

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

**CARACTERIZAÇÃO DE OSTEOLASTOS DIFERENCIADOS DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

Aluna: Natalia Manrique Cursino

Orientador: Profa. Cristina Antoniali Silva

Co-orientador: Prof. Adalberto Luiz Rosa

Araçatuba

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA

**CARACTERIZAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS DIFERENCIADOS DE CÉLULAS-
TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS (SHR)**

Natalia Manrique Cursino

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia do
Campus de Araçatuba – Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Unesp, para a
obtenção do Título de DOUTORA EM CIÊNCIA
ODONTOLÓGICA – SAÚDE BUCAL DA
CRIANÇA.

Araçatuba

2014

Catálogo-na-Publicação

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

- C977c Cursino, Natalia Manrique.
Caracterização de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) / Natalia Manrique Cursino. - Araçatuba, 2014
50 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM
- Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristina Antoniali Silva
Orientador: Prof. Adalberto Luiz Rosa
1. Células mesenquimais estromais 2. Osteoblastos
3. Técnicas de cultura de células 4. Ratos endogâmicos SHR
5. Expressão gênica 6. Receptores adrenérgicos I. Título

Black D27
CDD 617.645

Dados Curriculares

Natalia Manrique Cursino

Nascimento: 14/02/1983

Filiação: Jayme Décio Cursino
Elza Manrique

2004-2007: Curso de Graduação em Odontologia Faculdade de Odontologia de
Araçatuba - Unesp

2008-2010: Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Araçatuba – Unesp

2011-2014: Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência
Odontológica – Saúde Bucal da Criança

DEDICATÓRIAS

À Deus e minha família:

Agradeço diariamente o grande presente divino que recebi nesta vida, minha FAMÍLIA! Dedico este trabalho àqueles que sempre me apoiaram...

À minha mãe **Elza Manrique**, mulher guerreira, generosa, um exemplo de ser humano! Sinto muita saudade... e descontro com muitas ligações, que são bastante proveitosas! Tenho o privilégio de ser sua filha, muito obrigada por TUDO!

Ao meu pai, **Jayme Décio Cursino**, à **Aparecida Rocha** e meu irmão **Lucas Rocha Cursino**, por todo carinho dedicado a mim, todas as conversas, sinto muita falta por estar longe!

Ao meu irmão **Leandro Manrique Cursino**, minha cunhada **Luciana Chiari Cursino** e meu sobrinho **Eduardo Chiari Cursino**! Vocês moram em meu coração e me proporcionam muita alegria em cada reencontro, cada ligação. Sou uma pessoa ainda mais feliz depois do Eduardo entrar em nossas vidas...esse amor imenso de ser tia me fortaleceu ainda mais!

Ao amor da minha vida, meu marido **Wagner**, muito obrigada por todos esses 13 anos de companheirismo, dedicação, paciência, apoio, alegrias, superações...enfim, só tenho que agradecer por escolher crescer junto, ao meu lado!

AMO MUITO todos vocês!!!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, prof. **Cristina Antoniali Silva**, muito obrigada por ter contribuído para a minha formação durante todos esses anos de mestrado e doutorado. Nessa fase, você me proporcionou conhecer outro laboratório, em outra Universidade, uma nova realidade, onde aprendi muito e conheci excelestes profissionais.

Ao meu co-orientador prof. **Adalberto Luiz Rosa**, muito obrigada por me aceitar como co-orientada. Posso dizer, na verdade, que tive mais um orientador, pois imensa foi sua contribuição! Agradeço de coração sua paciência em transmitir sua sabedoria e objetividade, cada conversa foi extremamente proveitosa e esclarecedora.

À Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Unesp, nas pessoas da Diretora Profa. Dra. **Ana Maria Pires Soubhia** e Vice-Diretor Prof. Dr. **Wilson Roberto Poi**, pela oportunidade de realizar este curso e esta pesquisa.

À **CAPES** (Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela Bolsa de Doutorado a mim concedida.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria**, na pessoa de seu Coordenador Prof. Adj **Alberto Carlos Botazzo Delbem**, que tornou possível o

desenvolvimento dessa pesquisa pelo apoio financeiro concedido e de todo corpo docente pela contribuição na minha formação.

À **Néia e Wagner**, minha sogra e sogro, que me acolheram como uma filha. Muito obrigada por todo carinho!

À todas amigas de república, **Amanda, Aline Goulart, Aline Gozzi, Marina, Keila, Talita**. Vou levá-las em meu coração...aprendi muito com cada uma e minha jornada foi muito mais divertida com vocês!

Aos que me acolheram em seus apartamentos em Araçatuba, meus primos **Bruno e Jaqueline**, às queridas **Andréa Garcia, Carol Santinoni e Renata**, muito obrigada pelo carinho, meus dias foram muito melhores com vocês.

Às minhas companheiras de pós-graduação: **Dani Câmara, Dani Oliveira, Jackeline, Marcelle, Maria Daniela e Michele**. Obrigada pela convivência, mesmo que não tão frequente, mas muito agradável! Sucesso!

Ao Prof. **Márcio Mateus Beloti**, muito obrigada pela sugestão de trabalhar com as células do fêmur, o que era para ser algo a mais virou minha salvação. Agradeço também pelas orientações, pelas conversas no corredor e por ter aceitado de imediato o convite para fazer parte da banca desse trabalho.

À Prof. **Lusiane Maria Bendhack**, por estar sempre disponível para me orientar quanto ao uso de fármacos nas culturas celulares e disponibilizando seu laboratório para a medida da pressão arterial dos animais.

Aos meus companheiros de laboratório por todo grande suporte, palavra amiga, apoio e companhia, **Fernanda, Gabi Alonso, Gabi Cerminaro, Gileade, Helena, Kato, Larissa Castro, Larissa Sverzut, Lucas, Manu, Maily, Maiara, Paty Adachi, Renan.**

Aos funcionários e amigos **Fabíola, Milla e Roger** por toda ajuda na realização desse trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos amigos que aqui fiz e vou levar em meu coração, **Rodrigo, Thiago e Christopher.** Mal tenho palavras para agradecer a imensa participação de vocês nessa fase, muito obrigada por toda ajuda na realização desse trabalho e principalmente pela amizade! Vamos mantendo contato!

Aos queridos amigos **Murilo e Simone**, que mesmo de longe mantínhamos contato e cada reencontro era uma alegria! Muito obrigada por todo apoio, especialmente com a obtenção dos ratos SHR. Vocês são pessoas maravilhosas, obrigada por tudo!

À minha querida amiga, madrinha de casamento e agora membro da banca avaliadora deste trabalho, **Natália Pola**, pela amizade mesmo à distância! Uma amizade verdadeira, sempre levamos para a vida toda!! Fico extremamente feliz em ver seu crescimento...Você sabe como é importante em minha vida!

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“ De tudo ficaram três coisas:

A certeza de que estamos sempre começando...

A certeza de que precisamos continuar...

A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar...

Portanto devemos fazer:

Da interrupção um caminho novo...

Da queda, um passo de dança...

Do medo, uma escada...

Do sonho, uma ponte...

Da procura, um encontro...

E assim terá valido a pena existir! ”

Fernando Sabino

Cursino NM. **Caracterização de osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)** [tese]. Araçatuba: Unesp – Universidade Estadual Paulista; 2014.

