

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

**DENISE WEFFORT**

**Efeitos da diabetes mellitus tipos 1 e 2 na diferenciação osteoblástica de  
células-tronco mesenquimais**

RIBEIRÃO PRETO

2023



**DENISE WEFFORT**

**Efeitos da diabetes mellitus tipos 1 e 2 na diferenciação  
osteoblástica de células-tronco mesenquimais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia  
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa

**RIBEIRÃO PRETO**

**2023**

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

### Catálogo da Publicação

Serviço de Documentação Odontológica

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Weffort, Denise

Efeitos da diabetes mellitus tipos 1 e 2 na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais. Ribeirão Preto, 2023.

85p.: il.; 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Periodontia). Área de concentração: Cirurgia Buco-Maxilo-Facial.

Orientador: Rosa, Adalberto Luiz

1. Célula-tronco mesenquimal; 2. Diabetes mellitus; 3. Diferenciação osteoblástica; 4. Osteoblasto.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

WEFFORT, D. **Efeitos da diabetes mellitus tipos 1 e 2 na diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Programa: Odontologia (Periodontia)

Área de concentração: Cirurgia-Buco-Maxilo-Facial

Aprovada em: \_\_/\_\_/\_\_

### Banca examinadora

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Prof. Dr.:** \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



Trabalho realizado nos Laboratórios de Cultura de Células, Biologia Molecular e LAB 3D BIO e nos Biotérios da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na modalidade Bolsa de Mestrado (Processo nº 2019/18711-7) e Auxílio à Pesquisa – Projeto Temático (Processo nº 2017/12622-7).





Dedico,

Ao meu pai e irmã,

Paulo e Nádyá.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e dar forças para enfrentar as adversidades da vida e por permitir que esse sonho se realizasse.

A Nossa Senhora Aparecida, por manter a minha fé e esperança.

Aos meus pais, Paulo Antonio Weffort e Vera Lucia de Souza Weffort (*in memoriam*), pelo amor incondicional, educação, por serem meus exemplos na vida, pelos incentivos e confiança depositada em mim. Agraço todo esforço que fizeram por mim.

A minha irmã, Nádyá Cristina Weffort, por todas as trocas, ajudas, conversas, por dividir comigo as alegrias e tristezas da vida, por me apoiar e nunca ter deixado que eu desistisse. Amo você.

Ao meu parceiro de vida, Manoel Duarte Moreira Neto, pelo amor, por ser meu melhor amigo, por toda paciência, por entender as minhas ausências, por me incentivar e fazer meus dias mais leves e por compartilhar a vida comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa, por ser meu orientador durante esses anos, pelos ensinamentos transmitidos, pela paciência, por me ajudar na reta final desse trabalho e não ter desistido de mim. É um exemplo a ser seguido na pesquisa. Minha eterna gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Márcio Mateus Beloti, pelos ensinamentos transmitidos, por toda ajuda prestada e gentileza. Terá sempre minha admiração.

A Prof. Dra. Emanuela Prado Ferraz, quem admiro muito, pelos ensinamentos transmitidos, por toda ajuda, por sempre me ouvir, por ter acreditado em mim e pelos inúmeros conselhos. Obrigada por tudo.

À minha grande amiga, Letícia Faustino Adolpho, por ser minha dupla desde a graduação, por me ouvir, ajudar, pela compreensão, paciência e pelos conselhos. Por ser exemplo de dedicação em tudo que faz. Obrigada por tudo. Amo você.

Ao meu amigo, Allan Thaffarell Portilho de Souza, por todos os ensinamentos desde a graduação, por toda ajuda dentro e fora do laboratório e pela amizade construída ao longo dos anos.

Ao Gileade e Helena, pelos ensinamentos transmitidos tanto no laboratório quanto na clínica, por todo auxílio prestado e pela amizade construída.

Ao Roger, pelo conhecimento transmitido desde a minha iniciação científica, por todo auxílio prestado e pela amizade.

À Fabiola pelo conhecimento transmitido e por todo auxílio prestado durante a realização deste projeto.

À Adriana e Milla, pelos ensinamentos compartilhados e pelas horas de descontração.

Aos colegas de laboratório Ana Carolina Loyola, Maria Paula Gomes, Thaís Milan, Georgia Kors, Paola Souza, Gabriela Guaraldo, Letícia Castro, José Bernardo, Rayana Longo, Jéssica Moura Paz e Jaqueline Ramos, pelas experiências compartilhadas e boa convivência.

Aos Professores do Departamento de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Faciais e Periodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto: Alexandre Trivellato, Cássio Sverzut, Samuel Xavier e Valdemar Rocha Barros, pelo conhecimento transmitido desde a graduação.

Aos colegas de pós-graduação Adriano Garcia, Felipe Almeida, Gabriel Duarte, João Lisboa, José Henrique, Juliana Rozatto, Lucas Moura e Lucas Nogueira, pelas experiências compartilhadas, pelos ensinamentos clínicos e pela convivência.

Às funcionárias, Isabel, Imaculada, Dulce, Daniela e Rosângela, por todo auxílio prestado.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo pela infraestrutura, por permitir a realização deste trabalho e por me acolher desde a graduação.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Universidade Estadual Paulista, Prof. Dra. Roberta Okamoto e equipe, pela colaboração deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro deste projeto através dos Processos 2019/18711-7 e 2017/12622-7.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

A todos que participaram deste trabalho de forma direta ou indireta.

**Muito obrigada!**



## RESUMO

WEFFORT, D. **Efeitos da diabetes mellitus tipos 1 e 2 no processo de diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais.** 2023. 85p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A diabetes mellitus (DM) é um conjunto de doenças cuja incidência tem aumentado na população mundial e que pode ser dividida em dois tipos principais: tipo 1 (DM1), que tem como característica a ausência da secreção de insulina e tipo 2 (DM2), que é uma combinação da resistência à insulina e sua secreção diminuída, sendo que ambos os tipos levam à hiperglicemia persistente. O controle inadequado da hiperglicemia leva a complicações em diversos órgãos como rins, olhos, vasos e tem se estudado muito a relação da DM com tecido ósseo. Sabe-se que altas concentrações de glicose afetam os osteoblastos, levando a diminuição da proliferação celular, da expressão de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica e da formação de nódulos mineralizados. No entanto, não existem estudos comparando os eventuais efeitos distintos na diferenciação osteoblástica induzidos pela DM1 e DM2 e investigando quais vias de sinalização celular poderiam estar envolvidas nesse processo. Sendo assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da DM tipos 1 e 2 sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais (MSCs) e a participação das vias de sinalização das BMP, WNT e integrinas (ITG), que estão entre as principais vias que atuam neste processo e que são afetadas pela hiperglicemia. Para isso, DM1 e DM2 foram induzidas em ratos Wistar e MSCs foram isoladas a partir da medula óssea e cultivadas em condições osteogênicas, para induzir a diferenciação osteoblástica, e hiperglicêmicas. Foram avaliadas a proliferação celular, a atividade de fosfatase alcalina (ALP), a formação de matriz extracelular mineralizada, a expressão gênica dos marcadores osteoblásticos fator de transcrição relacionado ao *runt2* (*Runx2*), *osterix*, *Alp*, sialoproteína óssea e osteocalcina e a expressão proteica de RUNX2. Também foi avaliada a expressão gênica de componentes das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG. Os resultados indicam que a DM diminui a proliferação celular, atividade de ALP e formação de nódulos mineralizados e expressão de genes osteoblásticos, sendo DM1 mais severa que DM2. As vias sinalização avaliadas também apresentaram maior número de genes com modulação negativa na DM1. Entretanto, ao cultivar as MSCs em condições

normoglicêmicas as células DM1 apresentaram recuperação parcial do potencial osteoblástico, o que não ocorreu nas células DM2.

**Palavras-chave:** Célula-tronco mesenquimal, diabetes mellitus, diferenciação osteoblástica, osteoblasto.

## ABSTRACT

WEFFORT, D. **Effects of type 1 and 2 diabetes mellitus on the osteoblastic differentiation process of mesenchymal stem cells**. 2023. 85p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Diabetes mellitus (DM) is a group of diseases that can be divided into two main types: type 1 (DM1), which is characterized by the absence of insulin production and type 2 (DM2), which is a combination of resistance to and reduced production of insulin, both types lead to hyperglycemia. Inadequate control of hyperglycemia leads to complications in various organs such as the kidneys, eyes, vessels, and the relationship between DM and bone tissue. It is known that osteoblasts under high glucose concentrations present reduced proliferation, expression of genes involved in osteoblastic differentiation, and formation of mineralized nodules. However, there are no studies comparing the distinct negative effects on osteoblastic differentiation induced by DM1 and DM2 and investigating which cell signaling pathways could be involved in this process. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of DM types 1 and 2 on osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) and the participation of BMP, WNT and integrin (ITG) signaling pathways, which are among the main pathways that operate in this process. For this, DM1 and DM2 were induced in Wistar rats and MSCs were harvested from femurs and cultured under osteogenic conditions, to induce osteoblastic differentiation, and hyperglycemic conditions. Cell proliferation, alkaline phosphatase (ALP) activity, mineralized extracellular matrix formation, gene expression of osteoblastic markers, factor transcription related to runt2 (*Runx2*), osterix, *Alp*, bone sialoprotein and osteocalcin and RUNX2 protein expression were evaluated. Gene expression of components of the BMP, WNT and ITG signaling pathways was also evaluated. The results indicated that DM decreases cell proliferation, ALP activity, the expression of osteoblastic genes, and the formation of mineralized nodules, with DM1 being more severe than DM2. The evaluated signaling pathways also showed a greater number of genes with negative modulation in DM1. However, when cultivating MSCs under normoglycemic conditions, DM1 cells developed partial recovery of osteoblastic potential, which did not occur in DM2 MSCs.

**Keywords:** Mesenchymal stem cell, diabetes mellitus, osteoblastic differentiation, osteoblast.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Reconstruções microtomográficas tridimensionais obtidas dos fêmures dos ratos não-diabéticos (CTL) e ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) após 4 semanas de indução de DM (A). Parâmetros morfométricos obtidos após as reconstruções dos fêmures de ratos CTL, DM1 e DM2. Volume ósseo – BV, porcentagem de volume ósseo – BV/TV, superfície óssea – BS, superfície óssea – BS, espessura trabecular – Tb.Th, separação trabecular – Tb.Sp e densidade mineral óssea – BMD (B). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (One-way ANOVA  $p \leq 0,05$ ). Dados mostrados como média  $\pm$  desvio padrão da média (CTL n=5, DM1 n=5 e DM2 n=6).
- Figura 2.** Viabilidade de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glicose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 3.** Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glicose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 4.** Matriz extracelular mineralizada de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glicose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 5.** Expressão gênica relativa dos genes marcadores osteoblásticos (*Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D) e *Oc* (E)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glicose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 3 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos

diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

- Figura 6.** Expressão gênica relativa de *Rankl*, *Opg* e razão relativa *Rankl/Opg* de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente, aos 7 dias de cultura celular. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 7.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glut1* (A), *Glut3* (B), *Glut4* (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 8.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados a diferenciação (*Adipoq* (A), *aP2* (B), *PPAR $\gamma$*  (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Gadph* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 9.** Detecção das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot aos 10 dias de cultura celular (A) e quantificação de relativa de RUNX2 (B) e ALP (C) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).
- Figura 10.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente.

- Figura 11.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização ITG aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente.
- Figura 12.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização WNT aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente.
- Figura 13.** Viabilidade de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 14.** Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 15.** Matriz extracelular mineralizada de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 16.** Expressão gênica relativa dos genes marcadores osteoblásticos (*Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E) e *Rankl* (F), *Opg* (G) e razão *Rankl/Opg* (H)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

- Figura 17.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glut1* (A), *Glut3* (B) e *Glut4* (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 18.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados a diferenciação adipogênica (*Adipoq* (A), *aP2* (B), *PPAR $\gamma$*  (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Gapdh* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 19.** Detecção das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot aos 10 dias de cultura celular (A) e quantificação de relativa de RUNX2 (B) e ALP (C) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmicos (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).
- Figura 20.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).
- Figura 21.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização ITG aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).
- Figura 22.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização WNT aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

- Figura 23.** Viabilidade de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 24.** Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 25.** Matriz extracelular mineralizada de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5).
- Figura 26.** Expressão gênica relativa dos genes marcadores osteoblásticos (*Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E), *Rankl* (F), *Opg* (G) e razão de *Rankl/Opg* (H)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 27.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glut1* (A), *Glut3* (B) e *Glut4* (C)) de derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).
- Figura 28.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados a diferenciação adipogênica (*Adipoq* (A), *aP2* (B), *PPAR $\gamma$*  (C)) de MSCs derivadas de

ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Gapdh* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=4).

- Figura 29.** Detecção das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot aos 10 dias de cultura celular (A) e quantificação de relativa de RUNX2 (B) e ALP (C) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).
- Figura 30.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).
- Figura 31.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).
- Figura 32.** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Sequência de primers

**Tabela 2.** Glicemia (mg/dL) dos animais CTL, DM1 e DM2 nos diferentes períodos experimentais. Dados mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média





## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>30</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Animais</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.1</b>	<b>Indução de DM1</b> .....	<b>31</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Indução de DM2</b> .....	<b>32</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Não-diabéticos</b> .....	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>Análise microtomográfica (<math>\mu</math>CT)</b> .....	<b>32</b>
<b>3.3</b>	<b>Obtenção e cultura de células</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Obtenção e cultura de MSCs de ratos diabéticos DM1, DM2 e não-diabéticos (CTL)</b> .....	<b>33</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Diferenciação osteoblástica</b> .....	<b>34</b>
<b>3.4</b>	<b>Avaliação das respostas celulares</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.1</b>	<b>Viabilidade celular</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Atividade de ALP</b> .....	<b>35</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Formação de matriz extracelular mineralizada</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Análise da expressão gênica por PCR em tempo real</b> .....	<b>37</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Análise da expressão proteica por western blot</b> .....	<b>39</b>
<b>3.4.6</b>	<b>Investigação da participação das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT na diferenciação osteoblásticas de MSCs</b> .....	<b>40</b>
<b>3.5</b>	<b>Análise estatística</b> .....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>42</b>
<b>4.1</b>	<b>Curva glicêmica dos animais</b> .....	<b>42</b>
<b>4.2</b>	<b>Análise microtomomográfica (<math>\mu</math>CT)</b> .....	<b>42</b>

<b>4.3</b>	<b>Efeito da DM1 e DM2 na viabilidade celular e diferenciação osteoblástica de MSCs</b>	<b>43</b>
4.3.1	Viabilidade celular	43
4.3.2	Atividade de ALP	44
4.3.3	Formação de matriz extracelular mineralizada	45
4.3.4	Expressão gênica	46
4.3.5	Detecção e quantificação das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot	50
4.3.6	Efeito da DM1 e DM2 na modulação da expressão de genes das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT	51
<b>4.4</b>	<b>Efeito da glicemia na viabilidade celular e diferenciação osteoblástica de MSCs de ratos DM1</b>	<b>53</b>
4.4.1	Viabilidade celular	53
4.4.2	Atividade de ALP	54
4.4.3	Formação de matriz extracelular mineralizada	54
4.4.4	Expressão gênica	55
4.4.5	Detecção e quantificação das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot	58
4.4.6	Efeito da DM1 na modulação da expressão de genes das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT	59
<b>4.5</b>	<b>Efeitos da glicemia na viabilidade celular e diferenciação osteoblástica de MSCs de ratos DM2</b>	<b>62</b>
4.5.1	Viabilidade celular	62
4.5.2	Atividade de ALP	63
4.5.3	Formação de matriz extracelular mineralizada	63
4.5.4	Expressão gênica	64
4.5.5	Detecção e quantificação das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot	67

<b>4.5.6 Efeito da DM2 na modulação da expressão de genes das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT .....</b>	<b>68</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>76</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>84</b>
<b>Anexo 1.....</b>	<b>84</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A diabetes mellitus (DM) é caracterizada por altas concentrações de glicose no sangue, o que é denominado hiperglicemia e sua prevalência está aumentando mundialmente, de tal forma que se estima que em 2045 serão 783 milhões de pessoas com a doença (INTERNATIONAL FEDERATION DIABETES, 2021). As causas da hiperglicemia estão relacionadas aos tipos de DM, que podemos classificar em dois tipos principais e mais encontrados na população: diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2021). A DM1 é causada pela destruição autoimune das células  $\beta$ -pancreáticas, resultando em deficiência total de secreção de insulina, sendo mais frequente em crianças e jovens adultos. A DM2 é causada por uma combinação de resistência à ação da insulina e uma resposta secretora compensatória inadequada, e corresponde a cerca de 90% dos casos de DM na população (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2021). Em longo prazo, sabe-se que muitos tecidos e órgãos são atingidos pelos efeitos deletérios da DM, incluindo o tecido ósseo, uma vez que a DM pode afetar diferentes mecanismos dependendo da etiopatologia da doença (BOUILLON, 1991; INTERNATIONAL FEDERATION DIABETES, 2021).

Nos últimos anos, a relação entre DM e o tecido ósseo tem sido investigada, e foi constatado que pacientes com DM1 e DM2 possuem maior risco de fraturas ósseas quando comparados a população não-diabética (KEENAN; MADDALONI, 2016; COMPSTON, 2018). Além disso, são encontrados menor densidade mineral óssea (DMO) e espessura cortical em pacientes com DM1 e em pacientes com DM2 há risco de fratura elevado mesmo nos pacientes com DMO maior ou igual aos não-diabéticos (NAPOLI et al., 2017). Sendo assim, a fragilidade óssea não está associada somente à redução da DMO, mas também às alterações presentes na arquitetura óssea que estão relacionadas com as funções das células ósseas que sofrem interferências de DM1 e DM2 (JIANG et al., 2021; NAPOLI et al., 2017; RUBIN, 2015).

Os mecanismos iniciados pela DM que afetam a atividade osteoblástica não estão completamente elucidados, mas é sabido que múltiplos mecanismos participam desse processo. Foi demonstrado efeito deletério da DM sobre os osteoblastos reduzindo tanto sua diferenciação quanto sua função (RICO et al., 1989; BOTOLIN; MCCABE, 2006; HAMANN et al., 2011; BROWN et al., 2014; TAN et al., 2015). A DM1

reduz a proliferação, a diferenciação osteoblástica, e inibição na expressão proteica de RUNX2 e osteocalcina (OC), por inibir a sinalização de WNT e a ativação de  $\beta$ -catenina em modelos murinos diabéticos (HIE; TSUKAMOTO, 2010; CHEN et al., 2020). A DM1 também aumenta a expressão de esclerostina (Sost) e dickkopf-1 (Dkk-1) que são inibidores da via de WNT, aumentando a perda óssea em camundongos (HILDEBRANDT et al., 2021), também diminui a formação de cílios em osteoblastos, resultando em menor formação óssea durante o reparo de fraturas (CHINIPARDAZ et al., 2021). Além disso, osteoblastos de camundongos com DM1 tem seu potencial osteogênico reduzido, como avaliado pela expressão de genes marcadores ósseos, atividade de fosfatase alcalina (ALP) e formação de matriz mineralizada, devido ao aumento do estresse oxidativo (KALYANARAMAN et al., 2018).

A DM2 causa efeitos negativos na reparação óssea, como demonstrado em camundongos que passaram por dieta hipercalórica, nos quais foi observado tanto a inibição da diferenciação osteoblástica das células-tronco esqueléticas quanto o aumento populacional de células senescentes (FIGEAC et al., 2022). Além disso, ratos com DM2 tem o processo inflamatório local prolongado, interrompendo a organização e maturação das fibras de colágeno e retardando o processo de reparo alveolar (PITOL-PALIN et al., 2020). Reforçando esses achados, células-tronco mesenquimais (MSCs) derivadas de medula óssea de humanos e cultivadas com soro de pacientes DM2, apresentaram inibição de osteoblastos e aumento da diferenciação de adipócitos (DENG et al., 2018; FIGEAC et al., 2022). Níveis elevados de glicose produzem acúmulos de produtos da glicação avançada (advanced glycation end-products - AGEs) (VLASSARA; URIBARRI, 2013), e esses produtos afetam a qualidade da matriz orgânica do osso, podendo ainda reduzir a proliferação e a função dos osteoblastos. Na DM2, o acúmulo de AGEs inibe a diferenciação osteoblástica (STOLZING et al., 2010; PHIMPHILAI et al., 2017). Além disso, células de pacientes DM2 foram mais sensíveis ao receptor de AGEs e exibiram uma taxa de apoptose elevada, assim como MSCs de ratos diabéticos exibiram maiores níveis de AGEs e apoptose do que de ratos não diabéticos, o que pode explicar a diminuição da diferenciação osteoblástica (STOLZING et al., 2010; PHIMPHILAI et al., 2017).

Considerando as diferenças entre DM1 e DM2 em termos de etiopatologia e que a hiperglicemia por si só afeta negativamente a reparação do tecido ósseo (FIGEAC et al., 2022), nossa hipótese é que a DM1 e DM2 induzem níveis distintos

de inibição da diferenciação osteoblástica de MSCs que pode ser recuperada quando a condição hiperglicêmica é removida.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito da DM tipos 1 e 2 sobre a diferenciação osteoblástica de MSCs e a participação das vias de sinalização das BMP, integrinas (ITG) e WNT neste processo.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Esse projeto foi realizado em parceria com a Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Universidade Estadual Paulista (FOA – Unesp). Todos os experimentos realizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FOA (Processo FOA – nº 2019-0152). Ratos machos da linhagem *Wistar* foram divididos em três grupos: (1) não-diabéticos (CTL), (2) DM1 e (3) DM2. A indução de DM1 foi realizada em ratos com 13 semanas de idade pesando aproximadamente 450g e DM2, em ratos com 10 semanas de idade, pesando 350g. Todos os animais foram eutanasiados com 17 semanas de idade. O conjunto de experimentos descritos abaixo foi realizado em triplicata biológica e foram utilizados 6 ratos em cada grupo. Para a realização desse projeto foram utilizados 54 animais no total.

