHA, 2019). O miR155, também encontrado nos exossomos de macrófagos (YUAN *et al.*, 2021) e em microvesículas de adipócitos (NÓBREGA *et al.*, 2020) ambos derivados do tecido adiposo obeso, interfere na expressão de SMAD5 (ENDISHA *et al.*, 2021) e SOCS1 (PAN *et al.*, 2019) reduzindo a diferenciação de osteoblastos. Em um outro estudo, foi demonstrado que exossomos derivados de células mesenquimais possuem o RNA não codificante longo H19 que favorece a diferenciação osteogênica enquanto reduz a adipogênica. No contexto da obesidade, este RNA tem expressão reduzida (LOU *et al.*, 2019).

Desta forma, a falta de estudos que demonstrem o efeito direto das vesículas extracelulares de tecido adiposo obeso na regulação das alterações no tecido ósseo justifica a investigação deste tema.



## 1 OBJETIVOS

### 1.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito de fatores solúveis e vesículas extracelulares presentes no meio condicionado derivado de tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos ou obesos na diferenciação osteogênica *in vitro* da linhagem de osteoblastos humanos SAOS-2.

### 1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o efeito do meio condicionado derivado de tecido adiposo e das vesículas extracelulares sobre a proliferação e morfologia de osteoblastos humanos;
- b) Realizar a quantificação da expressão de marcadores iniciais e tardios de osteoblastos e de marcadores mesenquimais nas células tratadas com meio condicionado derivado de tecido adiposo e com as vesículas extracelulares;
- c) Observar os efeitos destes tratamentos sobre a atividade de calcificação de matriz extracelular;
- d) Avaliar interferências dos tratamentos sobre a ativação da via de sinalização osteogênica mediada pela  $\beta$ -Catenina;
- e) Identificar agentes presentes no meio condicionado e nas vesículas extracelulares responsáveis pelos possíveis efeitos observados com os tratamentos nos osteoblastos humanos;

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Células

As células utilizadas neste estudo são da linhagem imortalizada SAOS-2, que são osteoblastos humanos isolados de um osteosarcoma. Estas células foram obtidas comercialmente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

### 2.2 Cultura celular

As células SAOS-2 foram cultivadas em meio de cultura McCoys's 5A modificado com 1.5mM de L-Glutamina; 2,2 g/L de Bicarbonato de sódio; 5,2 g/L de tampão HEPES; 60 mg/L de Penicilina e 100 mg/L de Estreptomicina de sódio. O meio de cultura foi suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a uma concentração final de 10%. Para o subcultivo, quando as células atingiam 60-70% de confluência em garrafas de cultura, as mesmas eram lavadas com solução salina HANK's com 5mM de EDTA, e soltas através de dissociação enzimática com solução de Tripsina a 37° C por 5 minutos. Após a soltura das células, a atividade da Tripsina foi inibida com a adição de Meio de cultura com 10% de SFB no mesmo volume da solução enzimática. A suspensão de células resultante foi recolhida em tubos estéreis com tampa e centrifugada a 400x g, por 10 minutos a 20° C com aceleração e desaceleração 9. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células ressuspendido em meio de cultura com 10% SFB para contagem. A contagem foi realizada pelo método de azul de Trypan, no qual uma alíquota do ressuspendido de células é diluída em Azul de Trypan 0,2% em PBS na proporção de 1:20. As células viáveis, não coradas, foram contadas por quadrante na câmara de Neubauer e, ao final, a média do número de células por quadrante foi multiplicada pelo fator de diluição (20) e pelo valor de correção de volume para mL ( $10^4$ ). A partir do valor de células viáveis por mL de suspensão, as mesmas foram semeadas em novas garrafas de cultura ou em placas multiposos. Para a realização dos experimentos deste trabalho, foram utilizadas células nas passagens de número P3 a P8.

### **2.3 Recrutamento de pacientes obesos e eutróficos**

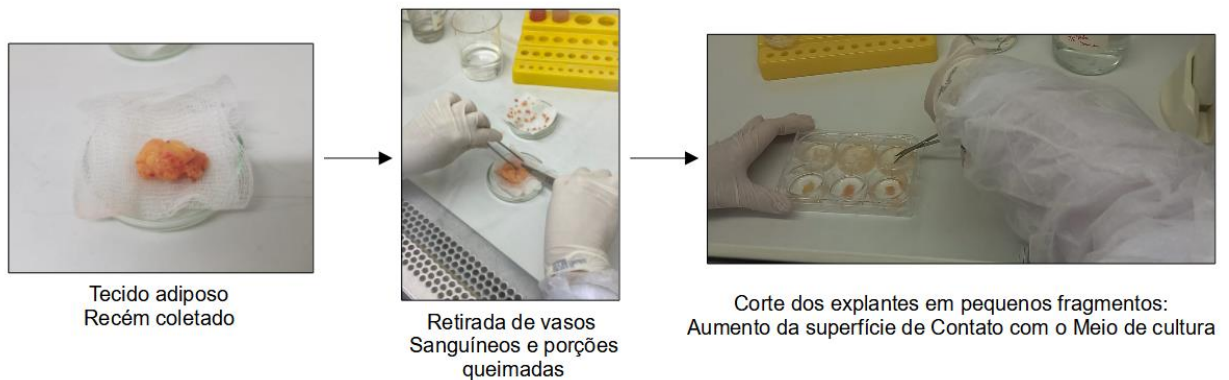
Este projeto de pesquisa foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em pesquisa para coleta das amostras no Hospital Federal de Ipanema (HFI) (CAAE: 36880914.0.0000.5259), e no Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) (CAAE: 5602121.2.0000.5259) (ANEXO A e B). Mediante esta autorização, recrutamos pacientes obesos eleitos para a cirurgia bariátrica no HUPE e HFI; com IMC igual ou superior a 30 Kg/m<sup>2</sup>, e que não apresentavam Diabetes do Tipo I ou Tipo II e Esteatose. Para o grupo de pacientes eutróficos, recrutamos pacientes eleitos para cirurgia plástica no HFI; com IMC variando de 18,5 a 25 Kg/m<sup>2</sup>, e que não apresentavam Diabetes do Tipo I ou Tipo II. De acordo com as normas do Comitê de ética em pesquisa humana, o projeto de pesquisa foi explicado de forma acessível para todos os pacientes e, aqueles que concordaram voluntariamente em participar do mesmo, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para a doação de amostras de sangue periférico e fragmentos de Tecido Adiposo Visceral e Subcutâneo durante seus respectivos procedimentos cirúrgicos. As coletas foram realizadas pelos anestesiologistas e cirurgiões responsáveis, com os pacientes anestesiados e sem comprometer o andamento das cirurgias nem a recuperação pós-cirúrgica. A idade dos pacientes incluídos nesta pesquisa varia de 26-45 anos, todos do sexo feminino.

### **2.4 Obtenção do meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano**

Os fragmentos de tecido adiposo subcutâneo foram armazenados inicialmente em tubos com tampa estéreis de 50 mL contendo 25 mL de PBS estéril, que foram imediatamente colocados em isopores com gelo para sua conservação. O tecido adiposo foi processado no Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular em até 4 horas após sua retirada do paciente. Inicialmente, o fragmento de tecido adiposo foi lavado em PBS para a retirada do excesso de sangue e, com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas autoclavadas, as porções queimadas pelo bisturi elétrico bem como os vasos sanguíneos foram retirados. O tecido limpo era então fragmentado em pedaços menores de aproximadamente 200-400 mg para pesagem em placas individuais estéreis (previamente pesadas para desconto da massa). Após a pesagem, os explantes foram inseridos em placas de 6 poços e em cada poço foi adicionado o volume de Meio de cultura M199 com 1% SFB (sem vermelho de fenol) correspondente à massa de tecido.

A proporção utilizada foi: a cada 100 mg de tecido adiposo foi adicionado 1000ul de Meio de cultura. Para o aumento da superfície de contato do meio com o tecido adiposo e consequente facilitação da secreção de fatores solúveis e vesículas extracelulares, o tecido adiposo foi cortado em pedaços bem menores, como mostra a figura 21 abaixo.

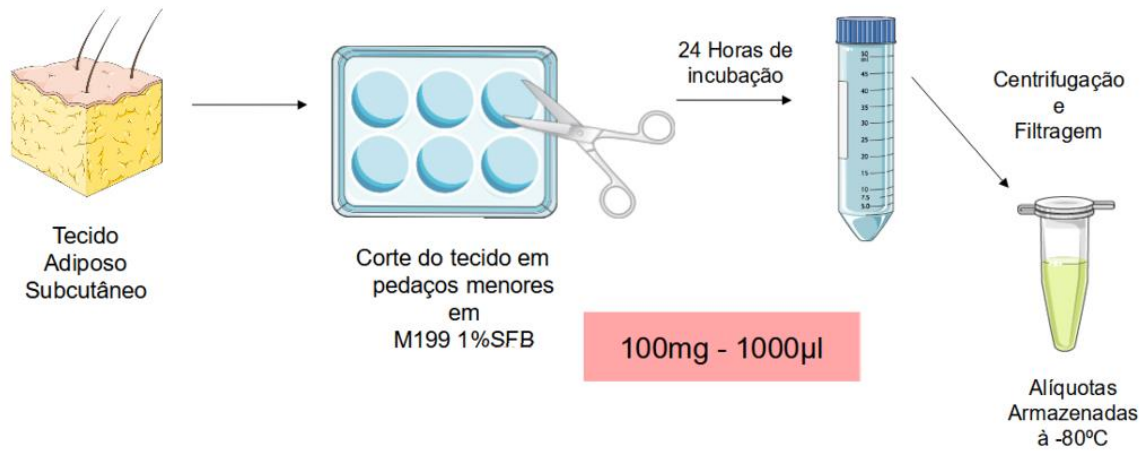
Figura 21 – Processamento do tecido adiposo subcutâneo humano para obtenção do meio condicionado



Fonte: A autora, 2022.

As placas com os explantes foram incubadas em estufas de cultura celular com 5% de CO<sub>2</sub> à 37° C por 24 horas. Após este período, o Meio condicionado foi aspirado com micropipeta, armazenado em tubo estéril de 50 mL com tampa e centrifugado a 2.000x g, por 10 minutos à 4° C para a remoção de células e debris. Depois de centrifugado, o sobrenadante foi filtrado em filtros de 0.22um, aliquotado e armazenado à -80° C até a utilização. Todo o procedimento foi esquematizado na figura 22 abaixo.

Figura 22 – Protocolo de obtenção do Meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano

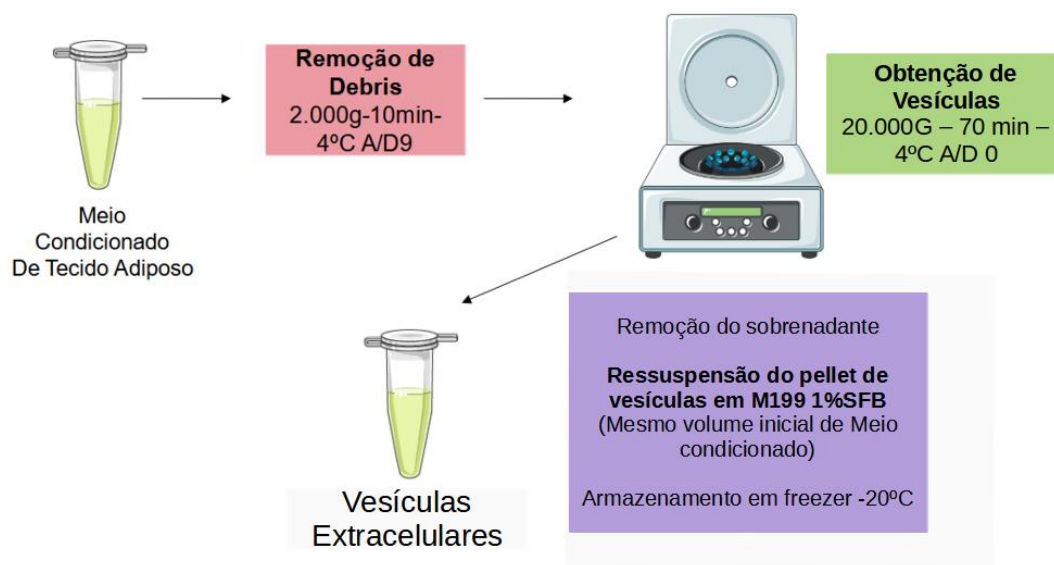


Fonte: A Autora, 2022

## 2.5 Obtenção das vesículas extracelulares do meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano

Para isolamento das vesículas extracelulares, o meio condicionado de tecido adiposo foi inicialmente centrifugado a 2.000 xg, por 10 minutos a 4° C com aceleração/desaceleração 9 para remoção de debris. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi transferido para novos microtubos estéreis com tampa e então centrifugados a 20.000x g, por 70 Minutos, à 4° C com aceleração/desaceleração 0. Após a centrifugação, o sobrenadante foi cuidadosamente removido com micropipeta e o *pellet* de vesículas foi ressuspensionado com Meio M199 1% SFB no mesmo volume inicial de meio condicionado utilizado para o isolamento. As vesículas foram alíquotadas e armazenadas a -20° C até a utilização. Todo o procedimento foi esquematizado na figura 23 abaixo.

Figura 23 – Protocolo de isolamento de vesículas extracelulares de meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo humano



Fonte: A autora, 2022.

## 2.6 Grupos experimentais e dose de meio condicionado e vesículas extracelulares para os experimentos

As células SAOS-2 foram tratadas com McCoy's 5A 10% SFB suplementado com 20% de meio Condicionado de tecido adiposo, sendo o grupo tratado com Meio Condicionado de eutróficos denominado pela sigla MCE, e o grupo tratado com Meio Condicionado de obesos denominado MCO. Da mesma forma, os experimentos conduzidos com as vesículas extracelulares foram realizados na concentração de 20% do volume final de meio de incubação, sendo os grupos identificados pelas Siglas análogas VEE para as vesículas de pacientes eutróficos e VEO para as vesículas de pacientes obesos. Os grupos denominados controle são aqueles que receberam apenas McCoy's 5A 10% SFB, sem suplementação.

## 2.7 Ensaio de Proliferação/viabilidade – MTT

As células SAOS-2 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $2 \times 10^4$  células por poço em meio McCoy's 5A suplementado com 10% SFB. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado e os tratamentos com Meio condicionado ou vesículas foram realizados por 48 horas. Para a avaliação do efeito dos tratamentos sobre a proliferação celular, foi

adicionado 10 $\mu$ L de solução de MTT em PBS (5mg/mL) por poço. A placa de cultura foi coberta com papel alumínio para proteção da luz e incubada por 4 horas em estufa de cultura a 37° C. Após esta etapa, o meio de cultura foi removido e 100 $\mu$ L de álcool Isopropílico P.A. foram adicionados por poço, para solubilização dos cristais de formazan intracelulares. Posteriormente, a placa foi inserida no leitor de placas Envision – Perkin Elmer para quantificação colorimétrica no comprimento de onda de 570nm.

## 2.8 Obtenção de extratos celulares proteicos

As células SAOS-2 foram semeadas em placas de 6 poços na densidade de 1x10<sup>6</sup> células por poço. Após 3 dias, foram adicionados os respectivos tratamentos com Meio de cultura suplementado com Meio condicionado ou vesículas extracelulares. Ao todo, as células foram incubadas com os estímulos por 7 dias, com troca de meio após os 3 primeiros dias de incubação. Após este período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado uma vez com PBS a 37° C e foram adicionados 200 $\mu$ L de Tampão RIPA gelado (SIGMA) com coquetel de inibidores PMSF, DNase, SBTI, ortovanadato de sódio, leupeptina e aprotinina. As placas para extrato foram colocadas sobre o gelo e com o auxílio de um *Cell Scraper*, as células foram lisadas. Após 30 minutos em contato com o tampão de lise, os extratos foram coletados e armazenados a -20° C para posterior análise.

## 2.9 Dosagem de proteínas dos extratos celulares e desnaturação das amostras

Para dosagem de proteínas das amostras foi utilizado o kit para dosagem BCA (ThermoFisher Scientific). Resumidamente, 3 $\mu$ L de cada amostra, do branco e de cada ponto da curva de BCA foram adicionadas em triplicata em placas de 96 poços. Após esta etapa, foi adicionado 200 $\mu$ L de solução de trabalho (preparada de acordo com o fabricante) por poço. A placa de dosagem de proteínas foi coberta com papel alumínio para proteção da luz e incubada por 30 minutos a 37° C. Após a incubação, a placa foi inserida no leitor de placas Envision – Perkin Elmer para quantificação colorimétrica no comprimento de onda de 562nm. A partir da dosagem de proteínas, foi calculado o volume ideal de cada amostra para que contivessem a mesma quantidade de proteínas. Para sua desnaturação, foi adicionado 20% do volume de amostra de tampão de amostra 5x concentrado (Glicerol, Hidróxido de Sódio,  $\beta$ -

Mercaptoetanol, SDS 10% e azul de bromofenol) e as mesmas foram fervidas em água destilada por 5 minutos.

### **2.10 Ensaio de Calcificação de matriz extracelular óssea – coloração com vermelho de Alizarina 2%**

As células SAOS-2 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço. Após 3 dias, foram iniciados os tratamentos de cada grupo experimental. Neste experimento, o grupo controle negativo consistia em células que recebiam apenas o meio McCoy's 5A 10% SFB, enquanto o grupo controle positivo recebia o meio de Diferenciação Osteogênica (McCoy's 5A 10% SFB com 10nM de  $\beta$ -Glicerofosfato de sódio, 50 $\mu$ g/mL de Ácido Ascórbico e 1 $\mu$ M de Dexametasona) para a calcificação de matriz extracelular. Desta forma, foi avaliada a capacidade de calcificação das células na presença do meio de diferenciação e 20% de Meio condicionado ou vesículas. As células foram expostas ao tratamento por 10 dias, com renovação total do meio a cada 3 dias. Após o estímulo, as células foram lavadas uma vez com PBS a 37° C, fixadas com Etanol 96% gelado por 10 minutos, lavadas duas vezes com água deionizada e incubadas com Vermelho de Alizarina 2% por 30 minutos ao abrigo da luz e a 37° C. Após remoção do corante e 3 lavagens com PBS, foram obtidas imagens no microscópio no aumento de 40x. Para quantificação da área calcificada, foi adicionado 200 $\mu$ l de Cloreto de Cetilpiridínio 10% em tampão fosfato de sódio 10mM pH7 sob agitação leve. Após 10 minutos, a placa foi inserida no leitor de placas Envision – Perkin Elmer, para a quantificação colorimétrica em 562nm.

### **2.11 Avaliação da morfologia celular – coloração com azul de metileno**

As células SAOS-2 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. Após 3 dias, receberam o tratamento com Meio Condicionado ou vesículas por mais 3 dias. Ao final do estímulo, as células foram lavadas uma vez com PBS a 37° C, fixadas com etanol 96% gelado por 10 minutos, lavadas duas vezes com água deionizada e coradas com solução de Azul de metileno 0,2% em PBS por 5 minutos. Após novas 3 lavagens com água deionizada, foram obtidas imagens em microscópio óptico no aumento de 100x.



## 2.12 Imunofluorescência

As células SAOS-2 foram semeadas sobre lamínulas de vidro, previamente cobertas com gelatina 1%, na densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços. Após 3 dias, as células foram tratadas com Meio Condicionado por adicionais 3 dias. Após o estímulo, as células foram lavadas uma vez com PBS a 37° C, fixadas em paraformaldeído 4% com sacarose por 30 minutos, lavadas com PBS, permeabilizadas com solução de Triton 0,2% em PBS, bloqueadas com BSA 5% em PBS por 45 minutos e incubadas *overnight* com os respectivos anticorpos primários, diluídos em BSA 1% em PBS na concentração de 1:400, a 4° C. No dia seguinte, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS; incubadas por 60 minutos a 4° C com o anticorpo secundário biotilado (diluído em BSA 1% em PBS na concentração de 1:400), lavadas 3 vezes com PBS, incubadas com o fluorocromo ALEXA 555 (diluído em BSA 1% em PBS na concentração de 1:400) por 60 minutos. Após esta última incubação, as lamínulas foram lavadas com PBS, contracoradas com DAPI e montadas para visualização em microscopia de fluorescência (Olympus IX71) no aumento de 600X. Nesta técnica foram observados os marcadores mesenquimais CD90, Vimentina e  $\alpha$ -Actina de Músculo Liso.

## 2.13 Western Blotting

Após desnaturação, volumes de amostras com a mesma quantidade de proteínas (6-8 $\mu$ g) foram submetidos a eletroforese por 70 minutos a 170V e 25mA em géis de Poliacrilamida SDS-PAGE (8; 10 e 12%) para a separação das proteínas pelo peso molecular. As proteínas presentes nos géis foram transferidas para membranas de PVDF, previamente ativadas com metanol, por 30 minutos a 25V e 1.0A no equipamento Trans-Blot® Turbo™ (Transfer System, Bio-Rad). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau Rouge 0,2% para confirmação da transferência, lavadas com água destilada para a remoção do corante e bloqueadas com leite desnatado 5% ou BSA 5% em TTBS 0,1% por 40 minutos. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas *overnight* a temperatura ambiente em agitação com os anticorpos primários para  $\beta$ -Actina (Millipore - 1:1000),  $\alpha$ -Tubulina (Sigma - 1:1000), Fosfatase Alcalina (Invitrogen - 1:1000), Colágeno do Tipo I (Invitrogen - 1:500), Osteopontina (Santa Cruz - 1:500), P-FAK Tyr 397 (Millipore - 1:500), FAK (Abcam - 1:500), P- $\beta$ Catenina (Cell Signalling - 1:500), Integrina  $\beta$ 1 (Santa Cruz - 1:500), Integrina  $\alpha$ 2 (Santa Cruz - 1:500), Integrina  $\alpha$ 5 (Santa Cruz - 1:500), Integrina  $\alpha$ v (Millipore - 1:500), CD90

(Proteintech – 1:1000), Vimentina (Sigma – 1:1000),  $\alpha$ -Actina de Músculo liso (Santa Cruz – 1:1000). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TTBS 0,1% 3 vezes por 10 minutos, incubadas com anticorpo secundário biotilado por 60 minutos (Rabbit, mouse e Goat – 1:5000), lavadas com TTBS 0,1% 3 vezes por 10 minutos, incubadas com Estreptavidina por 60 minutos (Invitrogen – 1:5000) e lavadas com TTBS 0,1% 3 vezes por 10 minutos. As membranas foram reveladas com ECL – PRIME Amersham no equipamento ChemiDoc Imaging System BIO-RAD. A quantificação das bandas foi realizada através do software ImageLab.

#### **2.14 Ensaio de transdiferenciação celular – indução de adipogênese em osteoblastos**

As células SAOS-2 foram semeadas na densidade de  $1,5 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços. Após 24 horas, as células foram pré-tratadas com meio de diferenciação osteogênico suplementado com 20% de MCO ou 20% de MCE por 3 dias. Posteriormente, o meio de cultura foi totalmente removido, e foi adicionado o meio de diferenciação adipogênico para todos os grupos experimentais de forma igual. O meio de diferenciação adipogênico foi preparado em McCoy's 5A 10% SFB com a suplementação de  $10 \mu\text{M}$  de insulina,  $1 \mu\text{M}$  de dexametasona e  $0,5 \text{mM}$  de isobutilmetilxantina. As células pré-tratadas foram cultivadas em meio adipogênico por 10 dias, com troca de meio a cada 3-4 dias. Após este período, as células foram lavadas 1 vez com PBS a  $37^\circ \text{C}$ , fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, lavadas uma vez com PBS e incubadas com solução de trabalho de Oil Red por 15 minutos em temperatura ambiente. A coloração foi removida, as células foram lavadas com água destilada por 3 vezes e observadas em microscópio ótico na objetiva de 20X.