RESUMO

A hipertensão arterial representa um fator de risco sistêmico para várias doenças incluindo redução da massa óssea por aumentar a reabsorção e diminuir a formação óssea. Considerando que a formação óssea é resultante da atividade de osteoblastos, o objetivo deste estudo foi avaliar as características fenotípicas e genotípicas de células osteoblásticas diferenciadas de CTMs (células-tronco mesenquimais) de SHR. A partir de medulas ósseas de fêmures de SHR, CTMs foram obtidas por adesão ao plástico de cultura de células e diferenciadas em osteoblastos por cultura em meio osteogênico até que atingissem a subconfluência. Em seguida, as células foram subcultivadas na densidade de 2×10^4 células/poço em placas de 24 poços. Células obtidas de Wistar foram utilizadas como controle. Para a avaliação das respostas celulares foram realizados ensaios de proliferação celular, atividade de fosfatase alcalina (ALP), formação de matriz mineralizada e expressão gênica dos marcadores osteoblástico: 1) *runt-related transcription fator 2* (RUNX2), 2) Osterix (OSX), 3) Fosfatase alcalina (ALP), 4) Proteína óssea morfogenética 2 (BMP2); 5) Sialoproteína óssea (BSP), 6) Osteocalcina (OC), 7) Osteopontina (OPN), 8) e Colágeno (COL), além dos receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos. Os dados foram comparados pelo teste ANOVA seguido do teste de Tukey, e o nível de significância adotado foi de 5% ($p \leq 0,05$). Células osteoblásticas de SHR apresentaram alterações no fenótipo osteoblástico, exibindo, em todos os períodos avaliados, menor proliferação celular, atividade de ALP e formação de matriz

mineralizada. A expressão gênica de todos os marcadores ósseos também foi menor em SHR quando comparado com Wistar na maioria dos períodos avaliados. A expressão gênica do receptor $\beta 2$ adrenérgico foi maior em SHR em todos os períodos avaliados e não foi detectada a expressão de receptor $\beta 1$ tanto em SHR como em Wistar. Com base nesses resultados, podemos concluir que os osteoblastos diferenciados das CTMs de SHR apresentam redução ou atraso nesse processo de diferenciação. Sugerimos ainda que a elevada expressão dos receptores $\beta 2$ adrenérgicos possa ter atuado nesse prejuízo da diferenciação osteoblástica.

Palavras-chave: Células mesenquimais estromais; osteoblastos; técnicas de cultura de células; ratos endogâmicos SHR; expressão gênica, receptores adrenérgicos.

Cursino NM. **Characterization of osteoblasts differentiated from mesenchymal stem cells from spontaneously hypertensive rats (SHR) bone marrow** [thesis].

Araçatuba: UNESP - Univ. Estadual Paulista, 2014.

ABSTRACT

Hypertension is a systemic risk factor for several diseases including reduction of bone mass by increasing bone resorption and reducing bone formation. Considering that bone formation results from osteoblast activity, the aim of this study was to assess the phenotypic and genotypic characteristics of osteoblastic cells differentiated from MSCs of SHR. Bone marrow was harvested from SHR femurs and MSCs were selected by adherence to plastic cell culture and differentiated into osteoblasts by culturing in osteogenic medium until subconfluence. Then, the cells were subcultured at a density of 2×10^4 cells / well in 24 well plates. Cells from Wistar rats were used as control. Cells responses were evaluated by assaying proliferation, alkaline phosphatase activity (ALP), mineralized matrix formation and the gene expression of the osteoblastic markers: runt-related 1) runt-related transcription factor 2 (RUNX2), 2) Osterix (OSX) 3) Alkaline phosphatase (ALP), 4) Bone morphogenetic protein 2 (BMP2); 5) Bone sialoprotein (BSP), 6) Osteocalcin (OC), 7) Osteopontin (OPN), 8) and Collagen type 1 alpha (COL), in addition to the gene expression of $\beta 1$ and $\beta 2$ adrenergic receptors. Data were compared by ANOVA followed by Tukey test and the level of significance was 5% ($p \leq 0.05$). SHR derived osteoblasts showed changes in osteoblastic phenotype, exhibiting in all periods reduced cell proliferation, ALP activity and mineralized matrix formation. The gene expression of all bone markers was also lower in SHR compared with Wistar in many periods. The gene expression of the $\beta 2$ adrenergic receptor was greater in SHR in all periods and it was

not detected the expression of β 1receptor either in SHR or Wistar. Based on these results, we conclude that osteoblasts differentiated from SHR MSCs exhibit reduced or delayed in the differentiation process. We also suggest that the overexpression of β 2 adrenergic receptors may have acted in prejudice of osteoblastic differentiation.

Keywords: mesenchymal stem cells; osteoblasts; cell culture; SHR; gene expression, adrenergic receptors.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 HIPERTENSÃO.....	15
1.2 CAUSAS DA HIPERTENSÃO.....	16
1.3 CONSEQUÊNCIAS DA HIPERTENSÃO.....	16
1.3.1 <i>Hipertensão e tecido ósseo</i>	17
3.4 AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS CELULARES.....	25
3.4.1 <i>Proliferação celular</i>	25
3.4.2 <i>Atividade de ALP</i>	25
3.4.3 <i>Formação de matriz mineralizada</i>	26
3.4.4 <i>Expressão gênica</i>	27
3.4.5 <i>Análise estatística</i>	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	31
4.2 ATIVIDADE DE ALP.....	31
4.3 FORMAÇÃO DE MATRIZ MINERALIZADA.....	32
4.4 EXPRESSÃO GÊNICA.....	33
5 DISCUSSÃO.....	36
6 CONCLUSÃO.....	39
7 REFERÊNCIAS.....	40

8 ANEXO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hipertensão

A Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) é uma condição clínica multifatorial caracterizada por níveis elevados e sustentados de pressão arterial (*apud* Diretrizes Brasileiras da Hipertensão IV, 2010). A pressão arterial ótima deve ser inferior a 120 mmHg de pressão sistólica e 80 mmHg de pressão diastólica. Valores de pressão sanguínea sistólica entre 120-139 mmHg e/ou diastólica 80-89 mmHg são considerados como pré-hipertensão e 140 mmHg sistólica e/ou diastólica 90 mmHg ou mais alto, como pressão arterial elevada ou hipertensão. A hipertensão aumenta diretamente o risco de ataque cardíaco, angina, derrame, insuficiência renal, doença arterial periférica (DAP) e morte.

Atualmente, a HAS é considerada um grave problema de saúde pública, atingindo entre 14% a 40% da população nos países do continente americano, afetando cerca de 1 bilhão de pessoas em todo o mundo e contribuindo para cerca de 9,4 milhões de mortes por doenças cardiovasculares e invalidez, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS/ONU, 2013). No entanto, apesar de um em cada cinco americanos serem hipertensos, 31,6% dessas pessoas são assintomáticas e desconhecem sua condição. No Brasil, estudos populacionais realizados nos últimos 20 anos mostram uma prevalência de HAS acima de 30% na população, e mais elevada em homens até os 50 anos e maior em mulheres a partir dos 50 anos (*apud* Diretrizes Brasileiras da Hipertensão IV).