##### 3.1.1 Indução de DM1

Para a indução de DM1, os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes da administração de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich, EUA), substância considerada diabetogênica devido ao efeito tóxico sobre as células  $\beta$ -pancreáticas, o que leva a diminuição da biossíntese e secreção de insulina, induzindo hiperglicemia (MASIELLO et al., 1998; SZKUDELSKI, 2001), assemelhando-se à DM em humanos, devido a destruição das células responsáveis pela produção e secreção de insulina (BRITO-CASILLAS; MELIÁN; WÄGNER, 2016; FURMAN, 2015). A STZ foi administrada em aplicação única intravenosa (i.v.) pela veia peniana na dose de 60 mg/Kg de peso animal, diluída em 0,2 mL de tampão citrato de sódio 0,01 M, pH = 4,5 (veículo). O grupo controle recebeu injeção de 0,2 mL de veículo. Após 7 dias, o nível sanguíneo de glicose em jejum foi avaliado utilizando o sistema Accu-Check Active® (Roche, Suíça), seguindo as instruções do fabricante, e foram considerados portadores de DM1 os ratos que apresentaram níveis de glicose  $\geq 300$  mg/dL. Segundo Harkness e Wagner (1993), o nível sanguíneo de glicose para ratos são considerados normais quando variam entre 50 e 135 mg/dL. Após a aplicação de STZ, os animais foram mantidos por 4 semanas antes da eutanásia para obtenção das MSCs.

### 3.1.2 Indução de DM2

Para a indução de DM2, foi utilizado o modelo de Correia-Santos et al. (2012), que é a associação de dieta hiperlipídica, também conhecida como dieta de cafeteria (CARILLON et al., 2013; GOMEZ-SMITH et al., 2016), e baixa dose de STZ. A dieta foi iniciada três semanas antes da administração de STZ e foi mantida durante todo o experimento e STZ 35 mg/Kg diluída em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH=4,5 injetado por i.v., de acordo com protocolo previamente descrito (SRINIVASAN et al., 2005). A dieta de cafeteria combinada com baixa dose de STZ induz a DM2 por gerar resistência insulínica em função da má alimentação e da disfunção das células  $\beta$ -pancreáticas devido à ação da droga. Sendo assim, o modelo animal reproduz a história natural e as características metabólicas comuns à DM2 em humanos (CARILLON et al., 2013; GOMEZ-SMITH et al., 2016). A confirmação do diabetes foi feita após 7 dias da aplicação da STZ seguindo os seguintes critérios: nível sanguíneo de glicose em jejum máxima maior que 288mg/dL, ou concentração maior que 198 mg/dL após 120 minutos de administração de solução oral de glicose (2 g glicose/kg de massa corporal) e foram considerados portadores de DM2 os ratos que apresentaram níveis de glicose  $\geq 198$ mg/dL (CORREIA-SANTOS et al., 2012). Após a aplicação de STZ os animais foram mantidos por 4 semanas, antes da eutanásia para obtenção das MSCs.

### 3.1.3 Não-diabéticos

Os animais não-diabéticos foram utilizados como grupo controle (CTL). Ratos com 13 semanas de idade receberam injeção de 0,2 mL de tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 4,5 sem a presença de STZ. Após 7 dias, o nível de glicose sanguíneo em jejum foi avaliado utilizando o sistema Accu-Chek Active® (Roche). Após a aplicação do veículo, os animais foram mantidos por 4 semanas, antes da eutanásia para obtenção das MSCs.

## 3.2 Análise microtomográfica ( $\mu$ CT)

Para avaliar o efeito deletério da DM1 e DM2 ao tecido ósseo, 17 fêmures (CTL n=5, DM1 n=6 e DM2 n=6), foram fixados em solução de formalina tamponada a 4% (pH=7) por 48 horas, e transferidos para uma solução de etanol 70% onde permaneceram por 3 dias. Em seguida foram utilizadas para análise tomográfica

( $\mu$ CT) por meio do microtomógrafo SkyScan 1172 (SkyScan, Bélgica) operando com fonte de raios-X de 100 kV detectados por uma câmera de 11 megapixels com resolução de até 1  $\mu$ m. Os dados foram adquiridos pelo software de aquisição de imagens do próprio equipamento e as reconstruções foram feitas pelo software NRecon Cluster (Micro Photonics, EUA). Após as reconstruções, foram analisados na diáfise dos ossos, os seguintes parâmetros: volume ósseo (BV, bone volume,  $\text{mm}^3$ ), porcentagem de volume ósseo (BV/TV, bone volume/ tissue volume, %), superfície óssea (BS, bone surface,  $\text{mm}^2$ ), espessura trabecular (Tb.Th, trabecular thickness, mm), número de trabéculas (Tb.N, trabecular number, 1/mm), separação trabecular (Tb.Sp, trabecular separation, mm), e densidade mineral óssea (BMD, bone mineral density). Esses parâmetros, automaticamente gerados pelo software, são preconizados pela *American Society of Bone and Mineral Research* (BOUXSEIN et al., 2010).

### **3.3 Obtenção e cultura de células**

#### **3.3.1 Obtenção e cultura de MSCs de ratos diabéticos DM1, DM2 e não-diabéticos (CTL)**

As MSCs foram isoladas a partir da medula óssea de fêmures de ratos portadores de DM1, DM2 e CTL. Os animais foram eutanasiados com sobredose de Tiopental sódico 1% (Thiopentax, Cristália, Brasil) na dosagem de 100-120 mg/Kg associado à Lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Brasil) na dosagem de 1 mg/Kg, via intraperitoneal. Após a retirada, os fêmures foram transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa ( $\alpha$ -MEM) (Gibco-Life Technologies, EUA) suplementado com 500  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 3  $\mu\text{g/mL}$  de fungisona (Gibco-Life Technologies). No fluxo laminar, foi realizada antissepsia e remoção de tecidos moles remanescentes dos fêmures. As epífises foram removidas e a medula óssea, extraída por irrigação com meio de crescimento, contendo  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco-Life Technologies), 50  $\mu\text{g/mL}$  de gentamicina (Gibco-Life Technologies) e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  de fungisona (Gibco-Life Technologies). Para a extração da medula óssea, seleção e cultura das MSCs foram utilizados três tipos de meio de crescimento diferentes: 1) em ratos portadores de DM1, meio de crescimento contendo concentração de glicose de 600 mg/dL (HG1), próxima à média observada no sangue

de animais com DM1 (>600mg/dL) e mimetizando ambiente hiperglicêmico DM1 em cultura; 2) em ratos portadores de DM2, meio de crescimento contendo concentração de glicose de 290 mg/dL (HG2), próxima à média observada no sangue de animais com DM2 (289±110 mg/dL) e mimetizando ambiente hiperglicêmico DM2 em cultura; e 3) em ratos controle, meio de crescimento contendo concentração de glicose de 100 mg/dL (NG) e mimetizando ambiente normoglicêmico em cultura.

As medulas ósseas derivadas de ratos DM1 foram cultivadas separadamente em meios de crescimento HG1 e NG, as derivadas de ratos DM2 foram cultivadas em meio de crescimento HG2 E NG e aquelas de ratos CTL foram cultivadas somente em meio NG, em frascos de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Incorporated, EUA) até a subconfluência para permitir a seleção de MSCs por aderência ao poliestireno e a sua expansão. Todos os meios, independente da concentração de glicose tinham a mesma osmolalidade (20 mOsm/KgH<sub>2</sub>O).

### **3.3.2 Diferenciação osteoblástica**

Ao atingirem 70% de subconfluência, o meio de crescimento foi removido e as culturas foram lavadas com PBS (Gibco-Life Technologies) e, em seguida, tripsinizadas com solução de tripsina 0,25% (Gibco-Life Technologies), 1,3 mg/mL de colagenase tipo II (Gibco-Life Technologies) e EDTA 1mM (Gibco-Life Technologies). A suspensão de células foi plaqueada em placas de 24 poços na concentração de 2x10<sup>4</sup> células/poço em meio osteogênico, que é o meio de crescimento suplementado com 5µg/mL de ácido ascórbico (Gibco-Life Technologies), beta-glicerofosfato 7mM (Sigma-Aldrich) e dexametasona 10<sup>-7</sup> M (Sigma-Aldrich), a fim de induzir a diferenciação osteoblástica. As células foram cultivadas por períodos de até 21 dias em meio osteogênico com a mesma concentração de glicose dos respectivos meios de crescimento descritos acima. Foram avaliados os seguintes grupos:

CTL em meio NG (CTL);

DM1 em meio NG (DM1-NG);

DM1 em meio HG1 (DM1-HG1);

DM2 em meio NG (DM2-NG);

DM2 em meio HG2 (DM2-HG2).

Para avaliar os efeitos das DM1 e DM2 na diferenciação osteoblástica foram comparados os grupos CTL, DM1-HG1 e DM2-HG2. Em seguida, para cada modelo de DM a diferenciação osteoblástica foi avaliada separadamente entre CTL, DM1-HG1 e DM1-NG e entre CTL, DM2-HG2 e DM2-NG.

A diferenciação osteoblástica foi avaliada pela: viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz extracelular mineralizada e expressão gênica e proteica de marcadores osteoblásticos. Para verificar se as vias de sinalização de BMP, WNT e ITG seriam afetadas, a expressão de alguns genes envolvidos nessas vias foi avaliada. Durante todo o período de cultura, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico.

### **3.4 Avaliação das respostas celulares**

#### **3.4.1 Viabilidade celular**

Para determinar a viabilidade celular aos 3, 7 e 10 dias, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}. O ensaio se dá por meio da clivagem do sal MTT, gerando cristais formazan (cor púrpura), como produto da reação. Essa reação ocorre nas mitocôndrias de células vivas (MOSMANN, 1983). O meio de cultura foi removido e nos poços foi adicionado 1 mL de meio de cultura contendo MTT 10% (5 mg/mL) e incubado a 37°C por 4 horas. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os cristais foram dissolvidos em 1 mL de solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 minutos e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio do espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc., EUA) utilizando o comprimento de onda de 570 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata (n=5) e expressos em absorbância.

#### **3.4.2 Atividade de ALP**

Ao final de 7 e 10 dias de cultura, foi avaliada a atividade de ALP, através da

liberação de timolftaleína por hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato. Para isso foi utilizado um kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest Diagnóstica, Brasil). Para obtenção do lisado de células, foi removido o meio de cultura dos poços e, em seguida, lavados com PBS (Gibco-Life Technologies) aquecido a 37°C. Aos poços foram adicionados 2 mL de solução de lauril sulfato de sódio a 0,1% (Sigma-Aldrich). As amostras foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, promovendo assim a lise celular. Nos tubos de ensaio correspondentes ao branco, padrão e amostras foram adicionados 50 µL de timolftaleína monofosfato misturados com 0,5 mL de tampão dietanolamina 0,3 M, pH 10,1, e no padrão foram adicionados 50 µL de solução padrão e deixados por 2 minutos a 37°C em banho-maria. Ao final desse tempo, foram acrescentados nos tubos testes 50 µL da amostra lisada e homogeneizada previamente e esta solução foi mantida em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Para o desenvolvimento da coloração, foram adicionados 2 mL do reagente de cor. A absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (BioTek Instruments Inc.) utilizando comprimento de onda de 590 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata (n=5), e foram corrigidos pelo padrão disponibilizado pelo fabricante e normalizados pelo conteúdo de proteína total, determinado pelo método de Lowry et al. nos mesmos lisados celulares (LOWRY et al., 1951).

### **3.4.3 Formação de matriz extracelular mineralizada**

A formação de matriz extracelular mineralizada foi avaliada aos 17 e 21 dias de cultura, detectada por coloração com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich). As culturas foram lavadas com PBS (Gibco-Life Technologies) aquecido a 37°C, em seguida, os poços foram preenchidos com 2 mL de formalina a 10% e mantidos a 4°C por 24 horas. Após esse tempo, a formalina foi removida e as culturas foram desidratadas com sequência de álcoois (30%, 50%, 70% e 100%), com duração de 60 minutos para cada graduação alcóolica. Depois de passar pelo processo de desidratação e secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma-Aldrich) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, evidenciadas pela coloração vermelha. As placas foram deixadas em temperatura ambiente para secagem, em seguida foram obtidas imagens macroscópicas dos poços com câmera fotográfica (Canon EOS Digital, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8). A quantificação

foi realizada por extração do corante como descrito previamente (GREGORY et al., 2004). Em cada poço, foram adicionados 150  $\mu$ L de ácido acético a 10% e a placa foi mantida sob agitação por 30 minutos. A camada de células foi raspada, transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vórtex por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 85°C por 10 minutos e transferidas para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 15 minutos. Em seguida, em uma placa de 96 poços adicionou-se 40  $\mu$ L de hidróxido de amônia a 10% e 100  $\mu$ L do sobrenadante de cada amostra para leitura em espectrofotômetro  $\mu$ Quant (BioTek Instruments Inc.) utilizando comprimento de onda de 405 nm. Os dados foram obtidos em quintuplicata (n=5) e expressos em absorbância.

#### **3.4.4 Análise da expressão gênica por PCR em tempo real**

A expressão dos genes marcadores da diferenciação osteoblástica: *Runx2* (fator de transcrição 2 relacionado ao runt), *Osx* (osterix), *Alp*, *Bsp* (sialoproteína óssea) e *Oc* (osteocalcina) foi avaliada por PCR em tempo real aos 3, 7 e 10 dias de cultura celular. O RNA total foi isolado de amostras coletadas com 1 mL de Trizol utilizando o kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação do RNA total a partir de 1  $\mu$ L da amostra no aparelho NanoVue (GE Healthcare, EUA). A integridade do RNA foi avaliada utilizando um kit Agilent RNA 6000 Nano Kit e o aparelho Agilent 2100 (Agilent Technologies, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente à avaliação da integridade do RNA foi realizada a confecção do DNA complementar (cDNA), a partir de 1000ng de RNA, utilizamos o Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) Para uma reação foram necessários 10  $\mu$ L de MIX contendo: 2  $\mu$ L de Buffer, 0,8  $\mu$ L de DNTP, 2  $\mu$ L de Random Primer, 1  $\mu$ L de Transcriptase reversa (20 U) 1  $\mu$ L de RNase Inibitor e 3,2  $\mu$ L de água MILI-Q tratada com DEPC. Após o preparo do MIX em eppendorf, no mesmo tubo foram adicionados 10  $\mu$ L de RNAm (1000ng) diluído em água MILI-Q tratada com DEPC. O eppendorf contendo Mix e RNA (volume final 20  $\mu$ L) foi levado ao termociclador Mastercycle (Eppendorf). Ao final do ciclo foram adicionados 180  $\mu$ L de água MILI-Q tratada com DEPC e os tubos foram armazenados em freezer -20°C. Para a realização do PCR em tempo real, foi utilizado o sistema SYBR Green para os genes osteogênicos e os marcadores do

metabolismo de glicose, em um aparelho StepOne Plus (Life Technologies, EUA). As reações foram feitas em quadruplicata (n=4), utilizando 7 µL do reagente *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) que contém o fluoróforo *SYBR Green*, a enzima polimerase *AmpliTaq Gold*, dNTPs com dUTP e o fluoróforo *ROX*, usado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, 2,5 µL da solução de cDNA, 2,5 µL de água Milli-Q tratada com DEPC e 0,5 µL da solução contendo cada *primer* com as concentrações adequadas. A reação de amplificação ocorreu em 2 minutos a 50°C, 20 segundos a 95°C, quarenta ciclos de 3 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, além de um ciclo final de 20 minutos, com temperatura crescente de 60°C a 95°C, que foi empregado para a obtenção de uma curva de dissociação dos produtos da reação, utilizada para análise da especificidade de amplificação. Para os genes adipocíticos utilizamos o sistema de sondas TaqMan (Applied Biosystems), foram realizados em quadruplicata (n=4), utilizando 5 µL de TaqMan Gene Expression Master Mix, 0,5 µL de TaqMan Gene expression. Master Mix (Sondas + Primers) e 4,5 µL de cDNA, para um volume final de 10 µL/reação. As reações de amplificação ocorreram em 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minutos a 60°C. Os resultados foram então analisados com base no valor do Ct (*cycle threshold* ou ciclo limiar). Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene *Eif2b1* (do inglês, *eukaryotic translation initiation factor 2B subunit alpha*) para o sistema SYBR Green e *Gapdh* (*Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*) para o sistema TaqMan, que foi utilizada para a normalização dos níveis de expressão dos genes avaliados. O método comparativo de  $2^{-ddCt}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi utilizado para comparar a expressão gênica das células dos diferentes grupos experimentais. Os *primers* utilizados no sistema *SYBR Green* foram desenhados utilizando o Programa *Primer-Blast* (Tabela 1), considerando uma eficiência entre 95 e 100%.

**Tabela 1.** Sequência de primers

Gene Alvo	Sequência Sense e Anti-sense
<i>Runx2</i>	CGTATTTTCAGATGATGACACTGC CAAATGCCTGGGAAGTGCCTG
<i>Osterix</i>	GAGGCCTTTTCGTCTGCAACT CAAGTGGTCGCTTCGGGTAA
<i>Alp</i>	TACTGCTGATCACTCCCACG



---

	ACCGTCCACCACCTTGTAAC
<i>Bsp</i>	AGACTGCTTTAATCTTGCTCTGC GTAGCGTGGCCGGTACTTA
<i>Oc</i>	GCATTCTGCCTCTCTGACCTG ACATCCCATCGGGTTCCCA
<i>Rankl</i>	AGCAAATGTTGGCGTACAGGT CCGGAGTCTATTCACCACCTTAC
<i>Opg</i>	TCGCAAGAGCAAACCTTTCCAG GCTTTCACAGAGGTCAATGTCTTG
<i>Glut1</i>	CTTATGTTGGCCGTGGGAGG CTCTCCATAGCGGTGGTTCC
<i>Glut3</i>	CGGACTCTTTGTCAACCGCT TCAACCGACTCCGCTATCTTG
<i>Glut4</i>	CCACAAGGCACCCTCACTAC AGCATAGCCCTTTTCCTTCCC
<i>Eif2b1</i>	TGCTGTTGGCTATATCATGGAGA TGCAACCACATAGAAGGGCT

---

### 3.4.5 Análise da expressão proteica por western blot

A expressão proteica de RUNX2 e ALP foram avaliadas por western blot, aos 10 dias de cultura celular. As células foram destacadas por tratamento com solução de tripsina, homogeneizadas, transferidas para tubos falcon e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células, lavadas 3 vezes com 5 mL de PBS (Gibco-Life Technologies) aquecido a 37°C. Após a última centrifugação, o PBS (Gibco-Life Technologies) foi removido, então foi adicionado tampão RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay – RIPA). A extração da proteína total foi realizada por lise celular, utilizando-se aparelho de ultrassom (Misonix, EUA) com 5 pulsos de 10 segundos e intervalos de 10 segundos entre pulsos. Primeiramente, a concentração de proteínas das amostras foi determinada em µg/mL, utilizando o aparelho NanoVue utilizando o comprimento de onda de 280 nm. Os géis de poliácridamida 8,5% foram preparados, montados em aparato próprio e foi adicionado o tampão de corrida. Para o ensaio, foram utilizadas 40 µg de proteína de cada grupo e para identificar o peso molecular das proteínas, foi usado um

marcador (Bio-Rad) que identifica as bandas entre 10 e 250 kDa. Após aquecimento em banho-maria a 100°C por 5 minutos, as amostras foram aplicadas no gel, e a separação das proteínas, realizada por eletroforese com aplicação de 100 Volts por 1 hora. As proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose (HybondC-Extra, Sigma-Aldrich) com o aparelho Trans-Blot® SD (Bio-Rad). A membrana foi submetida a três incubações a temperatura ambiente, sendo: (1) bloqueio dos sítios inespecíficos por 3 horas com leite desnatado 5% diluído em Tampão Salino de Tris com Tween 20 (TBS-T), (2) incubação, por 3 horas, com o anticorpo primário anti-RUNX2 (1:1000, monoclonal de camundongo, Millipore, EUA), diluído em solução de leite desnatado 2,5% em TBS-T; e (3) incubação, por 1 hora, com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2000, cabra anti-camundongo IgG HRP; Sigma-Aldrich) diluído em solução de leite desnatado 2,5% em TBS-T. Ao final de cada incubação, a membrana foi lavada três vezes, 10 minutos cada, com TBS-T. Por fim, a membrana foi incubada com solução quimiluminescente (Perkin Elmer, EUA) por 1 minuto e transferida para o aparelho G:BOX (SynGene, EUA). Para a captação de imagens da banda de RUNX2 e obtenção dos dados quantitativos, foi utilizado o programa GeneSnap (SynGene). A expressão de RUNX2 foi normalizada pela expressão da proteína constitutiva GAPDH. Para isso, a membrana foi submetida a tratamento com solução Re-blot plus mild (Millipore) por 20 minutos, à temperatura ambiente, para a remoção dos anticorpos, e então, incubada de acordo com os procedimentos previamente descritos, utilizando-se anticorpo primário anti-GAPDH (1:1000, policlonal de coelho IgG; Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anticorpo secundário conjugado com peroxidase (1:2000, cabra anti-coelho IgG HRP; Sigma- Aldrich).