#### **2.15 Avaliação do efeito de TGF- $\beta$ 1 sobre as células SAOS-2**

Para avaliar a participação de TGF- $\beta$  sobre os efeitos proporcionados, foi utilizado o anticorpo neutralizante para as três isoformas de TGF- $\beta$  (R&D Systems – MAB1835) administrado junto ao meio condicionado de tecido adiposo. Foi utilizada a dose máxima de neutralização segundo as normas do fabricante. Além disso, experimentos com TGF- $\beta$ 1 recombinante (Peprotech 100-21) nas doses de 20, 30 e  $40 \text{ng/mL}$  foram conduzidos para a confirmação dos efeitos observados com o meio condicionado.

## 2.16 Análise estatística

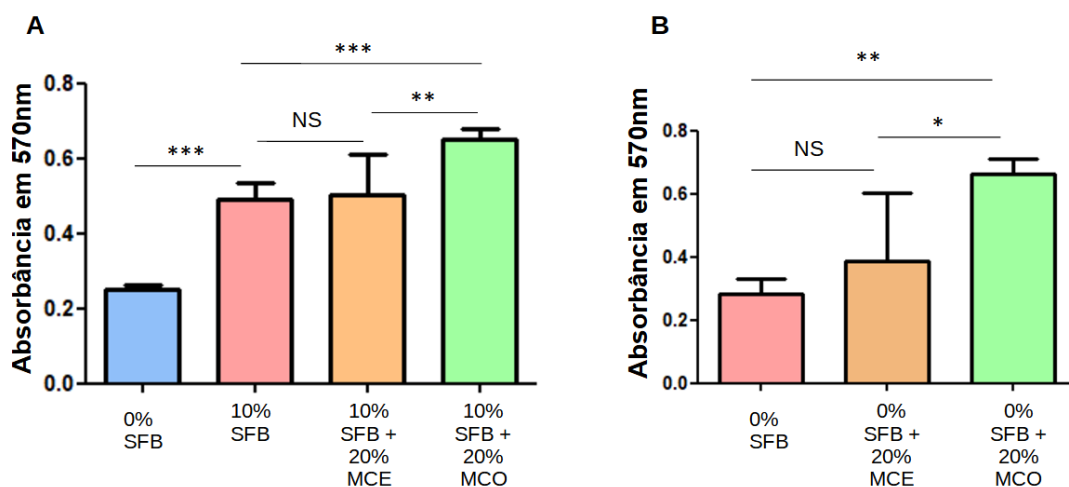
Os gráficos e testes estatísticos foram realizados no software GraphPad Prism versão 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Os dados foram disponibilizados em Média e Desvio Padrão das médias. Foram realizados o teste One-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Bonferroni. Em todas as análises, o valor de  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso aumenta a proliferação de osteoblastos

Células em estágios de diferenciação mais avançados apresentam uma relação inversa com a capacidade replicativa. Desta forma, osteoblastos maduros possuem uma reduzida taxa de proliferação quando comparados, por exemplo, com células osteoprogenitoras (ROSSI *et al.*, 2021). Visando avaliar a interferência do secretoma do tecido adiposo sobre a proliferação de osteoblastos tanto em condições fisiológicas, nos indivíduos eutróficos, como em condições patológicas, indivíduos com obesidade; foi realizado o tratamento das células SAOS-2 com meio condicionado derivado de tecido adiposo eutrófico ou obeso por 48 horas e a atividade proliferativa foi determinada através do ensaio de MTT. Através desta análise representada na figura 24, foi observado que o MCO induziu um aumento na proliferação tanto em comparação ao grupo controle (meio de Cultura 10% SFB) como em comparação ao grupo tratado com MCE. Ao mesmo tempo, o estímulo com MCE não interferiu na replicação das células (24A). De maneira similar, o MCO induziu um aumento na proliferação celular em meio sem SFB, e o MCE não promoveu alterações (24B).

Figura 24 - O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso aumenta a proliferação de osteoblastos



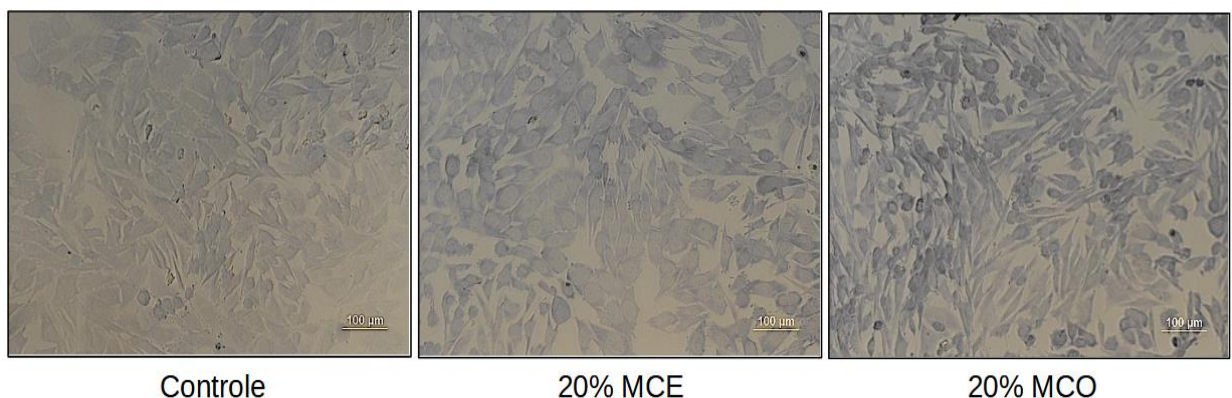
Legenda: O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso aumenta a proliferação de osteoblastos. As células SAOS-2 foram incubadas com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) ou obeso (MCO) por 48 horas em meio com 10% SFB (23 A) e na ausência de SFB (23B). A proliferação foi avaliada pelo

(continuação) ensaio de MTT. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP de 6 experimentos (23A) e 5 experimentos (23B) One -Way Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: A autora, 2022.

### 3.2 O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso induz mudança morfológica em osteoblastos

Osteoblastos são células de origem mesenquimal porém, similarmente às células que formam epitélios, possuem uma morfologia cuboidal e revestem a superfície óssea. Nas etapas de diferenciação osteogênica, células com formato mais alongado ou fibroblastóide estão associadas a estágios de menor grau de comprometimento (ROEDER; MATTHEWS; KALAJZIC, 2016). Para observar os efeitos do meio condicionado de tecido adiposo eutrófico ou obeso sobre a morfologia celular, as células SAOS-2 foram incubadas com os dois tipos de meio condicionado por 3 dias, fixadas e coradas com Azul de Metileno 0,2% para melhor visualização. Como pode ser observado na figura 25, as células tratadas com MCE permaneceram com morfologia semelhante ao grupo controle, células apresentando formato mais arredondado. Porém, diferentemente do grupo controle, as células tratadas com MCO adquiriram uma morfologia fibroblástica.

Figura 25 - O meio condicionado de tecido adiposo obeso induz mudança morfológica em osteoblastos

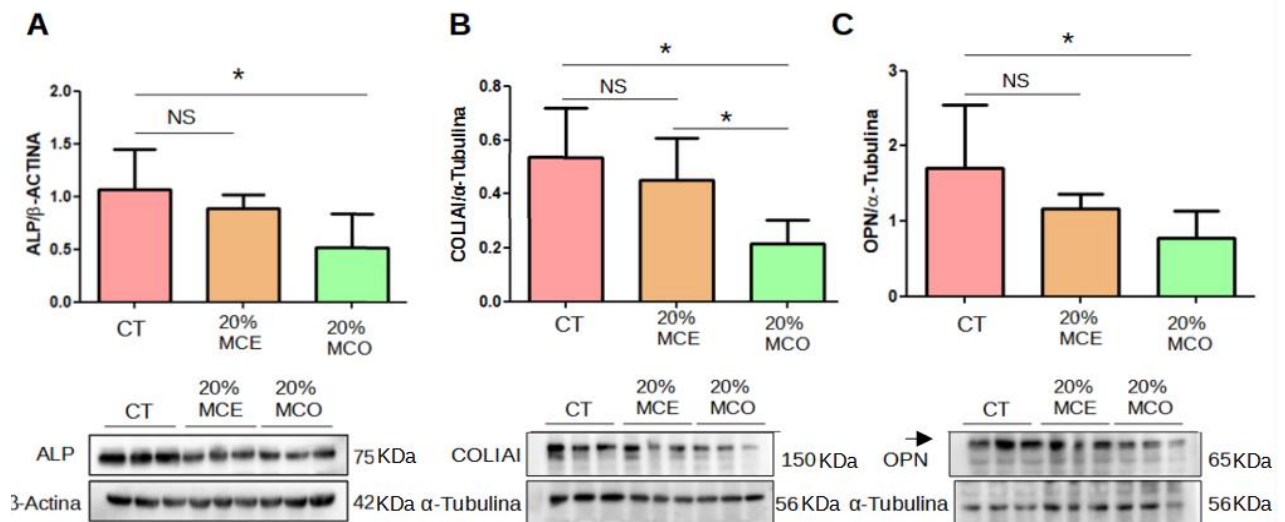


Legenda: O meio condicionado de tecido adiposo obeso induz mudança morfológica em osteoblastos. As células SAOS-2 foram tratadas com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) ou obeso (MCO) por 3 dias e coradas com azul de metileno para visualização. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 200X. Imagens representativas de 6 experimentos. Fonte: A autora, 2022.

### 3.3 O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso reduz a expressão de marcadores osteogênicos

Como mencionado anteriormente, os diferentes estágios da diferenciação osteogênica podem ser confirmados através da análise da expressão de marcadores iniciais e tardios (AMARASEKARA; KIM; RHO, 2021). Desta forma, foram obtidos extratos totais de células tratadas por 7 dias apenas com o Meio de Diferenciação osteogênica (Controle) ou com adição de 20% de MCE ou MCO em meio de diferenciação osteogênica. Tais extratos foram utilizados para a quantificação da expressão dos marcadores iniciais fosfatase alcalina (ALP) e colágeno do tipo I (COL1A1) e do marcador tardio osteopontina (OPN) pela técnica de *Western Blotting*. Foi possível observar nos gráficos da figura 26 que o estímulo com MCO reduziu a expressão de Fosfatase alcalina (26A), Colágeno do Tipo I (26B) e Osteopontina (26C) em comparação ao grupo controle. Ao mesmo tempo, o estímulo com MCE não foi capaz de interferir na expressão destes marcadores.

Figura 26 - O meio condicionado de tecido adiposo obeso reduz a expressão de marcadores osteogênicos



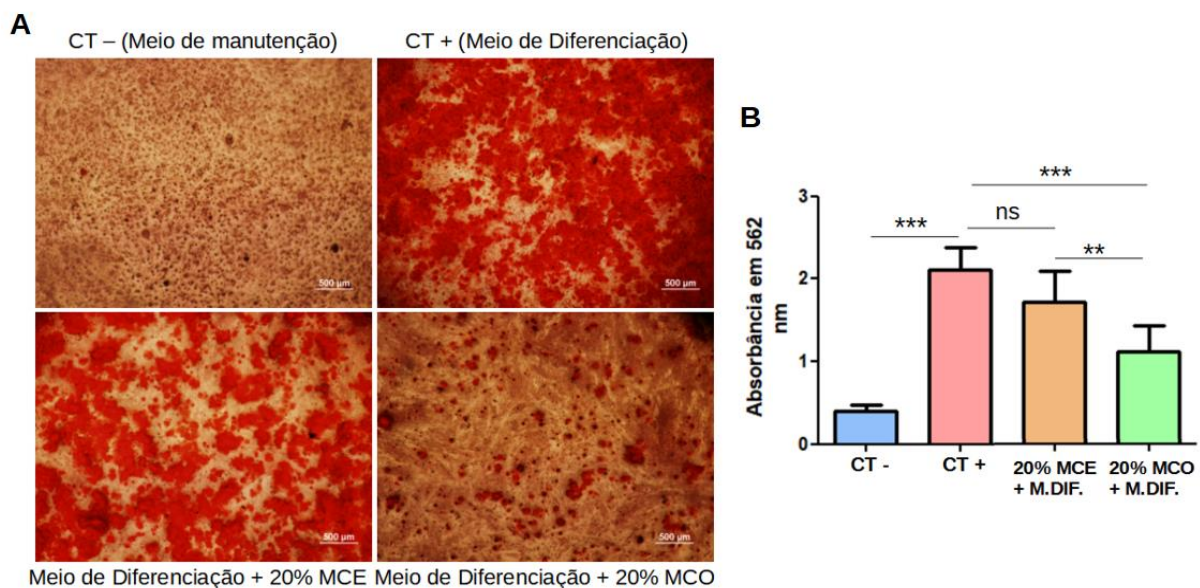
Legenda: O meio condicionado de tecido adiposo obeso reduz a expressão de marcadores osteogênicos. As células SAOS-2 foram tratadas com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) ou obeso (MCO) por 7 dias. O grupo controle recebeu apenas meio de diferenciação osteogênica. A quantificação da expressão de fosfatase alcalina (ALP) (26A), colágeno do tipo I (COL1A1) (26B) e osteopontina (OPN) (26C) foi realizada (continuação) através da densitometria das bandas. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 6 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: A autora, 2022.

### 3.4 O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso inibe a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*

Uma das principais características de osteoblastos em estágio maduro é a sua capacidade de mineralizar a matriz extracelular orgânica óssea (ROSSI *et al.*, 2021). Para avaliar o impacto do secretoma do tecido adiposo nas condições saudável e obeso sobre a habilidade de calcificação e, conseqüentemente, sobre o grau de diferenciação de osteoblastos; as células SAOS-2 foram incubadas por 10 dias com meio indutor de diferenciação osteogênica na presença ou ausência de meio condicionado de tecido adiposo eutrófico ou obeso. Como controle negativo, as células foram incubadas com meio de cultura de manutenção.

Foi possível observar que o tratamento com meio condicionado de tecido adiposo obeso inibiu a mineralização de matriz extracelular óssea em comparação ao grupo controle positivo e ao grupo tratado com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico. Ao mesmo tempo, não houve diferença na capacidade de calcificação entre o grupo controle positivo e o grupo tratado com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico. Os dados citados foram representados na figura 27.

Figura 27 - O Meio Condicionado derivado de Tecido adiposo Obeso inibe a calcificação de Matriz extracelular óssea *in vitro*



(Continuação) Legenda: O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso inibe a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*. As células SAOS-2 foram expostas ao meio indutor de diferenciação osteogênica

simultaneamente ou não ao MCE ou MCO por 10 dias. As células foram coradas com Vermelho de Alizarina 2%, imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 40x (27A) e a coloração foi extraída com Cloreto de Cetilpiridínio 10% para quantificação na absorbância de 562nm (27B). Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 7 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .  
Fonte: A autora, 2022.

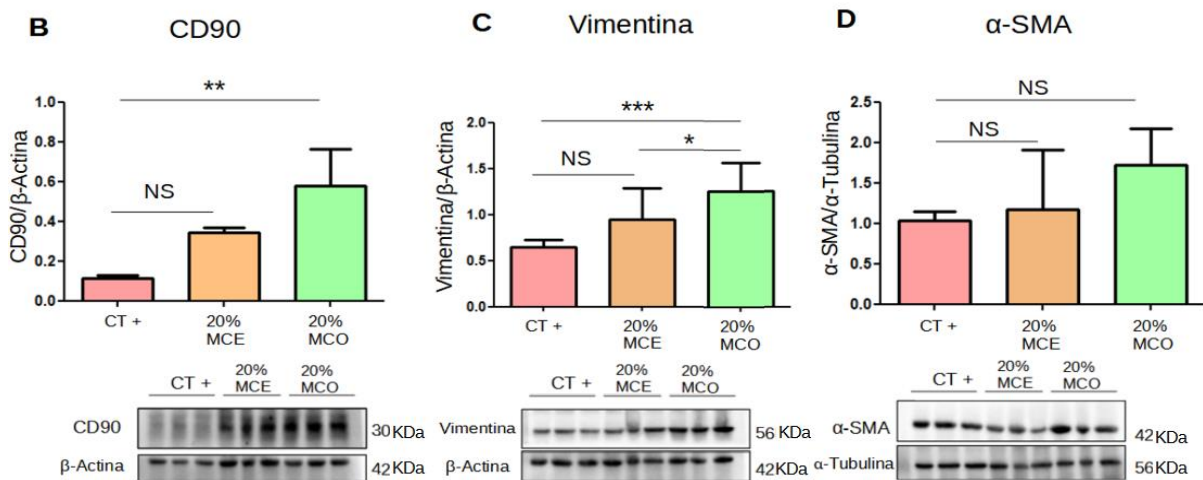
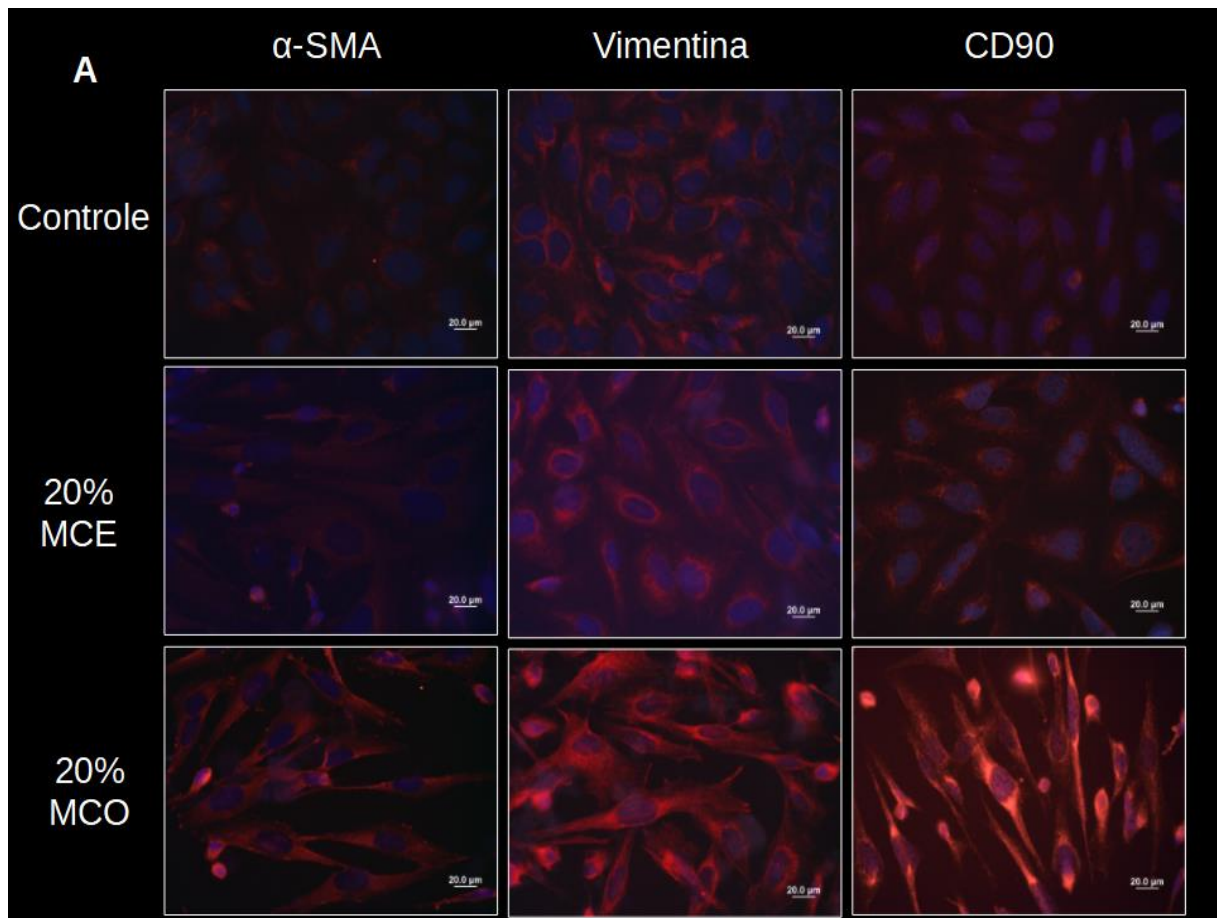
### **3.5 O meio condicionado de tecido adiposo obeso aumenta a expressão de marcadores mesenquimais em osteoblastos**

Mediante aos dados anteriores que demonstravam uma possível regressão de fenótipo de osteoblastos tratados com meio condicionado de tecido adiposo obeso, foi investigada a expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais e de osteoprogenitores CD90, Vimentina (VIM) e  $\alpha$ -actina de Músculo liso ( $\alpha$ -SMA) (DOMINICI *et al.*, 2006, OSTROUSKA; MCCULLOCH, 2021, ROEDER, MATTHEWS; KALAJZICA, 2016) nos grupos experimentais através de imunofluorescência. Foi observado que enquanto as células do grupo controle e do grupo tratado com meio condicionado derivado de tecido adiposo eutrófico apresentavam baixa expressão dos marcadores acima mencionados associado à morfologia cubóide, as células tratadas com Meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso possuíam uma maior expressão dos marcadores mesenquimais conjuntamente a morfologia fibroblástica (Figura 28A).

Para a confirmação de que estes marcadores realmente estavam mais expressos nas células tratadas com meio condicionado de tecido adiposo obeso fizemos a quantificação destas proteínas por Western Blotting em 7 dias de estímulo. Foi possível observar um aumento na expressão de vimentina (28C) comparado ao grupo controle e ao grupo tratado com MCE, e de CD90 (28B) comparado ao grupo controle. A expressão de  $\alpha$ -SMA (28D) apresentou apenas uma tendência de aumento, sem gerar diferença estatística.



Figura 28 - O Meio Condicionado de Tecido adiposo Obeso aumenta a expressão de marcadores mesenquimais em osteoblastos



Legenda: O Meio Condicionado derivado de Tecido adiposo Obeso aumenta a expressão de marcadores mesenquimais em osteoblastos. As células SAOS-2 foram tratadas com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) ou obeso (MCO) por 3 dias. A expressão de CD90, Vimentina e  $\alpha$ -SMA (Figura 28A) foi avaliada através de imunofluorescência no aumento de 600x. Dados obtidos de 3 experimentos. A quantificação da expressão de CD90 (figura 28B), Vimentina (Figura 28C) e  $\alpha$ -SMA (Figura 28D) foi realizada por western

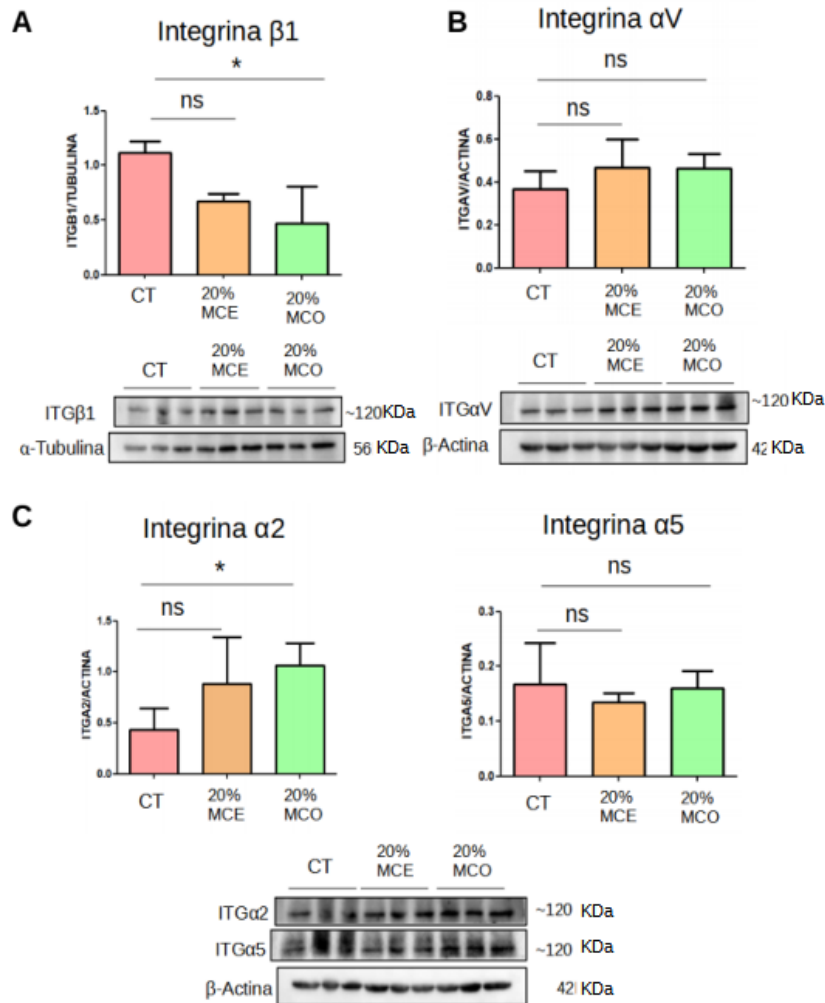
(continuação) blotting em células tratadas por 7 dias com MCE ou MCO. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 3-6 experimentos. One-Way Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .  
Fonte: A autora, 2022.