1.2 Causas da Hipertensão

Diversas são as causas envolvidas na fisiopatologia da hipertensão. Dez por cento dos pacientes apresentam hipertensão secundária, resultante de doenças do parênquima renal, doenças vasculares e de lesões de glândulas adrenais. Outros noventa por cento dos pacientes, entretanto, são ainda considerados hipertensos primários ou essenciais. A patogênese da hipertensão essencial é, em grande parte, indefinida, multifatorial e altamente complexa. Há indicações de que a hipertensão essencial do adulto teria sua origem na infância. Abaixo dos dez anos de idade, a hipertensão arterial geralmente (90% dos casos) é secundária, sendo na maioria das vezes devido à doença renal. A hipertensão arterial essencial predomina acima dos dez anos de idade, com níveis pressóricos não muito elevados, no percentil 95 ou discretamente acima dele. A prevalência da hipertensão arterial na criança/adolescente situa-se entre 0,8% a 9%, média de 5%, com significativa elevação quando associada à obesidade (SANTOS et al., 2003).

1.3 Consequências da Hipertensão

A hipertensão, quando não tratada, pode levar ao desenvolvimento de certas patologias, tais como: derrames cerebrais, insuficiência renal ou paralisação dos rins e alterações na visão, que podem levar à cegueira, insuficiência cardíaca e angina (dor no peito), doenças do coração, como infarto. As doenças cardiovasculares têm sido apontadas como as principais causas de morte no mundo, e no Brasil, tem sido consideradas como as responsáveis por 33% dos óbitos com causas conhecidas (PASSOS et al., 2006). No entanto, alterações em outros tecidos, como no tecido ósseo, também tem sido associadas à hipertensão.

1.3.1 Hipertensão e tecido ósseo

Diferentes estudos clínicos e experimentais mostraram que a hipertensão prejudica a qualidade e densidade óssea, sugerindo seu efeito direto sobre o metabolismo ósseo. Entre os estudos experimentais, muitos mostraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) apresentam alterações importantes de metabolismo ósseo, como aumento no *turnover* ósseo e redução na massa óssea cortical e trabecular. O rato espontaneamente hipertenso (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHR), geneticamente selecionado, é um dos modelos animais de hipertensão mais estudados. Estes animais nascem normotensos (~110-112 mmHg) e a partir da 4ª semana de nascimento desenvolvem espontaneamente ou sem uma causa pré-determinante, um aumento de pressão arterial sistólica, acima de 150mmHg, que se mantém por toda a vida do animal adulto.

O aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático em SHR pode estar diretamente relacionado às alterações observadas no metabolismo ósseo destes animais, uma vez que o *turnover* ou remodelação óssea seria controlado pelo sistema nervoso central, com participação do sistema nervoso autônomo simpático (SNS) como componente periférico e de receptores adrenérgicos, β_1 e β_2 , identificados em osteoblastos.

Uma explicação bem simplificada de mecanismo proposto sugere que a leptina estimula o hipotálamo a liberar neurotransmissor noradrenalina. O acoplamento de noradrenalina em receptores de membrana β_2 -adrenérgicos, ativa a proteína quinase A, a qual, no núcleo do osteoblasto, fosforila o gene regulador ATF4 (*Activating transcription factor 4*), produzindo RANK-L (*receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*), estimulando a formação de osteoclastos.



Figura retirada de

Substanciais evidências têm demonstrado que a sinalização simpática regula a remodelação óssea em parte por meio de receptores β -adrenérgicos . O mecanismo proposto explicaria o efeito de drogas antagonistas de receptores β -adrenérgicos sobre o metabolismo ósseo. Em SHR, tratamentos crônicos com baixas doses de propranolol aumentaram a massa óssea da vértebra lombar e da

tíbia . Em mulheres na menopausa, o uso de antagonistas β 1-adrenérgicos foi associado a menores índices de fraturas decorrentes de osteoporose .

Estudos realizados previamente em nosso laboratório demonstraram que densidade mineral óssea está reduzida nos diferentes dias do processo de reparo alveolar após a extração de dentes incisivos de SHR quando comparado a ratos Wistar, sugerindo um atraso no reparo alveolar associado a hipertensão . As alterações densitométricas, histomorfométricas e imunohistoquímicas (expressão diferencial das proteínas OPG, RANKL, RANK e MMP-9) associadas ao atraso no reparo alveolar em SHR foram revertidas pelo tratamento com o antagonista β -adrenérgico, atenolol (CURSINO, 2010). A alta prevalência de células que expressam TRAP e o aumento na razão de expressão entre RANKL/OPG observados no osso de suporte dos dentes de SHR associados a maior produção de mediadores inflamatórios no tecido gengival de SHR , promovem progressiva perda óssea alveolar associada a doença periodontal, mesmo após a remoção do estímulo . Juntos estes resultados sugerem que a hipertensão altera a expressão de proteínas e consequentemente a atividade/função de células envolvidas do metabolismo ósseo.

1.4 Osteoblastos

Os osteoblastos são células ósseas especializadas e possuem vários papéis importantes na remodelação óssea: expressão de fatores osteoclastogênicos, produção de proteínas da matriz óssea e mineralização óssea . As células osteoblásticas compreendem uma população celular diversa que inclui a linhagem de osteoblastos imaturos, em diferenciação e osteoblastos maduros produtores de matriz. *In vitro*, a heterogeneidade do fenótipo osteoblástico está associada à

diferenciação celular . O estágio de diferenciação do osteoblasto também influencia a contribuição funcional dessas células na remodelação óssea *in vivo*.

Os osteoblastos se desenvolvem de células tronco mesenquimais (CTMs) que são células-tronco não hematopoiéticas multipotentes e sob condições ambientais apropriadas, são capazes de se diferenciarem em osteoblastos maduros . As CTMs são capazes de formar colônias , se auto-renovarem e diferenciarem em linhagens do tecido conjuntivo, como osso, cartilagem, tendão, músculo e tecido adiposo .

Vários fatores de transcrição e moléculas sinalizadoras exercem papel fundamental nos mecanismos regulatórios da osteogênese, dentre eles podemos citar: 1) runt-related transcription fator 2 (RUNX2), fator de transcrição indispensável na diferenciação de CTMs em linhagem osteoblástica ; 2) Osterix (OSX), fator de transcrição essencial para diferenciação terminal de osteoblastos e formação óssea ; 3) Fosfatase alcalina (ALP), enzima importante para a disponibilização de fosfato para o processo de mineralização da matriz extracelular ; 4) Proteína óssea morfogenética 2 (BMP2) importante na diferenciação osteoblástica ; 5) Sialoproteína óssea (BSP), proteína não colágena da matriz que participa da nucleação dos primeiros cristais de apatita ; 6) Osteocalcina (OC), proteína não colágena da matriz, participa da regulação da mineralização da matriz ; 7) Osteopontina (OPN), proteína não colágena da matriz relacionada aos processos de adesão celular e controle do crescimento dos cristais de apatita durante o processo de mineralização ; 8) Colágeno (COL), constitui de 90 a 95% da matriz extracelular produzida, conferindo flexibilidade ao osso .