#### **3.4.6 Investigação da participação das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT na diferenciação osteoblásticas de MSCs**

Para a investigação da participação das vias de sinalização de BMP, WNT e ITG na diferenciação osteoblástica. Inicialmente foram realizadas as culturas celulares dos grupos CTL, DM1-HG1, DM1-NG, DM2-HG2, DM2-NG. Ao final de 7 de cultura em condições osteogênicas, foi realizado o PCR array utilizando o sistema TaqMan Array Plates (Thermo Fischer Scientific). Para a realização das reações de PCR em tempo real foi realizada a cultura e o material foi coletado,

extraído e quantificado de acordo como descrito no item 3.4.4. O cDNA foi confeccionado, em termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf), a partir de 4 µg de RNA total utilizando-se o SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fischer Scientific) para PCR Array, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foram adicionados 40 µL de reação de síntese de cDNA diluído em 10 vezes de água DNase/RNase free e 440 µL do reagente TaqMan Fast Advanced Master Mix (Thermo Fischer Scientific). Dessa mistura, adicionou-se 800 µL em cada placa de 384 poços contendo as sondas dos genes alvos. Para a reação de amplificação foi utilizado o aparelho QuantStudio™ 7 Flex System (Applied Biosystems). A reação ocorreu por 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 92°C e quarenta ciclos de 1 segundo a 95°C e 20 segundos a 60°C. Após a obtenção dos dados, esses foram analisados através do Software ExpressionSuite (Thermo Fischer Scientific). Os heatmaps foram confeccionados no site <http://www.heatmapper.ca/expression/> a partir das análises obtidas e os diagramas de Venn foram confeccionados no editor de imagens Adobe Photoshop CS6 (2012).

### **3.5 Análise estatística**

Os dados numéricos foram submetidos ao teste de aderência à curva normal para determinar a análise estatística adequada. Então, foram submetidos à análise estatística no programa SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Alemanha). Os dados relativos às comparações entre múltiplos grupos, por ANOVA one-way na presença de uma variável e ANOVA two-way na presença de duas variáveis, seguidas de pós-teste de Tukey. Os dados foram expressos como média e desvio padrão e o nível de significância adotado foi de 5%.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Curva glicêmica dos animais

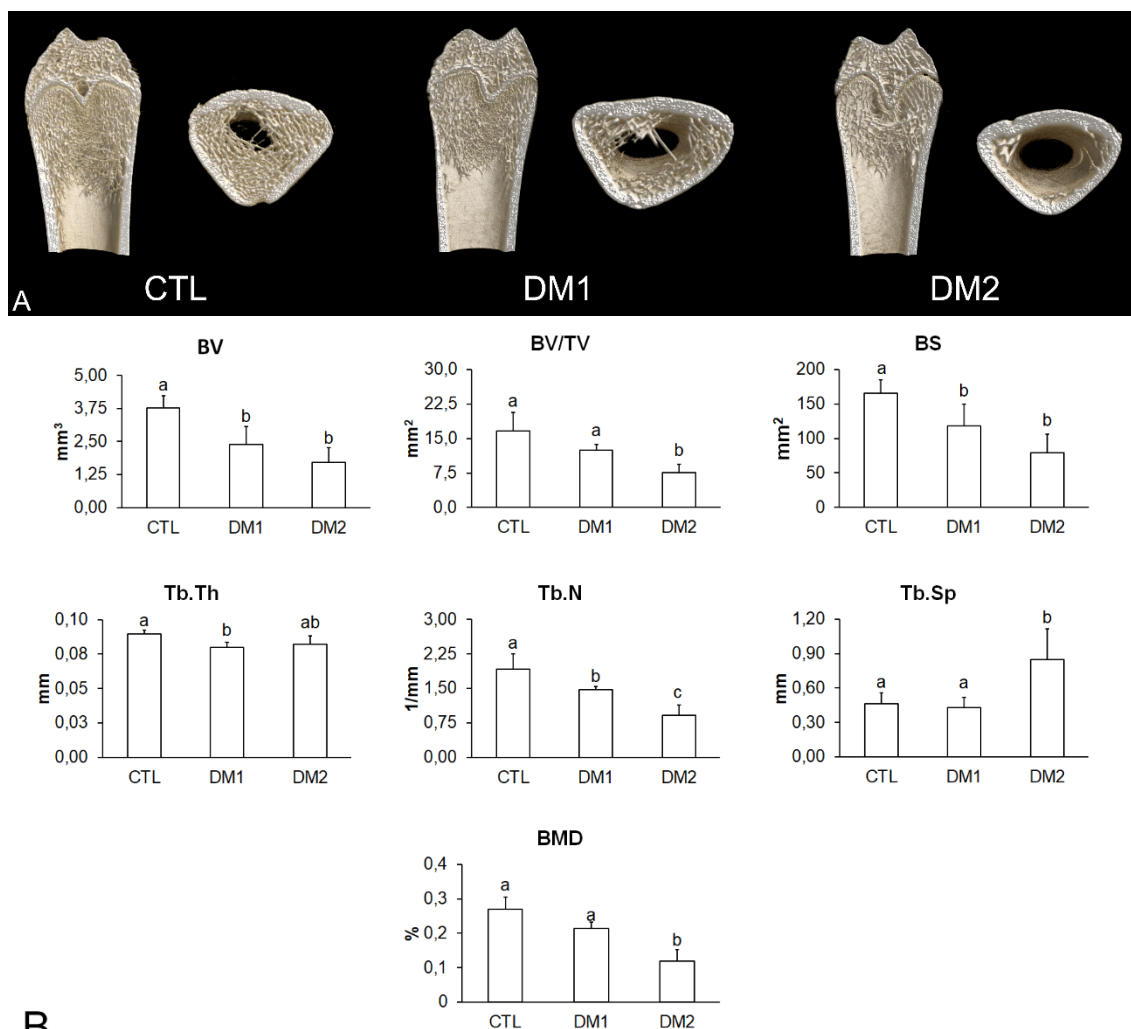
A glicemia dos ratos CTL, DM1 e DM2 é apresentada na Tabela 2. Pode-se observar que todos os animais apresentavam glicemia dentro dos valores de normalidade quando foram incluídos no estudo. Ao longo do tempo, os ratos CTL apresentaram discreto aumento da glicemia, mas ainda dentro dos valores de normalidade, os ratos DM1 uma semana após a injeção de STZ apresentaram glicemia acima do limite de detecção do aparelho Accu-Check Active® (Roche) e os DM2 já apresentaram glicemia elevada no momento da injeção de STZ, que aumentou ainda mais na primeira semana e continuou aumentando até o momento de obtenção das células.

**Tabela 2** – Glicemia (mg/dL) dos animais CTL, DM1 e DM2 nos diferentes períodos experimentais. Dados mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média

	Período Experimental					
	Início	Injeção de STZ	1ª. sem.	2ª. sem.	3ª. sem.	4ª. sem.
CTL	78,25 $\pm$ 1,25	94,75 $\pm$ 4,99	89,5 $\pm$ 5,44	95,75 $\pm$ 5,73	103 $\pm$ 5,47	103,75 $\pm$ 2,87
DM1	79,33 $\pm$ 5,95	99,16 $\pm$ 7,25	>600	>600	>600	>600
DM2	77,66 $\pm$ 7,89	141,66 $\pm$ 11,03	234 $\pm$ 40,91	209,66 $\pm$ 126,66	261,66 $\pm$ 113,15	289,33 $\pm$ 110,83

### 4.2 Análise microtomográfica ( $\mu$ CT)

Os fêmures dos animais com DM foram avaliados por  $\mu$ CT para analisar os efeitos da DM no tecido ósseo (Figura 1). A partir das reconstruções tridimensionais, observamos diferenças qualitativas na estrutura óssea dos fêmures DM1 e DM2 comparados ao CTL (Figura 1A). Ao analisar os parâmetros morfométricos (Figura 1B) foi observado que BV (CTL>DM1  $p=0,004$ ; CTL>DM2  $p=0,001$ ; DM2=DM1  $p=0,134$ ), BV/TV (CTL=DM1  $p=0,061$ ; CTL>DM2  $p=0,001$ ; DM1>DM2  $p=0,024$ ), BS (CTL>DM1  $p=0,029$ ; CTL>DM2  $p=0,001$ ; DM1=DM2  $p=0,062$ ), Tb.Th (CTL>DM1  $p=0,013$ ; CTL=DM2  $p=0,064$ ; DM1=DM2,  $p=0,678$ ), Tb.N (CTL>DM1  $p=0,044$ ; CTL>DM2  $p=0,001$ ; DM1>DM2  $p=0,009$ ), Tb.Sp (CTL=DM1  $p=0,954$ ; CTL<DM2  $p=0,01$ ; DM1<DM2  $p=0,005$ ) e BMD (CTL>DM2  $p=0,001$ ; CTL=DM1  $p=0,063$ ; DM1>DM2  $p=0,002$ ) foram todos afetados pelas DM1 e DM2.



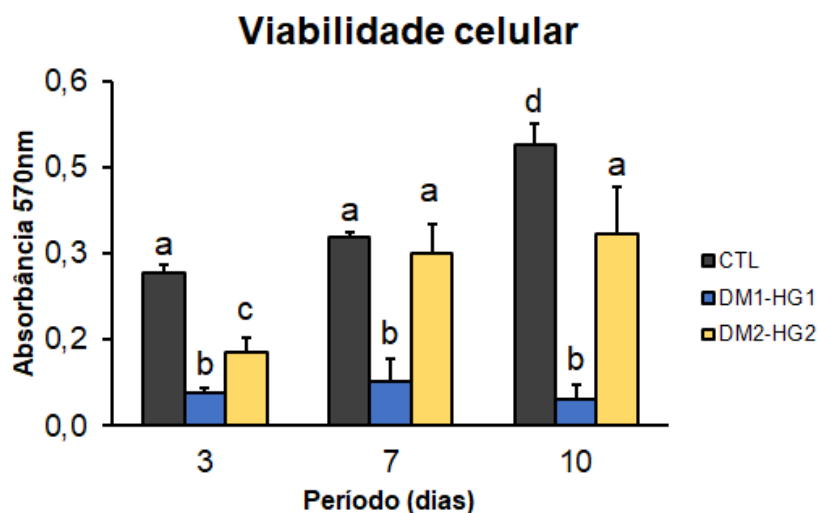
**Figura 1.** Reconstruções microtomográficas tridimensionais obtidas dos fêmures dos ratos não-diabéticos (CTL) e ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) após 4 semanas de indução de DM (A). Parâmetros morfométricos obtidos após as reconstruções dos fêmures de ratos CTL, DM1 e DM2. Volume ósseo – BV, porcentagem de volume ósseo – BV/TV, superfície óssea – BS, superfície óssea – BS, espessura trabecular – Tb.Th, separação trabecular – Tb.Sp e densidade mineral óssea – BMD (B). Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos (One-way ANOVA  $p \leq 0,05$ ). Dados mostrados como média  $\pm$  desvio padrão da média (CTL n=5, DM1 n=5 e DM2 n=6).

### 4.3 Efeito da DM1 e DM2 na viabilidade celular e diferenciação osteoblástica de MSCs

#### 4.3.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular das culturas foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias de cultivo (Figura 2). De modo geral, houve aumento do número de células ao longo do período de cultura, exceto para o grupo DM1-HG1. A análise entre os grupos dentro do mesmo período mostrou que, aos 3 dias o grupo CTL apresentou maior viabilidade celular seguido de DM2-HG2 e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ), sendo  $CTL > DM2-HG2 > DM1-HG1$ . Aos 7 dias, os grupos CTL e DM2-HG2 não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,503$ ), entretanto, os dois grupos apresentaram maior viabilidade em

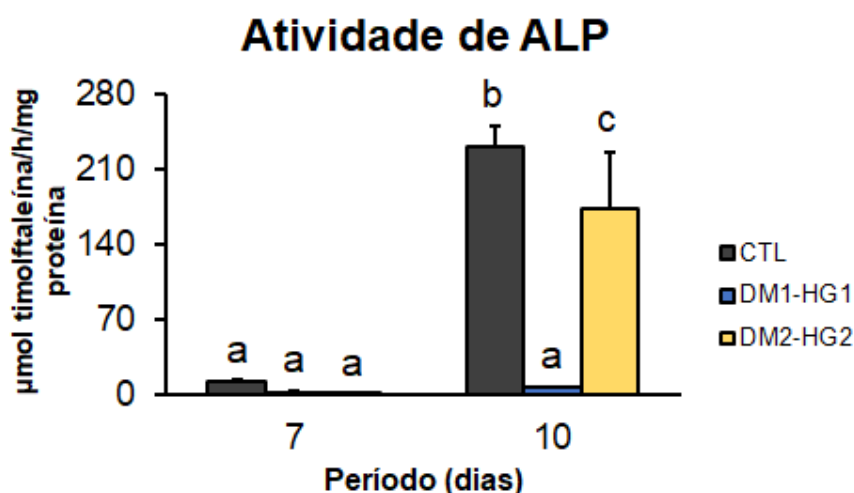
comparação ao grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$ ). Aos 10 dias, o grupo CTL seguiu um padrão semelhante ao período de 3 dias,  $CTL > DM2-HG2 > DM1-HG1$ , apresentando diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,001$ ; para todas as comparações).



**Figura 2.** Viabilidade de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.3.2 Atividade de ALP

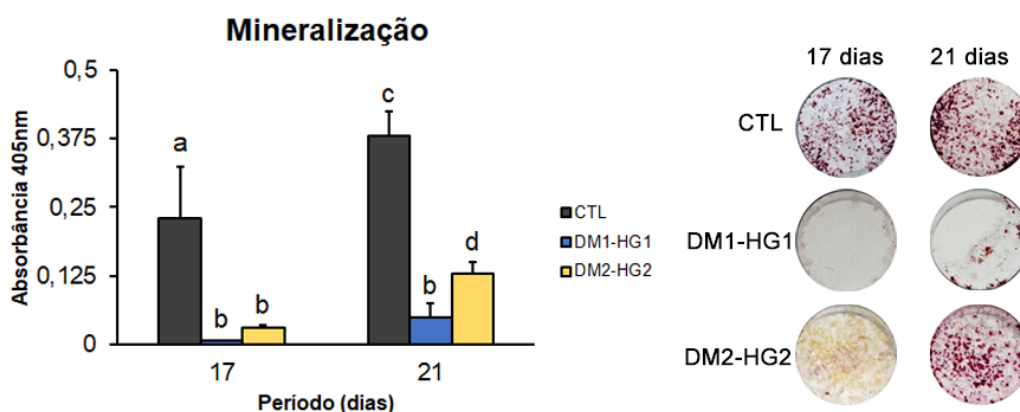
A atividade de ALP, detectada aos 7 e 10 dias de cultura (Figura 3), aumentou ao longo do tempo somente nos grupos DM2-HG2 e CTL. Aos 7 dias de cultura, os grupos não apresentaram diferenças significantes entre si, mas aos 10 dias houve um aumento da atividade de ALP de tal forma que  $CTL > DM2-HG2 > DM1-HG1$  ( $CTL \times DM2-HG2$   $p=0,002$  e demais comparações  $p=0,001$ ).



**Figura 3.** Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.3.3 Formação de matriz extracelular mineralizada

A formação de matriz extracelular mineralizada, detectada aos 17 e 21 dias de cultivo, aumentou ao longo do tempo (Figura 4). De modo geral, o grupo CTL apresentou maior mineralização nos dois períodos, seguido por DM2-HG2 e DM1-HG1, respectivamente. Aos 17 dias, foi observado que  $CTL > DM2-HG2 = DM1-HG1$  ( $p=0,001$ ) e aos 21 dias,  $CTL > DM2-HG2 > DM1-HG1$  ( $DM2-HG2 \times DM1-HG1$   $p=0,026$  e demais comparações  $p=0,001$ ).



**Figura 4.** Matriz extracelular mineralizada de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.3.4 Expressão gênica

##### 4.3.4.1 Expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica

De modo geral, a expressão dos genes osteogênicos avaliados aumentou durante a diferenciação celular.

Aos 3 dias, a expressão de *Runx2* no grupo DM2-HG2 foi maior em comparação aos grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ), e foi semelhante entre os grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,808$ ). Aos 7 dias, a expressão de *Runx2* não apresentou diferenças entre os grupos DM2-HG2 e CTL ( $p=0,506$ ), e os dois grupos apresentaram maior expressão em comparação ao grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$ ). Aos 10 dias, os grupos apresentaram diferenças significativas sendo  $CTL > DM2-HG2 > DM1-HG1$  ( $p=0,001$  para todas as comparações) (Figura 5A).

Aos 3 e 7 dias, CTL e DM2-HG2 apresentaram expressão gênica de *Osx* maior que DM1-HG1 ( $p=0,001$ , para ambos os períodos), mas entre si não apresentaram diferenças significativas ( $p=0,104$  em 3 dias e  $p=0,998$  em 7 dias). Aos 10 dias, houve aumento da expressão no grupo CTL quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM2-HG2 ( $p=0,001$  para ambos os grupos) e no DM2-HG2 a expressão foi maior do que DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 5B).

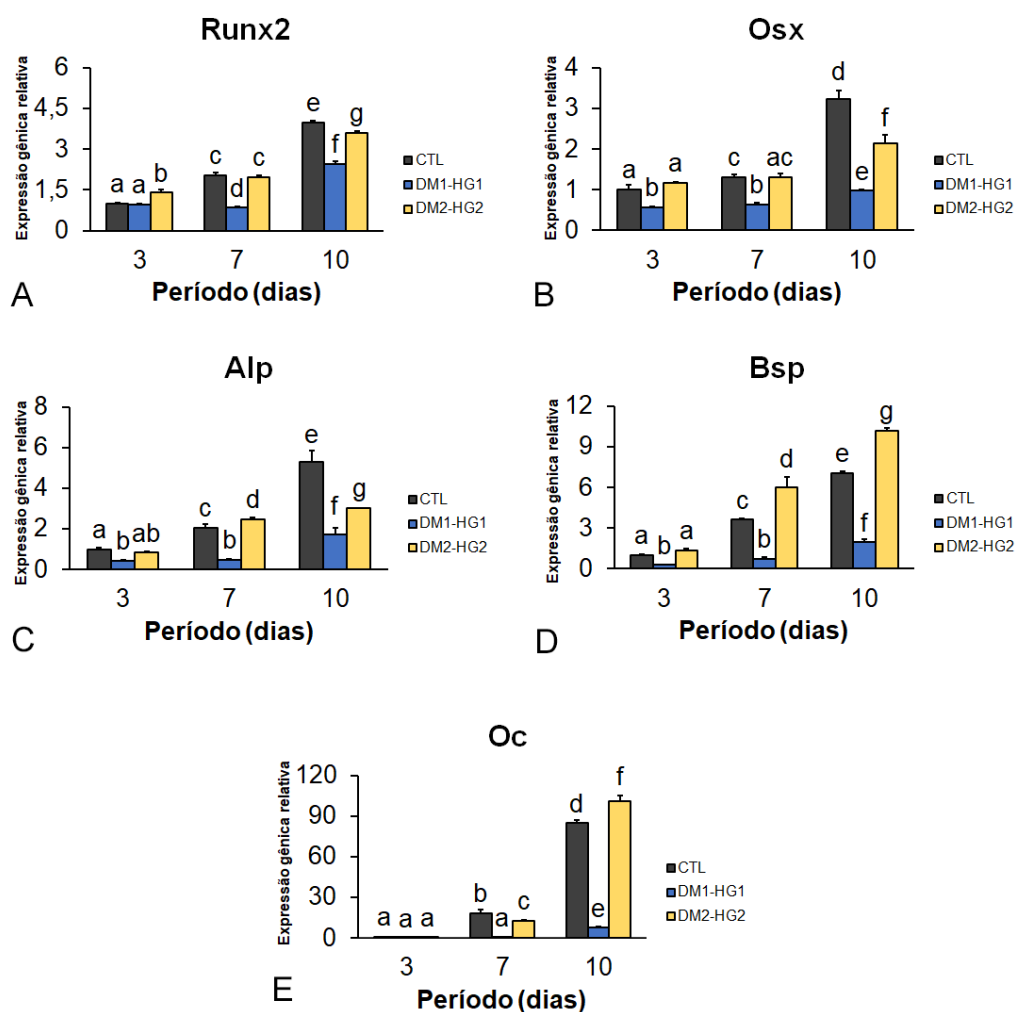
Aos 3 dias, o grupo DM2-HG2 apresentou expressão de *Alp* semelhante à dos grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,554$  e  $p=0,053$ , respectivamente), e CTL foi maior que DM1-HG1 ( $p=0,005$ ). Aos 7 dias, a expressão no grupo DM2-HG2 foi maior que CTL e DM1-HG1 ( $p=0,033$ ,  $p=0,001$ , respectivamente), e CTL foi maior que DM1-HG1 ( $p=0,001$ ). Aos 10 dias, a expressão foi maior no grupo CTL comparado ao DM1-HG1 e DM2-HG2 ( $p=0,001$ ) e DM2-HG2 foi maior que DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 5C).

Aos 3 dias, a expressão gênica de *Bsp* nos grupos CTL e DM2-HG2 não apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p=0,164$ ) e foi maior que DM1-HG1 ( $p=0,003$  e  $p=0,001$ , respectivamente). Aos 7 e 10 dias, o grupo DM2-HG2 apresentou maior expressão do que os grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ , para ambos os períodos), que foram diferentes entre si ( $p=0,001$ , para ambos os períodos). (Figura 5D).

Aos 3 dias, os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si na expressão de *Oc*. Aos 7 dias a expressão no grupo CTL foi maior que DM2-HG2 e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) e a expressão no grupo DM2-HG2 foi maior que no grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$ ). Aos 10 dias, a expressão de *Oc* no grupo



DM2-HG2 foi maior do que nos grupos CTL e DM1-HG1, que foi maior em CTL do que em DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 5E).