### **3.6 O meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso modifica o perfil de expressão de integrinas**

Durante a elaboração do protocolo de imunofluorescência, foi percebido que principalmente as células tratadas com meio condicionado de tecido adiposo obeso perdiam a adesão às lamínulas durante as etapas de marcação, o que inviabilizou alguns experimentos iniciais (dado não mostrado). Este comportamento de perda de adesividade foi relatado em osteoblastos que sofreram desdiferenciação *in vitro* devido ao estímulo com microgravidade (GIOIA *et al.*, 2018). Devido ao fato das integrinas serem uma das principais proteínas de adesão expressas pelo osteoblastos e terem um papel fundamental na interação com matriz extracelular e maturação celular, foi avaliado o efeito do secretoma de tecido adiposo obeso sobre a expressão das integrinas  $\alpha 2$ ;  $\alpha 5$ ;  $\alpha V$  e  $\beta 1$ .

Como demonstrado na figura 29, o estímulo com MCO reduziu a expressão da integrina  $\beta 1$  nas células SAOS-2 em comparação ao grupo controle. Apesar disso, o MCE não interferiu na expressão desta subunidade. A expressão das integrinas  $\alpha 5$  e  $\alpha V$  não foram comprometidas pela influência dos dois tipos de meio condicionado. Porém, a expressão da integrina  $\alpha 2$  foi aumentada com o tratamento com MCO em comparação ao grupo controle, enquanto o MCE não provocou mudanças significativas.

Figura 29 - O Meio condicionado derivado de tecido adiposo Obeso modifica o perfil de expressão de Integrinas



Legenda: O Meio condicionado de tecido adiposo obeso modifica o perfil de expressão de Integrinas. Avaliação por western blotting da expressão das Integrinas  $\beta 1$  (29A);  $\alpha V$  (29B),  $\alpha 2$  e  $\alpha 5$  (29C) em osteoblastos tratados com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) ou obeso (MCO) por 7 dias. A quantificação da expressão foi realizada através da densitometria das bandas. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 3-6 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni  $*p < 0,05$ . Fonte: A autora, 2022.

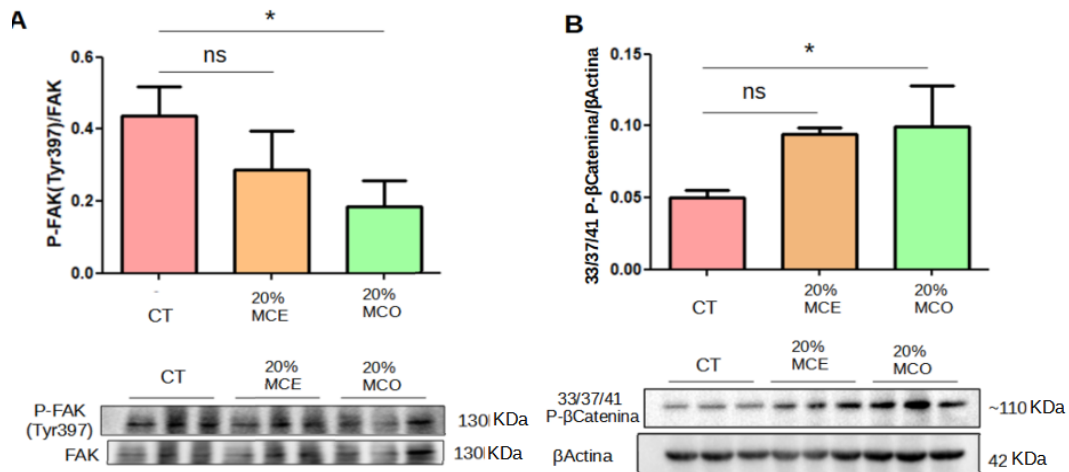
### 3.7 O Meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso interfere na sinalização mediada por P-FAK(Tyr 397) e promove a degradação de $\beta$ -Catenina

A ativação das integrinas expressas por células osteoprogenitoras e osteoblastos promove a fosforilação da FAK, que consequentemente, ativa tanto as vias de sinalização ERK quanto de PI3K-AKT que estão envolvidas com proliferação/sobrevivência e diferenciação

osteogênica. (MARIE, 2013). Já foi demonstrado que, em células-tronco mesenquimais, a ativação de integrina  $\alpha 5\beta 1$  culmina com a fosforilação de FAK que, através da ativação da via de PI3K-AKT, bloqueia a fosforilação de  $\beta$ -Catenina nos resíduos serina 33 e 37; e tirosina 41. Desta forma, a  $\beta$ -Catenina não fosforilada nestes sítios transloca para o núcleo e media a expressão de genes essenciais para a osteogênese (SAIDAK *et al.*, 2015). Ao contrário, quando fosforilada a  $\beta$ -Catenina é encaminhada a degradação.

Devido à redução da expressão da integrina  $\beta 1$  e mudanças morfológicas apresentadas pelas células tratadas com Meio condicionado de tecido adiposo obeso, foi investigado o papel das alterações promovidas pela obesidade sobre a ativação de FAK. Conforme ilustrado na figura 30, o estímulo com MCO reduziu a fosforilação de FAK no resíduo tirosina 397 (30A) ao mesmo tempo que aumentou a fosforilação de  $\beta$ -Catenina (30B), quando comparado ao grupo controle. Corroborando com dados anteriores, o MCE não alterou a fosforilação das duas proteínas avaliadas.

Figura 30 - O Meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso interfere na sinalização mediada por P-FAK(Tyr 397) e promove a degradação de  $\beta$ -Catenina



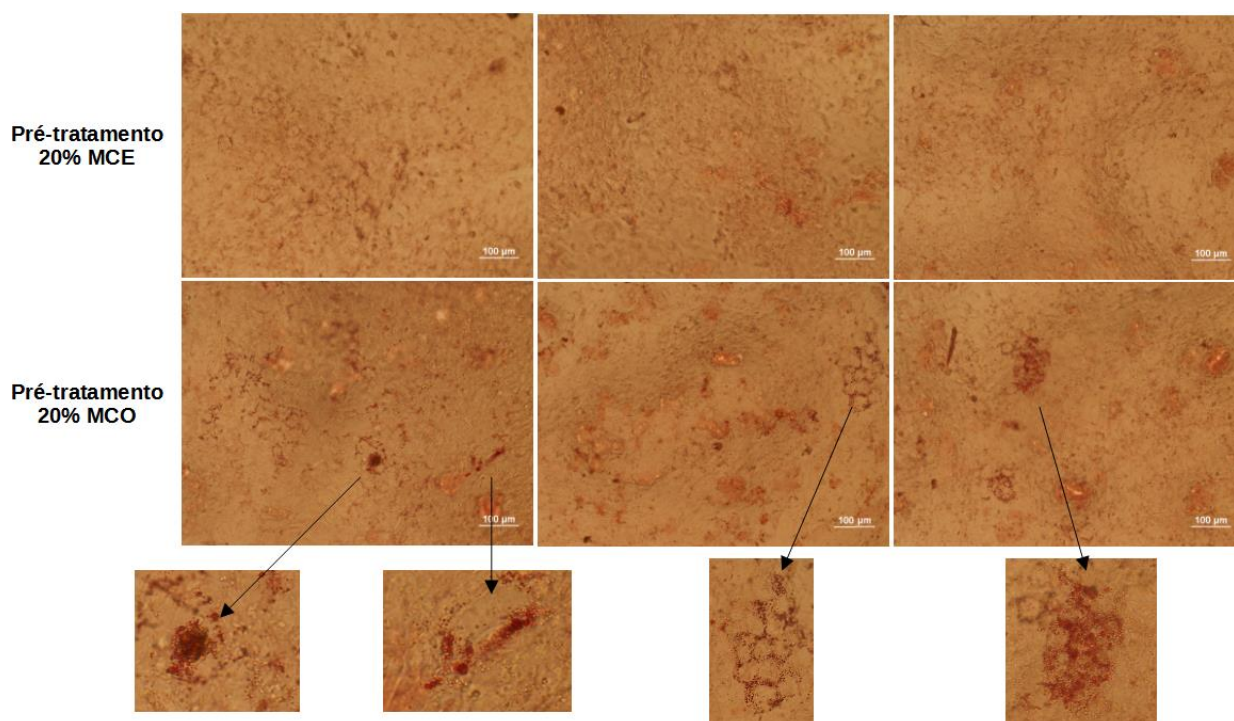
Legenda: O Meio Condicionado derivado de Tecido adiposo Obeso interfere na sinalização mediada por P-FAK(Tyr 397) culminando com a degradação de  $\beta$ -Catenina. Western blotting de extratos totais de células tratadas por 7 dias com meio de diferenciação (CT), Meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) e obeso (MCO). A quantificação da expressão foi realizada através da densitometria das bandas. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 3 experimentos. One-Way Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$ . Fonte: A autora, 2022.

### **3.8 O pré-tratamento com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso em osteoblastos favorece a formação de células *adipocyte-like* quando cultivadas em meio de diferenciação adipogênica**

Devido aos indícios de que os osteoblastos tratados com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso sofriam desdiferenciação, avaliamos se estas células desdiferenciadas possuíam habilidade de se diferenciarem em outro tipo celular mesenquimal como os adipócitos. Para isso, pré-tratamos as células por 3 dias com meio de diferenciação osteogênico suplementado com 20% do volume de MCE ou MCO. Após este período, o meio de cultura foi trocado e todos os grupos receberam somente meio de diferenciação adipogênico por 10 dias, com troca de meio ocorrendo a cada 3-4 dias. Ao final do protocolo, as células foram fixadas e coradas com solução de Oil red, para a observação de gotículas de lipídios no interior das células.

As imagens de microscopia obtidas revelam que o pré-tratamento com meio condicionado de tecido adiposo obeso favoreceu a formação de alguns grupos de células que apresentavam depósitos lipídicos em seu interior, ressalta-se que estes grupos de células não eram predominantes na cultura. Ao contrário, não foi possível observar a presença destes grupos de células *adipocyte-like* no grupo que recebeu o pré-tratamento com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico. Este dado indica que o MCO pode contribuir para o processo de transdiferenciação de osteoblastos em adipócitos, porém mais avaliações ainda são necessárias para a confirmação deste efeito. As imagens deste experimento podem ser observadas na figura 31 abaixo.

Figura 31 - O pré-tratamento com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso em osteoblastos favorece a formação de células *adipocyte-like* quando cultivadas em meio de diferenciação adipogênica



Legenda: O pré-tratamento com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso em osteoblastos favorece a formação de células *adipocyte-like* quando cultivadas em meio de diferenciação adipogênica. As células SAOS-2 foram pré-tratadas com meio condicionado de tecido adiposo eutrófico (MCE) ou obeso (MCO) por 3 dias e cultivadas em meio adipogênico por 10 dias. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 200X após coloração com Oil red. Imagens representativas de 4 experimentos. Fonte: A autora, 2022.

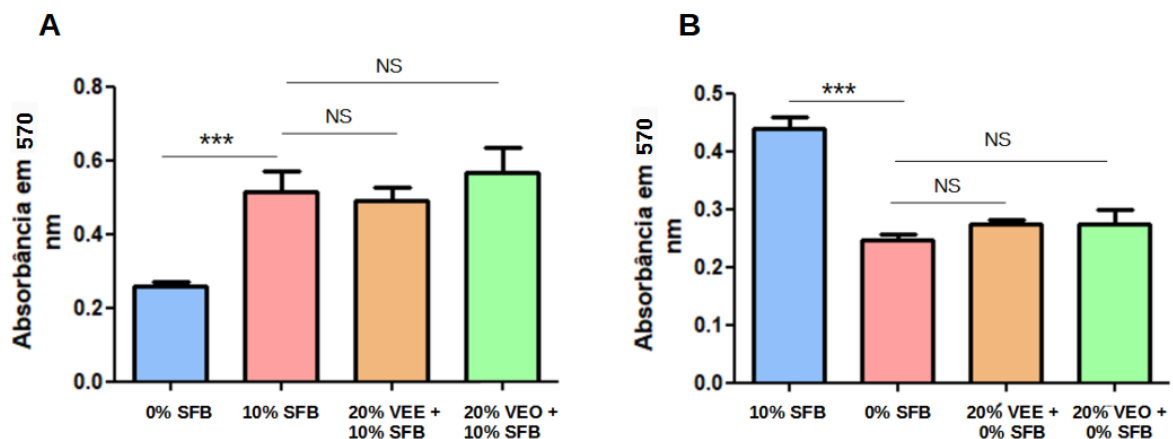
### 3.9 As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não alteram a proliferação de osteoblastos

Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram a importância das vesículas liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos no aumento do perfil inflamatório de monócitos e na malignidade de células tumorais de mama (RENOVATO-MARTINS et al., 2017; RAMOS et al., 2020). Por conta disso, investigamos a participação das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de indivíduos obesos sobre a regressão de fenótipo de osteoblastos maduros *in vitro*, promovida pelo meio condicionado de tecido adiposo obeso (A autora, 2022).

Inicialmente, realizamos o ensaio de MTT para avaliação da proliferação e viabilidade nas células tratadas com as vesículas derivadas do tecido adiposo de pacientes eutróficos (VEE)

ou de pacientes obesos (VEO) por 48 horas. Como observado da figura 32A, o estímulo com VEE ou VEO, na presença de meio de cultura com 10% de SFB, não comprometeu a viabilidade nem aumentou a proliferação de osteoblastos comparado ao grupo controle. Dados similares foram obtidos quando o estímulo foi realizado na ausência de SFB (32B).

Figura 32 - As vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo obeso não alteram a proliferação de osteoblastos



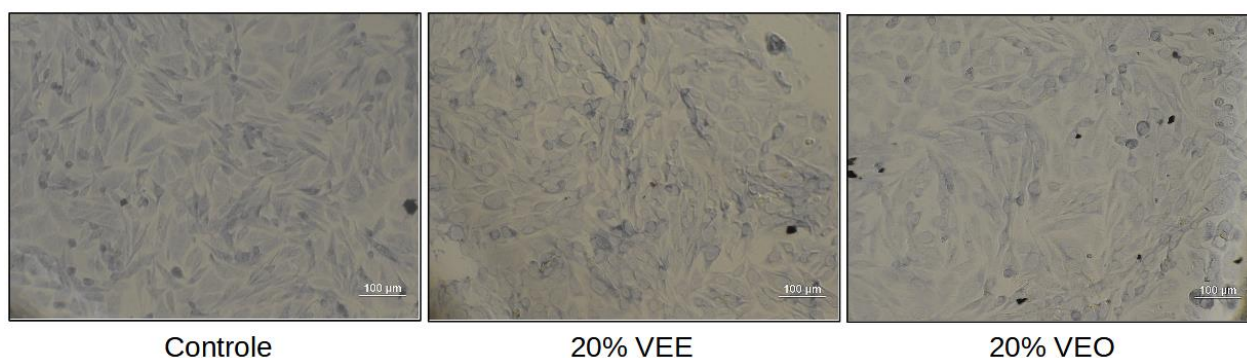
Legenda: As vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo obeso não alteram a proliferação de osteoblastos. As células SAOS-2 foram incubadas com 20% do volume final do meio de cultura com vesículas de tecido adiposo eutrófico (VEE) ou obeso (VEO) por 48 horas. A proliferação foi avaliada pelo ensaio de MTT. O estímulo foi realizado em meio de cultura com 10% SFB (32A), ou em meio de cultura sem SFB (32B). Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP de 4 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: A autora, 2022.

### 3.10 As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não modificam a morfologia de osteoblastos

Para avaliar a participação das vesículas sobre a alteração morfológica promovida pelo meio condicionado de tecido adiposo de pacientes obesos, as células SAOS-2 foram tratadas por 72 horas com VEE ou VEO. Após este período, as células foram fixadas e coradas com azul de metileno 0,2% para melhor visualização.

Foi possível observar que as VEO não foram capazes de alterar a morfologia dos osteoblastos, que diferentemente das células tratadas com MCO, permaneceram com o formato arredondado. As imagens deste experimentos são representadas na figura 33.

Figura 33 - As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo Obeso não modificam a morfologia de osteoblastos



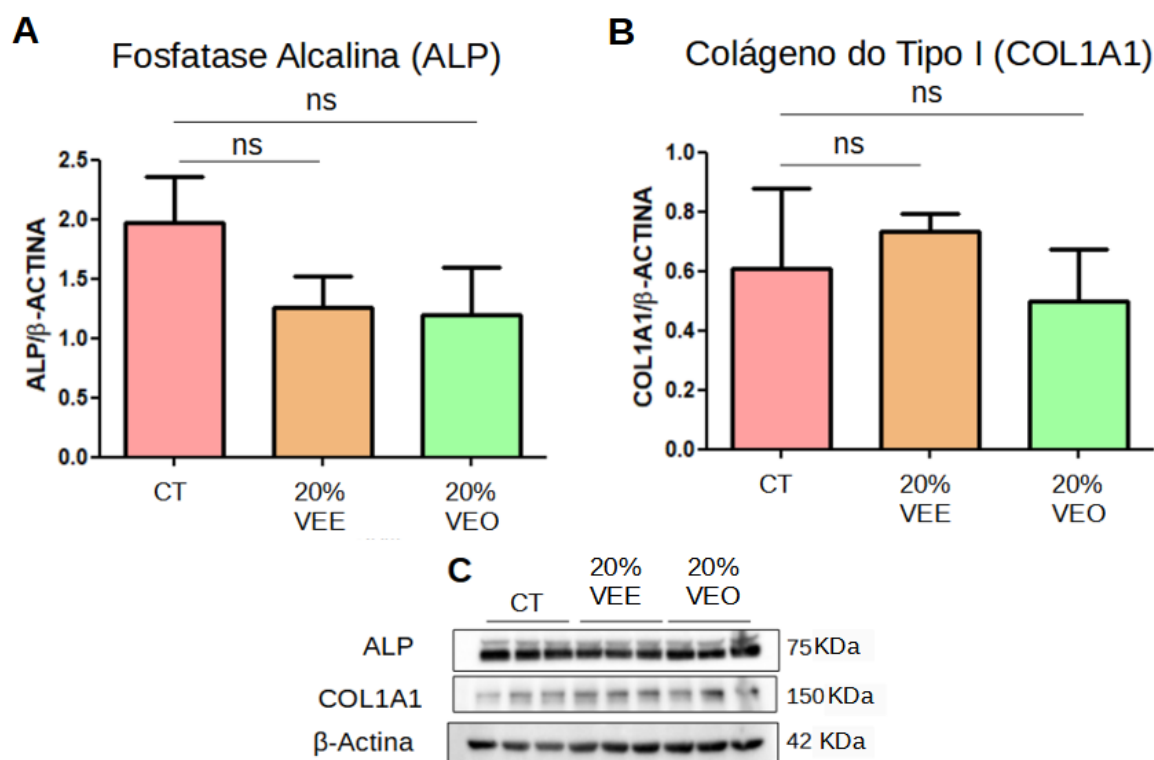
Legenda: As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não modificam a morfologia de osteoblastos. As células SAOS-2 foram tratadas com vesículas de tecido adiposo eutrófico (VEE) ou obeso (VEO) por 3 dias e coradas com azul de metileno para visualização. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 200X. Imagens representativas de 4 experimentos. Fonte: A autora, 2022.

### 3.11 As vesículas extracelulares de tecido adiposo obeso não interferem na expressão de marcadores osteogênicos

Para investigar a participação das VEO na redução dos marcadores osteogênicos promovido pelo tratamento com MCO, as células SAOS-2 foram cultivadas por 7 dias na presença de 20% de VEE ou VEO em meio de diferenciação osteogênica. Após este período, foram obtidos extratos celulares cujas proteínas foram avaliadas por *western blotting*. Como observado nos gráficos da figura 33, as MVO não interferiram na expressão de Fosfatase alcalina (34A) e colágeno do Tipo I (34B) comparado ao grupo tratado com 20% VEE e também ao grupo controle.



Figura 34 - As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não interferem na expressão de marcadores osteogênicos



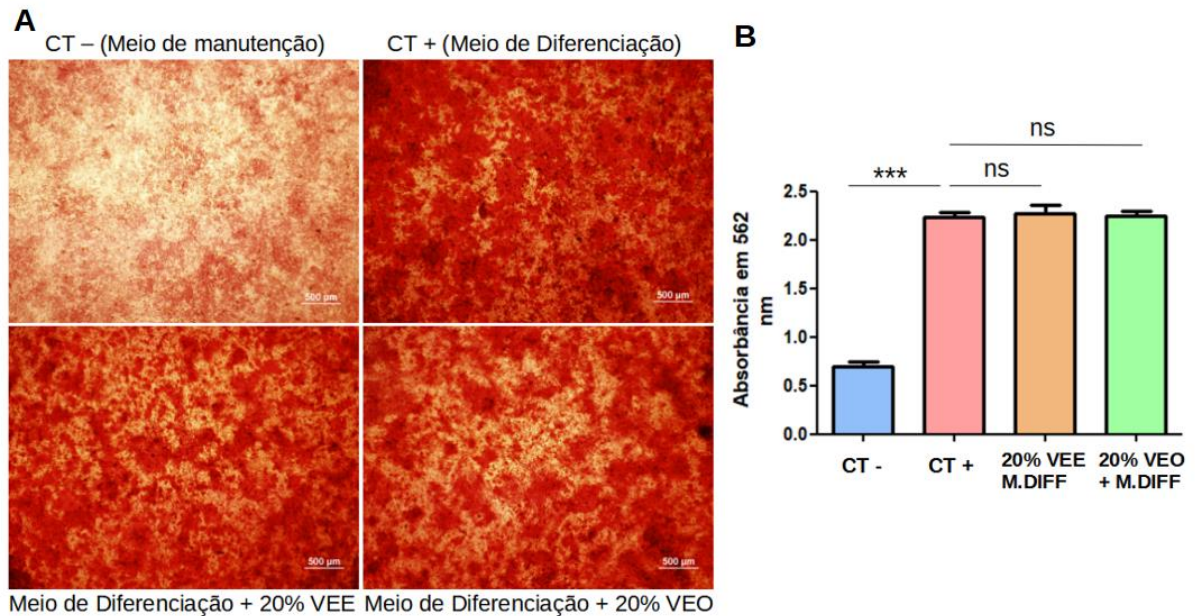
Legenda: As vesículas extracelulares derivadas de Tecido adiposo obeso não interferem na expressão de marcadores osteogênicos. As células SAOS-2 foram tratadas com vesículas de tecido adiposo eutrófico (VEE) ou obeso (VEO) por 7 dias. O grupo controle recebeu apenas meio de diferenciação osteogênica. A quantificação da expressão de fosfatase alcalina (ALP) (34A) e colágeno do tipo I (COL1A1) (34B) foi realizada através da densitometria das bandas (34C). Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 3 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: A autora, 2022.

