

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA**

AYNÁ EMANUELLI ALVES BARRETO

**PAPEL DOS RECEPTORES β_1 E β_2 ADRENÉRGICOS SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS
ESTROMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

**ARAÇATUBA
2019**

AYNÁ EMANUELLI ALVES BARRETO

**PAPEL DOS RECEPTORES β 1 E β 2 ADRENÉRGICOS SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS
ESTROMAIS DA MEDULA ÓSSEA DE RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Tit. Sandra Helena Penha de Oliveira

ARAÇATUBA

2019

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

B273p Barreto, Ayná Emanuelli Alves.
Papel dos receptores β_1 E β_2 adrenérgicos sobre a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais estromais da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos / Ayná Emanuelli Alves Barreto. - Araçatuba, 2019
86 f. : il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia, Araçatuba

Orientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Células-tronco mesenquimais 2. Receptores adrenérgicos
3. Ratos Wistar I. T.

CDD 612

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

DADOS CURRICULARES

AYNÁ EMANUELLI ALVES BARRETO

Nascimento: 28 de novembro de 1995; Penápolis/SP.

Filiação: Alexandre Carneiro Barreto

Rosemeire Aparecida Alves Barreto

2013/2016: Graduação em Biomedicina, Universidade Paulista – UNIP.

2017/2019: Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, nível Mestrado Acadêmico, pelo Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Foa/Unesp).

DEDICATÓRIA

Aos que proporcionaram minha chegada até aqui,
meus pais **Alexandre e Meire**, avós **Inês e Manoel** e meu noivo **Caique**.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, pois por Ele todas as outras coisas foram possíveis.

A professora Sandra Helena Penha de Oliveira pela orientação acadêmica durante o trabalho e pela oportunidade de ingressar em vosso laboratório.

A professora Cristina Antonialli Silva, pelo apoio obtido durante este percurso, especialmente em momentos mais delicados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo financiamento desta pesquisa

Ao meu parceiro da bancada e da vida, Victor Balera, minha inspiração diária. Agradeço ao apoio durante todas as etapas pertinentes a este trabalho, desde os experimentos realizados nos horários mais inconvenientes até a escrita definitiva, na qual foi oferecido todo seu conhecimento obtido com tanta dedicação.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia, em especial à Sabrina e Beatriz, que se empenharam junto a mim para que este trabalho se concretizasse. Todos os outros tiveram papel fundamental na construção de amizades que serão lembradas com muito carinho e saudades.

Por fim e não menos importantes, meus pais, Alexandre e Meire, que sempre acreditaram em mim. Minha avó, Inês, dona de todo o meu amor e gratidão, e meu avô Manoel, que virou uma estrelinha durante este período e hoje me dá forças a partir de um outro plano. Meu noivo e “namorado”, Caique, parceiro de outras vidas e principal responsável pelo amparo nos meus dias mais difíceis.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

*Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana
seja apenas outra alma humana.*

Carl Jung

RESUMO

BARRETO, A. E. A. **Papel dos receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos sobre a diferenciação osteoblástica de células mesenquimais estromais da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

Introdução: O remodelamento ósseo é um processo complexo que depende do balanço entre formação e reabsorção óssea, mecanismo regulado pelas células ósseas e fatores sistêmicos, como o Sistema Nervoso Simpático (SNS). Os mediadores deste sistema são capazes de regular o metabolismo ósseo através dos receptores adrenérgicos expressos na superfície dos osteoblastos. Entretanto, o papel dos receptores β -adrenérgicos ainda não está totalmente elucidado no processo de diferenciação osteogênica. **Objetivos:** avaliar o papel dos receptores β -adrenérgicos na diferenciação osteoblástica de células tronco mesenquimais da medula óssea de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos (SHR). **Métodos:** Ratos machos Wistar e SHR (10 semanas) foram utilizados para a coleta da medula óssea a partir do fêmur, as quais foram plaqueadas em garrafas de cultivo celular e depois em placas de 24 poços, onde receberam o meio osteogênico (MO: MEM, mais 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato e 10^{-8} M de dexametasona), e o tratamento com Isoprenalina (0,01 μM), Carvedilol (1 μM), antagonista adrenérgico não seletivo, ou Nebivolol (0,1 μM), antagonista $\beta 1$ -adrenérgico. O ensaio de proliferação celular (MTT) e a atividade de fosfatase alcalina (Fal) foram realizados nos dias 7, 10 e 14. A mineralização foi avaliada no dia 14 através do vermelho de Alizarina. A expressão gênica dos marcadores osteogênicos e dos receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos foi avaliada no dia 7 por RT-PCR em tempo real. A atividade proteolítica da metaloproteinase de matriz (MMP-2) foi avaliada no mesmo período utilizando zimografia. As vias da MAPK também foram avaliadas ao final de 7 dias. **Resultados:** A Isoprenalina reduz a fosfatase alcalina na linhagem de células Wistar nos dois primeiros períodos, e ao final de 14 dias apresenta um aumento significativo. A adição dos β -bloqueadores reverte tal resposta. Em SHR a Isoprenalina proporciona aumento da atividade de fosfatase alcalina no período intermediário. O Nebivolol inibe essa resposta no mesmo período e, em 7 dias, é capaz de reverter a redução causada pelo agonista. A Isoprenalina aumentou a expressão de todos os fatores de transcrição e o bloqueio dos receptores reverteu essa condição. A Isoprenalina aumenta a expressão de Opn, Ocn e BSP nas células de animais Wistar, e em SHR aumenta apenas Ocn e o tratamento com Carvedilol corrige. A atividade de MMP-2 também foi reduzida pelo Nebivolol apenas no grupo Wistar. Além disso, o Nebivolol reduziu a expressão gênica do receptor $\beta 1$ -adrenérgico. O ensaio de mineralização mostrou menor deposição mineral em Wistar. O Nebivolol também mediou a redução da fosforilação das vias da MAPK neste mesmo grupo de células. **Conclusão:** Nossos dados sugerem que o receptor $\beta 1$ -adrenérgico pode estar envolvido na diferenciação osteogênica de células de ratos Wistar mas não em células de ratos SHR.