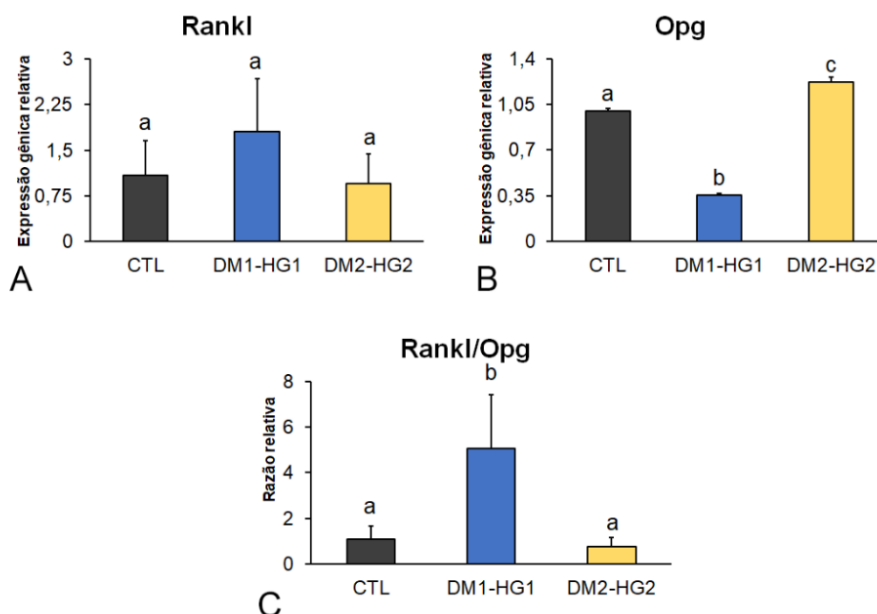


**Figura 5.** Expressão gênica relativa dos genes marcadores osteoblásticos (*Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D) e *Oc* (E)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (HG1), *high glucose 2* (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 3 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

Foram avaliados aos 7 dias de cultivo, a expressão dos genes *Rankl* e *Opg* e a razão relativa entre eles (Figura 6). Para a expressão de *Rankl* não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p=0,196$ ) (Figura 6A). A expressão de *Opg* no grupo DM2-HG2 foi maior que CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) e CTL foi maior que DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 6B).

Avaliando as razões *Rankl/Opg* entre os grupos, CTL e DM2-HG2 apresentaram razões semelhantes ( $p=0,947$ ) e DM1-HG1 apresentou razão maior em

comparação aos grupos CTL e DM2-HG2 ( $p=0,008$  e  $p=0,005$ , respectivamente) (Figura 6C).



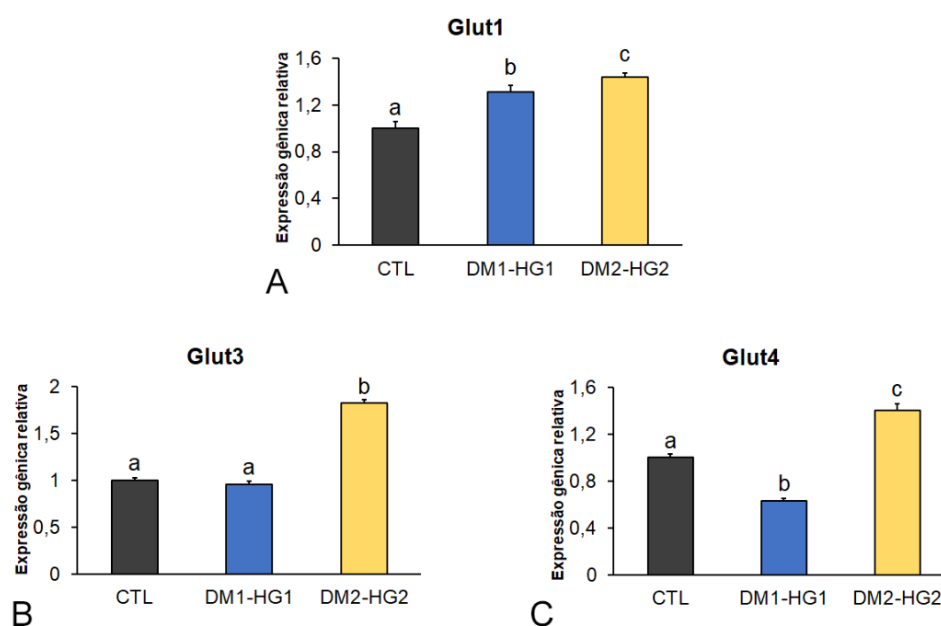
**Figura 6.** Expressão gênica relativa de *Rankl*, *Opg* e razão relativa *Rankl/Opg* de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente, aos 7 dias de cultura celular. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.3.4.2 Expressão de genes marcadores do metabolismo de glicose

A expressão de Glut1 foi maior no grupo DM2-HG2 em comparação a DM1-HG1 e CTL ( $p=0,001$  para ambos os grupos), sendo que no grupo DM1-HG1 foi maior do que no CTL ( $p=0,017$ ) (Figura 7A).

A expressão de Glut3 foi maior no grupo DM2-HG2 comparado aos grupos DM1-HG1 e CTL ( $p=0,001$ ), que não foram diferentes entre si ( $p=0,213$ ) (Figura 7B).

A expressão de Glut4 foi maior para DM2-HG2 quando comparado aos grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ), e o grupo CTL apresentou maior expressão que DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 7C).



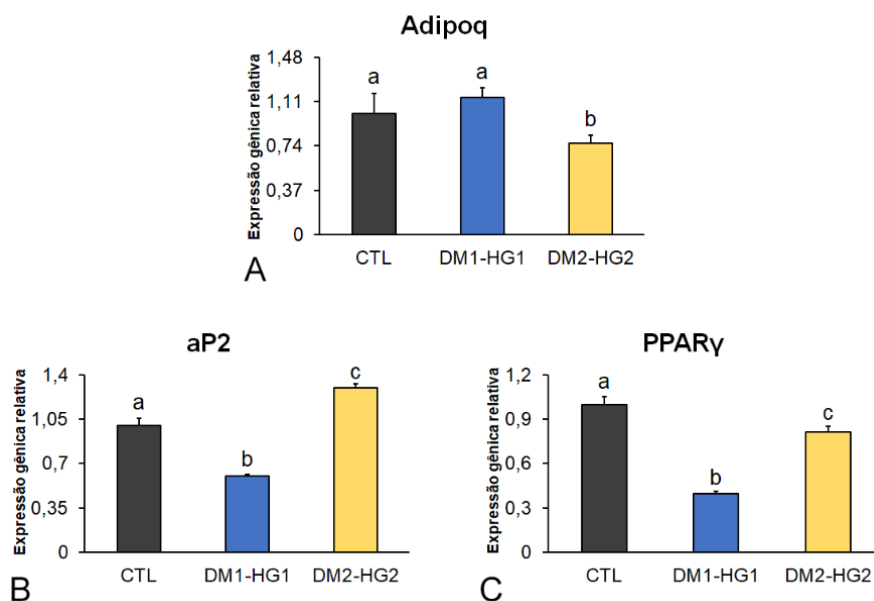
**Figura 7.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glut1* (A), *Glut3* (B), *Glut4* (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glicose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.3.4.3 Expressão de genes marcadores da diferenciação adipocítica

A expressão do gene *Adipoq* foi semelhante para os grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,275$ ) e maior do que no DM2-HG2 ( $p=0,031$  e  $p=0,003$ , respectivamente) (Figura 8A).

A expressão do gene *aP2* foi maior no grupo DM2-HG2 quando comparada à CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) e no CTL foi maior que no DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 8B).

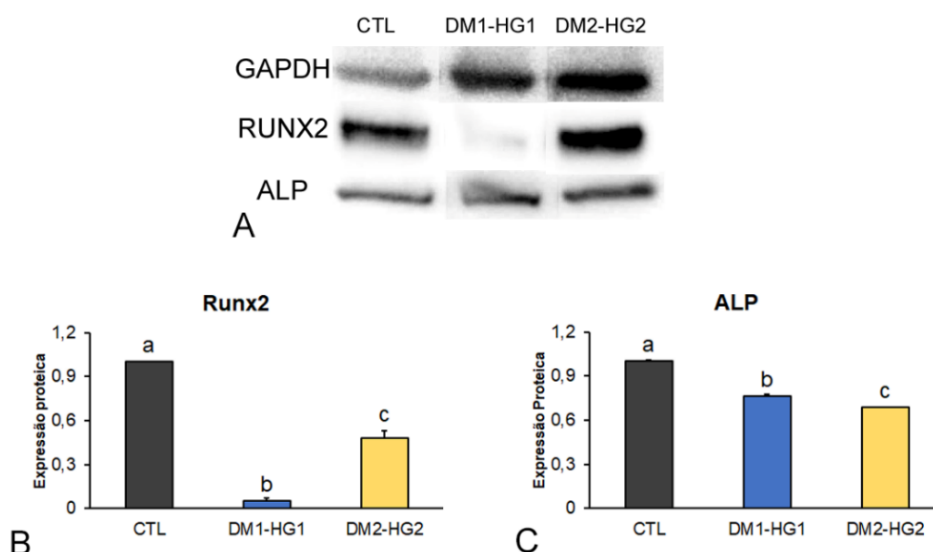
A expressão do gene *PPAR $\gamma$*  foi maior no grupo CTL comparado ao DM1-HG1 e DM2-HG2 ( $p=0,001$  para ambos os grupos) e no DM2-HG2 foi maior do que no DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 8C).



**Figura 8.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados a diferenciação (*Adipoq* (A), *aP2* (B), *PPARγ* (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Gadph* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.3.5 Detecção e quantificação das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot

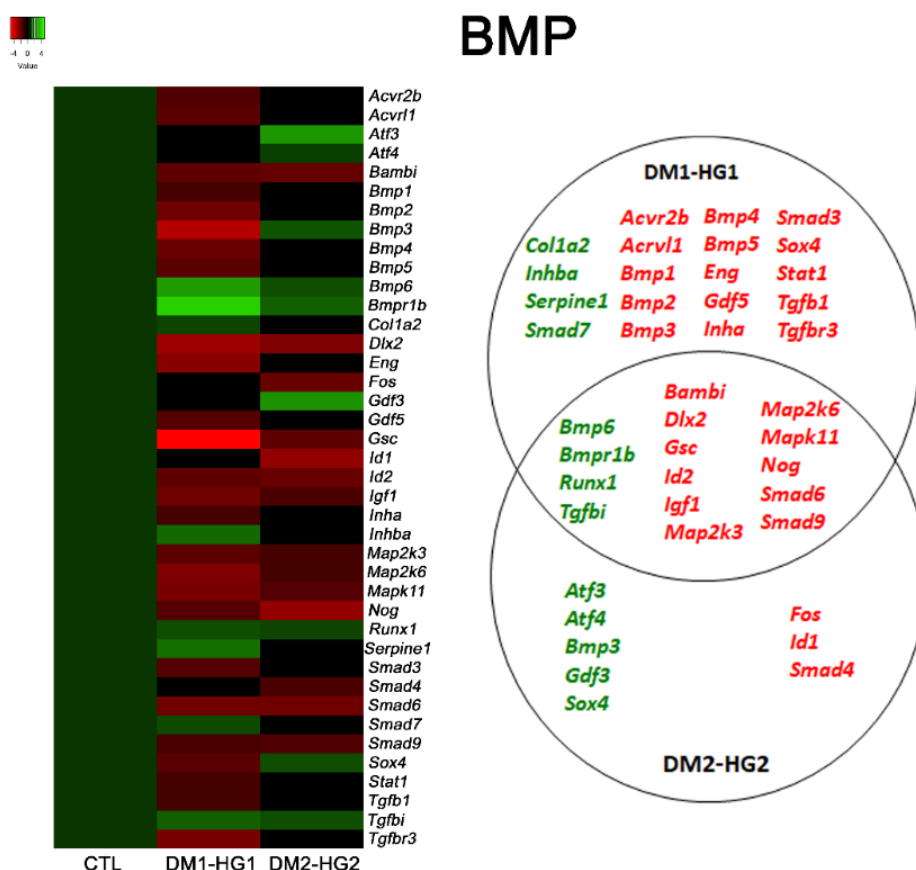
Obtivemos imagens das bandas de proteínas e as quantificações indicaram uma diminuição de RUNX2 nos grupos DM1-HG1 e DM2-HG2 ( $p=0,001$ ), sendo mais acentuada no grupo DM1-HG1. Porém, para quantidade de ALP encontrada no grupo DM1-HG1 foi maior que no grupo DM2-HG2 ( $p=0,001$ ) (Figura 9).



**Figura 9:** Detecção das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot aos 10 dias de cultura celular (A) e quantificação de relativa de RUNX2 (B) e ALP (C) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

#### 4.3.6 Efeito da DM1 e DM2 na modulação da expressão de genes das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT

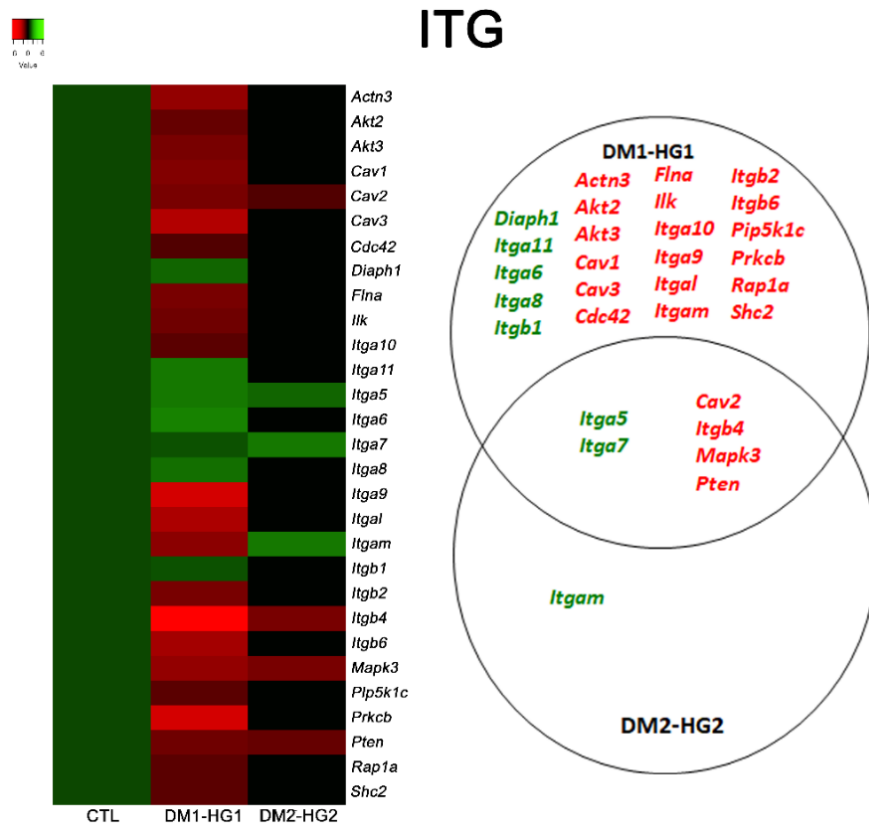
Os heatmaps apresentam os genes modulados positiva e negativamente nos grupos DM1-HG1 e DM2-HG2 em comparação ao grupo CTL nas vias de sinalização de BMP (Figura 10), ITG (Figura 11) e WNT (Figura 12), nas três vias avaliadas o grupo DM1-HG1 apresentou maior número de genes modulados negativamente. Na via de sinalização de BMP foram avaliados 63 genes. *Bmp6*, *Bmpr1b*, *Runx1* e *Tgfb1* foram modulados positivamente nos dois grupos DM1-HG1 e DM2-HG2. Os genes *Bambi*, *Dlx2*, *Gsc*, *Id2*, *Igf1*, *Map2k3*, *Map2k6*, *Mapk11*, *Nog*, *Smad6* e *Smad9* foram modulados negativamente. Entretanto, os genes *Bmp3* e *Sox4*, foram modulados de forma positiva para o grupo DM2-HG2 e negativamente para o grupo DM1-HG1.



**Figura 10:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente.

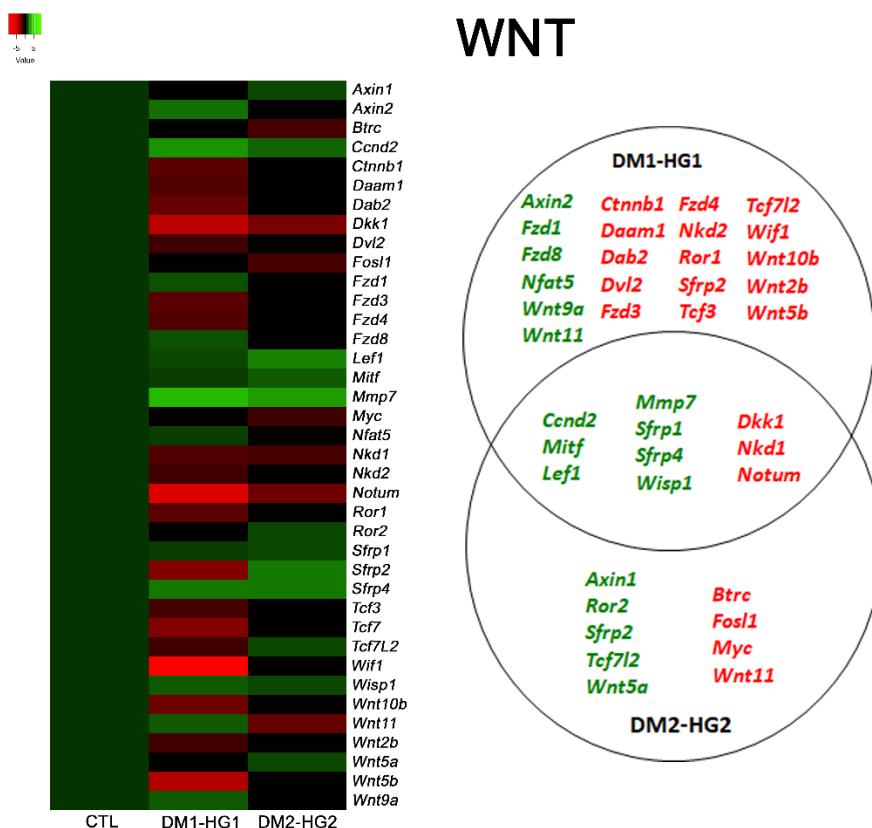
Foram avaliados 62 genes da via de sinalização de ITG, os genes modulados em comum nos grupos DM1-HG1 e DM2-HG2 foram – modulação positiva: *Itga5* e

*Itga7* e modulação negativa: *Cav2*, *Itgb4*, *Mapk3* e *Pten*. E o gene *Itgam* foi modulado de forma positiva no grupo DM2-HG2 e negativa no grupo DM1-HG1.



**Figura 11:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização ITG aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente.

Para a via WNT foram avaliados 63 genes, os genes modulados em comum para os grupos DM1-HG1 e DM2-HG2 foram – modulação positiva: *Ccnd2*, *Lef1*, *Mitf*, *Mmp7*, *Sfrp1*, *Sfrp4* e *Wisp1* e modulação negativa: *Dkk1*, *Nkd1* e *Notum*. E os genes *Sfrp2* e *Tcf7l2* foram modulados positiva no grupo DM2-HG2 e negativamente no grupo DM1-HG1 e *Wnt11* foi modulado de forma negativa no grupo DM2-HG2 e positivamente no DM1-HG1.

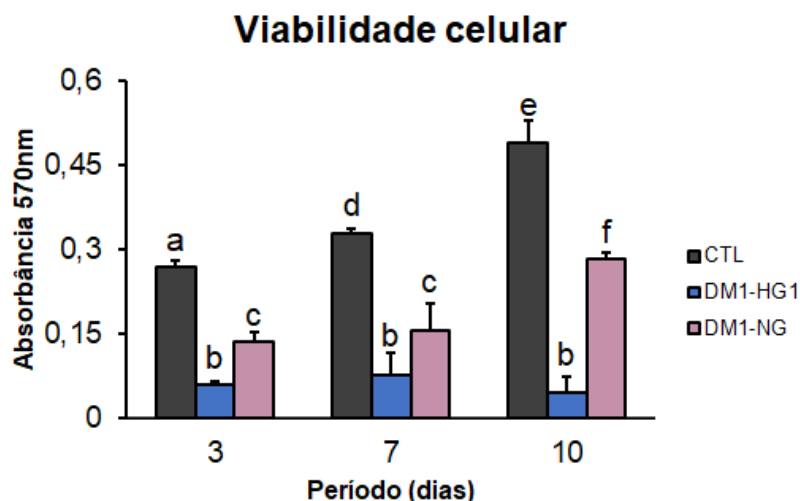


**Figura 12:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização WNT aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2) e não diabéticos (CTL), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (HG1), *high glucose* 2 (HG2) e normoglicêmico (CTL), respectivamente.

#### 4.4 Efeito da glicemia na viabilidade celular e diferenciação osteoblástica de MSCs de ratos DM1

##### 4.4.1 Viabilidade celular

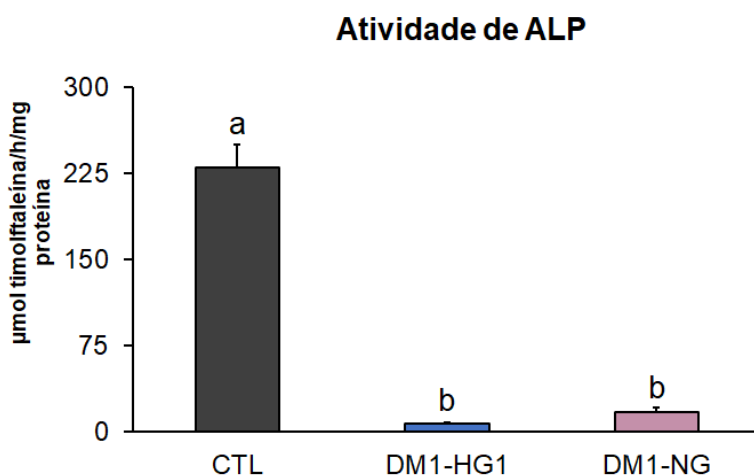
A viabilidade celular foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias de cultura (Figura 13). De modo geral, houve aumento do número de células, exceto para o grupo DM1-HG1. A análise entre os grupos dentro do mesmo período, mostrou que nos 3 períodos houve diferença entre os grupos, sendo CTL > DM1-NG > DM1-HG1 (p=0,001 para todas as comparações em todos os períodos).