### 3.12 As vesículas extracelulares derivadas de tecido adiposo obeso não comprometem a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*

Visando observar se as vesículas derivadas de tecido adiposo de pacientes obesos são relevantes para a inibição da calcificação de matriz extracelular promovida pelo meio condicionado de tecido adiposo obeso, as células SAOS-2 foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênica por 10 dias, na presença ou ausência de 20% de VEE ou VEO. Após este tratamento, as células foram fixadas, coradas com Vermelho de Alizarina 2% (35A) e a área calcificada foi quantificada pelo método de extração com Cloreto de cetilpiridínio 10% (35B). Como foi observado na figura 35, as VEO não foram capazes de inibir a calcificação de

matriz extracelular comparado ao grupo controle positivo e em comparação ao grupo tratado com 20% de VEE. Ao final desse conjunto de resultados, concluímos que as VEO não promovem a regressão de fenótipo de osteoblastos maduros provocada pelo MCO.

Figura 35 - As vesículas extracelulares de tecido adiposo obeso não comprometem a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*



Legenda: As vesículas extracelulares de tecido adiposo obeso não comprometem a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*. As células SAOS-2 foram expostas ao meio indutor de diferenciação osteogênica simultaneamente ou não ao VEE ou VEO por 10 dias. As células foram coradas com Vermelho de Alizarina 2%, imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 40x (35A) e a coloração foi extraída com Cloreto de Cetilpiridínio 10% para quantificação na absorbância de 562nm (35B). Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 4 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ .  
Fonte: A autora, 2022.

### 3.13 O meio condicionado de tecido adiposo obeso é enriquecido com TGF- $\beta$ 1

Em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, foi realizada a dosagem de adipocinas em amostras de meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos e obesos. Foram dosadas as adipocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , MCP-1, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 e TGF- $\beta$ 3. Os resultados desta análise, ilustrados na tabela 4 abaixo, demonstraram que em comparação

ao secretoma do tecido adiposo subcutâneo eutrófico, o tecido adiposo subcutâneo de pacientes com obesidade libera quantidades elevadas de TGF- $\beta$ 1.

Tabela 4 - O meio condicionado de tecido adiposo obeso é enriquecido com TGF- $\beta$ 1

Adipocinas	TAS Eutrófico	TAS Obeso
MCP-1 (ng/mL)	6,42 $\pm$ 1,62	7,04 $\pm$ 0,47
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	4,42 $\pm$ 2,83	4,07 $\pm$ 1,32
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,7 $\pm$ 0,47	0,63 $\pm$ 0,23
IL-6 (ng/mL)	1,89 $\pm$ 0,99	1,94 $\pm$ 0,68
<b>TGF-<math>\beta</math>1 (pg/mL)</b>	<b>113,04 <math>\pm</math> 16,1</b>	<b>188,7 <math>\pm</math> 60,03#</b>
TGF- $\beta$ 2 (pg/mL)	0,49 $\pm$ 0,39	0,17 $\pm$ 0,07
TGF- $\beta$ 3 (pg/mL)	35,69 $\pm$ 6,38	36,01 $\pm$ 2,22

Legenda: O meio condicionado de tecido adiposo obeso é enriquecido com TGF- $\beta$ 1. A dosagem de adipocinas foi realizada no meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo (TAS) de pacientes eutróficos e obesos. Fonte: RAMOS-ANDRADE, 2022.

Baseando-se nesta diferença de concentração e do papel inibitório de TGF- $\beta$  sobre a maturação de osteoblastos já descrito previamente (WU, CHEN, LI, 2016), investigamos se este fator de crescimento estava envolvido com os efeitos mediados pelo meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso em osteoblastos.

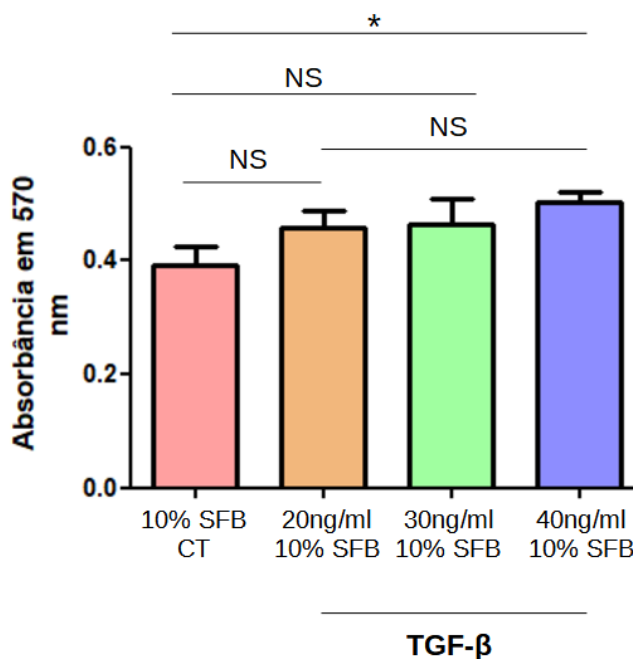
### 3.14 TGF- $\beta$ 1 induz um aumento na proliferação de osteoblastos

Para avaliar se o estímulo com TGF- $\beta$ 1 gerava dados similares aos dados observados com meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso, inicialmente as células SAOS-2 foram tratadas com TGF- $\beta$ 1 nas doses de 20, 30 e 40ng/mL por 48 horas e a viabilidade/proliferação foi aferida através do ensaio de MTT. Este tratamento foi realizado em meio de cultura de manutenção contendo 10% de soro fetal bovino.

Observamos que a adição de TGF- $\beta$ 1 nas doses de 20 e 30 ng/mL não alteraram a proliferação de osteoblastos, apenas uma tendência de aumento. Porém, no grupo que recebeu

a dose de 40ng/mL foi observado um aumento na proliferação das células tratadas em comparação ao controle. Este dado foi representado na figura 36 abaixo.

Figura 36 - TGF- $\beta$ 1 induz um aumento na proliferação de osteoblastos



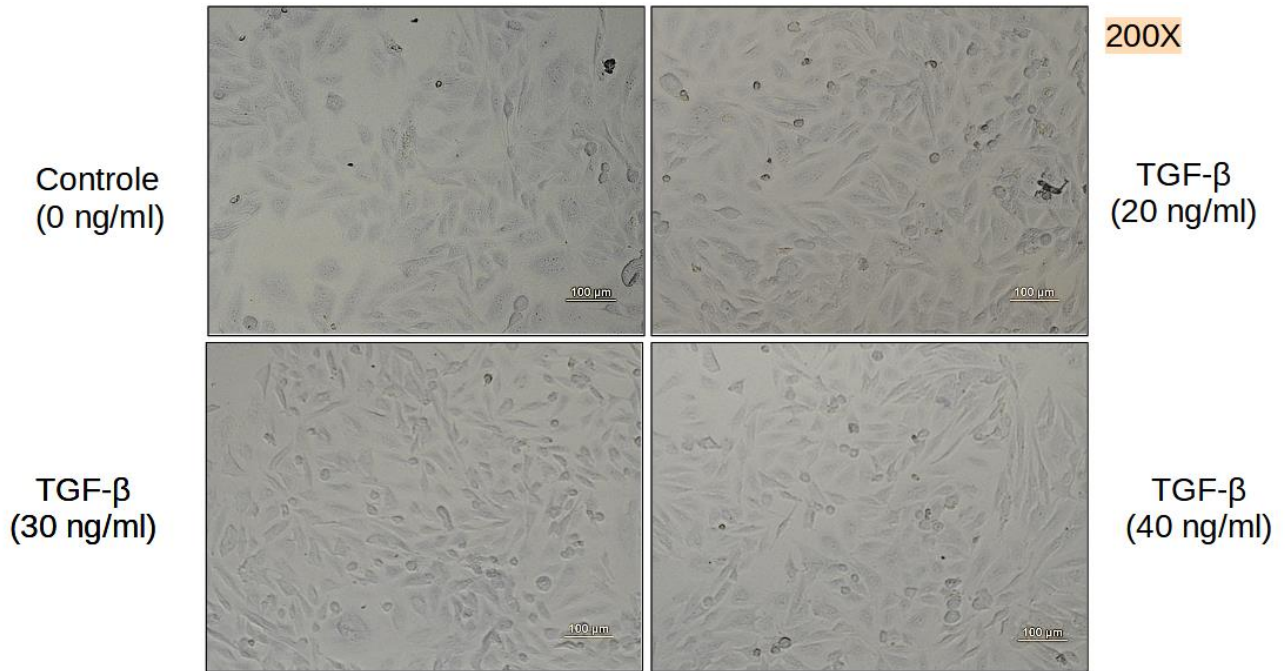
Legenda: TGF- $\beta$ 1 induz um aumento na proliferação de osteoblastos. As células SAOS-2 foram incubadas com TGF- $\beta$ 1 nas doses de 20, 30 ou 40 ng/mL por 48 horas. A proliferação foi avaliada pelo ensaio de MTT. O estímulo foi realizado em meio de cultura com 10% SFB. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP de 4 experimentos. One-Way Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: A autora, 2022.

### 3.15 TGF- $\beta$ 1 induz mudança morfológica para um formato alongado em osteoblastos de forma dose dependente

A seguir, para avaliar se o TGF- $\beta$ 1 provocaria mudanças morfológicas nos osteoblastos como o meio condicionado de tecido adiposo obeso, tratamos as células com TGF- $\beta$ 1 nas doses de 20, 30 e 40 ng/mL por 3 dias. Observamos que o tratamento com TGF- $\beta$ 1 provocou uma mudança morfológica leve, que foi intensificada nos grupos tratados com 30 e 40 ng/mL de forma dose dependente. Apesar do tratamento com TGF- $\beta$ 1 transformar a morfologia dos osteoblastos de um formato mais arredondado para uma morfologia fibroblástica, este efeito observado ocorreu de forma mais sutil do que o efeito provocado pelo meio condicionado de

tecido adiposo obeso. As imagens representativas deste experimento são observadas abaixo na figura 37.

Figura 37 - TGF- $\beta$ 1 induz mudança morfológica para um formato alongado em osteoblastos de forma dose dependente

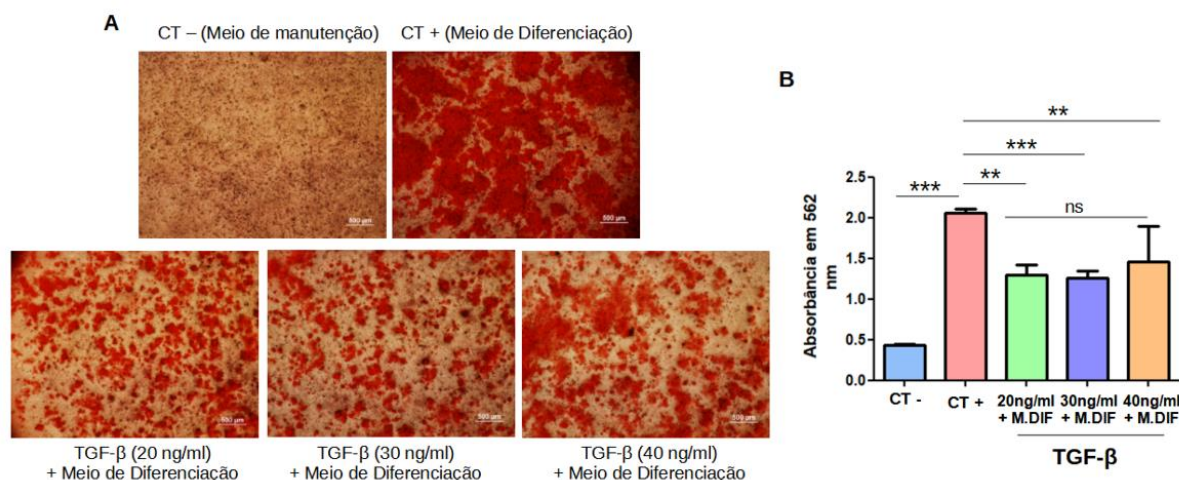


Legenda: TGF- $\beta$ 1 induz mudança morfológica para um formato alongado em osteoblastos de forma dose dependente. As células SAOS-2 foram tratadas com 20, 30 ou 40ng/mL de TGF- $\beta$ 1 por 3 dias e coradas com azul de metileno para visualização. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 200X. Imagens representativas de 4 experimentos. Fonte: A autora, 2022.

### 3.16 TGF- $\beta$ 1 inibe a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*

Nosso próximo passo foi avaliar de que forma TGF- $\beta$ 1 interferiria na mineralização de matriz extracelular de osteoblastos *in vitro*. Assim, as células SAOS-2 foram cultivadas por 10 dias na presença de meio de diferenciação osteogênica, na ausência ou presença de TGF- $\beta$ 1 nas doses anteriormente utilizadas. Verificamos que as doses de 20, 30 e 40 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 inibiram a formação dos nódulos de calcificação comparado ao grupo controle positivo. Entre si, os grupos tratados com TGF- $\beta$ 1 não apresentaram diferença. As imagens da microscopia (38A) e a quantificação da área corada com Alizarina (38B) são ilustradas na figura 38 abaixo.

Figura 38 - TGF- $\beta$ 1 inibe a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*



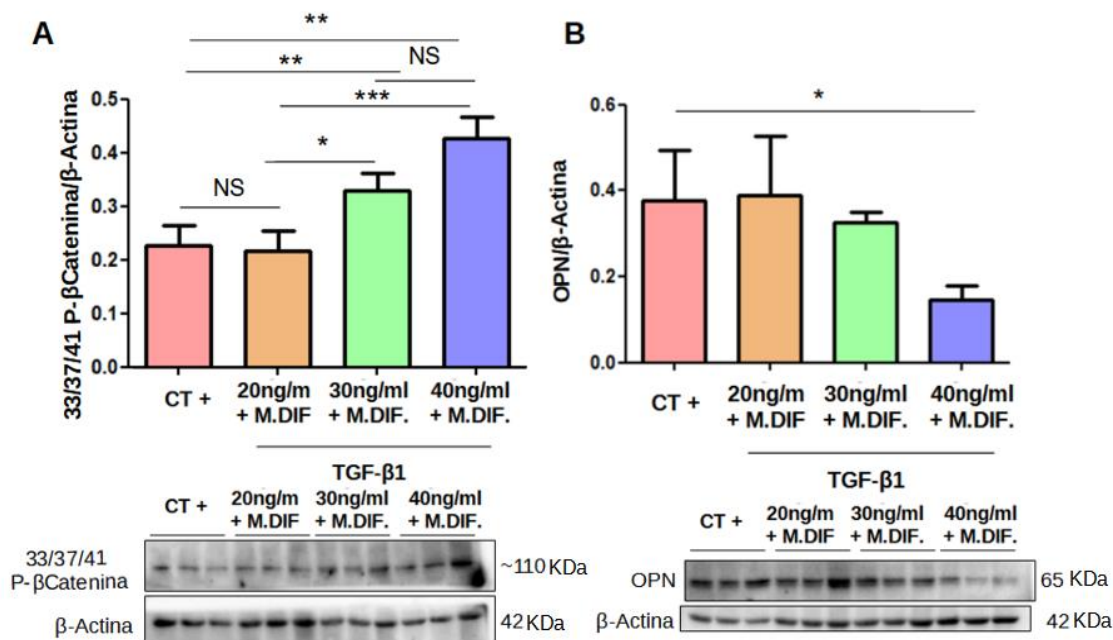
Legenda: TGF- $\beta$ 1 inibe a calcificação de matriz extracelular óssea *in vitro*. As células SAOS-2 foram expostas ao meio indutor de diferenciação osteogênica simultaneamente ou não com TGF- $\beta$ 1 por 10 dias. As células foram coradas com Vermelho de Alizarina 2%, imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 40x (37A) e a coloração foi extraída com Cloreto de Cetilpiridínio 10% para quantificação na absorbância de 562nm (37B). Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 4 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \*p<0,05 \*\*p<0,01 \*\*\*p<0,001. Fonte: A autora, 2022.

### 3.17 TGF- $\beta$ 1 induz o aumento da degradação de $\beta$ -Catenina e redução da expressão de osteopontina em osteoblastos

Dando continuidade a avaliação do efeito de TGF- $\beta$ 1 sobre os osteoblastos, estimulamos as células SAOS-2 com TGF- $\beta$ 1 nas mesmas doses anteriores em meio de diferenciação osteogênica por 7 dias. Após este período o extrato total destas células foi obtido para realização de *Western Blotting*.

Como mostrado na figura 38 abaixo, o tratamento com TGF- $\beta$ 1 em todas as doses aumentou a fosforilação de  $\beta$ -Catenina nos resíduos serina 33 e 37; e tirosina 41 (39A). Corroborando com este e os outros dados apresentados acima, TGF- $\beta$ 1 reduziu a expressão do marcador tardio de diferenciação osteopontina na dose de 40ng/mL (39B). Todos estes resultados reafirmam o efeito inibitório de TGF- $\beta$ 1 sobre a maturação de osteoblastos.

Figura 39 - TGF- $\beta$ 1 induz o aumento da degradação de  $\beta$ -Catenina e redução da expressão de osteopontina em osteoblastos



Legenda: TGF- $\beta$ 1 induz o aumento da degradação de  $\beta$ -Catenina e redução da expressão de osteopontina em osteoblastos. As células SAOS-2 foram tratadas na presença ou ausência de TGF- $\beta$ 1 por 7 dias em meio de diferenciação osteogênico. A quantificação da expressão de 33/37/41 P- $\beta$ catenina (39A) e osteopontina (OPN) (39B) foi realizada através da densitometria das bandas. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 3 experimentos. One-Way Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p$ <0,05 \*\* $p$ <0,01 \*\*\* $p$ <0,001. Fonte: A autora, 2022.

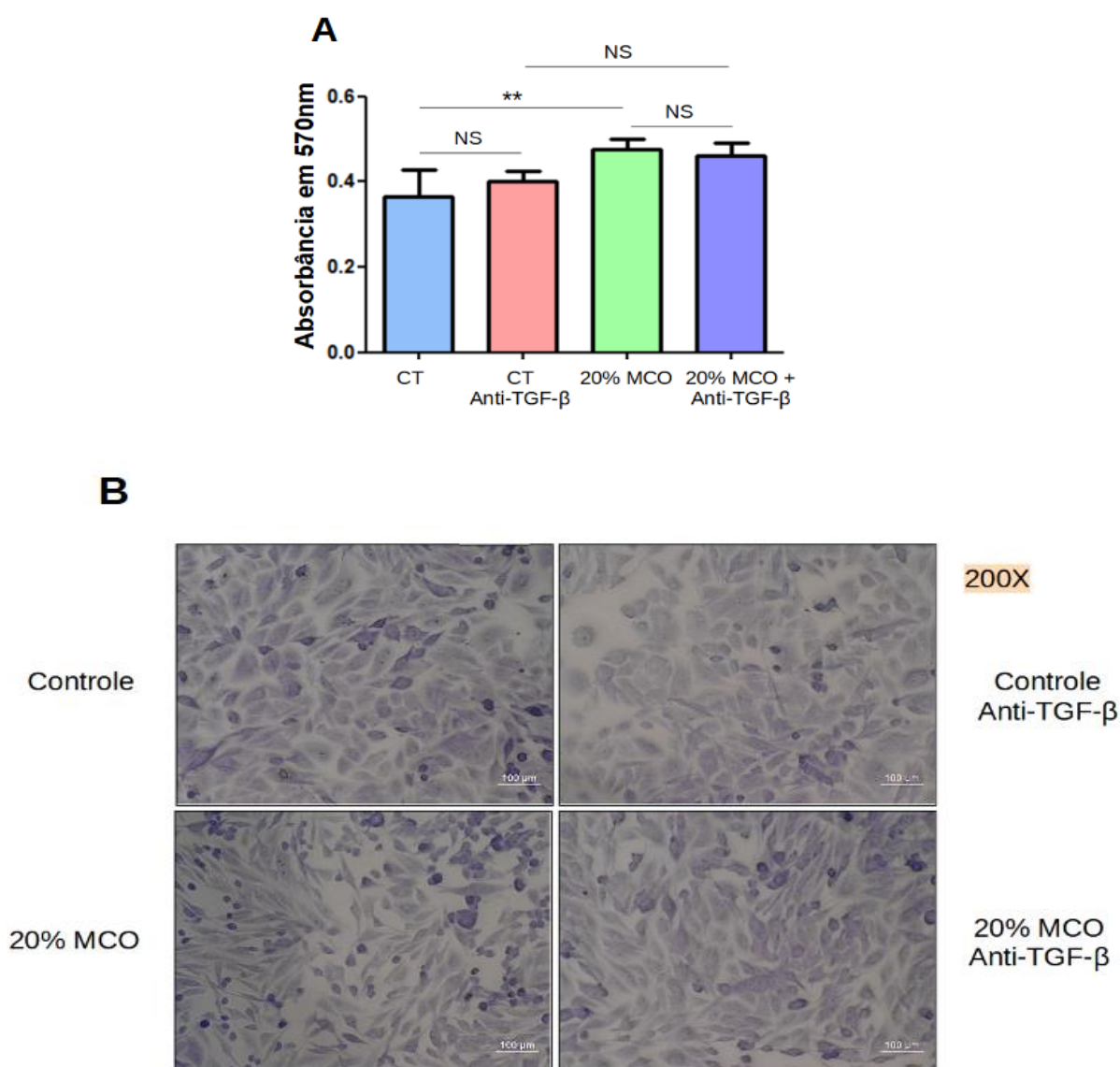
### 3.18 A neutralização de TGF- $\beta$ no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso reverte parte dos efeitos sobre a proliferação e morfologia celular

Os dados obtidos com o tratamento das células SAOS-2 com TGF- $\beta$ 1 recombinante apresentaram semelhança a alguns dos resultados obtidos com MCO. Para confirmar a participação deste fator de crescimento na regressão de fenótipo de osteoblastos, neutralizamos o TGF- $\beta$  junto no MCO. Inicialmente, foi avaliado o efeito do bloqueio do fator na proliferação mediada por MCO em 48 horas (39A) e depois na mudança morfológica estabelecida pelo MCO em 3 dias (40B).

Na avaliação, o grupo tratado com MCO Neutralizado não apresentou diferença estatística quando comparado com o grupo tratado com MCO. Apesar disso, quando o grupo controle neutralizado para TGF- $\beta$  é comparado com o grupo tratado com MCO também neutralizado, esses grupos passam a não apresentar diferença estatística.

Na avaliação morfológica, como observado no resultado anterior, observamos que o MCO modifica a morfologia das células SAOS-2 de um formato cuboidal para uma morfologia fibroblástica. De maneira interessante, a neutralização de TGF- $\beta$  no MCO conferiu um fenótipo um formato mais arredondado. Tais dados demonstram que o TGF- $\beta$  no MCO promove a maior parte das alterações morfológicas em osteoblastos. Estes resultados estão dispostos na figura 40 a seguir.