Apesar das alterações no tecido ósseo de ratos SHR descritas na literatura e citadas acima, não encontramos estudos que investigassem possíveis alterações no fenótipo, bem como na expressão gênica de marcadores ósseos na formação e

mineralização de matriz óssea de osteoblastos de SHR. Assim, nossa hipótese é que osteoblastos diferenciados de células-tronco mesenquimais da medula óssea de SHR apresentam alterações de genótipo e fenótipo que estão diretamente associadas às alterações de metabolismo/*turn over* ósseo observadas anteriormente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral: caracterizar o fenótipo e genótipo osteoblásticos de células diferenciadas de CTMs de fêmur de SHR.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o fenótipo osteoblástico de células de SHR por meio dos ensaios de proliferação celular, atividade de ALP, formação de matriz mineralizada extracelular.
- Avaliar o genótipo osteoblástico de SHR por meio da expressão gênica de marcadores osteoblásticos.
- Avaliar a expressão de receptores adrenérgicos $\beta 1$ e $\beta 2$ em osteoblastos de SHR.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os protocolos experimentais conduzidos no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA (protocolo nº 01560-2011, Certificado no Anexo A) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba,

UNESP, estando de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal- CONCEA.

O presente trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia, Campus de Araçatuba, Unesp, de acordo com o protocolo nº 01560-2011. Certificado em anexo (Anexo A).

3.1 Animais

Neste estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR), pesando entre 180 e 230g, com idade entre 2 e 3 meses, de uma linhagem mantida pelo grupo de pesquisa da Profa Dra Cristina Antoniali Silva no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba (FOA) – UNESP. Como controle experimental, foram utilizados ratos normotensos da linhagem Wistar (*ratus norvegicus albinus*) com idade e peso semelhantes aos de animais SHR. Os ratos Wistar foram fornecidos pelo Biotério Central da FOA - UNESP. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22-24° C) com ciclo de luz (12h/luz e 12h/escuro) no Biotério do Departamento de Ciências Básicas e foram alimentados com água potável e ração *ad libitum*.

3.2 Medida de pressão arterial

O registro da pressão arterial sistólica (PAS) dos animais foi realizado pelo método indireto de pletismografia de cauda, com a utilização de pletismógrafo adaptado para medidas em ratos (PowerLab, AD Instruments, Melbourne, Australia). Somente SHR com pressão arterial sistólica maior ou igual a 150 mmHg e ratos

normotensos Wistar com pressão arterial sistólica em torno de 112 mmHg foram utilizados nos experimentos.

3.3 Obtenção e cultura de células-tronco mesenquimais

Para obtenção de células, as CTMs foram isoladas de medula óssea de fêmures de ratos Wistar e SHR, como descrito por . Os ratos foram eutanasiados em câmara saturada com halotano e os fêmures retirados e transportados em meio de cultura contendo meio essencial mínimo modificação alfa (α -MEM, Gibco, EUA) suplementado com 500 μ g/mL de gentamicina (Gibco, EUA) e 3 μ g/mL de fungisona (Gibco, EUA).

No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à antissepsia e à remoção de tecidos moles remanescentes. As epífises foram removidas e a medula óssea extraída por meio de irrigação com meio de cultura suplementado contendo α -MEM, 10% de soro fetal bovino (Gibco, EUA), 50 μ g/mL de gentamicina, 0,3 μ g/mL de fungisona, 5 μ g/mL de ácido ascórbico (Gibco, EUA), 7 mM de β -glicerofosfato (Sigma, EUA) e 10^{-7} M de dexametasona (Sigma, EUA). Esse meio é chamado de osteogênico por induzir a diferenciação osteoblástica e, assim, permitir a obtenção de osteoblastos, conforme descrito por . As culturas foram mantidas em garrafas de 75cm² a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. As trocas do meio de cultura foram realizadas 3 vezes por semana.

Quando as culturas atingiram a subconfluência, o meio de cultura foi removido e adicionada solução de tripsina à 0,25% (Gibco, EUA), 1,3 mg/mL de collagenase do tipo II (Gibco, EUA) e EDTA à 1 mM (Gibco, EUA) para obtenção de suspensão de células, que foram subcultivadas em meio osteogênico em placas de 24 poços na concentração de 2×10^4 células/poço. As respostas celulares avaliadas

foram: proliferação celular, atividade de ALP, formação de matriz mineralizada e expressão gênica.

3.4 Avaliação das respostas celulares

3.4.1 Proliferação celular

A proliferação celular foi determinada aos 3, 7 e 10 dias pelo ensaio colorimétrico MTT (*Mitochondrial Tetrazolium Test*). O MTT é um sal que é reduzido em cristais de formazan (de cor púrpura) por proteinases mitocondriais, ativas apenas em células viáveis. Para isto, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, EUA) aquecida a 37°C, preenchidos com 1 mL de meio de cultura contendo MTT à 10% (5 mg/mL) e incubados a 37°C por 4 h. A seguir, os sobrenadantes foram aspirados e os cristais solubilizados utilizando 1 mL de uma solução de isopropanol ácido (HCl 0,04 N em isopropanol). As placas foram agitadas por 5 min e uma alíquota de 150 µL de cada poço foi transferida para uma placa de 96 poços. A absorbância foi avaliada por meio de um espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek Instruments Inc., EUA) e a proliferação celular foi expressa como absorbância, utilizando o comprimento de onda de 570 nm e comparada entre as culturas obtidas de CTMs de ratos Wistar e SHR.

3.4.2 Atividade de ALP

A atividade de ALP foi avaliada aos 7, 10 e 14 dias em lisados de células através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest, Diagnostica SA, Brasil). Para

obtenção dos lisados de células, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, EUA) aquecida a 37°C, preenchidos com 1 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma, EUA) e ao final de 30 min, a solução contida em cada poço foi homogeneizada e 50 µL dessa solução foram transferidos para os tubos de ensaio. Foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 50 µL de substrato (timolftaleína monofosfato) e 500 µL de tampão. No tubo padrão foram acrescentados 50 µL da solução padrão. Todos os tubos foram incubados a 37°C por 10 min. Após esse período, foram adicionados em cada tubo (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor. Alíquotas de 150 µL da solução de cada tubo foram transferidas para placas de 96 poços (Corning, EUA) e a densidade óptica foi lida em comprimento de onda de 590 nm no espectrofotômetro µQuant (Bio-Tek). A atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão, normalizada pela quantidade de proteína total, obtida de acordo com o método descrito por e expressa em µmol de timolftaleína/h/mg de proteína.

3.4.3 Formação de matriz mineralizada

Aos 17 e 21 dias, o meio de cultura foi removido e os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS, Gibco, EUA) aquecida a 37°C e as culturas foram fixadas com 2 mL de formalina 10% por 2 dias, desidratadas em álcool etílico na sequência de 30%, 50%, 70% e 100%, sendo 1 hora de incubação para cada concentração. Em seguida, foram coradas com vermelho de alizarina a 2%, pH 4,2, à temperatura ambiente por 15 min e novamente lavadas com PBS e água bidestilada. Para análise qualitativa, imagens macroscópicas das culturas aos 17 e 21 dias foram obtidas digitalmente com câmera de alta resolução (Canon EOS

Digital Rebel, 6.3 megapixels, com lente macro EF100 f/2.8, EUA). Para a análise quantitativa, foi realizada a extração do vermelho de alizarina: foram acrescentados em cada poço 280 µL de ácido acético a 10% e as placas, deixadas sob agitação suave por 30 min. A camada de células foi raspada e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida, os tubos foram aquecidos a 85°C por 10 min e transferidos para o gelo por 5 min. Na sequência, os tubos foram centrifugados a 13000 g por 20 min e 100 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços (Corning, EUA) contendo 40 µL de hidróxido de amônia a 10%. Por fim, a absorbância foi medida em espectrofotômetro µQuant (Bio-tek) utilizando comprimento de onda de 405 nm. A formação de matriz mineralizada foi expressa como absorbância.