**Figura 13.** Viabilidade de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.4.2 Atividade de ALP

A atividade de ALP, detectada aos 10 dias (Figura 14), mostrou que o grupo CTL apresentou maior atividade de ALP quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM1-NG ( $p=0,001$ ), que não apresentaram diferença entre eles ( $p=0,339$ ).

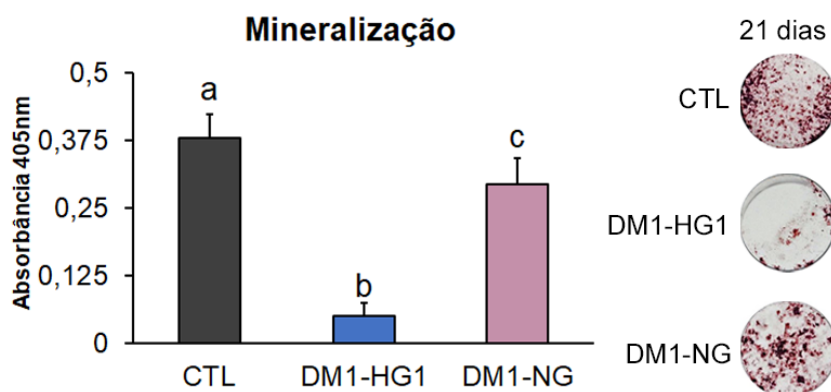


**Figura 14.** Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.4.3 Formação de matriz extracelular mineralizada



A formação de matriz extracelular foi avaliada aos 21 dias (Figura 15) de cultivo. O grupo CTL apresentou maior mineralização quando comparados aos grupos DM1-NG e DM1-HG1 ( $p=0,016$  e  $p=0,001$ , respectivamente) e o grupo DM1-NG foi maior do que o DM1-HG1 ( $p=0,001$ ).



**Figura 15.** Matriz extracelular mineralizada de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.4.4 Expressão gênica

##### 4.4.4.1 Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

Aos 7 dias de cultivo foi avaliada a expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica (Figura 16). Ao avaliarmos a expressão gênica de *Runx2*, CTL apresentou maior expressão em relação ao grupo DM1-NG e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ), e o grupo DM1-NG foi maior que o grupo DM1-HG1 ( $p=0,003$ ) (Figura 16A).

O grupo CTL apresentou maior expressão de *Osx* quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM1-NG ( $p=0,001$ ), e o grupo DM1-HG1 foi maior que DM1-NG ( $p=0,001$ ) (Figura 16B).

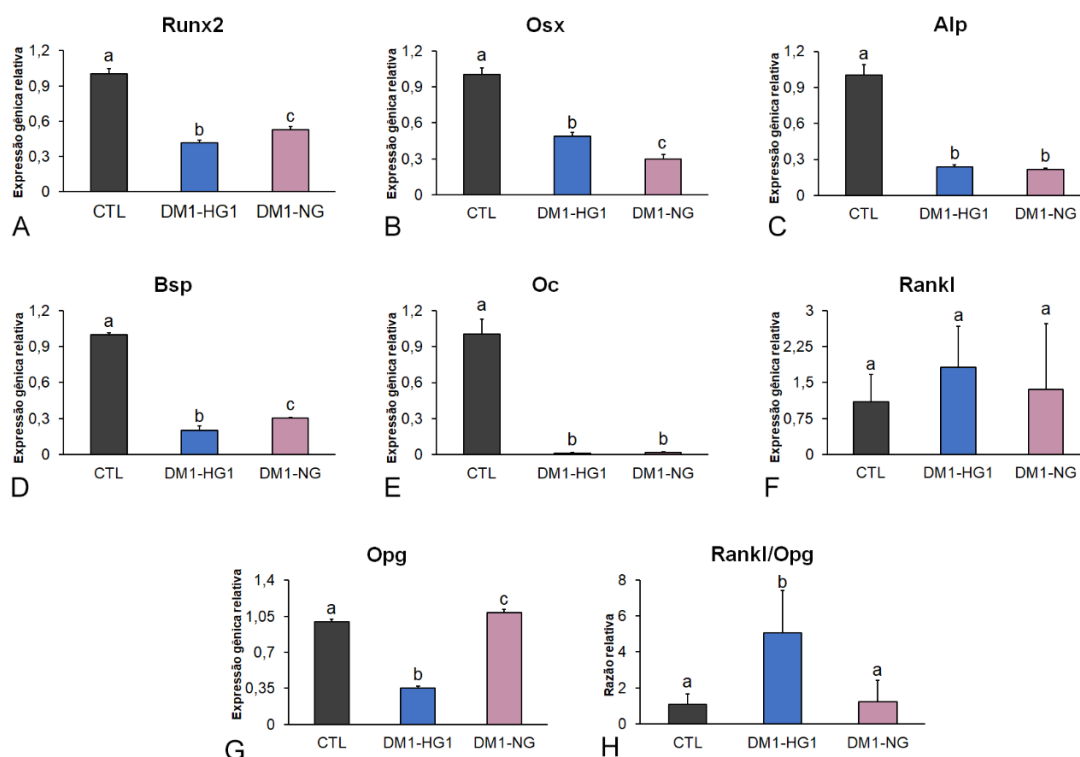
A expressão de *Alp* foi maior para CTL quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM1-NG ( $p=0,001$ ), e DM1-NG e DM1-HG1 não apresentaram diferenças significantes entre eles ( $p=0,883$ ) (Figura 16C).

O grupo CTL apresentou maior expressão de *Bsp* quando comparado aos grupos DM1-NG e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) e DM1-NG foi maior que o grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 16D).

A expressão de *Oc* foi maior para o grupo CTL quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM1-NG ( $p=0,001$ ) e os grupos DM1-HG1 e DM1-NG não apresentaram diferenças significantes entre eles ( $p=0,995$ ) (Figura 16E).

Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na expressão de *Rankl* ( $p=0,603$ ) (Figura 16F). A expressão de *Opg* foi maior no grupo DM1-NG em relação aos grupos CTL e DM1-HG1 e CTL foi maior que DM1-HG1 ( $p=0,001$  para todas as comparações) (Figura 16G).

Ao avaliarmos a razão de *Rankl/Opg*, CTL e DM1-NG não apresentaram diferenças significantes entre eles ( $p=0,992$ ). O grupo DM1-HG1 apresentou a maior razão entre os grupos quando comparado aos grupos CTL ( $p=0,014$ ) e DM1-NG ( $p=0,017$ ) (Figura 16H).



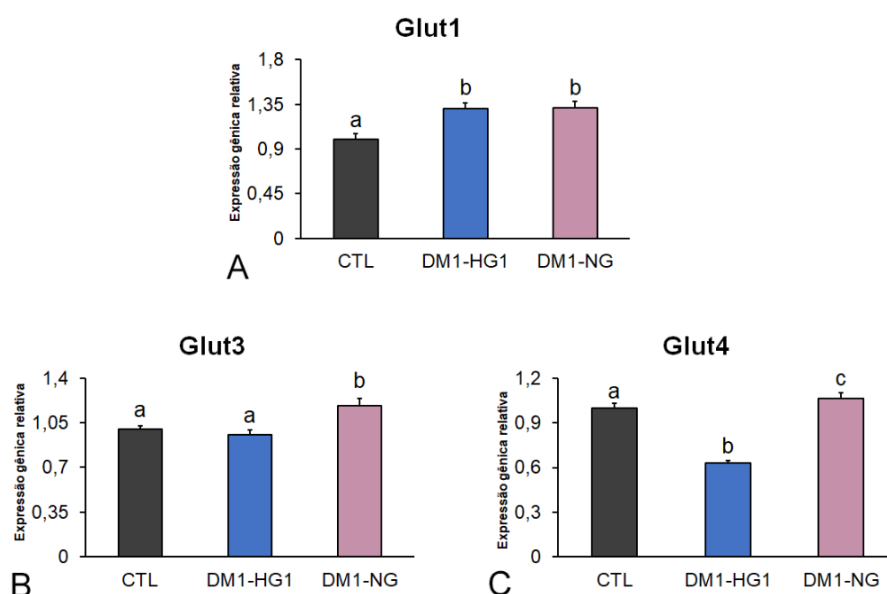
**Figura 16.** Expressão gênica relativa dos genes marcadores osteoblásticos (*Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E) e *Rankl* (F), *Opg* (G) e razão *Rankl/Opg* (H)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.4.4.2 Expressão de genes marcadores do metabolismo de glicose

A expressão de *Glut1* foi semelhante entre os grupos DM1-HG1 e DM1-NG ( $p=0,99$ ) que apresentaram maior expressão que o CTL ( $p=0,001$ ) (Figura 17A).

A expressão do gene *Glut3* foi maior para o grupo DM1-NG quando comparados aos grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ). Os grupos DM1-HG1 e CTL não apresentaram diferenças significantes entre eles ( $p=0,333$ ) (Figura 17B).

A expressão de *Glut4* foi maior para o grupo DM1-NG quando comparados aos grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,038$  e  $p=0,001$ , respectivamente) e CTL foi maior que o grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 17C).



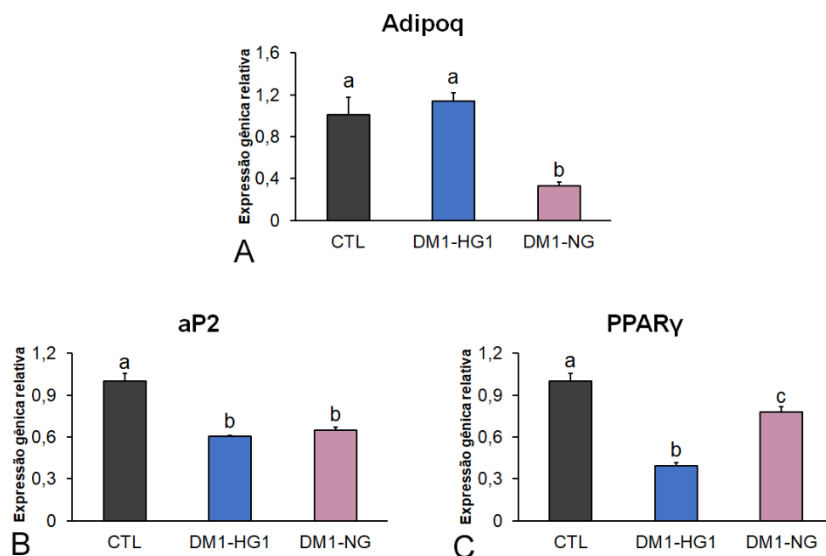
**Figura 17.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glut1* (A), *Glut3* (B) e *Glut4* (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.4.4.3 Expressão de genes marcadores da diferenciação adipocítica

A expressão de *Adipoq* foi semelhante para os grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,247$ ) e o grupo DM1-NG apresentou menor expressão quando comparados aos grupos CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 18A).

A expressão de *aP2* foi maior para o grupo CTL quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM1-NG ( $p=0,001$ ) e os grupos DM1-HG1 e DM1-NG não apresentaram diferenças entre eles ( $p=0,220$ ) (Figura 18B).

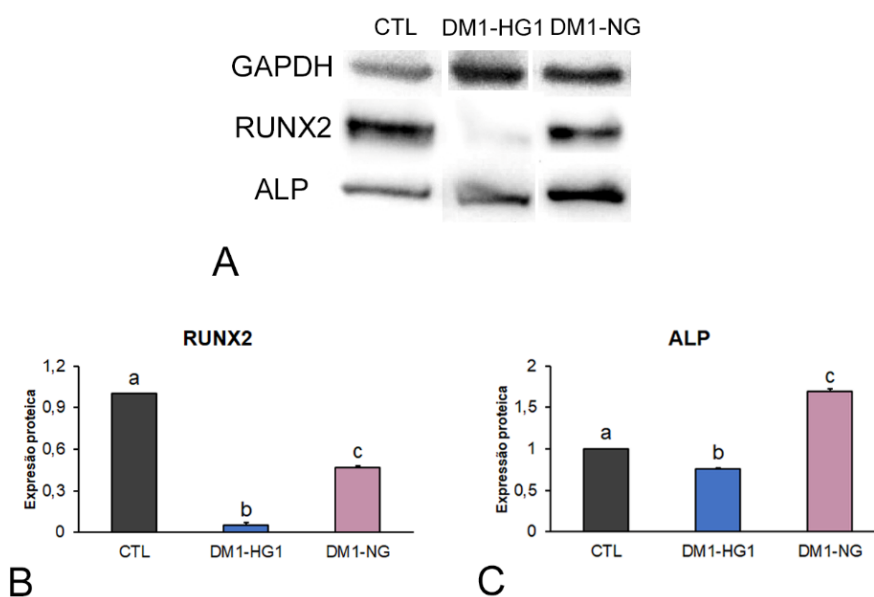
A expressão de *PPAR $\gamma$*  foi maior para o grupo CTL quando comparado aos grupos DM1-HG1 e DM1-NG, e DM1-NG foi maior que o grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$  para todas as comparações) (Figura 18C).



**Figura 18.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados a diferenciação adipogênica (*Adipoq* (A), *aP2* (B), *PPAR $\gamma$*  (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1), cultivadas em meios osteogênico *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Gapdh* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.4.5 Detecção e quantificação das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot

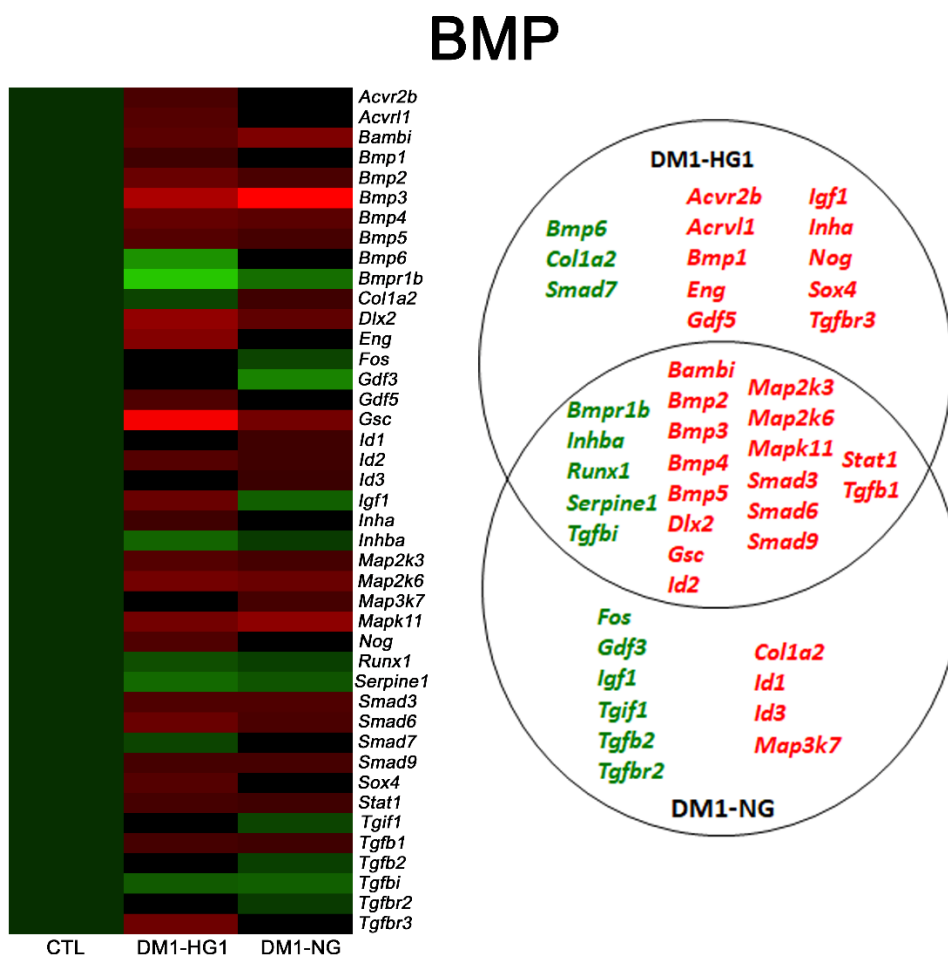
As imagens das bandas e as quantificações obtidas indicam que no grupo DM1-HG1 houve uma diminuição da expressão da proteínas RUNX2 e que no grupo DM1-NG houve um aumento da expressão em relação ao grupo DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 19B). A expressão de ALP no grupo DM1-HG1 foi maior quando comparado ao CTL e DM1-HG1 ( $p=0,001$ ) (Figura 19C).



**Figura 19:** Detecção das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot aos 10 dias de cultura celular (A) e quantificação de relativa de RUNX2 (B) e ALP (C) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmicos (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão (n=3).

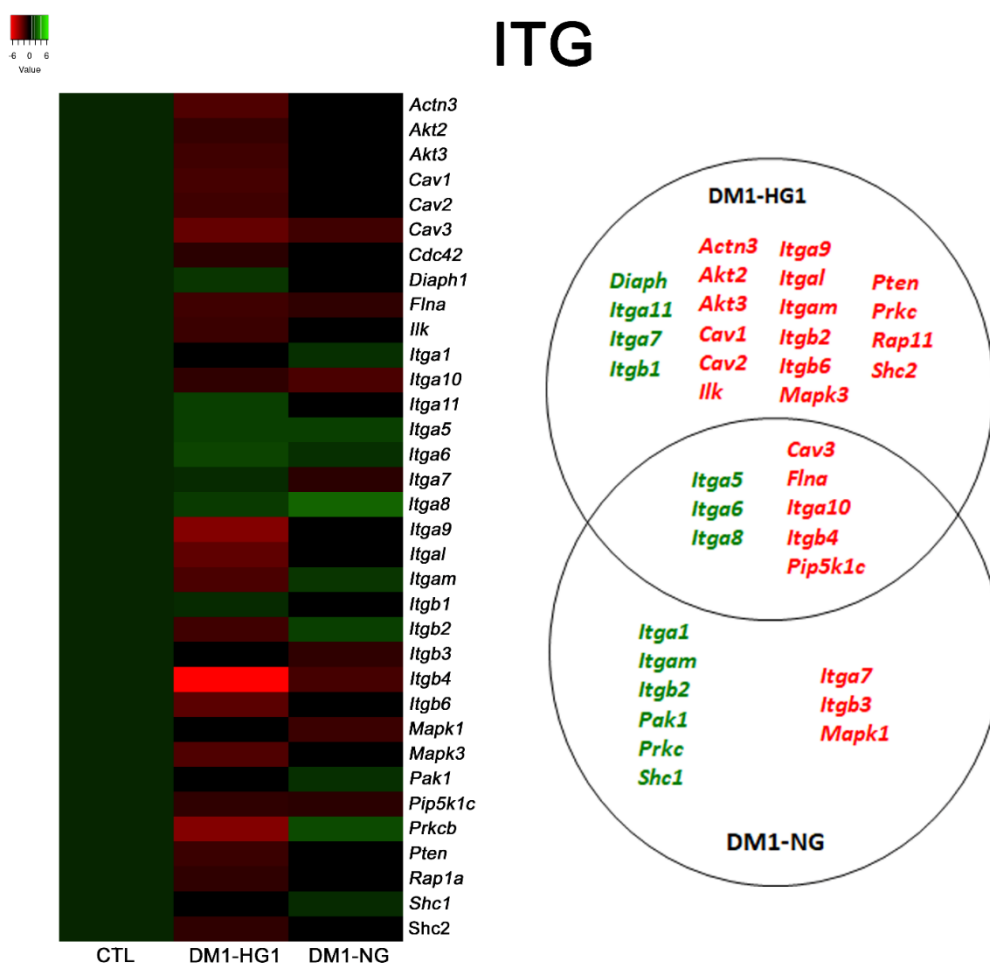
#### 4.4.6 Efeito da DM1 na modulação da expressão de genes das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT

Os heatmaps apresentam os genes modulados positivamente e negativamente nos grupos DM1-HG1 e DM1-NG em comparação ao grupo CTL nas vias de sinalização da BMP (Figura 20), ITG (Figura 21) e WNT (Figura 22). Na via da BMP foram avaliados 63 genes. *Bmpr1b*, *Inhba*, *Runx1*, *Serpine1* e *Tgfb1* foram modulados positivamente nos grupos DM1-HG1 e DM2-HG2. Os genes *Bambi*, *Bmp2*, *Bmp3*, *Bmp4*, *Bmp5*, *Dlx2*, *Gsc*, *Id2*, *Map2k3*, *Map2k6*, *Mapk11*, *Smad3*, *Smad6*, *Smad9*, *Stat1* e *Tgfb1* foram modulados de forma negativa em DM1-HG1 e DM2-H2. Os genes *Col1a2* foi modulado de forma positiva no grupo DM1-HG1 e negativa no grupo DM1-NG, e *Igf1* foi modulado de forma positiva no grupo DM1-NG e negativa no grupo DM1-HG1.