Figura 40 - A neutralização de TGF- $\beta$  no meio condicionado de tecido adiposo obeso altera os seus efeitos sobre a proliferação e morfologia celular



Legenda: A neutralização de TGF- $\beta$  no meio condicionado de tecido adiposo obeso altera os seus efeitos sobre a proliferação e morfologia celular. (340A) As células SAOS-2 foram incubadas com MCO na presença ou (continuação) ausência de anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$  por 48 horas. A proliferação foi avaliada pelo ensaio de MTT. O estímulo foi realizado em meio de cultura com 10% SFB. Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP

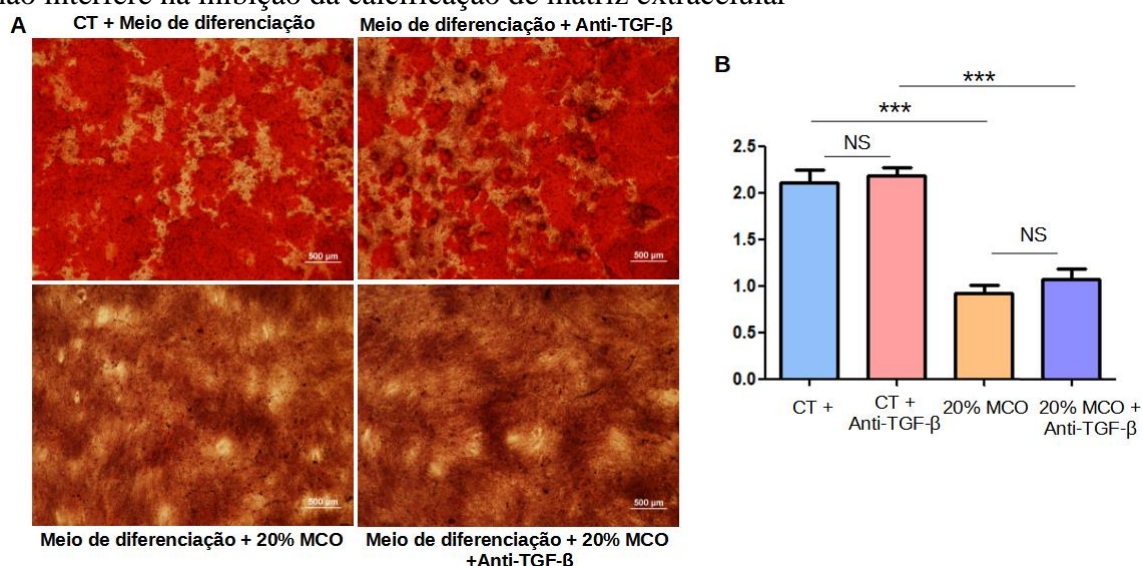


de 4 experimentos. One-Way Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . (40B) As células SAOS-2 foram tratadas com MCO na presença ou ausência de anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$  por 3 dias e coradas com azul de metileno para visualização. Imagens obtidas em microscópio óptico com aumento de 200X. Imagens representativas de 4 experimentos. Fonte: A autora, 2022.

### 3.19 A neutralização de TGF- $\beta$ no meio condicionado derivado do tecido adiposo obeso não interfere na inibição da calcificação de matriz extracelular

Por fim, investigamos a participação de TGF- $\beta$  na inibição da calcificação promovida pelo tratamento com MCO. Utilizamos um grupo controle positivo, um grupo controle positivo neutralizado para TGF- $\beta$ , o grupo tratado com MCO e outro grupo tratado com MCO neutralizado para TGF- $\beta$ . A neutralização de TGF- $\beta$  não interfere na calcificação normal de osteoblastos, como demonstrado no gráfico (41B). Apesar disso, a neutralização de TGF- $\beta$  no MCO não foi suficiente para reestabelecer a calcificação de osteoblastos. Estes dados apontam que parte dos efeitos mediados pelo MCO são estabelecidos por TGF- $\beta$ 1. As imagens de microscopia (41A) e a quantificação de área calcificada (41B) são observados na figura 41.

Figura 41 - A neutralização de TGF- $\beta$  no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso não interfere na inibição da calcificação de matriz extracelular



Legenda: A neutralização de TGF- $\beta$  no meio condicionado derivado de tecido adiposo obeso não interfere na inibição da calcificação de matriz extracelular. As células SAOS-2 foram incubadas com MCO na presença ou (continuação) ausência de anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$  por 10 dias. As células foram coradas com Vermelho de Alizarina 2%, as imagens foram obtidas em microscópio óptico no aumento de 40x (41A) e a coloração foi extraída com Cloreto de Cetilpiridínio 10% para quantificação na absorbância de 562nm (41B). Os dados foram expressos em média e  $\pm$  DP da média de 4 experimentos. Oneway Anova – pós-teste de Bonferroni \* $p < 0,05$  \*\* $p < 0,01$  \*\*\* $p < 0,001$ . Fonte: A autora, 2022.

## 4 DISCUSSÃO

A obesidade é uma doença inflamatória que atinge grandes proporções da população mundial e representa um risco para o desenvolvimento de distúrbios sistêmicos de outras naturezas (BLÜHER, 2019). Dentre eles, muito se discute sobre a real interferência da obesidade sobre a atividade das células do tecido ósseo, culminando com a perda ou ganho de massa óssea. Essa incerteza se dá pelos vários mecanismos pelos quais a obesidade é capaz de comprometer o funcionamento ósseo, dentre eles o aumento da massa do indivíduo, a geração de inflamação crônica de baixo grau pelo tecido adiposo obeso, mudanças de microbiota intestinal e estresse oxidativo (QIAO; WU; REN, 2021).

Avaliações da condição óssea em pacientes com obesidade mostradas em alguns estudos, indicam que o IMC correlaciona positivamente com a DMO, tendo como justificativa que o aumento do impacto mecânico decorrente do excesso de peso é benéfico para a formação óssea. Porém, análises mais descritivas apontam que o aumento do percentual de massa gorda é na verdade, deletério para o metabolismo ósseo. Os diferentes sítios de observação da microestrutura óssea, imprecisões nas metodologias de obtenção de DMO em obesos, e associações contraditórias dificultam a compreensão do efeito do excesso de gordura corporal no remodelamento ósseo (WALSH; VILACA, 2017; FASSIO *et al.*, 2018).

Nesse contexto, no presente trabalho buscamos avaliar de que forma os fatores liberados pelo tecido adiposo de indivíduos obesos e eutróficos influenciam os graus de diferenciação de osteoblastos humanos *in vitro*. Além disso, são escassos os trabalhos que abordam a contribuição das vesículas extracelulares liberadas pelo tecido adiposo de pessoas com obesidade sobre o remodelamento ósseo. Além disso, também avaliamos o efeito de vesículas extracelulares isoladas a partir do meio condicionado derivado de tecido adiposo de pacientes obesos e eutróficos sobre a maturação dos osteoblastos. Este estudo traz uma abordagem original para o tema com a utilização de metodologias novas que resultaram em alguns dados que não foram descritos previamente.

O tratamento da linhagem de osteoblastos humanos SAOS-2 com o meio condicionado derivado de tecido adiposo subcutâneo de pacientes obesos (MCO) resultou no aumento da proliferação dessas células, na presença ou ausência de soro fetal bovino; bem como na mudança morfológica partindo de um formato cuboidal para uma conformação fibroblástica. Concomitante, os osteoblastos tratados com MCO ao longo do protocolo de diferenciação osteogênica apresentaram uma reduzida expressão dos marcadores iniciais osteogênicos

fosfatase alcalina e colágeno do tipo I, e do marcador tardio osteopontina quando comparado ao grupo de células expostas somente ao meio de diferenciação osteogênico. Em um ensaio funcional de calcificação de matriz extracelular óssea, o estímulo com MCO inibiu consideravelmente a formação dos nódulos de mineralização após 10 dias de cultivo.

De acordo com esses dados que demonstram um efeito inibitório do tecido adiposo subcutâneo obeso sobre a formação óssea, estudos em roedores alimentados com dieta hiperlipídica já demonstraram que animais obesos apresentam perda óssea trabecular ( KIM *et al.*, 2021, LU *et al.*, 2021, MONTALVANY-ANTONUCCI *et al.*, 2018) e cortical (MONTALVANY-ANTONUCCI *et al.*, 2018, KIM *et al.*, 2021) em avaliações de microtomografia computadorizada da mandíbula (MONTALVANY-ANTONUCCI *et al.*, 2018), fêmur (MONTALVANY-ANTONUCCI *et al.*, 2018, LU *et al.*, 2021) e tíbia (KIM *et al.*, 2021). Corroborando com estes resultados, um número menor de osteoblastos e maior de osteoclastos na superfície óssea mandibular também foi observado (MONTALVANY-ANTONUCCI *et al.*, 2018).

Não foram encontrados estudos que descrevam o efeito da co-cultura de osteoblastos com adipócitos isolados de indivíduos com obesidade, apenas experimentos com adipócitos primários ou de linhagem. Apesar desta diferença, no trabalho de Dong e colaboradores, no qual foi realizada a co-cultura de adipócitos diferenciados a partir da linhagem 3T3-L1 com pré-osteoblasto MC3T3-E1, foi observado que os adipócitos reduziram a expressão de marcadores como Runx2, Colágeno I, fosfatase alcalina e osteocalcina; além de inibir a calcificação de matriz extracelular através da liberação de ácidos graxos livres. Apesar disso, diferente de nossos dados, a cocultura de osteoblastos com adipócito de linhagem comprometeu a viabilidade, conduzindo as células à apoptose (DONG *et al.*, 2014). Em outro trabalho, adipócitos primários mamários isolados de pacientes submetidos à cirurgia para remoção de tumores, induziram uma inibição da proliferação de osteoblastos, porém os não foram identificados o(s) agente(s) causador(es) do efeito (MAURIN *et al.*, 2000). No nosso estudo não foi verificado o comprometimento da viabilidade dos osteoblastos quando tratados com o MCE ou MCO, e observamos um aumento na proliferação celular com MCO. O fato de trabalharmos com o secretoma do tecido adiposo e não só com adipócitos, pode justificar as variações nos resultados. Vale ressaltar que adipócitos diferenciados a partir da linhagem 3T3-L1 não se comportam como adipócitos obesos, uma vez que não estão em um ambiente pró-inflamatório.

De maneira interessante, Rahman e colegas observaram que o tecido adiposo bege/marrom tem uma regulação positiva sobre a formação óssea. Utilizando animais

trangênicos, nos quais o tecido adiposo branco é reduzido passando a ter a morfologia do tecido bege e o tecido adiposo marrom é hipertrofiado (CEDERBERG *et al.*, 2001), observou-se o aumento da massa óssea pela maior ativação de osteoblastos endosteais (RAHMAN *et al.*, 2013). O meio condicionado derivado dos adipócitos beges, isolados dos animais trangênicos, aumentaram a atividade de osteoblastos estimulando a ativação da via AKT/ $\beta$ -Catenina (RAHMAN *et al.*, 2013). Comparado aos nossos dados, esses resultados demonstram as diferentes contribuições do tecido adiposo branco e bege, ao menos no estado de ausência de obesidade.

A exposição ao MCO também provocou o aumento da expressão de marcadores como CD90 e vimentina, e uma tendência de aumento na expressão de  $\alpha$ -actina de músculo liso ( $\alpha$ SMA). O CD90 é um marcador amplamente utilizado em conjunto a outros marcadores como CD103 e CD75 para definir a população de células-tronco mesenquimais, junto a um conjunto de marcadores hematopoiéticos negativos, e a multipotencialidade (DOMINICI *et al.*, 2006). A vimentina é uma proteína de citoesqueleto bastante empregada como marcador mesenquimal para avaliação de processos patológicos como a transição epitélio-mesênquima (OSTROUSKA; MCCULLOCH, 2021) e que tem atividade inibitória sobre a diferenciação osteogênica (LIAN *et al.*, 2009).

A  $\alpha$ SMA é uma isoforma de actina também expressa por células mesenquimais. Nos ossos de camundongos transgênicos, nos quais as células  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> são marcadas com GFP, análises histológicas mostram que a lâmina interna do periósteo possui marcação intensa, sendo um sítio de células osteoprogenitoras (ROEDER, MATTHEWS; KALAJZICA, 2016). Além disso, em modelo de remodelamento ósseo mediado por aparelho ortodôntico, Holland e colaboradores verificaram no início do processo a maior presença de células osteoprogenitoras  $\alpha$ SMA<sup>+</sup> nos ossos dos animais observados em decorrência de seu recrutamento, e já ao final da maturação ocorreu a queda de células positivas para  $\alpha$ SMA e crescimento da marcação dos marcadores maduros osteocalcina e osteopontina (HOLLAND; BAIN; UTREJA, 2019). Devido a esses dados, consideramos que estes marcadores são representativos da desdiferenciação de osteoblastos tratados com MCO. Até o presente momento, não identificamos publicações que quantifiquem a expressão destes ou outros marcadores mesenquimais em osteoblastos no contexto da obesidade.

Adicionalmente, foi observada a perda de adesividade das células tratadas com meio condicionado derivado de pacientes obesos quando semeadas sobre lamínulas de vidro (dado não mostrado), o que por muitas vezes dificultou a execução do protocolo de imunofluorescência. Este comportamento nos levou a investigar modulações na expressão de

proteínas de adesão como as integrinas, que têm um papel fundamental na promoção da diferenciação osteogênica (MARIE, 2013). Observamos uma diminuição na expressão da subunidade  $\beta 1$ , e um aumento na expressão da subunidade  $\alpha 2$  sem comprometer a expressão de  $\alpha 5$  e  $\alpha V$ . Apesar disso, devido ao fato destas subunidades alfa formarem heterodímeros com a subunidade  $\beta 1$ , a redução da mesma já comprometeria a sinalização mediada por integrinas, uma vez que a cauda intracitoplasmática está presente na subunidade  $\beta$  (MORSE *et al.*, 2014). De maneira interessante, em um estudo de Lee e colaboradores foi quantificada a expressão de diferentes subunidades de integrinas ao longo da diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos. Enquanto as integrinas  $\alpha V$  e  $\alpha 3$  têm suas expressões aumentadas conforme os osteoblastos são diferenciados, a integrina  $\alpha 2$  tem sua expressão reduzida, apresentando um pico de expressão no dia 0 de indução de diferenciação (LEE *et al.*, 2020).

Sabendo da influência da ativação da proteína FAK mediante a ação de integrinas (MORSE *et al.*, 2014), observamos que a fosforilação de FAK encontrava-se reduzida nos osteoblastos tratados com MCO e que a fosforilação de  $\beta$ -Catenina em resíduos que conduzem à sua degradação estava aumentada em comparação às células expostas ao meio indutor de diferenciação. A redução da ativação das vias canônica ou não canônica de  $\beta$ -Catenina é responsável por muitos efeitos inibitórios observados sobre a osteoblastogênese (SAIDAK *et al.*, 2015).

Nosso conjunto de dados nos indicam que o MCO estava promovendo uma desdiferenciação de osteoblastos maduros. Não existem publicações que descrevam a regressão de fenótipo de osteoblastos maduros na obesidade, e sim trabalhos que verificam a menor diferenciação de progenitores mesenquimais na linhagem osteogênica e inibição na atividade de formação óssea por osteoblastos, sem a avaliação marcadores e mudanças morfológicas que indiquem a desdiferenciação.

Em contrapartida, esse evento já foi descrito em osteoblastos cultivados em condições de microgravidade. Diferente das células submetidas à gravidade normal, os osteoblastos influenciados pela baixa pressão adquirem morfologia fibroblástica, redução da proteína adesiva integrina  $\beta 1$ , redução da expressão dos marcadores osteogênicos Runx2, BMP-2 e RANKL e aumento do marcador CD44, inibição de deposição mineral e motilidade estimulada (GIOIA *et al.*, 2018). Recentemente, demonstrou-se que a microgravidade reduz a ativação de FAK em osteoblastos e conseqüentemente a translocação de  $\beta$ -Catenina para o núcleo das células; além disso, demonstrou-se que o reestabelecimento farmacológico da sinalização via FAK recupera a expressão de marcadores osteogênicos e a mineralização de matriz extracelular (FAN *et al.*, 2022). De acordo com nossos dados, os osteoblastos tratados com MCO

apresentaram boa parte dos comportamentos de uma célula desdiferenciada, concomitante a menor ativação de FAK e maior degradação de  $\beta$ -Catenina.

A desdiferenciação também foi observada em osteoblastos tratados com meio condicionado derivado de algumas células tumorais. Antonelli e colaboradores descreveram que osteoblastos tratados com meio condicionado derivado da linhagem tumoral de próstata PC3 adquiriram morfologia alongada, inibição de calcificação e da expressão de marcadores osteogênicos, redução da expressão de integrina  $\beta 1$  e  $\alpha 3$  e caderina 11, aumento da expressão de Vimentina,  $\alpha$ SMA, CD44 e TGF- $\beta 1$ , sem alterar a proliferação. Este efeito foi desencadeado pela liberação de metilglioxal pelas células tumorais (ANTONEGLLI *et al.*, 2021). Utilizando meio condicionado de células tumorais de mama, Mercer e colaboradores também observaram redução da expressão de marcadores osteogênicos, atividade de fosfatase alcalina e calcificação, mudança morfológica e perda de pontos de adesão focal em osteoblastos. Estes efeitos foram mediados, em parte, pela secreção de TGF- $\beta 1$  no meio condicionado derivado das células MDA MB-231 (MERCER; MYASAKA; MASTRO, 2004). Por fim, a regressão de fenótipo de osteoblastos também já foi descrita em um modelo de amputação de nadadeira em Zebra fish, no qual osteoblastos maduros se desdiferenciam em osteoprogenitores com maior capacidade proliferativa para promoverem a regeneração do membro, voltando a se comprometerem no perfil maduro ao final do processo (KNOPF *et al.*, 2011).

Realizamos um ensaio para avaliar se as células tratadas com MCO, até então no nosso entendimento desdiferenciadas, seriam progenitores com capacidade de se diferenciarem apenas em osteoblastos ou se adquiriram multipotência. Após as células serem cultivadas em meio adipogênico por 10 dias, observamos que as células pré-tratadas com MCO apresentaram formação de gotículas lipídicas em seu interior em apenas alguns grupos de célula da cultura, indicando que o tratamento favoreceu o desenvolvimento de algumas células com potencial de se tornarem *adipocyte-like*. Diferente deste dado, no modelo de desdiferenciação de osteoblastos por amputação de nadadeira em zebra *fish*, as células desdiferenciadas são descritas como células que dão origem apenas a osteoblastos (KNOPF *et al.*, 2011). Sabemos que a diferenciação adipogênica leva em torno de 21 dias (CIUFFREDA *et al.*, 2016), e a avaliação do potencial adipogênico das células desdiferenciadas por MCO poderia gerar resultados mais contundentes com este tempo de exposição. Além disso, a confirmação da trans-diferenciação precisa ser realizada pela quantificação de marcadores moleculares como PPAR- $\gamma$  e CEBPs. Todas essas avaliações são perspectivas deste projeto para investigar o papel do tratamento com MCO em osteoblastos para a trans-diferenciação adipogênica.

Nos perguntando sobre a possível participação das vesículas extracelulares derivadas do tecido adiposo no processo, repetimos alguns experimentos anteriores tratando os osteoblastos com vesículas extracelulares (no mesmo volume utilizado para o meio condicionado) de tecido adiposo subcutâneo de pacientes eutróficos (VEE) e obesos (VEO). Não observamos diferença na proliferação, morfologia, calcificação de matriz extracelular e expressão dos marcadores iniciais osteogênicos nas células tratadas tanto com as VEO quanto as VEE, indicando que os efeitos antes constatados pelo MCO são independentes da ação das VEO e são proporcionados por fatores solúveis presentes no meio condicionado.

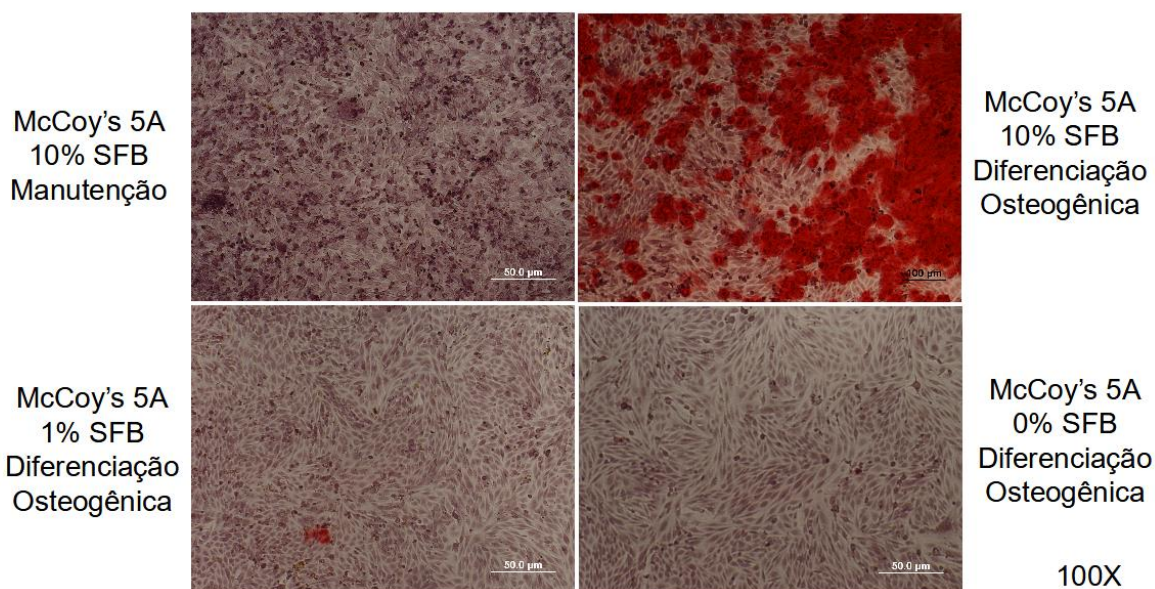
As vesículas de tecido adiposo obeso subcutâneo, assim como o respectivo meio condicionado, são enriquecidas com TGF- $\beta$ 1 (dado não mostrado). Apesar disso, as duas frações das amostras apresentam ações claramente distintas. Possivelmente, a interação de TGF- $\beta$ 1 com outro fator presente no meio condicionado mas não presente nas vesículas, poderia potencializar o seu efeito; como um evento sinérgico. Além disso, é provável que a concentração de TGF- $\beta$ 1 presente nas VEO seja inferior a concentração encontrada em MCO, que é capaz de comprometer a diferenciação terminal de osteoblastos.

Outro ponto importante é que a estrutura da vesícula poderia estabelecer uma barreira física para que o TGF- $\beta$ 1 encapsulado não conseguisse sinalizar via seu receptor na membrana plasmática das células-alvo, tornando apenas o TGF- $\beta$ 1 livre reconhecido pelo receptor. Contudo, receptores presentes na membrana das vesículas extracelulares podem interagir com ligantes na membrana plasmática das células alvo, culminando com a liberação do conteúdo das vesículas na superfície da célula. Desse modo, fatores como o TGF- $\beta$ 1 que se ligam externamente poderiam gerar seu efeito (MAAS; BREAKFIELD, WEAVER, 2017). Por conta dos nossos resultados obtidos em linhagem de osteoblastos, acreditamos que as vesículas isoladas de tecido adiposo subcutâneo apresentem um baixo tropismo para as células avaliadas.

Adicionalmente, é preciso ressaltar que na metodologia da maior parte dos trabalhos que estudam o efeito de vesículas *in vitro*, os estímulos são realizados em meio de cultura com baixas concentrações de soro fetal bovino, ou até mesmo na ausência do mesmo devido às interferências do soro na ação das vesículas (LEHRICH *et al.*, 2021). Em nosso estudo, a maior parte dos experimentos com vesículas foram conduzidos em meio com 10% de soro fetal bovino. Para a maturação da linhagem SAOS-2 ao ponto das células induzirem a mineralização, é preciso de, no mínimo, a exposição ao meio de diferenciação por 5 dias (dado não mostrado). Nos experimentos realizados durante a padronização do projeto, as células foram expostas a três tipos de meio de diferenciação, um contendo a suplementação normal de 10% SFB, outro com 1% de SFB e o último sem soro. Quando estimulamos as células para que mineralizassem,

observamos que apenas o meio com 10% de SFB obteve êxito. As microscopias desse ensaio são observadas na figura 42 abaixo.