3.4.4 Expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada aos 7, 10 e 14 dias através da reação em cadeia da polimerase em tempo real (Real-time PCR). Para tanto, o meio de cultura foi removido dos poços e foi adicionado o reagente Trizol LS (Invitrogen, EUA) à temperatura ambiente, por 5 min, sob agitação por pipetagem. A extração do RNA total foi realizada através do kit SV Total RNA Isolation System (Promega, EUA), de acordo com especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260, 280, 230 e 320 nm) em espectrofotômetro Nanovue plus (GE Healthcare, EUA) e sua integridade avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante a 1,5% (m/v). Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com dietilpirocarbonato (DEPC, Sigma, EUA). Para o preparo da água, foi adicionado 1 mL de DEPC em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura

incubada à temperatura ambiente por 24 h e autoclavada por 30 min. O gel foi preparado dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco, EUA) em 144 mL de água DEPC. Em seguida, a mistura foi aquecida a 65°C e, então, foram adicionados 36 mL de formaldeído a 12,3 M (Merck, Alemanha), 7 µL de GelRed (Biotium Inc., EUA) e 20 mL de tampão de corrida, constituído de 50 mM de acetato de sódio (Merck, Alemanha), 5 mM de EDTA (Merck, Alemanha) e 100 mM de ácido 3-[N-morfolino]propanosulfônico (MOPS, Sigma, EUA). A mistura foi despejada em fôrmas adequadas para moldagem do gel. Para o preparo das amostras, foram adicionados 3 µg de RNA total, 2 µL de tampão de corrida, 4 µL de formaldeído a 12,3 M e 10 µL de formamida (Merck, Alemanha). Esta mistura foi aquecida a 85°C por 10 min e, posteriormente, submetida a resfriamento a 4°C por 5 min. Em seguida, foi adicionado o tampão de amostra, composto por 50% de glicerol (v/v), 0,25% de azul de bromofenol (m/v), 0,25% de xileno cianol (m/v) e 10 nM de EDTA em água DEPC. A eletroforese foi conduzida a 60 V durante 1 a 3 h, utilizando-se tampão de corrida. Após este período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta a 300 nm. A integridade do RNA foi verificada pela visualização de duas subunidades (18S e 28S) do RNA ribossômico presentes em organismos eucariotos. Em seguida, foi confeccionada a fita de cDNA a partir de 1 µg de RNA total. Este procedimento foi feito no termociclador Mastercycle Gradient (Eppendorf, Alemanha) por meio de reação com a enzima transcriptase reversa, utilizando-se o kit High-capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA).

Para realização da PCR em tempo real foi utilizado o sistema SYBR Green (Applied Biosystems), no aparelho CFX96 (Bio-Rad, CA, EUA). Foi preparado um mix composto por 7µL do reagente *SYBR Green Master Mix* que contém o fluoróforo SYBR Green, a enzima polimerase AmpliTaq Gold, dNTPs e o fluoróforo ROX,

utilizado como referência passiva para normalização dos níveis de fluorescência, além dos demais componentes de tampão e 0,5 µL da solução contendo cada *primer* (*forward* e *reverse*) com as concentrações adequadas, somando 8 µL. Foi preparado 2,5 µL da solução de cDNA com 2,5 µL de água deionizada autoclavada, totalizando 5 µL. Em cada poço da placa de 96 poços (Bio Rad) foi adicionado 8 µL do mix e 5 µL da solução de c DNA, em triplicata, para cada *primer* selecionado. Uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada par das sequências dos *primers* utilizados. As reações de amplificação consistem em 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, quarenta ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 min a 60°C (desnaturação e extensão). Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cycle threshold*, ou ciclo limiar), sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos em que a amplificação das amostras atinge um limiar (determinado entre o nível de fluorescência dos controles negativos e a fase de amplificação exponencial das amostras), que permite a análise quantitativa da expressão do fator avaliado. Como controle endógeno, foi avaliada a expressão do gene para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A expressão do controle endógeno foi utilizada para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo. Os primers foram desenhados utilizando o programa Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) e apresentaram eficiência entre 95-105%.

A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método comparativo de 2^{-ddCt} . Utilizando esse método, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica, tomando-se como controle os 7 dias do grupo Wistar. O desenvolvimento do fenótipo osteogênico das células foi avaliado pela expressão gênica de: 1) RUNX2; 2) OSX; 3) ALP; 4) BMP2 ; 5) BSP; 6) OC; 7) OPN; 8) COL, além dos receptores adrenérgicos $\beta 1$ e $\beta 2$ (Tabela

1).

Tabela 1. Sequência dos *primers* para PCR em tempo real

Gene	Sense Antisense	pb (pares de bases)
GADPH	TGTGAACGGATTTGGCCGTA ATGAAGGGGTCGTTGATGGC	93
RUNX2	CACAAACAACCACAGAACCAC TTGCTGTCCTCCTGGAGAAA	56
OSX	CAAGAGTCGGATTCTAGGATTGGAT CAAACCTTGCTGCAGGCTGCT	208
ALP	CCAACCTCATTTGTGCCAGAG CAGGGCATTTCCTCAAGGTCTC	80
BSP	CTACTTTTATCCTCCTCTGAAACGGTT GCTAGCGGTTACCCCTGAGA	202
BMP2	ATGGACGTCCCCCCTAGTGCTT CGGCCACCATGGTCGACCTTTA	65
COL	CCAACGAGATCGAGCTCAGG GACTGTCTTGCCCCAAGTTCC	101
OPN	CGTTTTGACTCCAATCGCCC TGTGGCATCGGGATACTGTT	124
OC	GCAGACACCATGAGGACCCT CCGGAGTCTATTACACCTTACTG	153
Receptor β 1- adrenérgic o	TCGTCACCAACCGGGCCTACG CGCGGAACACCCGGAGGTACA	96
Receptor β 2- adrenérgico	AGCGTCTGGGCACTGAAAGCC GGGTGCCAGCAAGAAGTCGCT	83

3.4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa Sigma Stat 3.5. Os dados obtidos foram agrupados e tabulados para realizar a estatística descritiva (cálculos de média e desvio-padrão) para serem representados na forma de gráficos. Foram realizados três experimentos distintos utilizando em cada um deles um pool de células da medula óssea de SHR e Wistar. As comparações dos dados de proliferação celular e atividade de ALP foram feitas agrupando os resultados dos três experimentos (n=15). Para comparação dos resultados da formação de matriz

mineralizada (n=5) e expressão gênica (n=3) foram utilizados os dados de um único experimento representativo dos três ensaios. Os dados foram comparados por Análise de Variância (ANOVA) com dois fatores de variação, linhagem de ratos e tempo, e a interação linhagem x tempo, seguido pelo pós-teste de Tukey. O nível de significância foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Proliferação celular

Em ambos os grupos avaliados, a proliferação celular foi crescente ao longo dos tempos de cultura, atingindo o valor máximo aos 10 dias (Wistar: $p=0,001$ para todos os períodos; SHR: 3 *versus* 7 dias $p=0,02$, 3 *versus* 10 dias $p=0,001$ e 7 *versus* 10 dias $p=0,025$). A comparação entre os grupos mostrou que a proliferação celular no grupo SHR foi muito menor em todos os períodos comparada com Wistar ($p=0,001$ para todos os períodos). Os dados foram apresentados na Figura 1A.