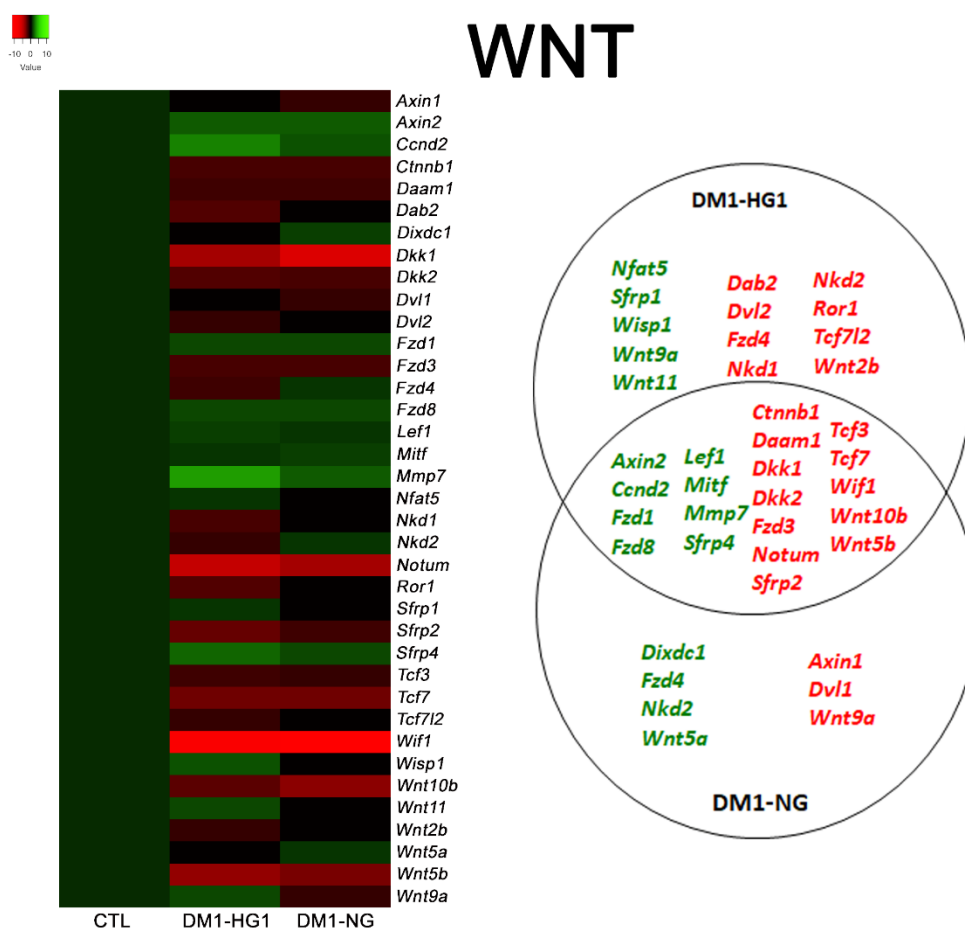
**Figura 20:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

Na via ITG foram avaliados 62 genes, os grupos DM1-HG1 e DM1-NG apresentaram oito genes modulados em comum, modulação positiva: *Itga5*, *Itga6* e *Itga8*, modulação negativa: *Cav3*, *Flna*, *Itga10*, *Itgb4* e *Pip5k1c*. E os genes *Itgam*, *Itgb2*, *Prkc* foram modulados positivamente no grupo DM1-NG e negativamente no grupo DM1-HG1 e *Itga7* foi modulado de forma positiva no grupo DM1-HG1 e de forma negativa no grupo DM1-NG.



**Figura 21:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização ITG aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 1 (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

Foram avaliados 63 genes na via de sinalização da WNT, os genes em comum entre os grupos DM1-HG1 e DM1-NG modulados positivamente são: *Axin2*, *Ccnd2*, *Fzd1*, *Fzd8*, *Lef1*, *Mitf*, *Mmp7* e *Sfrp4*, os genes modulados negativamente são: *Ctnnb1*, *Daam1*, *Dkk1*, *Dkk2*, *Fzd3*, *Notum*, *Sfrp2*, *Tcf3*, *Tcf7*, *Wif1*, *Wnt10b* e *Wnt5b*. E os genes modulados em comum com modulações opostas são: *Fzd4*, *Nkd2* que foram modulados de forma positiva no grupo DM1-NG e negativa no grupo DM1-HG1 e *Wnt9a* foi modulado negativamente em DM1-NG e positivamente em DM1-HG1.



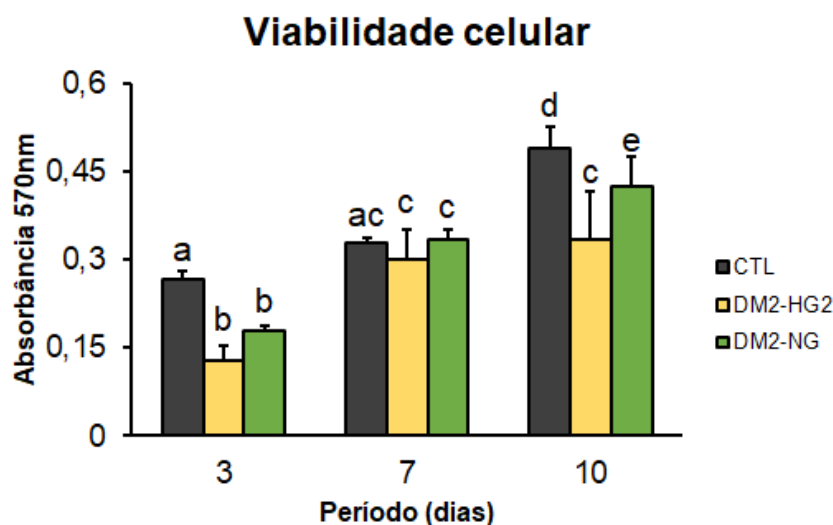
**Figura 22:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização WNT aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 1 (DM1) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 1* (DM1-HG1) e normoglicêmico (DM1-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

## 4.5 Efeitos da glicemia na viabilidade celular e diferenciação osteoblástica de MSCs de ratos DM2

### 4.5.1 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada aos 3, 7 e 10 dias de cultivo (Figura 23). De modo geral, houve aumento do número de células ao longo do tempo. Ao avaliarmos os grupos dentro do mesmo período, aos 3 dias o CTL apresentou maior viabilidade celular quando comparado aos grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,001$  e  $p=0,005$ ; respectivamente). Aos 7 dias, os grupos não diferenciam significantes ( $p>0,05$ ). Aos 10 dias, o grupo CTL foi maior que os grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,001$  e  $p=0,045$ ; respectivamente) e o grupo DM2-NG foi maior que DM2-NG ( $p=0,003$ ).

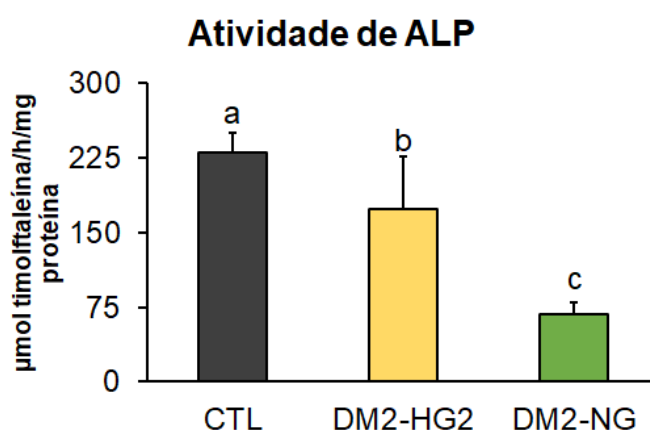




**Figura 23.** Viabilidade de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos dentro do mesmo período e entre o mesmo grupo em períodos diferentes (Two-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.5.2 Atividade de ALP

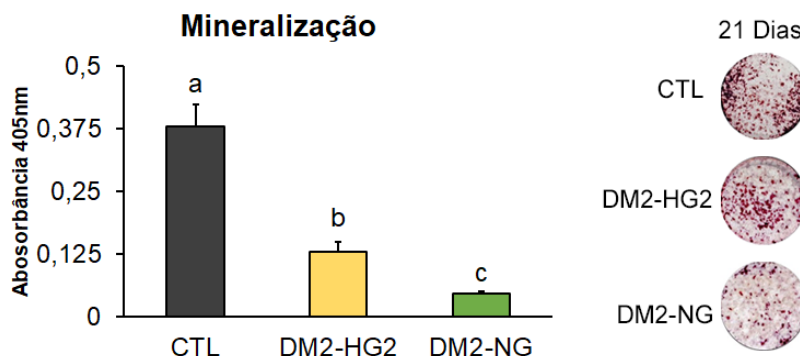
A atividade de ALP foi detectada aos 10 dias de cultura (Figura 24). O grupo CTL apresentou maior atividade de ALP quando comparado aos grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,045$  e  $p=0,001$ , respectivamente) e a atividade em DM2-HG2 foi maior que no grupo DM2-NG ( $p=0,001$ ).



**Figura 24.** Atividade de fosfatase alcalina (ALP) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.5.3 Formação de matriz extracelular mineralizada

A formação de matriz extracelular mineralizada foi avaliada aos 21 dias de cultura (Figura 25). O grupo CTL apresentou maior mineralização comparado aos grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,001$ ) e o grupo DM2-HG2 maior que DM2-NG ( $p=0,002$ ).



**Figura 25.** Matriz extracelular mineralizada de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=5$ ).

#### 4.5.4 Expressão gênica

##### 4.5.4.1 Expressão de genes marcadores da diferenciação osteoblástica

A expressão de *Runx2* foi semelhante nos grupos CTL e DM2-HG2 ( $p=0,589$ ) e os dois grupos apresentaram maior expressão quando comparados ao grupo DM2-NG ( $p=0,001$ ) (Figura 26A).

A expressão de *Osx* apresentou um padrão semelhante a expressão de *Runx2*, sendo os grupos CTL e DM2-HG2 semelhantes ( $p=0,996$ ) e uma menor expressão do grupo DM2-NG em relação ao CTL e DM2-HG2 ( $p=0,001$ ) (Figura 26B).

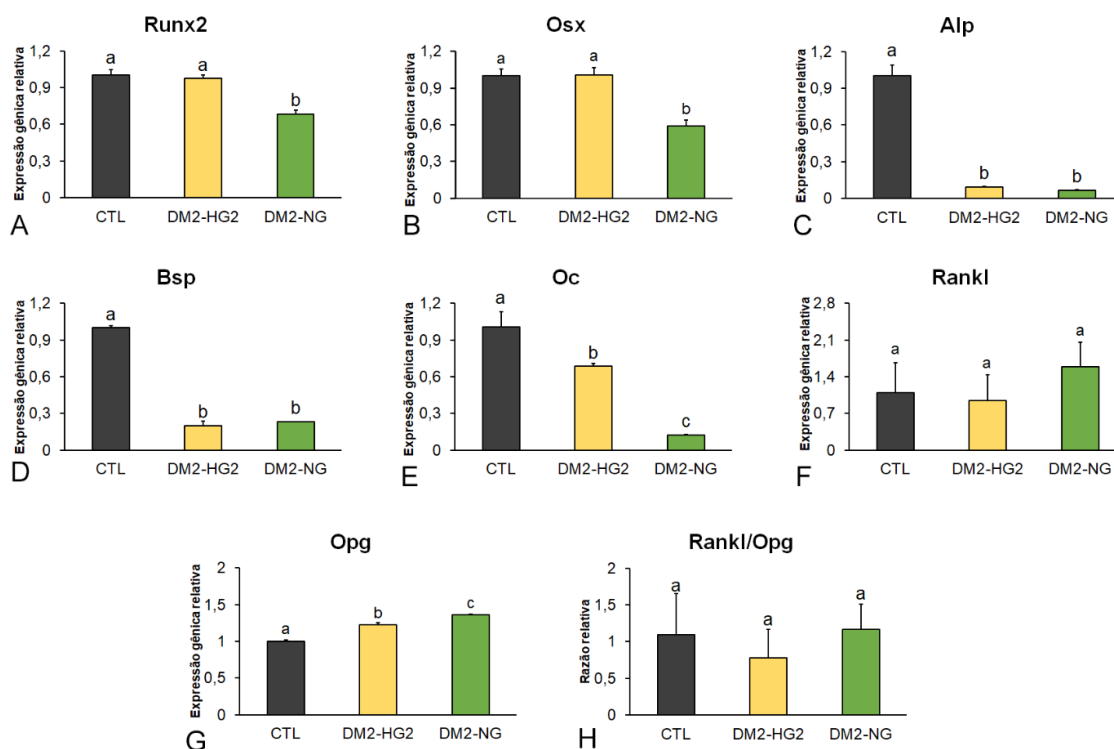
O grupo CTL apresentou maior expressão de *Alp* quando comparado aos grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,001$ ) e os grupos DM2-HG2 e DM2-NG não apresentaram diferenças significantes ( $p=0,712$ ) (Figura 26C).

A expressão gênica de *Bsp* foi maior no grupo CTL em relação aos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,001$ ) e os grupos DM2-HG2 e DM2-NG não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ( $p=0,211$ ) (Figura 26D).

A expressão gênica de *Oc* foi maior no grupo CTL comparado aos grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=0,001$ ) e o grupo DM2-HG2 foi maior em relação ao grupo DM2-NG ( $p=0,001$ ) (Figura 26E).

Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significante na expressão de *Rankl* ( $p=0,233$ ) (Figura 26F). A expressão de *Opg* foi maior no grupo DM2-NG quando comparado aos grupos CTL e DM2-HG2 ( $p=0,001$ ) e CTL foi menor que DM2-HG2 ( $p=0,001$ ) (Figura 26G).

Ao avaliarmos a razão *Rankl/Opg* não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos ( $p=0,447$ ) (Figura 26H).



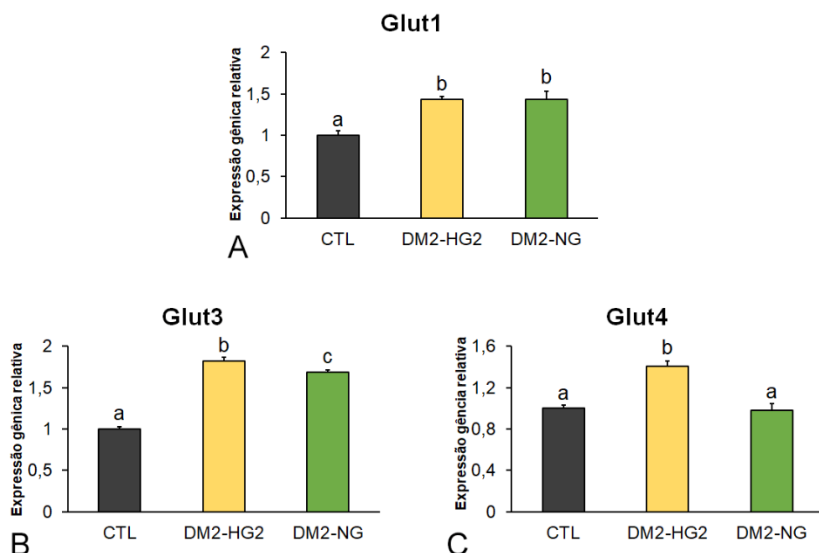
**Figura 26.** Expressão gênica relativa dos genes marcadores osteoblásticos (*Runx2* (A), *Osx* (B), *Alp* (C), *Bsp* (D), *Oc* (E), *Rankl* (F), *Opg* (G) e razão de *Rankl/Opg* (H)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivados em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.5.4.2 Expressão de genes relacionados ao metabolismo de glicose

A expressão do gene *Glut1* foi semelhante entre os grupos foi maior para os grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $p=1,0$ ) e apresentaram expressão maior que o CTL ( $p=0,001$ ) (Figura 27A).

A expressão gênica de *Glut3* foi maior para o grupo DM2-HG2 quando comparado aos grupos CTL e DM2-NG ( $p=0,001$ ) e DM2-NG foi maior que o grupo CTL ( $p=0,001$ ) (Figura 27B).

A expressão do gene *Glut4* foi maior no grupo DM2-HG2 em relação aos grupos DM2-NG e CTL ( $p=0,001$ ) e os grupos DM2-NG e CTL não apresentaram diferenças significantes ( $p=0,784$ ) (Figura 27C).



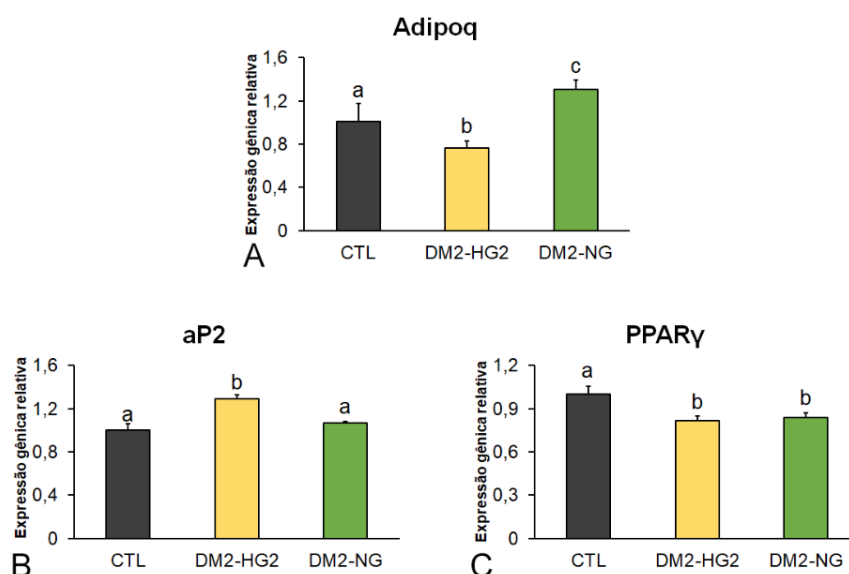
**Figura 27.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados ao metabolismo de glicose (*Glut1* (A), *Glut3* (B) e *Glut4* (C)) de derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose 2* (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Eif2b1* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.5.4.3 Expressão de genes marcadores da diferenciação adipocítica

A expressão do gene *Adipoq* foi maior no grupo DM2-NG comparado a CTL e DM2-HG2 ( $p=0,001$  para todas as comparações) (Figura 28A).

A expressão de *aP2* foi maior para o grupo DM2-HG2 quando comparados aos grupos CTL e DM2-NG ( $p=0,001$ ) e os grupos CTL e DM2-NG apresentaram expressões de *aP2* semelhantes ( $p=0,071$ ) (Figura 28B).

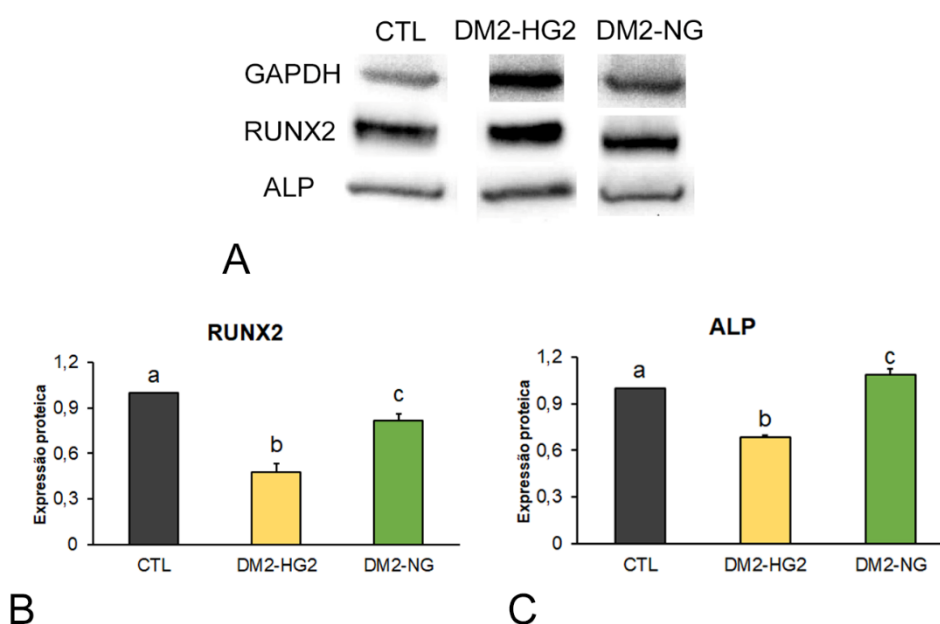
A expressão de *PPAR $\gamma$*  foi maior no grupo CTL comparado aos grupos DM2-HG2 e DM2-NG ( $P=0,001$ ) e os grupos DM2-HG2 e DM2-NG não apresentaram diferenças significantes ( $p=0,692$ ) (Figura 28C).



**Figura 28.** Expressão gênica relativa dos genes relacionados a diferenciação adipogênica (*Adipoq* (A), *aP2* (B), *PPARγ* (C)) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2), cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Os valores foram normalizados pelo gene constitutivo *Gapdh* e calibrados em relação à expressão dos genes do CTL aos 7 dias. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=4$ ).

#### 4.5.5 Detecção e quantificação das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot

As imagens das bandas obtidas e as quantificações indicam que no grupo DM2-HG2 houve redução da expressão de RUNX2 em comparação ao CTL e DM2-NG ( $p=0,001$ ). A expressão no grupo DM2-NG foi maior que o grupo DM2-HG2 ( $p=0,001$ ) e menor que o CTL ( $p=0,004$ ) (Figura 29).