Figura 42 – As células SAOS-2 não são capazes de promoverem a calcificação de matriz extracelular em meio de diferenciação com 1 ou 0% de SFB



Legenda: As células SAOS-2 não são capazes de promoverem a calcificação de matriz extracelular em meio de diferenciação com 1 ou 0% de SFB. Durante a padronização do protocolo de mineralização de matriz extracelular *in vitro*, foi observado que a suplementação com 10% SFB era essencial para o processo. Fonte: A Autora, 2022.

Por conta da necessidade de cultivarmos as células por longos períodos e da baixa concentração de soro inviabilizar a diferenciação osteogênica, realizamos o tratamento com as vesículas na presença de soro. Apesar disso, no ensaio de proliferação que executamos, onde as VEE e as VEO foram disponibilizadas em meio de cultura sem soro, não foi possível observar diferença em comparação ao grupo controle, indicando que a baixa interferência das vesículas na proliferação celular acontece mesmo sem soro. Contudo, reconhecemos que esta condição experimental é um ponto limitante para os nossos resultados.

Devido ao aumento na concentração de TGF- $\beta$ 1 nas amostras de pacientes com obesidade e aos dados presentes na literatura que apontam um efeito inibitório deste fator sobre a maturação de osteoblastos (WU; CHEN; LI, 2016), investigamos a contribuição de TGF- $\beta$ 1 para a promoção dos efeitos de MCO. Os osteoblastos apresentaram uma mudança morfológica para um formato mais afilado com o estímulo de TGF- $\beta$ 1 de forma dose dependente. O ensaio de proliferação e viabilidade demonstrou uma tendência de aumento na proliferação nas doses de 20 e 30 ng/mL, enquanto a dose de 40ng/mL foi capaz de aumentar a proliferação em



comparação ao grupo não-tratado. O tratamento com o fator de crescimento aumentou a fosforilação de  $\beta$ -Catenina em resíduos que conduzem a sua degradação e reduziu a expressão de osteopontina das células. Além disso, a adição de TGF- $\beta$ 1 ao meio de diferenciação osteogênico inibiu a calcificação de matriz extracelular em todas as doses testadas.

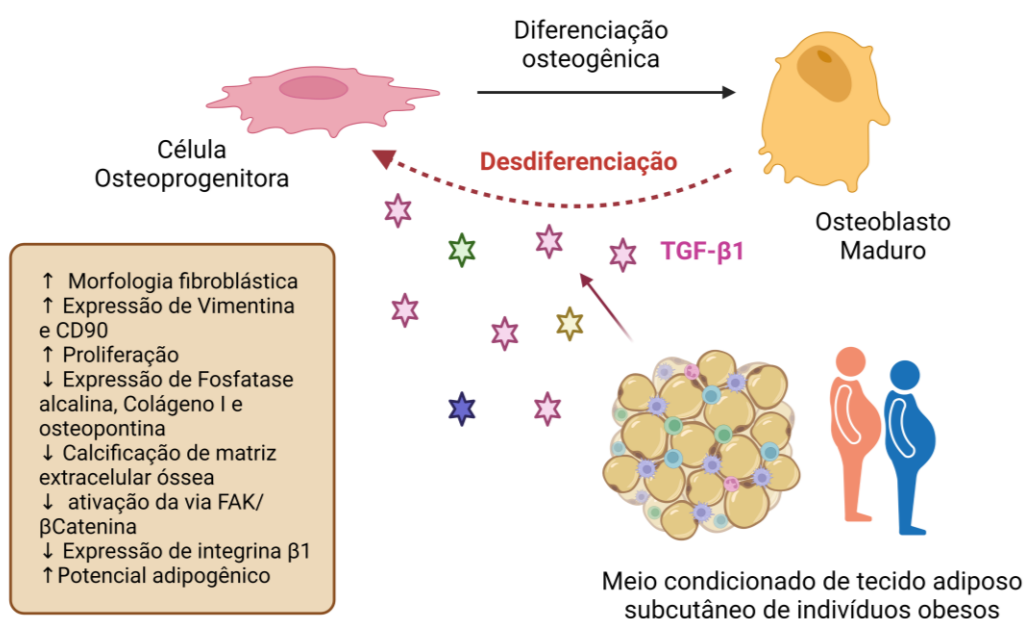
Similar aos nossos resultados, diferentes trabalhos mostraram que o estímulo com TGF- $\beta$  inibe a mineralização tanto em pré-osteoblastos (TAKEUCHI *et al.*, 2010, FANG *et al.*, 2010, SUZUKI *et al.*, 2014) quanto em osteoblastos primários (BREEN *et al.*, 1994). Além disso, em outras avaliações o TGF- $\beta$  induziu uma mudança de formato nas células para uma conformação mais alongada, juntamente a redução da atividade da fosfatase alcalina e expressão de marcadores (BREEN *et al.*, 1994, FANG *et al.*, 2010). De acordo aos achados do nosso projeto, Sefat e colaboradores demonstraram que as três isoformas de TGF- $\beta$  induzem um aumento da soltura de osteoblastos em cultura (SEFAT *et al.*, 2013), o que justificaria a dificuldade que tivemos com a perda de adesão dos osteoblastos tratados com MCO sobre as lamínulas de vidro.

Através da utilização de um anticorpo neutralizante de TGF- $\beta$ , verificamos que o bloqueio deste fator no MCO contribuiu para o retorno da morfologia cuboide dos osteoblastos tratados. Apesar de não estabelecer diferença entre os grupos MCO e MCO neutralizado para TGF- $\beta$  no ensaio de proliferação, o grupo controle neutralizado para TGF- $\beta$  e o grupo MCO neutralizado para TGF- $\beta$  passaram a não apresentar diferença. No estudo de Mercer e colaboradores a neutralização de TGF- $\beta$  no meio condicionado derivado de células tumorais de mama MDA-MB-231 reestabeleceu a expressão gênica de fosfatase alcalina, osteocalcina e sialoproteína óssea, antes inibida (MERCER; MYASAKA; MASTRO, 2004). Apesar dos dados anteriores, em nosso estudo a neutralização de TGF- $\beta$  no MCO não foi capaz de reverter a inibição da formação de nódulos de mineralização, demonstrando que o TGF- $\beta$  contribui em parte para os efeitos de MCO sobre a regressão de fenótipo maduro de osteoblastos.

## CONCLUSÃO

Neste trabalho, observamos pela primeira vez, que o meio condicionado de tecido adiposo subcutâneo obeso induz uma regressão de fenótipo de um perfil de osteoblasto maduro para um estágio similar ao de célula osteoprogenitora. Este tratamento provocou o aumento da proliferação, mudança morfológica, redução da calcificação de matriz extracelular e da expressão de marcadores osteogênicos, aumento de marcadores de progenitores mesenquimais, e redução da via de sinalização promotora de diferenciação FAK/ $\beta$ catenina; caracterizando a desdiferenciação de osteoblastos. Este efeito é proporcionado parcialmente pela atividade de TGF- $\beta$ 1 (Figura 43).

Figura 43 – O meio condicionado de tecido adiposo obeso induz uma regressão de fenótipo em osteoblastos maduros para um perfil similar ao de osteoprogenitor



Fonte: Criado com BioRender.com. A Autora, 2022.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, M. J.; et al. Negative Skeletal Effects of Locally Produced Adiponectin. **PLOS ONE**, v. 10, n. 7, e0134290, 2015.
- ABELS, E. R.; BREAKFIELD, X. O. Introduction to Extracellular Vesicles: Biogenesis, RNA Cargo Selection, Content, Release, and Uptake. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 36, n. 3, p. 301–312, 2016.
- ABUNA, R. P. F.; et al. Participation of TNF- $\alpha$  in Inhibitory Effects of Adipocytes on Osteoblast Differentiation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 1, p. 204–214, 2015.
- ACEBRÓN, I.; et al. Structural basis of Focal Adhesion Kinase activation on lipid membranes. **EMBO J.** v.39, n.19, e104743, 2020.
- ALCORTA-SEVILLANO, N. et al. Deciphering the Relevance of Bone ECM Signaling. **Cells**, v. 9, n. 12, 2630, 2020.
- ALI, E.M. M. et al. Fat mass and obesity-associated (FTO) and leptin receptor (LEPR) gene polymorphisms in Egyptian obese subjects. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 127, n. 1, p. 28-36, 2021.
- ALMALKI, S. G.; AGRAWAL, D. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells. **Differentiation; research in biological diversity**, v. 92, n.1-2 , p. 41-51, 2016.
- AMABEBE, E. et al. Microbial dysbiosis-induced obesity: role of gut microbiota in homeostasis of energy metabolism. **The British journal of nutrition**, v. 123, n. 10, p. 1127-1137, 2020.
- AMARASEKARA, D. S., KIM, S., RHO, J. Regulation of Osteoblast Differentiation by Cytokine Networks. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 6, 2851, 2021.
- ANDRADE, I. R., et al. Obese adipose tissue extracellular vesicles raise breast cancer cell malignancy. **Endocr Relat Cancer**, v. 27, n.10, p. 571-582, 2020.
- ARAI, F.; SUDA, T. Maintenance of quiescent hematopoietic stem cells in the osteoblastic niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1106, p. 41–53, 2007.
- ASHRAFIAN, F. et al. Extracellular vesicles and pasteurized cells derived from *Akkermansia muciniphila* protect against high-fat induced obesity in mice. **Microbial cell factories**, v. 20, n. 1, 219, 2021.
- Associação brasileira para estudo da obesidade e síndrome metabólica (ABESO) – 2019. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>

Atlas mundial de obesidade – 2022. Disponível em:

[https://pt.worldobesityday.org/assets/downloads/World\\_Obesity\\_Atlas\\_2022\\_WEB.pdf](https://pt.worldobesityday.org/assets/downloads/World_Obesity_Atlas_2022_WEB.pdf)

AXPE, E. et al. A human mission to Mars: Predicting the bone mineral density loss of astronauts. **PLoS one**, v. 15, n.1, e0226434, 2020.

BACHMANN, M. et al. Cell Adhesion by Integrins, **Physiol Rev**, v. 99, n. 4, p.1655-1699, 2019.

BAEK, K. et al. TNF- $\alpha$  upregulates sclerostin expression in obese mice fed a high-fat diet. **Journal of cellular physiology**, vol. 229, n. 5, p. 640-650, 2014.

BAILEY, J. R. ; TAPSCOTT, D.C. Osteopetrosis. StatPearls, **StatPearls Publishing**, 2022.

BAKKER, A. D.; et al. IL-6 Alters Osteocyte Signaling toward Osteoblasts but Not Osteoclasts. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 4, p. 394–399, 2014.

BECKER A.; et al. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. **Cancer Cell**, v. 30, n. 6, p. 836–848, 2016.

BEHERA, J.; et al. Probiotics Stimulate Bone Formation in Obese Mice via Histone Methylations. **Theranostics**, v. 11, n. 17, p.8605-8623, 2021.

BIN, G.; et al. Fluid shear stress inhibits TNF- $\alpha$ -induced osteoblast apoptosis via ERK5 signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.466, n. 1, p. 117–123, 2015.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 288-298, 2019.

BORA, P., & MAJUMDAR, A. S. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, 145, 2017.

BORNSTEIN, S.; et al. Metformin Affects Cortical Bone Mass and Marrow Adiposity in Diet-Induced Obesity in Male Mice. **Endocrinology**, v. 158, n.10, p. 3369–3385, 2017.

Bray, G.A. History of obesity In: Williams G, Frühbeck G, eds. Obesity: Science to Practice. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2009.

BREEN, E. C. et al. TGF beta alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts in vitro, preventing development of the mature bone phenotype. **Journal of cellular physiology**, v. 160, n. 2, p. 323-335, 1994.

BRONDANI, L.A. et al. Association of the UCP polymorphisms with susceptibility to obesity: case-control study and meta-analysis. **Molecular biology reports**, v. 41, n. 8, p. 5053-5067, 2014.

CAMINO, T.;. Deciphering Adipose Tissue Extracellular Vesicles Protein Cargo and Its Role in Obesity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 24, 9366, 2020.

CAO, J. J.; PICKLO, M. J. N-Acetylcysteine Supplementation Decreases Osteoclast Differentiation and Increases Bone Mass in Mice Fed a High-Fat Diet. **The Journal of Nutrition**, v. 144, n. 3, p. 289–296, 2013.

CAO, Y.; et al. IL-1 $\beta$  differently stimulates proliferation and multinucleation of distinct mouse bone marrow osteoclast precursor subsets. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 3, p. 513–523, 2016.

CARNOVALI, M.; et al. Metabolic and bone effects of highfat diet in adult zebrafish. **Endocrine**, v. 61, n. 2, p. 317–326, 2017.

CEDERBERG, A et al. FOXC2 is a winged helix gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. **Cell**, v. 106, n. 5, p. 563-573, 2001.

CHAIN, A. et al. Obesity, dynapenia, and their combination: Implications for bone mineral density in Brazilian adults-the Pró-Saúde study. **Nutrition**, v. 81, 110898, 2021.

CHALMERS, C. R; CHALONER, E. J. 500 years later: Henry VIII, leg ulcers and the course of history. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 102, n.12, p.514-517, 2009.

CHANG, Y.; et al. Ibudilast Mitigates Delayed Bone Healing Caused by Lipopolysaccharide by Altering Osteoblast and Osteoclast Activity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, 1169, 2021.

CHENG, L. et al. Brown and beige adipose tissue: a novel therapeutic strategy for obesity and type 2 diabetes mellitus. **Adipocyte**, v. 10, n. 1, p. 48-65, 2021.

CHINA, S. P.; et al. Globular adiponectin reverses osteo-sarcopenia and altered body composition in ovariectomized rats. **Bone**, v. 105, p. 75–86, 2017.

CIUFFREDA, M. C. et al. Protocols for in vitro Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells into Osteogenic, Chondrogenic and Adipogenic Lineages. **Methods in molecular biology**, v. 1416, p. 149-158, 2016.

COMPSTON, J. Type 2 diabetes mellitus and bone. **Journal of internal medicine**, v. 283, n. 2, p. 140-153, 2018.

CROVESY, L., MASTERSON, D.; ROSADO, E. L. Profile of the gut microbiota of adults with obesity: a systematic review. *European journal of clinical nutrition*, v. 74, n. 9, p. 1251–1262, 2020.

CURREY, J. D., DEAN, M. N., SHAHAR, R. Revisiting the links between bone remodelling and osteocytes: insights from across phyla. **Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 92, n. 3, p. 1702–1719, 2017.

DENG, T. et al. Obesity, Inflammation, and Cancer. **Annual review of pathology**, v. 11, p. 421-449, 2016.

- DIMITRI, P.; et al. Leptin May Play a Role in Bone Microstructural Alterations in Obese Children. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 100, n. 2, p. 594–602, 2015.
- DOMINICI, M; et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. **The International Society for Cellular Therapy position statement**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.
- DONG, X.; et al. FFAs-ROS-ERK/P38 pathway plays a key role in adipocyte lipotoxicity on osteoblasts in co-culture. **Biochimie**, v. 101, p. 123–131, 2014.
- DRAGOJEVIC, J.; et al. Triglyceride metabolism in bone tissue is associated with osteoblast and osteoclast differentiation: a gene expression study. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 31, n. 5, p.512–519, 2013.
- DU, Ji. et al. Dietary betaine prevents obesity through gut microbiota-driven microRNA-378a family. **Gut microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-19, 2021.
- EAIMWORAWUTHIKUL, S.; TUNAPOONG, W.; CHUNCHAI, T. et al. Effects of probiotics, prebiotics or synbiotics on jawbone in obese-insulin resistant rats. **Eur J Nutr**, v. 58, p. 2801–2810, 2019.
- EKNOYAN, G. A history of obesity, or how what was good became ugly and then bad. **Advances in chronic kidney disease**, v.13, n.4, p.421-427, 2006.
- ELLERT-MIKLASZEWSKA, A. et al. Integrin Signaling in Glioma Pathogenesis: From Biology to Therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n.3, 888, 2020.
- ENDISHA, H.; et al. MicroRNA-34a-5p Promotes Joint Destruction during Osteoarthritis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 73, n. 3, p. 426-439, 2021.
- FANG.; L. et al. Transforming growth factor- $\beta$  inhibits nephronectin-induced osteoblast differentiation. v. 584, n.13, p. 2877–2882, 2010.
- FASSIO, A. et al. The obesity paradox and osteoporosis. **Eating and weight disorders : EWD**, v. 23, n. 3, p. 293-302, 2018.
- FERNÁNDEZ-MURGA, M. L.; OLIVARES, M.; SANZ, Y. Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT 7765 reverses the adverse effects of diet-induced obesity through the gut-bone axis. **Bone**, v. 141, 115580, 2020.
- FINTINI, D. et al. The Bones of Children With Obesity. **Frontiers in endocrinology**, v. 11, 200, 2020.
- FLORENCIO-SILVA, R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **BioMed research international**, v. 2015, 421746, 2015.
- FRANCESCHI, R. T.; GE, C. Control of the Osteoblast Lineage by Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. **Current molecular biology reports**, v. 3, n. 2, p.122–132, 2017.

- FREUDE, T.; et al. Hyperinsulinemia reduces osteoblast activity in vitro via upregulation of TGF- $\beta$ . **Journal of Molecular Medicine**, v.90, n. 11, p. 1257–1266, 2012.
- FUNCKE, J-B.; PHILIPP E. S. Beyond adiponectin and leptin: adipose tissue-derived mediators of inter-organ communication. **Journal of lipid research**, v. 60, n. 10, p.1648-1684, 2019.
- GALAL, A. A. et al. Association of Apolipoprotein E gene polymorphism with the risk of T2DM and obesity among Egyptian subjects. **Gene**, v. 769, 145223, 2021.
- GAO, A.; et al. Effect of Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide (Pg-LPS) on the expression of EphA2 in osteoblasts and osteoclasts. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 52, n. 2, p. 228–234, 2015.
- GIOIA, M. et al. Simulated microgravity induces a cellular regression of the mature phenotype in human primary osteoblasts. **Cell death discovery**, v. 4, 59, 2018.
- GKASTARIS, K. et al. Obesity, osteoporosis and bone metabolism. **Journal of musculoskeletal & neuronal interactions**, v. 20, n.3, p. 372-381, 2020.
- GOEL, P. N.; et al. Notch signaling inhibition protects against LPS mediated osteolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 515, n. 4, p. 538–543, 2019.
- GOMES, A. C.; HOFFMANN, C.; MOTA, J. F. The human gut microbiota: metabolism and perspective in obesity. **Gut Microbes**, v. 9, n. 4, p.308–325, 2018.
- GOODARZI, M. O. Genetics of obesity: what genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. **The lancet. Diabetes & endocrinology**, v. 6, n.3, p. 223-236, 2018.
- GRABOWSKI, P. Physiology of bone. **Endocrine development**, v. 16, capítulo 3, p. 32–48, 2009.
- GU, R. et al. Is extracellular matrix (ECM) a promising scaffold biomaterial for bone repair?. **Histology and histopathology**, v. 36, n. 12, p. 1219-1234, 2021.
- GUILLEMOT-LEGRIS, O.; MUCIOLLI, G. G. Obesity-Induced Neuroinflammation: Beyond the Hypothalamus. **Trends in neurosciences**, v. 40, n. 4, p. 237–253, 2017.
- GUO, C.; et al. Lipopolysaccharide (LPS) Induces the Apoptosis and Inhibits Osteoblast Differentiation Through JNK Pathway in MC3T3-E1 Cells. **Inflammation**, v. 37, n. 2, p. 621–631, 2013.
- GURHA, P. Noncoding RNAs in cardiovascular diseases. **Current opinion in cardiology**, v. 34, n. 3, p. 241–245, 2019.
- GURUNATHAN, S.; et al. Review of the Isolation, Characterization, Biological Function, and Multifarious Therapeutic Approaches of Exosomes. **Cells**, v. 8, n. 4, 307, 2019.
- GURUNG, S.; et al. The exosome journey: from biogenesis to uptake and intracellular signalling. **Cell Commun Signal**, v. 19, n. 1, 47, 2021.

GUTIN, I. In BMI We Trust: Reframing the Body Mass Index as a Measure of Health. **Soc Theory Health**. v.16, n.3, p. 256-271, 2018.

HALPERN, B. et al. Proposal of an obesity classification based on weight history: an official document by the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM) and the Brazilian Society for the Study of Obesity and Metabolic Syndrome (ABESO). **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 66, n.2, p. 139-151, 2022.

HAMIDOUCHE, Z., et al. Priming integrin alpha5 promotes human mesenchymal stromal cell osteoblast differentiation and osteogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.106, n. 44, p.18587-18591, 2009.

HAMMOUD, E. et al. Does the Severity of Obesity Influence Bone Mineral Density Values in Premenopausal Women?. **Journal of clinical densitometry: the official journal of the International Society for Clinical Densitometry**, v. 24, n. 2, p. 225-232, 2021.

HASEGAWA, T. Ultrastructure and biological function of matrix vesicles in bone mineralization. **Histochemistry and cell biology**, v. 149, n.4, p. 289-304, 2018.

HASLAM, D. Weight management in obesity - past and present. **International Journal of Clinical Practice**, v.70, n.3, p.206–217, 2016.

HAUGEN, S.; et al. Adiponectin Reduces Bone Stiffness: Verified in a Three-Dimensional Artificial Human Bone Model In Vitro. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 2018.

HE, B.; et al. Blockade of IL-6 alleviates bone loss induced by modeled microgravity in mice. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, p. 1–6, 2020.

HE, H.; et al. Folic Acid Attenuates High-Fat Diet-Induced Osteoporosis Through the AMPK Signaling Pathway. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 9, 791880, 2022.

HE, Z.; et al. Evaluation of genetic variants in IL-1B and its interaction with the predisposition of osteoporosis in the northwestern Chinese Han population. **The Journal of Gene Medicine**, v. 22, n.10, e3214, 2020.

HOLLAND, R., BAIN, C., UTREJA, A. Osteoblast differentiation during orthodontic tooth movement. **Orthodontics & craniofacial research**, v. 22, n. 3, p. 177–182, 2019.

HU, H. M.; et al. Overexpression of integrin a2 promotes osteogenic differentiation of hBMSCs from senile osteoporosis through the ERK pathway. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 6, n. 5, p. 841-852, 2013.

HUANG, W.; OLSEN, B. R. Skeletal defects in Osterix-Cre transgenic mice. **Transgenic research**, v. 24, n. 1, p. 167-172, 2015.

IGARASHI, Y.; et al. VEGF-C and TGF- $\beta$  reciprocally regulate mesenchymal stem cell commitment to differentiation into lymphatic endothelial or osteoblastic phenotypes. **Int J Mol Med**, v. 37, n. 4, p.1005-1013, 2016.