4.2 Atividade de ALP

O perfil da atividade de ALP foi diferente entre os grupos. Em Wistar, essa atividade aumentou de 7 para 10 dias e diminuiu de 10 para 14 dias, havendo diferença entre todos os períodos ($p=0,001$ para todos os períodos). Em SHR, a atividade de ALP aumentou ao longo dos tempos de cultura sem diferença estatisticamente significativa entre 7 e 10 dias ($p=0,083$), mas com pico de atividade aos 14 dias comparado com 7 e 10 dias ($p=0,001$). A comparação entre SHR e Wistar mostrou que em culturas derivadas de SHR a atividade de ALP foi menor nos três períodos avaliados ($p=0,001$ para todos os períodos). Os dados estão

apresentados na Figura 1B.

4.3 Formação de matriz mineralizada

Ao final de 17 e 21 dias, a formação de matriz mineralizada foi detectada pelo corante vermelho de alizarina em todas as culturas. Independentemente dos grupos, as marcações eram mais acentuadas aos 21 do que aos 17 dias. Qualitativamente, SHR apresentava marcações menos acentuadas em comparação com Wistar. As quantificações do vermelho de alizarina comprovaram que havia maior formação de matriz mineralizada nas culturas derivadas de Wistar comparadas às SHR, tanto aos 17 como aos 21 dias ($p=0,001$ para os dois períodos). Os dados estão apresentados na Figura 1C.

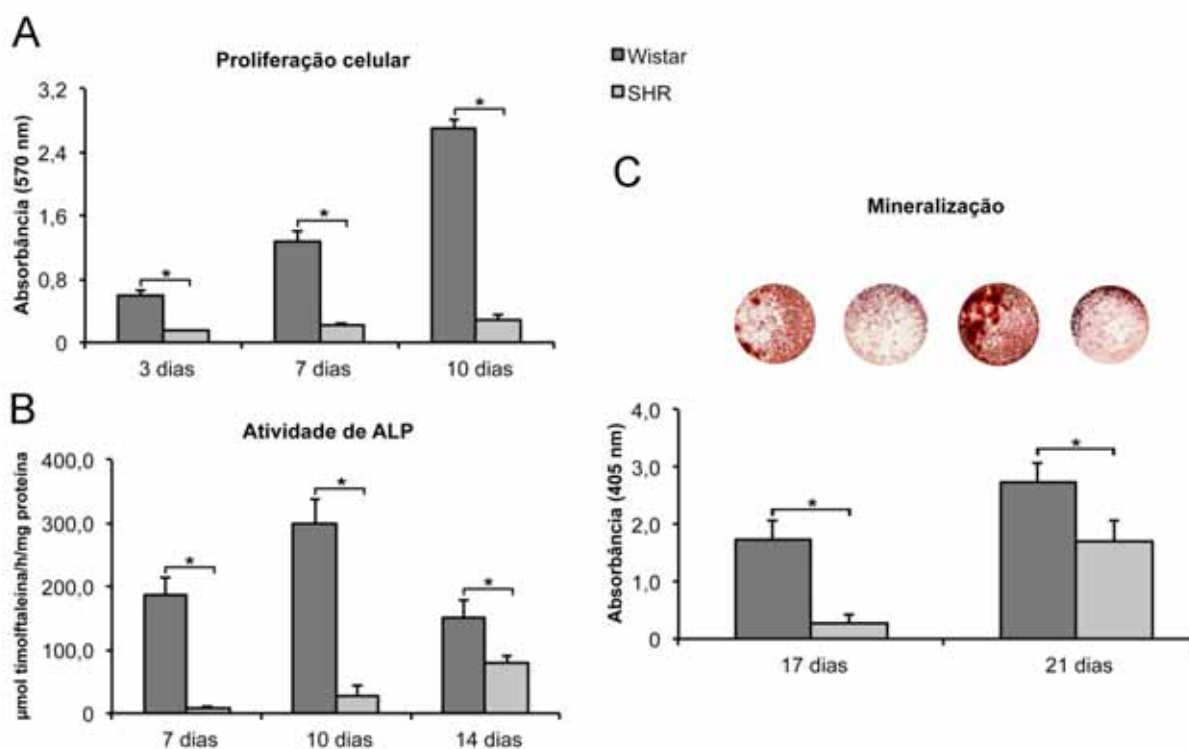


FIGURA 1. A) Proliferação de células osteoblásticas derivadas de ratos Wistar e SHR.

Wistar: 3<7<10 dias, $p=0,001$ para todos os períodos; SHR: 3<7<10 dias (3 *versus* 7 dias

$p=0,02$, 3 *versus* 10 dias $p=0,001$ e 7 *versus* 10 dias $p=0,025$). **B)** Atividade de ALP das células osteoblásticas derivadas de ratos Wistar e SHR. Wistar: $7<10>14$ dias, $p=0,001$ para todos os períodos. SHR: $7=10<14$ dias (7 *versus* 10 dias $p=0,083$, outros períodos $p=0,001$). **C)** Formação de matriz mineralizada por células osteoblásticas derivadas de ratos Wistar e SHR. Wistar e SHR: $17<21$ dias, $p=0,01$. Os dados são representados como médias $\pm$ desvio padrão (A e B $n=15$, C $n=5$). * indica diferença entre Wistar e SHR dentro de cada período ($p=0,001$).

4.4 Expressão gênica

A expressão gênica para RUNX2, OSX, ALP, BSP e COL, no geral, reduziu de 7 para 14 dias em Wistar ($p=0,001$), como pode ser observado na Figura 2. Esse padrão foi mantido por SHR em todos os genes ($p=0,001$), porém os valores observados foram reduzidos em todos os genes e na maioria dos períodos analisados quando comparado com Wistar, exceto para RUNX2 e ALP aos 10 dias de cultura. A expressão gênica para OC não mostrou diferença estatística entre os grupos nos períodos inicial e final, sendo bastante reduzida sua expressão aos 10 dias em SHR ($p=0,001$). A expressão para BMP2 também mostrou menores valores de expressão gênica para SHR em todos os períodos (7 dias: $p=0,003$, 10 e 14 dias: $p=0,001$). A OPN demonstrou expressão também reduzida para SHR em todos os períodos ($p=0,001$). Os dados estão apresentados na Figura 2.

O receptor adrenérgico $\beta 1$ foi considerado como não expresso, pois sua amplificação se deu após o Ct 30. Já o receptor adrenérgico $\beta 2$, apresentou expressão aumentada para SHR em todos os períodos avaliados. Os dados estão apresentados na Figura 3.