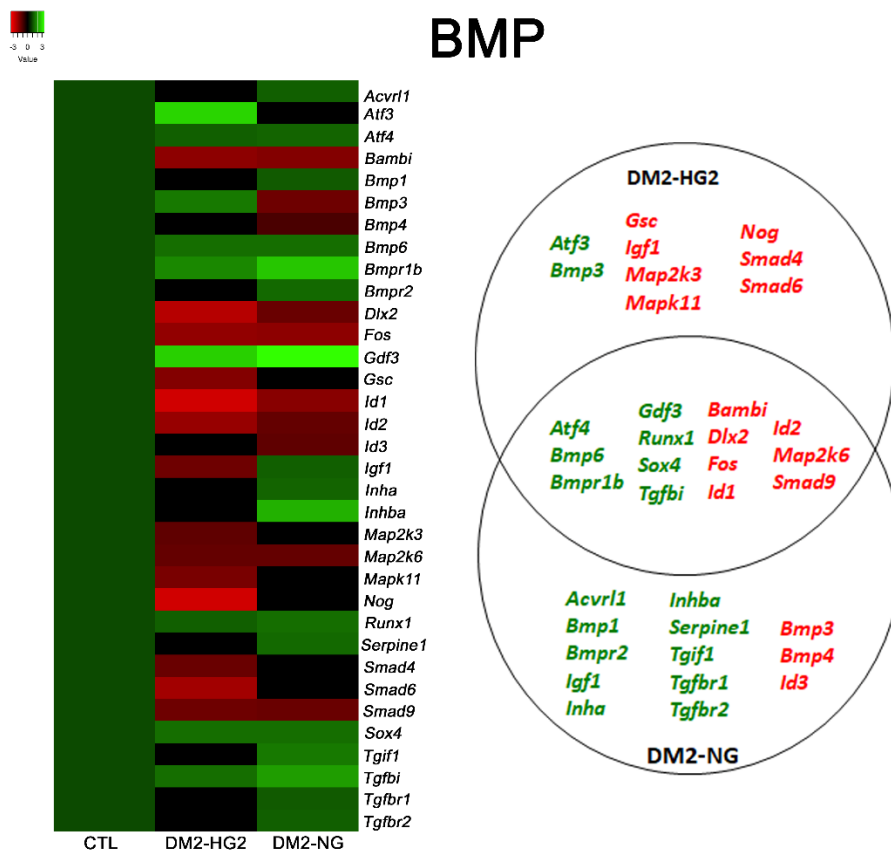


**Figura 29:** Detecção das proteínas RUNX2 e ALP por Western Blot aos 10 dias de cultura celular (A) e quantificação de relativa de RUNX2 (B) e ALP (C) de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-

diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL). Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (One-way ANOVA,  $p \leq 0,05$ ). Os dados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão ( $n=3$ ).

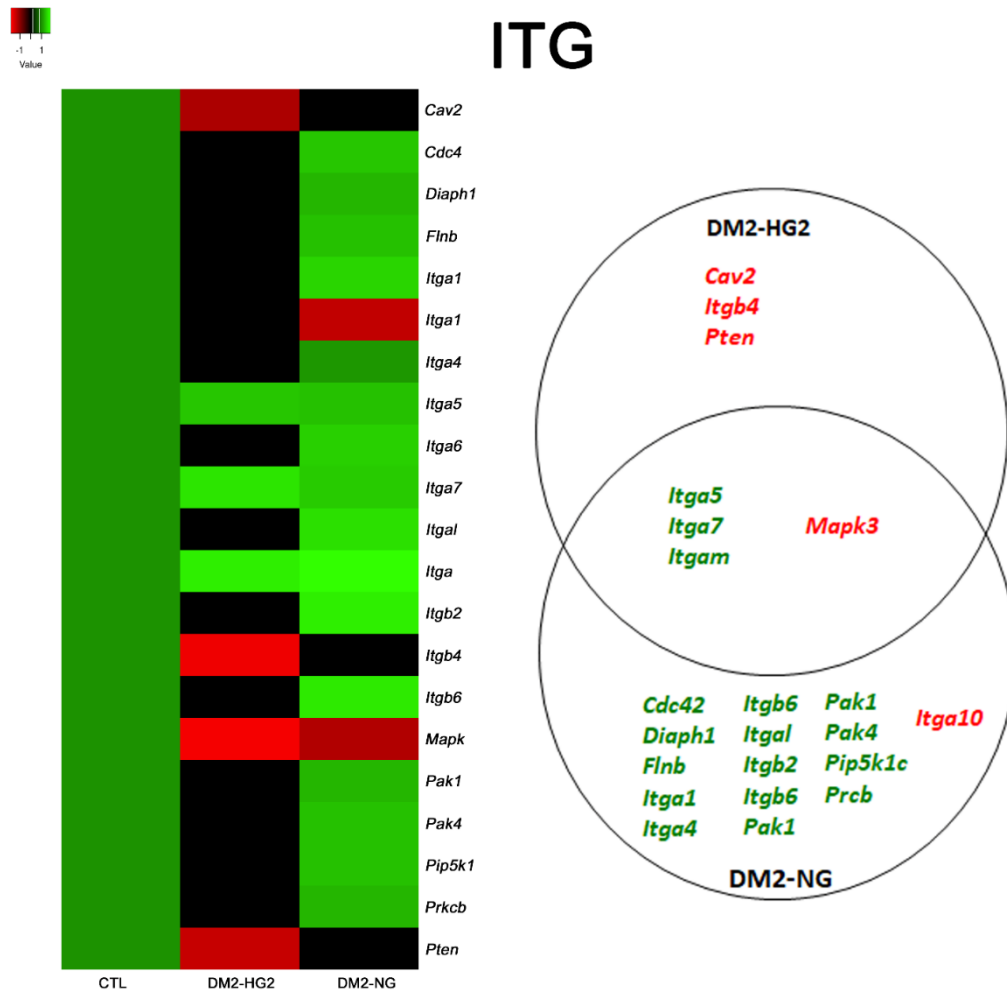
#### 4.5.6 Efeito da DM2 na modulação da expressão de genes das vias de sinalização de BMP, ITG e WNT

Os heatmaps apresentam os genes modulados positivamente e negativamente nos grupos DM1 e DM2 em comparação ao grupo CTL nas vias de sinalização de BMP (Figura 30), ITG (Figura 31) e WNT (Figura 32). Dos 63 genes avaliados na via de sinalização de BMP, *Atf4*, *Bmp6*, *Bmpr1b*, *Gdf3*, *Runx1*, *Sox4* e *Tgfb1* foram modulados positivamente nos grupos DM2-HG2 e DM2-NG. Os genes *Bambi*, *Dlx2*, *Fos*, *Id1*, *Id2*, *Map2k6* e *Smad9* foram modulados negativamente nos dois grupos. O gene *Bmp3* foi modulado positivamente no grupo DM2-HG2 e negativamente no grupo DM2-NG, e *Igf1* foi modulado de forma positiva no grupo DM2-NG e negativa no grupo DM2-HG2.



**Figura 30:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

Para a via de ITG os genes que foram modulados em comum nos grupos DM2-HG2 e DM2-NG foram *Itga5*, *Itga7* e *Itgam* apresentando modulação positiva e o gene *Mapk3* apresentou modulação negativa.

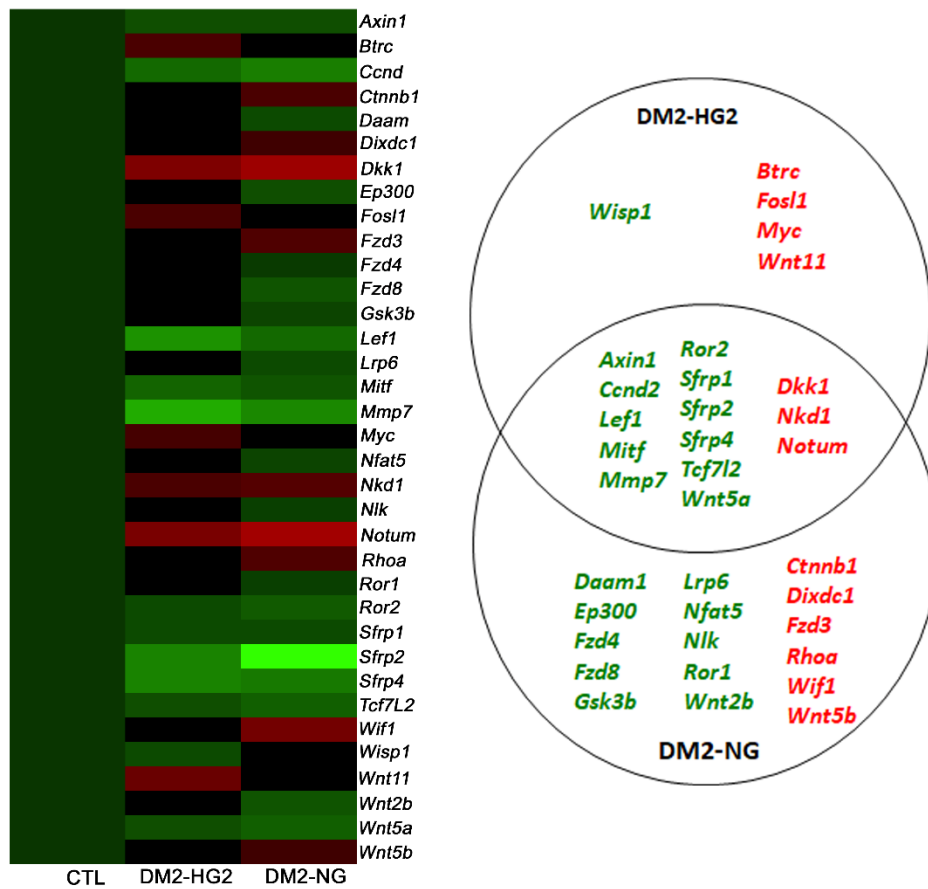


**Figura 31:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).

Na via de sinalização WNT os genes modulados em comum nos grupos DM2-HG2 e DM2-NG foram: *Axin1*, *Ccnd2*, *Lef1*, *Mitf*, *Mmp7*, *Ror2*, *Sfrp1*, *Sfrp2*, *Sfrp4*, *Tcf7l2* e *Wnt5a* de forma positiva, e os genes *Dkk1*, *Nkd1* e *Notum* foram modulados negativamente.



## WNT



**Figura 32:** Modulação da expressão dos genes da via de sinalização BMP aos 7 dias de cultivo de MSCs derivadas de ratos com diabetes mellitus tipo 2 (DM2) cultivadas em meios osteogênicos *high glucose* 2 (DM2-HG2) e normoglicêmico (DM2-NG) e de ratos não-diabéticos cultivadas em meio osteogênico normoglicêmico (CTL).



## 5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foram avaliados os efeitos da DM1 e da DM2 na diferenciação osteoblástica de MSCs e a participação das vias de sinalização das BMP, WNT e ITG nesse processo. Para isso, utilizamos MSCs obtidas da medula óssea de animais CTL, DM1 e DM2 cultivadas em meios de diferenciação osteoblástica com níveis de glicose distintos que mimetizavam o ambiente de origem. A avaliação dos fêmures por  $\mu$ CT demonstrou que a DM prejudica a estrutura óssea, com efeito mais pronunciado na DM2. A avaliação fenotípica e genotípica das MSCs revelou que as células derivadas de animais DM1 e DM2 apresentaram inibição da diferenciação osteoblástica em comparação àquelas derivadas de animais CTL. Quando cultivadas em condições normoglicêmicas as células DM1 recuperam parcialmente o potencial osteogênico, o que não ocorre na DM2, deve-se pelo menos em parte, à regulação das vias de sinalização BMP, WNT e ITG

Os métodos de indução de DM1 e DM2, alta dose de STZ em administração de única injeção e dieta hiperlipídica seguida de injeção de baixa dose de STZ, respectivamente, são protocolos bem estabelecidos na literatura e geraram condições hiperglicêmicas observadas pelos níveis de glicose no sangue dos animais. (JUNOD et al., 1969; SRINIVASAN et al., 2005; YIN et al., 2006; SKOVSTØ, 2014; SILVA et al., 2015, p. 20). A avaliação dos fêmures de ratos com DM1 e DM2 através dos parâmetros morfométricos, demonstraram os efeitos deletérios da DM no tecido ósseo, sendo mais proeminente em DM2 do que em DM1. Estudos indicam redução da DMO em pacientes com DM1 comparados a não diabéticos, enquanto DM2 pode ter DMO maior, apesar de terem discrepâncias entre os estudos (BOUILLON, 1991; KRAKAUER et al., 1995; SCHWARTZ, 2003; MA et al., 2012; NAPOLI et al., 2017; HOFBAUER et al., 2022). Em modelos de roedores, a DM1 induzida por STZ reduziu DMO, BV/TV e Tb.Sp de fêmures comparados a não diabéticos (ERDAL et al., 2012; LONDZIN et al., 2020). Ao compararmos ratos com DM2 espontânea (Zucker Diabetic Fatty) com ratos controle, os animais diabéticos exibem menor DMO, BV/TV e Tb.N (HAMANN et al., 2011). Nossos resultados concordam com esses estudos, foi observado efeitos negativos de DM1 e DM2 sobre o tecido ósseo dos fêmures quando comparados ao controle, porém, nenhum dos trabalhos comparou os efeitos de ambos os tipos de diabetes como apresentado no presente estudo. O quadro mais severo em DM2 comparado a DM1 sobre o tecido ósseo, poderia ser explicado pela dieta

hiperlipídica associada a STZ que pode modular outros mecanismos celulares, já que a dieta hiperlipídica induz perda óssea (CHEN et al., 2019; DAI et al., 2022).

Em relação ao potencial osteogênico, apesar da perda óssea ser mais evidente em animais DM2, as respostas celulares das MSCs de ratos com DM1 foram menores quando comparadas as MSCs de ratos com DM2, com cultivo de ambos em condições hiperglicêmicas. Nossos resultados corroboram com estudos *in vitro* que demonstram o impacto negativo da alta concentração de glicose em uma concentração semelhante a que utilizamos nesse estudo para a diferenciação osteoblástica das MSCs (CAO; LIU; WANG, 2016; HUANG et al., 2019; WANG et al., 2019; ASWAMENAKUL et al., 2020; GONG et al., 2021). A expressão gênica de marcadores da diferenciação osteoblástica apresentou menor expressão no grupo DM1 e maior expressão no grupo DM2 em comparação ao controle. Entretanto, as MSCs de DM2 por apresentar maiores expressões gênicas não apresentaram osteoblastos mais diferenciados, pois tanto DM1 quanto DM2, apresentaram inibição de marcadores fenotípicos como ALP, expressão proteica de RUNX2 e mineralização da matriz extracelular, além da viabilidade celular reduzida das MSCs, com resultados mais drásticos em DM1. Os resultados apresentados poderiam ser explicados devido a sensibilidade da diferenciação osteoblástica ao aumento da concentração de glicose, onde níveis de glicose semelhantes aos encontrados no sangue dos animais, sendo HG2 (16mM) e HG1 (33mM), e DM1 apresentou mais efeitos deletérios do que DM2 (ASWAMENAKUL et al., 2020). Como não foi reproduzido no modelo de DM2 *in vitro*, o ambiente rico em gordura como é oferecido no modelo *in vivo*, isso gera uma limitação do nosso estudo e reduz o efeito nocivo de DM2 durante a diferenciação osteoblástica. Os genes marcadores do metabolismo de glicose foram avaliados e encontramos que os osteoblastos de originados das MSCs expressaram *Glut1*, *Glut3* e *Glut4*, esses dados corroboram com dados encontrados de osteoblastos de calvária de recém-nascido que expressaram os mesmos marcadores (LI et al., 2016). Além disso, o trabalho de LI et al. (2016) sugere que *Glut4* facilita a diferenciação osteoblástica, em nossos resultados *in vitro*, DM2 apresentou maior expressão de *Glut4*, o poderia explicar o melhor desempenho em alguns fatores avaliados. A avaliação dos genes marcadores da diferenciação adipocítica revelou que no grupo DM2 cultivadas em meio *high glucose* houve diminuição da expressão de *Adipoq*, o que ser explicado pela origem da célula, pois a *adipoq* é diminuída na DM2 e pode ser

usada como marcador de DM2 e síndrome metabólica (KADOWAKI et al., 2006), e em modelo de DM2 de dieta hiperlipídica associada a STZ, as MSCs apresentaram maior capacidade para diferenciação adipocítica e que não ocorreu para diferenciação osteoblástica (FIGEAC et al., 2022). sugerindo o porquê de DM2 expressar mais genes adipocíticos que DM1.

Sabemos que as vias de sinalização BMP, ITG e WNT são de grande importância e influenciam no processo de diferenciação osteoblástica de MSCs (DOCHEVA et al., 2014; LOWERY; ROSEN, 2018; MAEDA et al., 2019; LOPES et al., 2019). O maior efeito inibitório na diferenciação osteoblástica de MSCs induzidas por T1DM em comparação com T2DM pode estar relacionado à modulação da transdução dos sinais das vias de BMP, WNT e ITG. As MSCs de ratos DM1 e DM2 cultivadas sob condições hiperglicêmicas apesar de compartilharem a regulação da expressão de vários componentes das vias de sinalização, DM1 apresentou maior número de genes modulados nas três vias de sinalização. Na via de sinalização de BMP, DM1 e DM2 cultivadas em condições hiperglicêmicas, os grupos apresentaram modulações individuais de alguns genes que são importantes para a diferenciação osteoblástica e formação óssea. No grupo DM1, os genes importantes para a diferenciação osteoblástica como *Bmp1*, *Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp5* e *Sox4* foram modulados negativamente (BANDYOPADHYAY et al., 2006; NISSEN-MEYER et al., 2007; ROSEN, 2009; ASHARANI et al., 2012; VIJAYAN; GUPTA; GUPTA, 2017). No grupo DM2 apenas *Id1* e *Smad4* foram modulados negativamente, enquanto *Sox4* e *Aff4* foram modulados positivamente, sendo esses últimos, genes que favorecem a diferenciação osteoblástica (MAKOWSKI et al., 2014). Na via de ITG, o grupo DM1 apresentou o maior número de genes modulados negativamente (16 genes) quando comparado a DM2, dentre eles está o gene *Actn3*, esse gene é expresso no tecido ósseo, e camundongos deficientes de *Actn3* apresentam uma redução da densidade mineral óssea (YANG et al., 2011), sendo assim, uma modulação negativa poderia diminuir a função dos osteoblastos. Na via de WNT os grupos DM1 e DM2 apresentaram modulação positiva dos genes *Sfrp1* e *Sfrp4* que são conhecidos por inibir a sinalização de WNT. O grupo DM1 apresentou modulação positiva de *Axin2* que leva a diminuição de marcadores osteogênicos (YU et al., 2005), além disso, esse grupo também apresentou modulação positiva do gene *Nfat5*, que em células intestinais atuam como inibidores da via WNT dependente de  $\beta$ -catenina (WANG et

al., 2013) sugerindo que a diminuição da diferenciação osteoblástica seja devido, pelo menos em parte, à maior expressão desse gene.

De acordo com nossos resultados, a hiperglicemia inibe a diferenciação osteoblástica de MSCs, sendo mais severa em DM1, e pode ser devido à modulação de um maior número de genes que são importantes para a diferenciação osteoblástica quando comparada à DM2. Nesse trabalho avaliamos partes das vias isoladas, mas sabe-se que as vias de sinalização se inter-relacionam (FUKUDA et al., 2010; ZHANG et al., 2013; YANG et al., 2020), o que poderia favorecer um acúmulo de efeitos das vias, exacerbando a inibição da diferenciação osteoblástica. As MSCs quando cultivadas em condições normoglicêmicas, apresentaram recuperação parcial do potencial osteogênico, principalmente do grupo DM1. Essa recuperação parcial pode ser devido à remoção da hiperglicemia, pois segundo Zhao et al. (2013), a DM1 reduz o potencial osteogênico de MSCs de camundongos. Já MSCs de DM2, por não possuírem um efeito exacerbado na diferenciação osteogênica, não há uma recuperação evidente do potencial osteogênico, porém nas características *ex-vivo* apresentam-se mais severas do que DM1. Tomados em conjunto os resultados indicam que a DM reduz a diferenciação osteoblástica e em ambientes hiperglicêmicos há redução acentuada do potencial osteogênico, principalmente em DM1, e ao serem cultivadas em condições normoglicêmicas, as MSCs tem seu potencial osteogênico recuperado parcialmente, o que não ocorre em DM2.

## 6 CONCLUSÕES

- DM1 e DM2 diminuem a proliferação, expressão gênica de genes osteoblásticos e formação de matriz extracelular mineralizada, sendo mais severa em DM1
- As vias de sinalização de BMP, ITG e WNT são moduladas de formas distintas nos tipos de DM
- MSCs de ratos DM1 quando cultivadas em condições normoglicêmicas recuperam parcialmente o potencial osteogênico.
- MSCs de ratos DM2 quando cultivadas em condições normoglicêmicas não recuperam o potencial osteogênico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2022. **Diabetes Care**, [S. l.], v. 45, n. Supplement\_1, p. S17–S38, 2021. DOI: 10.2337/dc22-S002.
2. ASHARANI, P. V. et al. Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. **American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 90, n. 4, p. 661–674, 2012. DOI: 10.1016/j.ajhg.2012.02.026.
3. ASWAMENAKUL, Kuneerat; KLABKLAI, Parin; PANNENGPETCH, Supitcha; TAWONSAWATRUK, Tulyapruet; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, Chartchalerm; ROYTRAKUL, Sittiruk; NANTASENAMAT, Chanin; SUPOKAWAJ, Aungkura. Proteomic study of in vitro osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in high glucose condition. **Molecular Biology Reports**, [S. l.], v. 47, n. 10, p. 7505–7516, 2020. DOI: 10.1007/s11033-020-05811-x.
4. BANDYOPADHYAY, Amitabha; TSUJI, Kunikazu; COX, Karen; HARFE, Brian D.; ROSEN, Vicki; TABIN, Clifford J. Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 2, n. 12, p. e216, 2006. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020216.
5. BOTOLIN, Sergiu; MCCABE, Laura R. Chronic hyperglycemia modulates osteoblast gene expression through osmotic and non-osmotic pathways. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 411–424, 2006. DOI: 10.1002/jcb.20842.
6. BOUILLON, Roger. Diabetic bone disease. **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 49, n. 3, p. 155–160, 1991. DOI: 10.1007/BF02556109.
7. BOUXSEIN, Mary L.; BOYD, Stephen K.; CHRISTIANSEN, Blaine A.; GULDBERG, Robert E.; JEPSEN, Karl J.; MÜLLER, Ralph. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. **Journal of Bone and Mineral Research**, [S. l.], v. 25, n. 7, p. 1468–1486, 2010. DOI: 10.1002/jbmr.141.
8. BRITO-CASILLAS, Yeray; MELIÁN, Carlos; WÄGNER, Ana María. Study of the pathogenesis and treatment of diabetes mellitus through animal models. **Endocrinología y Nutrición**, [S. l.], v. 63, n. 7, p. 345–353, 2016. DOI: 10.1016/j.endonu.2016.03.011.
9. BROWN, Matthew L. et al. Delayed Fracture Healing and Increased Callus Adiposity in a C57BL/6J Murine Model of Obesity-Associated Type 2 Diabetes Mellitus. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. e99656, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0099656.
10. CAO, Boran; LIU, Ning; WANG, Wenbo. High glucose prevents osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via lncRNA AK028326/CXCL13 pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 84, p. 544–551, 2016. DOI: 10.1016/j.biopha.2016.09.058.
11. CARILLON, Julie; ROMAIN, Cindy; BARDY, Guillaume; FOURET, Gilles; FEILLET-COUDRAY, Christine; GAILLET, Sylvie; LACAN, Dominique; CRISTOL, Jean-Paul; ROUANET, Jean-Max. Cafeteria diet induces obesity and insulin resistance associated with oxidative stress but not with inflammation: improvement by dietary supplementation with a melon superoxide dismutase. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 65, p. 254–261, 2013. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.06.022.