- IZQUIERDO, A. G. et al. Leptin, Obesity, and Leptin Resistance: Where Are We 25 Years Later?. **Nutrients**, v. 11, n.11, 2704, 2019.
- JEONG, B.-C. ATF3 mediates the inhibitory action of TNF- $\alpha$  on osteoblast differentiation through the JNK signaling pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 499, n. 3, p. 696–701, 2018.
- JIKKO, A.; et al. Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. **J Bone Miner Res**, v. 14, n. 7, p. 1075-1083, 1999.
- JIN, J.; et al. Simvastatin Inhibits LPS induced Alveolar Bone Loss during Metabolic Syndrome. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 3, p. 294–299, 2013.
- JOHAM, A. E., PALOMBA, S.; HART, R. Polycystic Ovary Syndrome, Obesity, and Pregnancy. **Seminars in reproductive medicine**, v. 34, n. 2, p. 93–101, 2016.
- JOHNSON, R. J et al. Upper Paleolithic Figurines Showing Women with Obesity may Represent Survival Symbols of Climatic Change. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 29, n.1, p. 11-15, 2021.
- JULIAN, V. et al. Does the severity of obesity influence bone density, geometry and strength in adolescents?. **Pediatric obesity**, v. 16, n.12, e12826, 2021.
- KALINKOVICH, A.; LIVSHITS, G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. **Ageing research reviews**, v. 35, p. 200–221, 2017.
- KALRA, H.; et al. Comparative proteomics evaluation of plasma exosome isolation techniques and assessment of the stability of exosomes in normal human blood plasma. **Proteomics**, v. 13, n. 22, p. 3354-3364, 2013.
- KANG, I. S.; KIM, C. NADPH oxidase gp91phox contributes to RANKL-induced osteoclast differentiation by upregulating NFATc1. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 38014, 2016.
- KARCZEWSKI, J. et al. Obesity and inflammation. **European cytokine network**, v. 29, n. 3, p. 83-94, 2018.
- KARSENTY, G.; MERA, P. Molecular bases of the crosstalk between bone and muscle. **Bone**. v. 115, p. 43-49, 2018.
- KATSIMBRI, P. The biology of normal bone remodelling. **European journal of cancer care**, v. 26, n. 6, 10.1111/ecc.12740, 2017.
- KATSUNO, Y.; DERYNCK, R. Epithelial plasticity, epithelial-mesenchymal transition, and the TGF- $\beta$  family. **Dev Cell.**, v. 56, n. 6, p. 726-746, 2021.
- KAWAI, T., AUTIERI, M. V., & SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **American journal of physiology**. Cell physiology, v. 320, n. 3, p. C375–C391, 2021.

- KECHAGIA, J. Z; IVASKA, J; ROCA-CUSACHS, P. Integrins as biomechanical sensors of the microenvironment. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 20, n. 8, p.457-473, 2019.
- KELLY, T. L., WILSON, K. E., & HEYMSFIELD, S. B. Dual energy X-Ray absorptiometry body composition reference values from NHANES. **PloS one**, v.4, n.9, e7038, 2009.
- KERKADI, A. et al. The Relationship Between Bone Mineral Density and Body Composition Among Qatari Women With High Rate of Obesity: Qatar Biobank Data. **Frontiers in nutrition**, v. 9, 834007, 2022.
- KESHAVARZ A. R. S.; et al. Assessment of fecal Akkermansia muciniphila in patients with osteoporosis and osteopenia: a pilot study. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 20, n. 1, p. 279–284, 2021.
- KIM, J. et al. The Association between Fat Mass, Lean Mass and Bone Mineral Density in Premenopausal Women in Korea: A Cross-Sectional Study. **Korean journal of family medicine**, v. 39, n. 2, p.74-84, 2018.
- KIM, K.-J.; et al. Austalide K from the Fungus Penicillium rudallense Prevents LPS-Induced Bone Loss in Mice by Inhibiting Osteoclast Differentiation and Promoting Osteoblast Differentiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n.11, 5493, 2021.
- KIM, S. et al. Osteoblastic glucocorticoid signaling exacerbates high-fat-diet- induced bone loss and obesity. **Bone research**, v. 9, n. 1, 40, 2021.
- KIM, W. et al. The relationship between body fat and bone mineral density in Korean men and women. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 32, n. 6, p. 709-717, 2014.
- KIRK, B., ZANKER, J., & DUQUE, G. Osteosarcopenia: epidemiology, diagnosis, and treatment-facts and numbers. **Journal of cachexia, sarcopenia and muscle**, v. 11, n. 3, p. 609–618, 2020.
- KISHIKAWA, A.; et al. Docosahexaenoic Acid Inhibits Inflammation-Induced Osteoclast Formation and Bone Resorption in vivo Through GPR120 by Inhibiting TNF- $\alpha$  Production in Macrophages and Directly Inhibiting Osteoclast Formation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 157, 2019.
- KO, S. H.; KIM, H. S. Menopause-Associated Lipid Metabolic Disorders and Foods Beneficial for Postmenopausal Women. **Nutrients**, v. 12, n. 1, 202, 2020.
- KOKKINIAS, A. D.; KOKKINIAS, S. D. Mechanical loading effect to the functional bone adaptation. **Journal of frailty, sarcopenia and falls**, v.2, n. 3, p. 62–64, 2017.
- KOLIADA, A. et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC microbiology**, v. 17,n. 1, 120, 2017.
- KUMAR, S.; SELVARANGAN, P. Bone homing of mesenchymal stem cells by ectopic alpha 4 integrin expression. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 21, n. 14, p. 3917-3927, 2007.

- KWAN, H.Y.; et al. The impact of obesity on adipocyte-derived extracellular vesicles. **Cell Mol Life Sci**, v. 78, n. 23, p. 7275-7288, 2021.
- LANGENBACH, F.; HANDSCHEL, J. Effects of dexamethasone, ascorbic acid and  $\beta$ -glycerophosphate on the osteogenic differentiation of stem cells in vitro. **Stem cell research & therapy**, v. 4, n. 5, 117, 2013.
- LAZZERINI, P. E.; et al. Rosuvastatin inhibits spontaneous and IL-1 $\beta$ -induced interleukin-6 production from human cultured osteoblastic cells. **Joint Bone Spine**, v. 80, n. 2, p. 195–200, 2013.
- LEBIEDOWSKA, A. et al. How reliable is BMI? Bioimpedance analysis of body composition in underweight, normal weight, overweight, and obese women. **Irish journal of medical science**, v. 190, n.3, p. 993-998, 2021.
- LEE, H. M. et al. Expression dynamics of integrin  $\alpha$ 2,  $\alpha$ 3, and  $\alpha$ V upon osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **Stem cell research & therapy**, v. 11, n. 1, 210, 2020.
- LEE, J.; et al. Stimulation of osteoclast migration and bone resorption by C–C chemokine ligands 19 and 21. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 49, n. 7, e358, 2017.
- LEE, S. J., LEE, J. Y.; SUNG, J. Obesity and Bone Health Revisited: A Mendelian Randomization Study for Koreans. **Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 34, n. 6, p.1058–1067, 2019.
- LEE, W.S.; et al. Atorvastatin inhibits osteoclast differentiation by suppressing NF- $\kappa$ B and MAPK signaling during IL-1 $\beta$ -induced osteoclastogenesis. **Korean J Intern Med**, v. 33, n. 2, p. 397-406, 2018.
- LEHRICH, B. M. et al. Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses. **Journal of extracellular vesicles**, v. 10, n. 3, e12061, 2021.
- LI, J.; et al. Obesity and Leptin Influence Vitamin D Metabolism and Action in Human Marrow Stromal Cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 198, 105564, 2019.
- LI, W.; et al. The effects of fat-induced obesity on bone metabolism in rats. **Obesity Research & Clinical Practice**, v. 11, n. 4, p. 454–463, 2017.
- LIAN, N. et al. Vimentin inhibits ATF4-mediated osteocalcin transcription and osteoblast differentiation. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 44, p. 30518-30525, 2009.
- LIN, X.; LI, H. Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, 706978, 2021.
- LIU, C.; & JIANG, D. High glucose-induced LIF suppresses osteoblast differentiation via regulating STAT3/SOCS3 signaling. **Cytokine**, v. 91, p. 132–139, 2017.

LIU, H.; et al. An adiponectin receptor agonist promote osteogenesis via regulating bone-fat balance. **Cell Proliferation**, v. 54, n. 6, 2021.

LIU, H.; et al. Protective Role of Oligomycin Against Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction Caused by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ . **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 29, n.5-6, p. 799–808, 2012.

LIU, J.; et al. Extracellular Vesicles from Child Gut Microbiota Enter into Bone to Preserve Bone Mass and Strength. **Advanced Science**, v. 8, n. 9, 2004831, 2021.

LIU, J. et al. The Leptin Resistance. **Advances in experimental medicine and biology**, v. 1090, p. 145-163, 2018.

LONG, F.; ORNITZ, D. M. Development of the endochondral skeleton. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 1, a008334, 2013.

LONGO, M. et al. Adipose Tissue Dysfunction as Determinant of Obesity-Associated Metabolic Complications. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 9, 2358, 2019.

LOPES, D. et al. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. **Biomaterials**, v. 185, p. 240-275, 2018.

LOU, Z.; et al. miR-142-5p promotes the osteoclast differentiation of bone marrow-derived macrophages via PTEN/PI3K/AKT/FoxO1 pathway. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 37, n. 5, p. 815-824, 2019.

LU, J-F. et al. Association of ADIPOQ polymorphisms with obesity risk: a meta-analysis. **Human immunology**, v. 75, n.10, p.1062-1068, 2014.

LU, L. et al. Gut Microbiota and Serum Metabolic Signatures of High-Fat-Induced Bone Loss in Mice. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, 788576, 2021.

LUO, G.; et al. TNF- $\alpha$  and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- $\kappa$ B pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, p. 6605-6611, 2018.

MAAS, S., BREAKFIELD, X. O., WEAVER, A. M. Extracellular Vesicles: Unique Intercellular Delivery Vehicles. **Trends in cell biology**, v. 27, n. 3, p. 172–188, 2017.

MADDEL, M.-B. et al. Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. **Frontiers in immunology**, v. 10, 1408, 2019.

MAEDA, K. et al. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 22, 5525, 2019.

MAGGIO, A.B.; et al. High bone density in adolescents with obesity is related to fat mass and serum leptin concentrations. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**; v. 58, n. 6, p. 723-728, 2014.

MANZINI, B. M. et al. Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review. **Journal of biosciences**, v. 46, 17, 2021.

MARAHLEH, A.; et al. TNF- $\alpha$  Directly Enhances Osteocyte RANKL Expression and Promotes Osteoclast Formation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 2019.

MARIE, P. J. Targeting integrins to promote bone formation and repair. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 5, p. 288–295, 2013.

MAROUSEZ, L.; LESAGE, J.; EBERLÉ, D. Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming?. **Nutrients**, v.1, n.12, 2966, 2019.

MARTIN, P. J; et al. Adipogenic RNAs are transferred in osteoblasts via bone marrow adipocytes-derived extracellular vesicles (EVs). **BMC Cell Biology**, v. 16, n. 1, 10, 2015.

MATSUMOTO, M.A. et al. Bone Tissue Healing Dynamics Damage to Reconstruction. **Journal of molecular signaling updates**, v.1, p.33-40, 2016.

MAURIN; A.C. et al. Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. **Bone**, v. 26, n. 5, p. 485-489, 2000.

MCCABE, L. R.; et al. Exercise prevents high fat diet-induced bone loss, marrow adiposity and dysbiosis in male mice. **Bone**, v. 118, p. 20-31, 2018.

MÉNDEZ-SALAZAR, E. O.; et al. Altered Gut Microbiota and Compositional Changes in Firmicutes and Proteobacteria in Mexican Undernourished and Obese Children. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 2494, 2018.

MERCER R. R. , MIYASAKA, C., MASTRO, A. M. Metastatic breast cancer cells suppress osteoblast adhesion and differentiation. **Clin Exp Metastasis**, v. 21, n. 5, p. 427-435, 2004.

MILISIC, L. et al. Bone Mineral Density Assessment by DXA vs. QCT in Postmenopausal Females with Central Obesity. **Current aging science**, v. 13, n. 2, p.153-161, 2020.

MIN, H., SON, H.; JANG, W. Alpha-pinene promotes osteoblast differentiation and attenuates TNF $\alpha$ - induced inhibition of differentiation in MC3T3-E1 pre-osteoblasts. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 47, p. 831–837, 2019.

MISHRA, V. K. et al. Identifying the Therapeutic Significance of Mesenchymal Stem Cells. **Cells**, v. 9, n. 5, 1145, 2020.

MIZOKAMI, A., KAWAKUBO-YASUKOCHI, T., & HIRATA, M. Osteocalcin and its endocrine functions. **Biochemical pharmacology**, v.132, p. 1–8, 2017.

MONTALVANY-ANTONUCCI, C. C. et al. High-fat diet disrupts bone remodeling by inducing local and systemic alterations. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 59, p. 93-103, 2018.

MONTEIRO, C. A. et al. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 14, Suppl 2 p. 21-28, 2013.

- MOON, S.-J.; et al. Temporal differential effects of proinflammatory cytokines on osteoclastogenesis. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 31, n. 4, p. 769–777, 2013.
- MOREIRA JÚNIOR, R. E. et al. Diet-induced obesity leads to alterations in behavior and gut microbiota composition in mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 92, 108622, 2021.
- MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. TGF- $\beta$  and the TGF- $\beta$  Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 8, n. 5, a021873, 2016.
- MORSE, E. M. et al. Integrin cytoplasmic tail interactions. **Biochemistry**, v. 53, n. 5, p. 810-820, 2014.
- MOSIALOU, I. et al. Lipocalin-2 counteracts metabolic dysregulation in obesity and diabetes. **The Journal of experimental medicine**, v. 217, n. 10, e20191261, 2020.
- MOUSSA, F. M.; et al. Osteoactivin promotes osteoblast adhesion through HSPG and  $\alpha v \beta 1$  integrin. **Journal of cellular biochemistry**, v. 115, n. 7, p. 1243-1253, 2014.
- MUKHERJEE, R.; et al. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase 2 modulates inflammatory vigor during nonalcoholic fatty liver disease progression in mice. **Hepatology Communications**, v. 2, n. 5, p. 546–560, 2018.
- Museu de reproduções de arte. Pintura: Vênus e Cupido com um organista – Tiziano Vecellio 1548. Disponível em: <https://pt.wahooart.com/@/8YE74Y-Tiziano-Veccellio-%28Titian%29-V%C3%A9nus-e-Cupido-com-um-organista>
- NARAYANAN, K.; et al. Lineage-specific exosomes could override extracellular matrix mediated human mesenchymal stem cell differentiation. **Biomaterials**, v. 182, p. 312-322, 2018.
- NEGI, P.C. et al. Role of omega 3 and omega 6 poly unsaturated fatty acids (PUFA) and vitamin D deficiency as risk determinants of metabolic syndrome in obesity: Worksite based case-control observational study. **Diabetes & metabolic syndrome**, v. 16, n. 4, 102467, 2022.
- NEWTON, S. et al. Socio-economic status over the life course and obesity: Systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n.5, e0177151, 2017.
- NIKEL, O. et al. Structural role of osteocalcin and osteopontin in energy dissipation in bone. **Journal of biomechanics**, v. 80, p. 45-52, 2018.
- NÓBREGA, O. T.; et al. Circulating miR-34a and Bone Mineral Density of Brazilian Very-Old Adults. **Journal of Aging Research**, v. 2020, 3431828, 2020.
- O'BRIEN, K.; et al. RNA delivery by extracellular vesicles in mammalian cells and its applications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n.10, p. 585-606, 2020.
- OHORI, F.; K. et al. IL-33 Inhibits TNF- $\alpha$ -Induced Osteoclastogenesis and Bone Resorption. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 3, 1130, 2020.

OKAMOTO, M. et al. Noncanonical Wnt5a enhances Wnt/ $\beta$ -catenin signaling during osteoblastogenesis. **Scientific reports**, v. 4, 4493, 2014.

OKIFUJI, A.; HARE, B. D. The association between chronic pain and obesity. **Journal of pain research**, V. 8, p. 399–408, 2015.

OKUNOGBE, A. et al. Economic impacts of overweight and obesity: current and future estimates for 161 countries. **BMJ global health**, v. 7, n.9, e009773, 2022.

OLIVEIRA, M. C et al. Osteoporosis and osteoarthritis are two sides of the same coin paid for obesity. **Nutrition**, v. 70, 110486, 2020.

OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY. Capítulo 6, módulo 6.3 A estrutura óssea. Disponível em: <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-3-bone-structure/>

OREGON STATE EDUCATION – ANATOMY AND PHYSIOLOGY. Capítulo 6, módulo 6.4 A formação e desenvolvimento ósseos. Disponível em: <https://open.oregonstate.education/aandp/chapter/6-4-bone-formation-and-development/>

Organização Mundial de Saúde – OMS. Obesidade e sobrepeso Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>

Organização Mundial de saúde (OMS) – Tópicos em saúde: Atividade física. Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/physical-activity#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/physical-activity#tab=tab_1)

OSTROWSKA-PODHORODECKA, Z.; MCCULLOCH, C. A. Vimentin regulates the assembly and function of matrix adhesions. **Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society**, v. 29, n. 4, p. 602-612, 2021.

OZEKI, N.; et al . IL-1 $\beta$ induced matrix metalloproteinase-13 is activated by a disintegrin and metalloprotease-28-regulated proliferation of human osteoblast-like cells. **Experimental Cell Research**, v. 323, n. 1, p. 165–177, 2014.

PALACIOS-GONZÁLEZ, B.; et al. Multi-Omic Analysis for Low Bone Mineral Density in Postmenopausal Women Suggests a Relationship between Diet, Metabolites, and Microbiota. **Microorganisms**, v. 8, n. 11, 1630, 2020.

PAN, B. T.; JOHNSTONE, R. M. Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: Selective externalization of the receptor. **Cell**, v. 33, n. 3, p. 967–978, 1983.

PAN, Y.; et al. Adipocyte-secreted exosomal microRNA-34a inhibits M2 macrophage polarization to promote obesity-induced adipose inflammation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 129, n. 2, p. 834–849, 2019.

- PAPAVRAMIDOU, N.S.; PAPVRAMIDIS; S.T.; CHRISTOPOULOU-ALETRA, H. Galen on Obesity: Etiology, Effects, and Treatment. **World journal of surgery**, v.28, n.6, p.631–635, 2004.
- PARRY, S.M., PUTHUCHEARY, Z.A. The impact of extended bed rest on the musculoskeletal system in the critical care environment. **Extrem Physiol Med**, v. 4,16, 2015.
- PETAK, S. et al. The Official Positions of the International Society for Clinical Densitometry: body composition analysis reporting. **Journal of clinical densitometry : the official journal of the International Society for Clinical Densitometry**, v. 16, n.4, p. 508-519, 2013.
- PHILBRICK, K. A.; et al. Leptin stimulates bone formation in ob/ob mice at doses having minimal impact on energy metabolism. **Journal of Endocrinology**, v. 232, n. 3, p. 461–474, 2017.
- PODDAR, M., CHETTY, Y.; CHETTY, V. T. How does obesity affect the endocrine system? A narrative review. **Clinical obesity**, v. 7,n. 3, p.136–144, 2017.
- PULLIERO, A; et al. Extracellular vesicles in biological fluids. A biomarker of exposure to cigarette smoke and treatment with chemopreventive drugs. **J Prev Med Hyg**, v. 60, n. 4, E327-E336, 2019.
- QI, S.; et al. FAK Promotes Early Osteoprogenitor Cell Proliferation by Enhancing mTORC1 Signaling. **J Bone Miner Res**, v. 35, n. 9, p. 1798-1811, 2020.
- QIAO, D. et al. Association of obesity with bone mineral density and osteoporosis in adults: a systematic review and meta-analysis. **Public health**, v. 180, p. 22-28, 2020.
- QIAO, J., WU, Y., REN, Y. The impact of a high fat diet on bones: potential mechanisms. **Food & function**, v. 12, n. 3, p. 963–975, 2021.
- QU, X.; et al. Lenalidomide regulates osteocytes fate and related osteoclastogenesis via IL-1 $\beta$ /NF- $\kappa$ B/RANKL signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 501, n. 2, p. 547–555, 2018.
- RAHMAN, M. M.; et al. Nox2 Activity Is Required in Obesity-Mediated Alteration of Bone Remodeling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–10, 2018.
- RAHMAN, S.; et al. Inducible Brown Adipose Tissue, or Beige Fat, Is Anabolic for the Skeleton. **Endocrinology**, v. 154, n. 8, p. 2687–2701, 2013.
- RAZNY, U.; et al. Relation of the protein glycation, oxidation and nitration to the osteocalcin level in obese subjects. **Acta Biochimica Polonica**, v. 64, n. 3, p. 415–422, 2017.
- REID, I. R.; BALDOCK, P. A.; & CORNISH, J. Effects of Leptin on the Skeleton. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 6, p. 938-959, 2018.
- RENOVATO-MARTINS, M.; et al. Microparticles derived from obese adipose tissue elicit a pro-inflammatory phenotype of CD16+, CCR5+ and TLR8+ monocytes. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**, v. 1863, n.1, p.139-151, 2017.



RIOS, J.L.; et al. Protective effect of prebiotic and exercise intervention on knee health in a rat model of diet-induced obesity. **Sci Rep**, v. 9, n. 1, 3893, 2019.

RISTIC-MEDIC, D., BAJERSKA, J., & VUCIC, V. Crosstalk between dietary patterns, obesity and nonalcoholic fatty liver disease. **World journal of gastroenterology**, v. 28, n. 27, p. 3314–3333, 2022.

ROBERTS, A. B.; et al. New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 9, 1981, p. 5339-5343, 1981.

ROEDER, E., MATTHEWS, B. G., & KALAJZIC, I. Visual reporters for study of the osteoblast lineage. **Bone**, v. 92, p. 189–195, 2016.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, Inflammation, Toll-Like Receptor 4 and Fatty Acids. **Nutrients**, v.10, n. 4, 432, 2018.

ROLIAN, C. Endochondral ossification and the evolution of limb proportions. **Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology**, v. 9, n. 4, e373, 2020.

ROMERO-IBARGUENGOITIA, M. E. et al. Family history and obesity in youth, their effect on acylcarnitine/aminoacids metabolomics and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). Structural equation modeling approach. **PLoS one**, v. 13, n. 2, e0193138, 2018.

ROSEN, C. J.; BOUXXEIN, M. L. Mechanisms of disease: is osteoporosis the obesity of bone? **Nature clinical practice. Rheumatology**, v. 2, n. 1, p. 35–43, 2006.

ROSS, R. et al. Waist circumference as a vital sign in clinical practice: a Consensus Statement from the IAS and ICCR Working Group on Visceral Obesity. **Nature reviews Endocrinology**, v. 16, n.3, p. 177-189, 2020.

ROSSI, M. et al. Looking for new anabolic treatment from rare diseases of bone formation. **The Journal of endocrinology**, v. 248, n. 2, p. R29-R40, 2021.

RUTKOVSKIY, A., STENSLOKKEN, K. O.; VAAGE, I. J. Osteoblast Differentiation at a Glance. *Medical science monitor basic research*, v. 22, p. 95–106, 2016.

SABATER GONZÁLEZ, M. Skeletal Cartilage and Bone Formation, Composition, and Function in Small Mammals, Birds, and Reptiles. **The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice**, v. 22, n. 2, p. 123-134, 2019.

SADEGHI, O. et al. Abdominal Obesity and Risk of Hip Fracture: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. **Advances in nutrition**, v. 8, n. 5, p. 728-738, 2017.

SAIDAK, Z.; et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling mediates osteoblast differentiation triggered by peptide-induced  $\alpha 5\beta 1$  integrin priming in mesenchymal skeletal cells. **J Biol Chem**, v. 290, n. 11, p. 6903-6912, 2015.