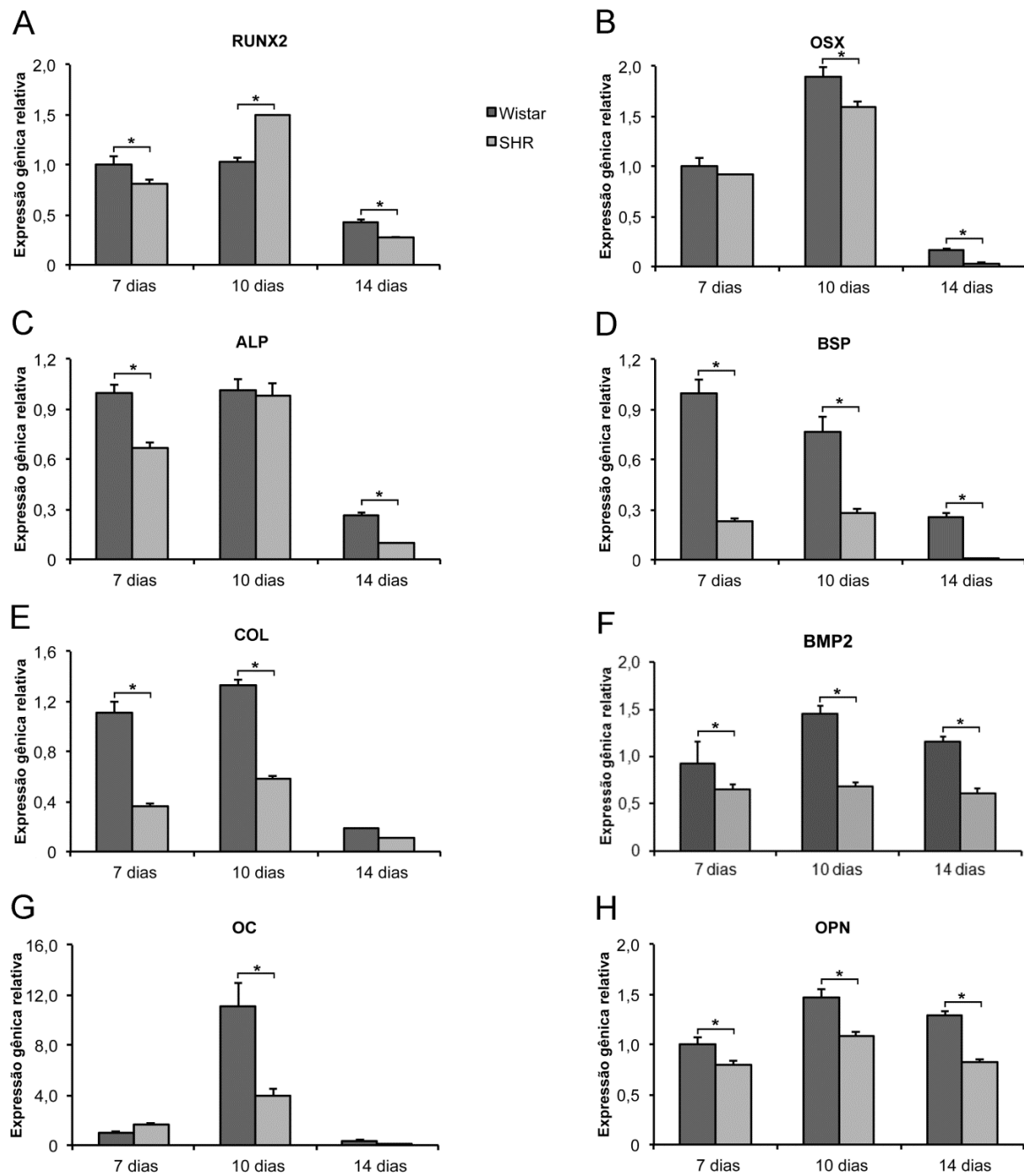


FIGURA 2. Expressão gênica dos marcadores do fenótipo osteoblástico das células osteoblásticas derivadas de ratos Wistar e SHR. **A)** RUNX2: Wistar: 7=10>14 dias (7 versus 10 $p=0,643$, para as outras comparações $p=0,001$). SHR: 7<10>14 dias, $p=0,001$ para todas as comparações. **B)** OSX: Wistar e SHR 7<10>14 dias, $p=0,001$ para todas as comparações dentro de cada grupo. **C)** ALP: Wistar 7=10>14 (7 versus 10 $p=0,914$, para as outras comparações $p=0,001$). SHR: 7<10>14, $p=0,001$ para todas as comparações. **D)** BSP: Wistar: 7>10>14 dias, $p=0,001$ para todas as comparações. SHR: 7=10>14 dias (7 versus

10 dias $p=0,468$, para as outras comparações $p=0,001$). **E) COL:** Wistar e SHR: $7<10>14$ dias, $p=0,001$ para todas as comparações. **F) BMP2:** Wistar: $7<10>14$ dias (7 *versus* 10 dias $p=0,001$, 7 *versus* 14 dias $p=0,022$, 10 *versus* 14 dias $p=0,003$). SHR: $7=10=14$ dias. **G) OC:** Wistar: $7<10>14$ (7 *versus* 14 $p=0,616$, para as outras comparações $p=0,001$). SHR: $7<10>14$ (7 *versus* 10 dias $p=0,013$, 7 *versus* 14 $p=0,094$, 10 *versus* 14 $p=0,001$). **H) OPN:** Wistar: $7<10>14$ (7 *versus* 10 dias e 7 *versus* 14 dias $p=0,001$, 10 *versus* 14 dias $p=0,005$). SHR: $7<10>14$ (7 *versus* 10 dias e 10 *versus* 14 dias $p=0,001$, 7 *versus* 14 dias $p=0,898$). Os dados são representados como médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). * indica diferença entre Wistar e SHR dentro de cada período ($p\leq 0,002$).