12. CHEN, Fulian et al. Flaxseed oil ameliorated high-fat-diet-induced bone loss in rats by promoting osteoblastic function in rat primary osteoblasts. **Nutrition & Metabolism**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 71, 2019. DOI: 10.1186/s12986-019-0393-0.
13. CHEN, Sixu et al. Preactivation of  $\beta$ -catenin in osteoblasts improves the osteoanabolic effect of PTH in type 1 diabetic mice. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 235, n. 2, p. 1480–1493, 2020. DOI: 10.1002/jcp.29068.
14. CHINIPARDAZ, Zahra; LIU, Min; GRAVES, Dana; YANG, Shuying. Diabetes impairs fracture healing through disruption of cilia formation in osteoblasts. **Bone**, [S. l.], v. 153, p. 116176, 2021. DOI: 10.1016/j.bone.2021.116176.
15. COMPSTON, J. Type 2 diabetes mellitus and bone. **Journal of Internal Medicine**, [S. l.], v. 283, n. 2, p. 140–153, 2018. DOI: 10.1111/joim.12725.
16. CORREIA-SANTOS, André Manoel; SUZUKI, Akemi; ANJOS, Juliana; RÊGO, Thaís; ALMEIDA, Kátia; BOAVENTURA, Gilson. Indução de Diabetes Tipo 2 por dieta hiperlipídica e baixa dose de estreptozotocina em ratas wistar. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, [S. l.], v. 45, p. 436, 2012. DOI: 10.11606/issn.2176-7262.v45i4p436-444.
17. DAI, Fang; ZHANG, Yi; XU, Dongmei; LIU, Chao; CAO, Qiongqiong; GUI, Li; LU, Yunxia; ZHANG, Qiu. Effects of long term diabetogenic high fat diet on bone in ovariectomized female rats. **Biotechnic & Histochemistry**, [S. l.], v. 0, n. 0, p. 1–9, 2022. DOI: 10.1080/10520295.2022.2083685.
18. DENG, Xiangqun; XU, Min; SHEN, Moyu; CHENG, Jinluo. Effects of Type 2 Diabetic Serum on Proliferation and Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Diabetes Research**, [S. l.], v. 2018, p. e5765478, 2018. DOI: 10.1155/2018/5765478.
19. DOCHEVA, Denitsa; POPOV, Cvetan; ALBERTON, Paolo; ASZODI, Attila. Integrin signaling in skeletal development and function. **Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 13–36, 2014. DOI: 10.1002/bdrc.21059.
20. ERDAL, Nurten; GÜRGÜL, Serkan; DEMIREL, Can; YILDIZ, Altan. The effect of insulin therapy on biomechanical deterioration of bone in streptozotocin (STZ)-induced type 1 diabetes mellitus in rats. **Diabetes Research and Clinical Practice**, [S. l.], v. 97, n. 3, p. 461–467, 2012. DOI: 10.1016/j.diabres.2012.03.005.
21. FIGEAC, Florence et al. Impaired Bone Fracture Healing in Type 2 Diabetes Is Caused by Defective Functions of Skeletal Progenitor Cells. **Stem Cells**, [S. l.], v. 40, n. 2, p. 149–164, 2022. DOI: 10.1093/stmcls/sxab011.
22. FUKUDA, Toru et al. Canonical Wnts and BMPs cooperatively induce osteoblastic differentiation through a GSK3 $\beta$ -dependent and  $\beta$ -catenin-independent mechanism. **Differentiation**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 46–52, 2010. DOI: 10.1016/j.diff.2010.05.002.
23. FURMAN, Brian L. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. **Current Protocols in Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 5.47.1-5.47.20, 2015. DOI: 10.1002/0471141755.ph0547s70.
24. GOMEZ-SMITH, Mariana; KARTHIKEYAN, Sudhir; JEFFERS, Matthew S.; JANIK, Rafal; THOMASON, Lysie A.; STEFANOVIC, Bojana; CORBETT, Dale. A physiological characterization of the Cafeteria diet model of metabolic syndrome in the rat. **Physiology & Behavior**, [S. l.], v. 167, p. 382–391, 2016. DOI: 10.1016/j.physbeh.2016.09.029.

25. GONG, Fangzi; GAO, Le; MA, Luyao; LI, Guangxin; YANG, Jianhong. Uncarboxylated osteocalcin alleviates the inhibitory effect of high glucose on osteogenic differentiation of mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells by regulating TP63. **BMC Molecular and Cell Biology**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 24, 2021. DOI: 10.1186/s12860-021-00365-7.
26. GREGORY, Carl A.; GRADY GUNN, W.; PEISTER, Alexandra; PROCKOP, Darwin J. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 329, n. 1, p. 77–84, 2004. DOI: 10.1016/j.ab.2004.02.002.
27. HAMANN, Christine et al. Delayed bone regeneration and low bone mass in a rat model of insulin-resistant type 2 diabetes mellitus is due to impaired osteoblast function. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 301, n. 6, p. E1220–E1228, 2011. DOI: 10.1152/ajpendo.00378.2011.
28. HIE, Mamiko; TSUKAMOTO, Ikuyo. Increased expression of the receptor for activation of NF-kappaB and decreased runt-related transcription factor 2 expression in bone of rats with streptozotocin-induced diabetes. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 611–618, 2010. DOI: 10.3892/ijmm\_00000506.
29. HILDEBRANDT, Nick; COLDITZ, Juliane; DUTRA, Caio; GOES, Paula; SALBACH-HIRSCH, Juliane; THIELE, Sylvia; HOFBAUER, Lorenz C.; RAUNER, Martina. Role of osteogenic Dickkopf-1 in bone remodeling and bone healing in mice with type I diabetes mellitus. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1920, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-81543-7.
30. HOFBAUER, Lorenz C. et al. Bone fragility in diabetes: novel concepts and clinical implications. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 207–220, 2022. DOI: 10.1016/S2213-8587(21)00347-8.
31. HUANG, Kuo-Chin; CHUANG, Po-Yao; YANG, Tien-Yu; HUANG, Tsan-Wen; CHANG, Shun-Fu. Hyperglycemia inhibits osteoblastogenesis of rat bone marrow stromal cells via activation of the Notch2 signaling pathway. **International Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 696–703, 2019. DOI: 10.7150/ijms.32707.
32. INTERNATIONAL FEDERATION DIABETES; Privacy. **IDF Diabetes Atlas 2021 | IDF Diabetes Atlas**. , 2021. Disponível em: <https://diabetesatlas.org/atlas/tenth-edition/>. Acesso em: 18 out. 2022.
33. JIANG, Hongyuan; ROBINSON, Dale L.; NANKERVIS, Alison; GARLAND, Suzanne M.; CALLEGARI, Emma T.; PRICE, Sarah; LEE, Peter V. S.; WARK, John D. Bone Measures by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry and Peripheral Quantitative Computed Tomography in Young Women With Type 1 Diabetes Mellitus. **Journal of Clinical Densitometry**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 259–267, 2021. DOI: 10.1016/j.jocd.2020.05.009.
34. JUNOD, Alain; LAMBERT, André E.; STAUFFACHER, Werner; RENOLD, Albert E. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 48, n. 11, p. 2129–2139, 1969. DOI: 10.1172/JCI106180.
35. KADOWAKI, Takashi; YAMAUCHI, Toshimasa; KUBOTA, Naoto; HARA, Kazuo; UEKI, Kohjiro; TOBE, Kazuyuki. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. **The Journal of Clinical Investigation**, [S. l.], v. 116, n. 7, p. 1784–1792, 2006. DOI: 10.1172/JCI29126.



36. KALYANARAMAN, Hema; SCHWAERZER, Gerburg; RAMDANI, Ghania; CASTILLO, Francine; SCOTT, Brian T.; DILLMANN, Wolfgang; SAH, Robert L.; CASTEEL, Darren E.; PILZ, Renate B. Protein Kinase G Activation Reverses Oxidative Stress and Restores Osteoblast Function and Bone Formation in Male Mice With Type 1 Diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 67, n. 4, p. 607–623, 2018. DOI: 10.2337/db17-0965.
37. KEENAN, Hillary A.; MADDALONI, Ernesto. Bone Microarchitecture in Type 1 Diabetes: It Is Complicated. **Current Osteoporosis Reports**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 351–358, 2016. DOI: 10.1007/s11914-016-0338-8.
38. KRAKAUER, Jesse C.; MCKENNA, Malachi J.; FENN BUDERER, Nancy; RAO, D. Sudhaker; WHITEHOUSE, Fred W.; PARFITT, A. Michael. Bone Loss and Bone Turnover in Diabetes. **Diabetes**, [S. l.], v. 44, n. 7, p. 775–782, 1995. DOI: 10.2337/diab.44.7.775.
39. LI, Zhu; FREY, Julie L.; WONG, G. William; FAUGERE, Marie-Claude; WOLFGANG, Michael J.; KIM, Jason K.; RIDDLE, Ryan C.; CLEMENS, Thomas L. Glucose Transporter-4 Facilitates Insulin-Stimulated Glucose Uptake in Osteoblasts. **Endocrinology**, [S. l.], v. 157, n. 11, p. 4094–4103, 2016. DOI: 10.1210/en.2016-1583.
40. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
41. LONDZIN, Piotr; KISIEL-NAWROT, Ewa; KOCIK, Sonia; JANAS, Aleksandra; TRAWCZYŃSKI, Marcin; CEGIEŁA, Urszula; FOLWARCZNA, Joanna. Effects of diosgenin on the skeletal system in rats with experimental type 1 diabetes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 129, p. 110342, 2020. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110342.
42. LOPES, Helena B.; FREITAS, Gileade P.; ELIAS, Carlos N.; TYE, Coralee; STEIN, Janet L.; STEIN, Gary S.; LIAN, Jane B.; ROSA, Adalberto L.; BELOTI, Marcio M. Participation of integrin  $\beta 3$  in osteoblast differentiation induced by titanium with nano or microtopography. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [S. l.], v. 107, n. 6, p. 1303–1313, 2019. DOI: 10.1002/jbm.a.36643.
43. LOWERY, Jonathan W.; ROSEN, Vicki. The BMP Pathway and Its Inhibitors in the Skeleton. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 98, n. 4, p. 2431–2452, 2018. DOI: 10.1152/physrev.00028.2017.
44. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.
45. MA, Lili et al. Association between bone mineral density and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis of observational studies. **European Journal of Epidemiology**, [S. l.], v. 27, n. 5, p. 319–332, 2012. DOI: 10.1007/s10654-012-9674-x.
46. MAEDA, Kazuhiro; KOBAYASHI, Yasuhiro; KOIDE, Masanori; UEHARA, Shunsuke; OKAMOTO, Masanori; ISHIHARA, Akihiro; KAYAMA, Tomohiro; SAITO, Mitsuru; MARUMO, Keishi. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 22, p. E5525, 2019. DOI: 10.3390/ijms20225525.
47. MAKOWSKI, Alexander J.; UPPUGANTI, Sasidhar; WAADER, Sandra A.; WHITEHEAD, Jack M.; ROWLAND, Barbara J.; GRANKE, Mathilde; MAHADEVAN-JANSEN, Anita; YANG, Xiangli; NYMAN, Jeffry S. The Loss of Activating Transcription Factor 4 (ATF4)

- Reduces Bone Toughness and Fracture Toughness. **Bone**, [S. l.], v. 62, p. 1–9, 2014. DOI: 10.1016/j.bone.2014.01.021.
48. MASIELLO, P.; BROCA, C.; GROSS, R.; ROYE, M.; MANTEGHETTI, M.; HILLAIRE-BUYS, D.; NOVELLI, M.; RIBES, G. Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. **Diabetes**, [S. l.], v. 47, n. 2, p. 224–229, 1998. DOI: 10.2337/diab.47.2.224.
49. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
50. NAPOLI, Nicola; CHANDRAN, Manju; PIERROZ, Dominique D.; ABRAHAMSEN, Bo; SCHWARTZ, Ann V.; FERRARI, Serge L. Mechanisms of diabetes mellitus-induced bone fragility. **Nature Reviews Endocrinology**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 208–219, 2017. DOI: 10.1038/nrendo.2016.153.
51. NISSEN-MEYER, Lise Sofie Haug et al. Osteopenia, decreased bone formation and impaired osteoblast development in Sox4 heterozygous mice. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 120, n. 16, p. 2785–2795, 2007. DOI: 10.1242/jcs.003855.
52. PHIMPHILAI, Mattabhorn; POTHACHAROEN, Peraphan; KONGTAWELERT, Prachya; CHATTIPAKORN, Nipon. Impaired osteogenic differentiation and enhanced cellular receptor of advanced glycation end products sensitivity in patients with type 2 diabetes. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 631–641, 2017. DOI: 10.1007/s00774-016-0800-9.
53. PITOL-PALIN, Letícia; DE SOUZA BATISTA, Fábio Roberto; GOMES-FERREIRA, Pedro Henrique Silva; MULINARI-SANTOS, Gabriel; ERVOLINO, Edilson; SOUZA, Francisley Ávila; MATSUSHITA, Dóris Hissako; OKAMOTO, Roberta. Different Stages of Alveolar Bone Repair Process Are Compromised in the Type 2 Diabetes Condition: An Experimental Study in Rats. **Biology**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 471, 2020. DOI: 10.3390/biology9120471.
54. RICO, H.; HERNANDEZ, E. R.; CABRANES, J. A.; GOMEZ-CASTRESANA, F. Suggestion of a deficient osteoblastic function in diabetes mellitus: the possible cause of osteopenia in diabetics. **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 45, n. 2, p. 71–73, 1989. DOI: 10.1007/BF02561404.
55. ROSEN, Vicki. BMP2 signaling in bone development and repair. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, Bone Morphogenetic Proteins, Stem Cells and Regenerative Medicine. [S. l.], v. 20, n. 5, Bone Morphogenetic Proteins, Stem Cells and Regenerative Medicine, p. 475–480, 2009. DOI: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.018.
56. RUBIN, Mishaela R. Bone Cells and Bone Turnover in Diabetes Mellitus. **Current Osteoporosis Reports**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 186–191, 2015. DOI: 10.1007/s11914-015-0265-0.
57. SCHWARTZ, A. V. Diabetes Mellitus: Does it Affect Bone? **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 73, n. 6, p. 515–519, 2003. DOI: 10.1007/s00223-003-0023-7.
58. SILVA, J. C.; SAMPAIO, P.; FERNANDES, M. H.; GOMES, P. S. The Osteogenic Priming of Mesenchymal Stem Cells is Impaired in Experimental Diabetes. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 116, n. 8, p. 1658–1667, 2015. DOI: 10.1002/jcb.25126.


59. SKOVSTØ, Søs. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of Diabetes Investigation**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 349–358, 2014. DOI: 10.1111/jdi.12235.
60. SRINIVASAN, K.; VISWANAD, B.; ASRAT, Lydia; KAUL, C. L.; RAMARAO, P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: A model for type 2 diabetes and pharmacological screening. **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 52, n. 4, p. 313–320, 2005. DOI: 10.1016/j.phrs.2005.05.004.
61. STOLZING, Alexandra; SELLERS, Donna; LLEWELYN, Owen; SCUTT, Andy. Diabetes Induced Changes in Rat Mesenchymal Stem Cells. **Cells Tissues Organs**, [S. l.], v. 191, n. 6, p. 453–465, 2010. DOI: 10.1159/000281826.
62. SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. [S. l.], v. 50, p. 10, 2001.
63. TAN, Jun; ZHOU, Lihua; ZHOU, Yang; XUE, Peng; WU, Guangsheng; DONG, Guangying; GUO, Hang; WANG, Qintao. The Influence of Diabetes Mellitus on Proliferation and Osteoblastic Differentiation of MSCs. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 388–400, 2015.
64. VIJAYAN, Viji; GUPTA, Sakshi; GUPTA, Sarika. Bone morphogenetic protein-5, a key molecule that mediates differentiation in MC3T3E1 osteoblast cell line. **BioFactors**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 558–566, 2017. DOI: 10.1002/biof.1360.
65. VLASSARA, Helen; URIBARRI, Jaime. Advanced Glycation End Products (AGE) and Diabetes: Cause, Effect, or Both? **Current Diabetes Reports**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 453, 2013. DOI: 10.1007/s11892-013-0453-1.
66. WANG, Q.; ZHOU, Y.; RYCHAHOU, P.; LIU, C.; WEISS, H. L.; EVERS, B. M. NFAT5 represses canonical Wnt signaling via inhibition of  $\beta$ -catenin acetylation and participates in regulating intestinal cell differentiation. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 4, n. 6, p. e671–e671, 2013. DOI: 10.1038/cddis.2013.202.
67. WANG, Rongze; ZHANG, Yuanxu; JIN, Fujun; LI, Gongchen; SUN, Yao; WANG, Xiaogang. High-glucose-induced miR-214-3p inhibits BMSCs osteogenic differentiation in type 1 diabetes mellitus. **Cell Death Discovery**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–11, 2019. DOI: 10.1038/s41420-019-0223-1.
68. YANG, Chengliang et al. Fibronectin 1 activates WNT/ $\beta$ -catenin signaling to induce osteogenic differentiation via integrin  $\beta$ 1 interaction. **Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology**, [S. l.], v. 100, n. 12, p. 1494–1502, 2020. DOI: 10.1038/s41374-020-0451-2.
69. YANG, Nan et al.  $\alpha$ -Actinin-3 deficiency is associated with reduced bone mass in human and mouse. **Bone**, [S. l.], v. 49, n. 4, p. 790–798, 2011. DOI: 10.1016/j.bone.2011.07.009.
70. YIN, Dengping; TAO, Jing; LEE, David D.; SHEN, Jikun; HARA, Manami; LOPEZ, James; KUZNETSOV, Andrey; PHILIPSON, Louis H.; CHONG, Anita S. Recovery of Islet  $\beta$ -Cell Function in Streptozotocin- Induced Diabetic Mice: An Indirect Role for the Spleen. **Diabetes**, [S. l.], v. 55, n. 12, p. 3256–3263, 2006. DOI: 10.2337/db05-1275.
71. YU, Hsiao-Man Ivy; JERCHOW, Boris; SHEU, Tzong-Jen; LIU, Bo; COSTANTINI, Frank; PUZAS, J. Edward; BIRCHMEIER, Walter; HSU, Wei. The role of Axin2 in calvarial

- morphogenesis and craniosynostosis. **Development**, [S. l.], v. 132, n. 8, p. 1995–2005, 2005. DOI: 10.1242/dev.01786.
72. ZHANG, Rongrong; OYAJOB, Babatunde O.; HARRIS, Stephen E.; CHEN, Di; TSAO, Christopher; DENG, Hong-Wen; ZHAO, Ming. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. **Bone**, [S. l.], v. 52, n. 1, p. 145–156, 2013. DOI: 10.1016/j.bone.2012.09.029.
73. ZHAO, Yan-Fang; ZENG, De-Liang; XIA, Lun-Guo; ZHANG, Song-Mei; XU, Lian-Yi; JIANG, Xin-Quan; ZHANG, Fu-Qiang. Osteogenic potential of bone marrow stromal cells derived from streptozotocin-induced diabetic rats. **International Journal of Molecular Medicine**, [S. l.], v. 31, n. 3, p. 614–620, 2013. DOI: 10.3892/ijmm.2013.1227.



## ANEXOS


## Anexo 1



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**

CAMPUS ARAÇATUBA  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals



### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Expressão gênica em larga escala de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea e tecido adiposo de ratos diabéticos tipo 1 e tipo 2"**, Processo FOA nº 00152-2019, sob responsabilidade de Roberta Okamoto apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 10 de Maio de 2019.

**VALIDADE DESTE CERTIFICADO:** 15 de Maio de 2021.

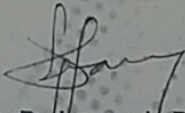
**DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL:** até 15 de Junho de 2021.

### CERTIFICATE

We certify that the study entitled **"Large-escale gene expression of mesenchymal stem cells derived from the bone marrow and fat tissue of type 1 and type 2 diabetic rats"**, Protocol FOA nº 00152-2019, under the supervision of Roberta Okamoto presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on May 10, 2019.

**VALIDITY OF THIS CERTIFICATE:** May 15, 2021.

**DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT:** June 15, 2021.



**Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani**  
Coordenador da CEUA  
CEUA Coordinator

---

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Odontologia de Araçatuba  
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba  
Rua José Bonifácio, 1193 – Vila Mendonça - CEP 16015-050 – ARAÇATUBA – SP  
Fone (18) 3636-3234      Email CEUA: ceua@foa.unesp.br