- SAITO, M.; MARUMO, K. Bone Quality in Diabetes. **Frontiers in Endocrinology**, v. 4, 2013.
- SALASZNYK, R. M; et al. Activation of FAK is necessary for the osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on laminin-5. **J Cell Biochem**, v.100, n.2, p. 499-514, 2007.
- SCHETZ, M. et al. Obesity in the critically ill: a narrative review. **Intensive care medicine**. n.45, n.6, p.757-769, 2019.
- SEFAT, F. et al. Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) isomers influence cell detachment of MG-63 bone cells. **Tissue & cell**, v. 47, n. 6, p. 567-574, 2015.
- SEO, Y.G. et al. Relationship Between Bone Mineral Density and Body Composition According to Obesity Status in Children. **Endocr Pract**. v. 27, n. 10, p. 983-991, 2021.
- SERAVALLE G.; GRASSI, G. Obesity and hypertension. **Pharmacol Res.**; v. 122, p.1-7, 2017.
- SESHADRI, K. Obesity: A Venusian story of Paleolithic proportions. **Indian Journal of Endocrinology and Metabolism**, v.16, n.1, 134, 2012.
- SHAH, R.; PATEL, T.; FREEDMAN, J. E. Circulating Extracellular Vesicles in Human Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 379, n. 10, p. 958–966, 2018.
- SHEN, C.-L.; et al. Green tea polyphenols benefits body composition and improves bone quality in long-term high-fat diet– induced obese rats. **Nutrition Research**, v. 32, n. 6, p. 448–457, 2012.
- SHINOHARA, H.; et al. Double Stranded RNA-Dependent Protein Kinase is Necessary for TNF- $\alpha$ -Induced Osteoclast Formation In Vitro and In Vivo. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 9, p. 1957–1967, 2015.
- SHU, L.; et al. High-Fat Diet Causes Bone Loss in Young Mice by Promoting Osteoclastogenesis Through Alteration of the Bone Marrow Environment. **Calcified Tissue International**, v. 96, n. 4, p. 313–323, 2015.
- SIMEONE, P.; et al. Extracellular Vesicles as Signaling Mediators and Disease Biomarkers across Biological Barriers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, 2514, 2020.
- SIMOPOULOS, A. P.; DINICOLANTONIO, J. J. The importance of a balanced  $\omega$ -6 to  $\omega$ -3 ratio in the prevention and management of obesity. **Open heart**, v. 3, n. 2, e000385, 2016.
- SKOTLAND, T.; et al. An emerging focus on lipids in extracellular vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 159, p. 308-321, 2020.
- SON, H. S.; et al. Benzylamine inhibits osteoclast differentiation and bone resorption via down-regulation of interleukin-1 expression. **Acta Pharmaceutica Sinica B** ,v. 10, n. 3, 462e474, 2019.

SUN, C.; et al. FAK Promotes Osteoblast Progenitor Cell Proliferation and Differentiation by Enhancing Wnt Signaling. **J Bone Miner Res**, v. 31, n. 2, p. 2227-2238, 2016.

SUN, X.; et al. Modulation of gut microbiota by fucoxanthin during alleviation of obesity in high-fat diet-fed mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 68, n.18, p. 5118-5128, 2020.

SUN, X.; et al. TGF- $\beta$  Inhibits Osteogenesis by Upregulating the Expression of Ubiquitin Ligase SMURF1 via MAPK-ERK Signaling. *Journal of Cellular Physiology*. **J Cell Physiol**, v. 233, n.1, p. 596-606, 2018.

SUZUKI, E. et al. Akt activation is required for TGF- $\beta$ 1-induced osteoblast differentiation of MC3T3-E1 pre-osteoblasts. **PloS one**, v. 9, n. 12, e112566, 2014.

TAKEUCHI, K. et al. Tgf-Beta inhibition restores terminal osteoblast differentiation to suppress myeloma growth. **PloS one**, v. 5, n. 3, e9870, 2010.

TAPIAL, M. P.; LÓPEZ, N. P, LIETHA D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. **Biomolecules**, v.10, n.2, 179, 2020.

TERAJIMA, M. et al. Glycosylation and cross-linking in bone type I collagen. **The Journal of biological chemistry** v. 289, n. 33, p. 22636-22647, 2014.

TOKGÓZ, Y. et al. Perilipin polymorphisms are risk factors for the development of obesity in adolescents? A case-control study. **Lipids in health and disease**, v. 16, n. 1, 52, 2017.

TORRES-CASTILLO, N. et al. High Dietary  $\omega$ -6: $\omega$ -3 PUFA Ratio Is Positively Associated with Excessive Adiposity and Waist Circumference. **Obesity facts**, v. 11, n. 4, p. 344-353, 2018.

TRESGUERRES, F. G. F. et al. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. **Annals of anatomy = Anatomischer Anzeiger: official organ of the Anatomische Gesellschaft**, v. 227, 151422, 2020.

TSAI, C.-L.; et al. TNF- $\alpha$  induces matrix metalloproteinase-9-dependent soluble intercellular adhesion molecule-1 release via TRAF2- mediated MAPKs and NF- $\kappa$ B activation in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. **Journal of Biomedical Science**, v. 21, n. 1, 12, 2014.

TU, Q.; et al. Adiponectin Inhibits Osteoclastogenesis and Bone Resorption via APPL1-mediated Suppression of Akt1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.14, p.12542–12553, 2013.

TU, X. et al. Noncanonical Wnt signaling through G protein-linked PKCdelta activation promotes bone formation. **Developmental cell**, v. 12, n. 1, p. 113-127, 2007.

TURCOTTE, A-F. et al. Association between obesity and risk of fracture, bone mineral density and bone quality in adults: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 16, n. 6, e0252487, 2021.

UNAMUNO, X. et al. Adipokine dysregulation and adipose tissue inflammation in human obesity. **European journal of clinical investigation**, v. 48, n. 9, e12997, 2018.

VADDE, R., GUPTA, M. K., & NAGARAJU, G. P. Is Adipose Tissue an Immunological Organ? **Critical reviews in immunology**, v. 39, n. 6, p. 481–490, 2019.

VAN NIEL, G.; D'ANGELO, G.; RAPOSO, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 4, p. 213-228, 2018.

VANDER, A.; ALEXANDRA, C. J.; LI, X. TGF- $\beta$  receptors: In and beyond TGF- $\beta$  signaling. **Cell Signal**, v. 52, p. 112-120, 2018.

VERRUGIO, C. C. Role of Transforming Growth Factor Family of Peptides in Health and Diseases. **Current Protein & Peptide Science**, v. 19, n. 12 ,p. 1136–1137, 2018.

VERSTAPPEN, J. F. M.; et al. RGD-functionalized supported lipid bilayers modulate pre-osteoblast adherence and promote osteogenic differentiation. **Journal of biomedical materials research. Part A**, v. 108, n. 4, p. 923-937, 2020.

VIGEVANO, F.; et al. In Men With Obesity, T2DM Is Associated With Poor Trabecular Microarchitecture and Bone Strength and Low Bone Turnover. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**,v. 106, n. 5, p. 1362–1376, 2021.

Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico (VIGITEL) – 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/publicacoes-svs/vigitel/vigitel-brasil-2021-estimativas-sobre-frequencia-e-distribuicao-sociodemografica-de-fatores-de-risco-e-protecao-para-doencas-cronicas/>

VILLARROYA, F. et al. Inflammation of brown/beige adipose tissues in obesity and metabolic disease. **Journal of internal medicine**, v. 284, n. 5, p. 492-504, 2018.

WAGNER, K.J.P et al. Socio-economic life course and obesity among adults in Florianopolis, southern Brazil. **Gaceta sanitaria**, v. 32, n.3, p.244-250, 2018.

WALLACE, J. M .et al. Distribution of type I collagen morphologies in bone: relation to estrogen depletion. **Bone**, v. 46, n. 5, p.1349-1354, 2010.

WALMSLEY, G. G., et al. Stem Cells in Bone Regeneration. **Stem cell reviews and reports**, v. 12, n. 5, p. 524–529, 2016.

WALSH, J. S., ViLAVA, T. Obesity, Type 2 Diabetes and Bone in Adults. **Calcified tissue international**, v. 100, n. 5, p. 528–535, 2017.

WANG, C.; et al. Interleukin-6 gene knockout antagonizes high-fat-induced trabecular bone loss. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 57, n. 3, p. 161– 170, 2016.

WANG, F.; et al. Deficiency of Adiponectin Protects against Ovariectomy-Induced Osteoporosis in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, e68497, 2013.

- WANG, J. et al. Characterization and therapeutic applications of mesenchymal stem cells for regenerative medicine. **Tissue & cell**, v. 64, 101330, 2020.
- WANG, N.; et al. TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation upregulates microRNA-150-3p and inhibits osteogenesis of mesenchymal stem cells by targeting  $\beta$ -catenin. **Open Biology**, v. 6,n. 3, 150258, 2016.
- WANG, Y.; et al. IL1 $\beta$  and TNF $\alpha$  promote RANKL-dependent adseverin expression and osteoclastogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 131, n.11, jcs213967, 2018.
- WEE, N. K. Y.; et al. Diet-induced obesity suppresses cortical bone accrual by a neuropeptide Y-dependent mechanism. **International Journal of Obesity**, v. 42, n. 11, p. 1925-1938, 2018.
- WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, 2003.
- WIECHERT, M.; HOLZAPFEL, C. Nutrition Concepts for the Treatment of Obesity in Adults. **Nutrients**, v. 14, n. 1, 169, 2021.
- WITTKOWSKE, C. et al. In Vitro Bone Cell Models: Impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. **Frontiers in bioengineering and biotechnology**, v. 4, n. 87, 2016.
- WONG, J. C. et al. Comparison of obesity and metabolic syndrome prevalence using fat mass index, body mass index and percentage body fat. **PLoS one**, v. 16, n.1, e0245436, 2021.
- WU, M.; CHEN, G.; LI, Y. P. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. **Bone Research**, v. 4, 16009, 2016.
- WU, Z.; et al. Systemic leptin administration alters callus VEGF levels and enhances bone fracture healing in wildtype and ob/ob mice. **Injury**, v. 49, n. 10, p. 1739-1745, 2018.
- XIE, H.; et al Graphene-Induced Osteogenic Differentiation Is Mediated by the Integrin/FAK Axis. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 3, 574, 2019.
- XU, F.; et al. Long noncoding RNAs in autoimmune diseases. **Journal of Biomedical Materials Research Part A.**, v. 107, n. 2, p. 468-475, 2019.
- YAMAMOTO, T. et al. Role of advanced glycation end products in adynamic bone disease in patients with diabetic nephropathy. **American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 38, n.4, Suppl 1, p. S161-164, 2001.
- YAN, Y. X.; et al. Mechanical strain regulates osteoblast proliferation through integrin-mediated ERK activation. **PLoS One**, v.7, n. 4, e35709, 2012.
- YAN, Y.; et al. Mechanical strain promotes osteoblastic differentiation through integrin- $\beta$ 1-mediated  $\beta$ -catenin signaling. **Int J Mol Med**, v. 38, n. 2, p. 594-600, 2016.

YANG, J.; et al. Adiponectin Deficiency Triggers Bone Loss by Up-Regulation of Osteoclastogenesis and Down-Regulation of Osteoblastogenesis. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, 2019.

YAO, Y-S. et al. Association between PPAR- $\gamma$ 2 Pro12Ala polymorphism and obesity: a meta-analysis. **Molecular biology reports**, v. 42, n. 6, p. 1029-1038, 2015.

YE, X.;et al. Inhibition of Runx2 signaling by TNF- $\alpha$  in ST2 murine bone marrow stromal cells undergoing osteogenic differentiation. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 52, n. 10, p. 1026–1033, 2016.

YING, W. et al. The role of macrophages in obesity-associated islet inflammation and  $\beta$ -cell abnormalities. **Nature reviews. Endocrinology**, v. 16, n. 2, p. 81-90, 2020.

YUAN, T.; et al. Extracellular vesicles derived from T-cell acute lymphoblastic leukemia inhibit osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via miR-34a-5p. **Endocr J.**, v. 68, n. 10, p. 1197-1208, 2021.




YUE, R.; et al. Leptin Receptor Promotes Adipogenesis and Reduces Osteogenesis by Regulating Mesenchymal Stromal Cells in Adult Bone Marrow. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 6, p. 782–796 2016.

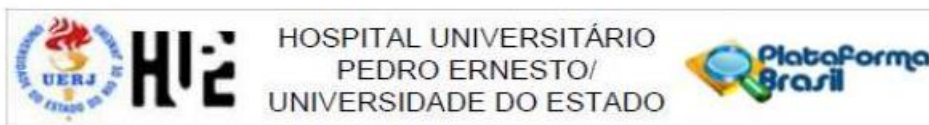
ZHANG, K. et al. Preservation of high-fat diet-induced femoral trabecular bone loss through genetic target of TNF- $\alpha$ . **Endocrine**, v. 50, n. 1, p. 239-249, 2015.

ZHOU, S. TGF- $\beta$  regulates  $\beta$ -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. **J Cell Biochem**, v. 112, n. 6, p.1651-1660, 2011.

ZWICK, R. K., et al. Anatomical, Physiological, and Functional Diversity of Adipose Tissue. **Cell metabolism**, v. 27, n. 1, p. 68–83, 2018.

## ANEXO A – Aprovação do comitê de ética em pesquisa (Hospital Federal de Ipanema)

		HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PEDRO ERNESTO/ UNIVERSIDADE DO ESTADO	
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>			
<b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b>			
<b>Título da Pesquisa:</b> Interação de moléculas secretadas pelo tecido adiposo com as funções monocitárias e linhagens celulares imortalizadas			
<b>Pesquisador:</b> Thereza Christina Barja Fidalgo			
<b>Área Temática:</b> Genética Humana: (Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);			
<b>Versão:</b> 2			
<b>CAAE:</b> 36880914.0.0000.5259			
<b>Instituição Proponente:</b> Hospital Universitário Pedro Ernesto			
<b>Patrocinador Principal:</b> FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO MINISTERIO DA EDUCACAO			
<b>DADOS DO PARECER</b>			
<b>Número do Parecer:</b> 923.929			
<b>Data da Relatoria:</b> 16/12/2014			
<b>Apresentação do Projeto:</b> Documentação dentro das boas práticas em pesquisa.			
<b>Objetivo da Pesquisa:</b> Objetivos em concordância com o projeto .			
<b>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> exames coletados durante o procedimento cirurgico. paciente ja com acesso venoso, portanto sem riscos extras.			
<b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> Todos os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todas dados necessários para apreciação ética. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas			
<b>Endereço:</b> Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo			
<b>Bairro:</b> Vila Isabel <b>CEP:</b> 20.551-030			
<b>UF:</b> RJ <b>Município:</b> RIO DE JANEIRO			
<b>Telefone:</b> (21)2868-8253 <b>Fax:</b> (21)2264-0853 <b>E-mail:</b> cep-hupe@uerj.br			



Continuação do Parecer: 923.929

virgentes e sem riscos eminentes ao participante de pesquisa envolvido.

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

as modificações foram atendidas.

**Recomendações:**

Apenas modificar um detalhe (na parte do texto do TCLE que segue retirar "pela sua cirurgia - deixando apenas durante sua cirurgia):

"A coleta de sangue e tecido adiposo será feita pelo médico responsável pela sua cirurgia durante o decorrer da mesma, e por isso é totalmente indolor e sem nenhum risco adicional ao do procedimento cirúrgico para o paciente (já informado no termo de consentimento da cirurgia)."

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

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO

**Situação do Parecer:**

Aprovado

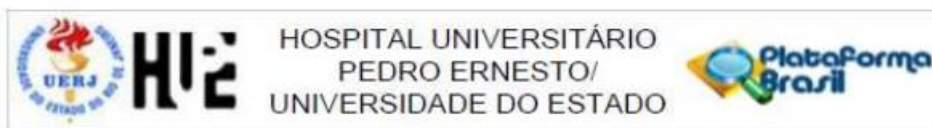
**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: 1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e termo de consentimento livre e esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de pacientes deve ser temporariamente interrompida até a resposta do Comitê, após análise das mudanças propostas. 2. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes. 3. O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais e anuais referentes ao andamento da pesquisa ao término da pesquisa encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto.





Continuação do Parecer: 523.529

RIO DE JANEIRO, 19 de Dezembro de 2014

---

Assinado por:  
WILLE OIGMAN  
(Coordenador)

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de ética em pesquisa (Hospital Universitário Pedro Ernesto)



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Papel do tecido adiposo sobre células do sistema imune, linhagens celulares primárias e imortalizadas

**Pesquisador:** Thereza Christina Barja Fidalgo

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 56302121.2.0000.5259

**Instituição Proponente:** Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 5.602.906

**Apresentação do Projeto:**

Transcrição editada do conteúdo registrado do protocolo "Nome do Arquivo: PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_1862299" e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. A obesidade é um dos maiores problemas mundiais de saúde pública, sendo um fator de risco para o desenvolvimento de diversas doenças crônicas, entre elas o câncer e disfunções endoteliais e ósseas. Durante a obesidade, ocorre uma expansão anormal do tecido adiposo (TA), o que acarreta em um estado inflamatório caracterizado pela elevação sistêmica de moléculas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-6, importantes no desenvolvimento de complicações metabólicas. Adicionalmente, o TA de indivíduos obesos libera maiores quantidades de vesículas extracelulares (VEs), estruturas responsáveis pela comunicação célula-célula, podendo então modificar o fenótipo e função das células receptoras. Estudos recentes demonstraram que VEs apresentam um papel multifacetado no câncer, sendo capazes de promover a progressão tumoral pela modulação do microambiente tumoral. Demonstramos que VEs liberadas pelo TA modulam monócitos humanos para um perfil pró-inflamatório. Sendo assim, faz-se necessário estudos adicionais que demonstrem a influência do tecido adiposo sobre as células do sistema imune presentes no tecido

**Endereço:** Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br



Continuação do Parecer: 5.802.906

adiposo: os neutrófilos, que são os primeiros leucócitos a chegarem ao tecido adiposo inflamado, assim como macrófagos, que formam a principal população de células no tecido adiposo inflamado. Estudos epidemiológicos têm correlacionado obesidade e aumento da incidência do risco de câncer de mama, além da piora do prognóstico deste tipo de câncer entre mulheres obesas. Um outro ponto a ser observado é que a obesidade causa uma desregulação no sistema endócrino, alterando a homeostase vascular e contribuindo para a disfunção endotelial, como já demonstrado em alguns trabalhos científicos. A obesidade, a carcinogênese e disfunções endoteliais compartilham características em comum, pois compartilham vias inflamatórias. Já foi demonstrado que eventos celulares que acontecem no TA inflamado culminam na liberação de TNF-, IL-6 e PGE2, que podem estimular a expressão de aromatase, que está diretamente relacionada com a o aumento da progressão e mortalidade do câncer de mama. Sendo assim, torna-se de grande interesse a investigação da composição molecular da secreção e das VEs liberadas pelos diferentes depósitos de TA e seu efeito sobre linhagens celulares tumorais e endoteliais, caracterizando e elucidando os mecanismos celulares envolvidos nessas alterações funcionais. Adicionalmente a isso, alguns trabalhos apontam que a obesidade impacta de forma negativa a densidade mineral e a matriz extracelular ósseas, por interferir no funcionamento das células deste tecido. Citocinas inflamatórias e outras moléculas derivadas do tecido adiposo obeso podem favorecer a diferenciação de osteoclastos, que são células multinucleadas derivadas de monócitos de medula óssea, que realizam a reabsorção do tecido. Da mesma forma, alguns destes mediadores também podem direcionar as células tronco mesenquimais da medula óssea para um perfil mais adipogênico, reduzindo a formação de osteoblastos, que são as células responsáveis pela formação dos componetes da matriz extracelular óssea. Há poucos dados na literatura sobre a participação das VEs derivadas do tecido adiposo sobre o remodelamento ósseo. Destaca-se o trabalho de Perrine e colaboradores (2015), mostrando que vesículas de adipócitos podem transferir RNAs adipogênicos e miRNAs antiosteogênicos para osteoblastos. Porém, esta vertente tem sido pouco explorada. A compreensão do papel das VEs liberadas pelo tecido adiposo

**Endereço:** Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br



Continuação do Parecer: 5.602.906

obeso, bem como outros mediadores, na função e diferenciação tanto de osteoblastos quanto de osteoclastos faz-se necessária para obtermos maior entendimento do papel da obesidade na regulação do tecido ósseo.

**Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

• Quantificar as adipocinas liberadas pelos diferentes depósitos de tecido adiposo • Quantificar as vesículas extracelulares liberadas pelos diferentes depósitos de tecido adiposo • Caracterizar o conteúdo proteico e metabólico das vesículas extracelulares • Caracterizar o papel do meio secretado pelos diferentes depósitos de tecido adiposo sobre a transição epitélio mesênquima (TEM) em células tumorais. • Caracterizar o papel do meio secretado pelos diferentes depósitos de tecido adiposo sobre o perfil inflamatório de leucócitos circulantes. • Caracterizar o papel do meio secretado pelos diferentes depósitos de tecido adiposo sobre o perfil angiogênico e inflamatório de células endoteliais. • Caracterizar o papel do meio secretado pelos diferentes depósitos de tecido adiposo sobre a migração e invasão e perfil metabólico de células tumorais. • Caracterizar o papel do meio secretado pelos diferentes depósitos de tecido adiposo na proliferação, diferenciação e produção de matriz extracelular calcificada de osteoblastos. • Caracterizar o papel do meio secretado pelos diferentes depósitos de tecido adiposo na diferenciação e capacidade reabsortiva de osteoclastos.

Objetivo Secundário:

• Identificação de possíveis biomarcadores comuns (séricos ou no tecido adiposo) entre pacientes com recidiva de obesidade após a cirurgia bariátrica. • Identificação de possíveis biomarcadores comuns (séricos ou no tecido adiposo) entre pacientes que não perdem peso após a cirurgia bariátrica.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

A coleta de sangue e tecido adiposo será feita pelo médico responsável pela sua cirurgia durante o decorrer da mesma, e por isso é totalmente indolor e sem nenhum risco adicional ao do procedimento cirúrgico para o paciente (já informado)

**Endereço:** Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br



Continuação do Parecer: 5.602.906

no termo de consentimento da cirurgia).

**Benefícios:**

Tal estudo possibilitará a melhor compreensão de mecanismos envolvidos na gênese da inflamação do tecido adiposo. Sendo assim, contribuindo para a elucidação de novos mecanismos envolvidos na inflamação do tecido adiposo (bem como a migração de células inflamatórias para o mesmo) que posteriormente podem dar origem à novas janelas de intervenções terapêuticas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível. Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos na pesquisa.

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

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

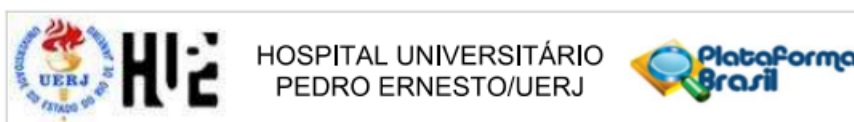
- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado
- 2) Projeto de Pesquisa: Adequado
- 3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado
- 4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado
- 5) Cronograma: Adequado
- 6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado
- 7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos na pesquisa.

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

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Após análise do protocolo foi verificado o atendimento à legislação vigente e o protocolo encontra-se apto para início. Diante do

**Endereço:** Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br



Continuação do Parecer: 5.602.906

exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em consonância com a resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o CEP recomenda ao O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado, Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. Sª., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

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

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1862299.pdf	27/04/2022 19:58:08		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Termo_de_Consentimento_Livre_e_Esclarecido_adulto_Projeto_HUPE_Tecido_Adiposo_Corrigido.pdf	27/04/2022 19:49:27	YASMIN SILVA FORTE	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaração_de_ciencia_e_confidencialidade_HUPE_tecido_adiposo.pdf	09/02/2022 10:33:58	YASMIN SILVA FORTE	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_PAPEL_DO_TECIDO_ADIPOSO_EM_CELULAS_IMORTALIZADAS_E_PRIMARIAS.pdf	23/11/2021 11:52:30	YASMIN SILVA FORTE	Aceito
Folha de Rosto	FOLHA_DE_ROSTO_COLETA_DE_TECIDO_ADIPOSO.pdf	23/11/2021 11:48:13	YASMIN SILVA FORTE	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br



Continuação do Parecer: 5.602.906

RIO DE JANEIRO, 25 de Agosto de 2022

---

**Assinado por:**  
**WILLE OIGMAN**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio  
**Bairro:** Vila Isabel **CEP:** 20.551-030  
**UF:** RJ **Município:** RIO DE JANEIRO  
**Telefone:** (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br