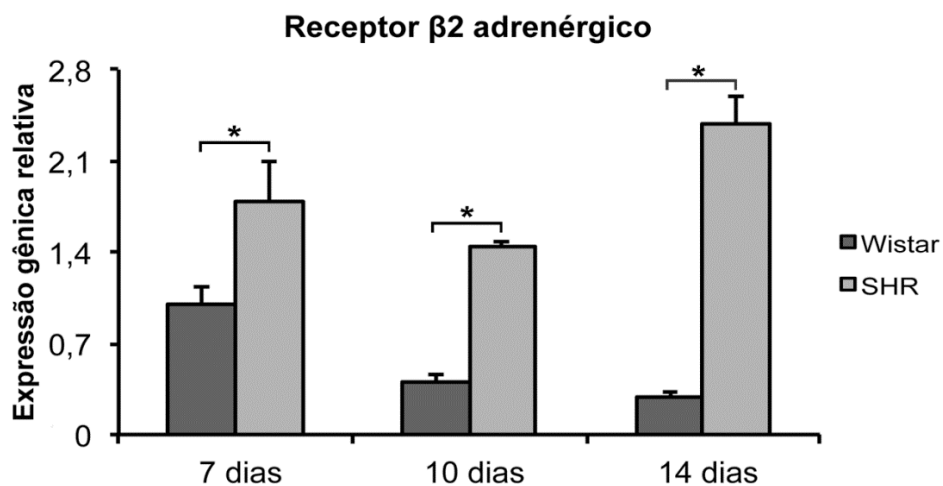


FIGURA 3. Expressão gênica do receptor $\beta 2$ adrenérgico em células osteoblásticas derivadas de ratos Wistar e SHR. Wistar: $7>10=14$ dias (7 *versus* 10 dias $p=0,002$, 7 *versus* 14 dias $p=0,001$, 10 *versus* 14 dias $p=0,659$). SHR: $7>10<14$ dias (7 *versus* 10 dias $p=0,05$, 7 *versus* 14 dias $p=0,002$, 10 *versus* 14 dias $p=0,001$). Os dados são representados como médias $\pm$ desvio padrão ($n=3$). * indica diferença entre Wistar e SHR dentro de cada período ($p=0,001$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram observadas as diferenças fenotípica e genotípica dos marcadores da diferenciação osteoblástica de CTMs obtidas da medula óssea de SHR comparadas com Wistar. Para quase todos os parâmetros avaliados mostraram valores reduzidos para o grupo SHR. O entendimento das alterações presentes em osteoblastos desse modelo de hipertensão essencial pode significativamente contribuir para elucidar os vários prejuízos que essa patologia gera para o organismo, especialmente para os tecidos mineralizados, incluindo o tecido ósseo.

No presente estudo, apesar de a proliferação celular exibir um padrão crescente para ambos os grupos, foi drasticamente reduzida em células obtidas de SHR em todos os períodos avaliados. Embora nesse estudo não se tenha investigado os mecanismos que resultaram na menor proliferação celular, talvez a maior taxa de senescência das células derivadas de medula óssea de SHR possa ter contribuído para a redução na taxa de proliferação.

A diferenciação osteoblástica é controlada por vários fatores de transcrição, incluindo RUNX2 e OSX. A expressão de RUNX2 em CTMs é essencial para a diferenciação osteoblástica como demonstrado pela ausência de osteoblastos maduros e esqueleto mineralizado em camundongos *knockout* para esse fator. OSX é expresso em osteoblastos que já expressam RUNX2 e é essencial para a diferenciação de células pré-osteoblásticas em osteoblastos maduros. Culturas osteogênicas compreendem usualmente uma mistura de populações, que varia de células precursoras até osteoblastos totalmente diferenciados. A maior expressão em períodos iniciais dos fatores de transcrição RUNX2 e OSX, cruciais para a diferenciação osteoblástica, sugerem culturas com predominância de células em

estágio mais avançado de diferenciação . Em nosso estudo, o grupo SHR nem sempre apresentou menor expressão de RUNX2, mas é interessante observar que nos períodos mais tardios a expressão de OSX foi sempre menor, o que evidencia um atraso no processo de diferenciação dos osteoblastos derivados de SHR. Considerando que a contínua indução de BMP2 é essencial para gerar osteoblastos maduros, podemos sugerir que essa via de sinalização também está contribuindo para um prejuízo nos osteoblastos provenientes de SHR .

A ALP é importante para a deposição mineral inicial por osteoblastos *in vitro*, pois ela hidrolisa o β -glicerofosfato, disponibilizando fosfato para a mineralização da matriz extracelular . A ALP é expressa nas fases iniciais da formação de cartilagem e osso, atinge o pico de expressão nas fases intermediárias seguida por declínio nas fases tardias . Em nosso estudo, o grupo Wistar apresentou esse padrão de atividade de ALP como anteriormente descrito para osteoblastos derivados da medula óssea e de osso alveolar . Contrário a esse padrão, o grupo SHR apresentou atividade de ALP crescente até os 14 dias, porém, em todos os períodos, bem menor do que o Wistar. Tais observações foram corroboradas pela análise da expressão gênica de ALP, onde foi observado pico de expressão mais tardio para SHR e nos períodos mais iniciais e finais menor expressão desse gene em SHR. Provavelmente como resultado dessa menor e atrasada expressão e atividade da ALP juntamente com a menor expressão gênica de colágeno, o principal componente protéico da matriz extracelular do tecido ósseo, a expressão fenotípica final da diferenciação osteoblástica, que é a formação de matriz mineralizada, foi menor no grupo SHR. É interessante observar que a quantidade de matriz mineralizada no grupo SHR aos 21 dias é similar àquela observada no Wistar aos 17 dias. Esses resultados estão de acordo com observações anteriores

relatadas por Amaral (2013). Nesse estudo, também avaliamos a expressão gênica dos marcadores tardios da diferenciação osteoblástica BSP, OC e OPN, cujas funções estão ligadas ao controle do processo de mineralização . Em geral, a expressão desses genes também foi menor nos grupo SHR. Tais evidências indicam que a diferenciação osteoblástica está atrasada e diminuída em células derivadas de SHR. Pelo menos em parte, essas alterações em osteoblastos derivados de SHR, podem explicar algumas observações de prejuízo na qualidade óssea relatadas para essa linhagem. .

Estudos têm avaliado o papel do tônus simpático do sistema nervoso na regulação da massa óssea por meio de neurotransmissores tais com epinefrina e norepinefrina via inervações das células ósseas . Tem sido mostrado que o tônus simpático diminui a massa óssea tanto por reduzir a formação como por aumentar a reabsorção pela ativação de receptores adrenérgicos beta-2 . Mesmo na ausência de tônus simpático aumentado, esses receptores participam do controle da massa óssea . Portanto, como nossos resultados mostraram que osteoblastos derivados de SHR apresentam maior expressão gênica de receptores beta-2 e inferindo que isso resulte em receptores funcionais, muito provavelmente isso explica porque esses osteoblastos apresentam-se menos diferenciados e produzam menos matriz mineralizada.

6 CONCLUSÃO

Tomadas em conjunto, as informações presentes em nosso trabalho permite concluir que os osteoblastos diferenciados das CTMs de SHR apresentam redução ou atraso nesse processo de diferenciação. Sugerimos ainda que a elevada expressão dos receptores β_2 adrenérgicos possa ter atuado nesse prejuízo da diferenciação osteoblástica.

7 REFERÊNCIAS

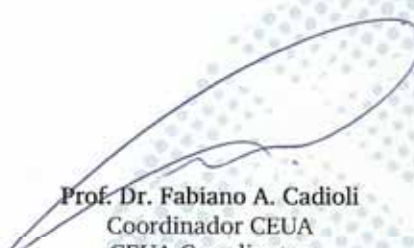
Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Committee for Ethical Use of Animals (CEUA)

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto "Caracterização do fenótipo celular e avaliação do efeito do atenolol em osteoblastos obtidos do processo de reparo alveolar de ratos espontaneamente hipertensos (SHR)" sob responsabilidade da Pesquisadora CRISTINA ANTONIALI SILVA e colaboração de Natalia Manrique Cursino e Adalberto Luiz Rosa está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pelo CEUA, de acordo com o processo 01560-2011.

CERTIFICATE

We certify that the research "Characterization of cellular phenotype and evaluation of the atenolol effect in osteoblasts obtained from alveolar bone healing process in spontaneously hypertensive rats (SHR)", process number 01560-2011, under responsibility of CRISTINA ANTONIALI SILVA and with collaboration of Natalia Manrique Cursino and Adalberto Luiz Rosa agree with Ethical Principles in Animal Research (COBEA) and was approved by CEUA.



Prof. Dr. Fabiano A. Cadioli
Coordenador CEUA
CEUA Coordinator