Palavras-chave: células tronco mesenquimais, diferenciação osteogênica, receptor adrenérgico, rato Wistar.

ABSTRACT

BARRETO, A. E. A. **Role of β 1 and β 2 adrenergic receptor on bone marrow mesenchymal stem cells osteoblastic differentiation from hypertensive rats.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

Introduction: Bone remodeling is a complex process that depends on the balance between formation and resorption bone, a process which is regulated by bone cells and systemic factors, like the Sympathetic Nervous system (SNS). The mediators of these system are able to regulate bone metabolism through adrenergic receptors on the surface of the osteoblasts. However, the role of β -adrenergic receptors is not clear in the osteogenic differentiation process. Thus, in this study we aimed to evaluate the role of B-adrenergic receptor on osteoblastic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells from normotensive and Spontaneously Hypertensive Rats (SHR). **Methods:** 70-days-old male Wistar and SHR rats were used for bone marrow collection from femurs, which was placed in cell culture flasks and after in to 24-well plates, where they received osteogenic medium (OM: MEM, plus 50 μ g/mL ascorbic acid, 10 mM β glycerophosphate, and 10^{-8} M dexamethasone) and the treatment with Isoprenaline (0.01 μ M), Carvedilol (1 μ M), non-selective adrenergic receptor antagonist, or Nebivolol (0,1 μ M), β 1-adrenergic receptor antagonist. Cell proliferation (MTT assay) and alkaline phosphatase specific activity (Alp) were analyzed at day 7, 10 and 14. Mineralization was evaluated at day 14, by Alizarin Red S. Gene expression of osteogenic markers and B1 and B2-adrenergic receptor were evaluated at day 7, by real time-RT-PCR. The proteolytic activity of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) were evaluated at day 7 using gelatin zymography. The MAPK pathway was evaluated at the same period. **Results:** Isoprenaline provides increased alkaline phosphatase activity in the intermediate period. The addition of Nebivolol includes this response over this same period and, within 7 days, was able to reverse the reduced agonist reduction. Isoprenaline increased expression of all transcription factors and receptor blockade reversed this condition. Isoprenaline increases expression of Opn, Ocn and BSP in Wistar animal cells, and in SHR only increases Ocn and Carvedilol-corrected treatment. MMP-2 was reduced by Nebivolol treatment just at Wistar cells. Besides that, Nebivolol reduced ADRB1 gene expression at day 7 in Wistar group. Mineralization showed that Nebivolol reduced mineral deposition in Wistar. Nebivolol reduced MAPK proteins phosphorylation. **Conclusion:** Our results suggest that β 1 adrenergic receptor seems to be involved in the osteogenic differentiation of cells from Wistar rats but not in SHR cells.

Key words: mesenchymal stem cells, osteogenic differentiation, adrenergic receptor, Wistar rat.

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Taxa de viabilidade celular de células tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos durante a diferenciação osteogênica associada ou não ao bloqueio de receptores adrenérgicos **51**
- Figura 2** - Atividade específica de fosfatase alcalina de células tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos durante a diferenciação osteogênica associada ou não ao bloqueio de receptores adrenérgicos. **52**
- Figura 3** - Mineralização biológica avaliada com o vermelho de Alizarina S. **54**
- Figura 4** - Quantificação relativa (RQ) da expressão gênica do receptor $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgico (Adrb1 e Adrb2). **55**
- Figura 5** - Quantificação relativa (RQ) da expressão gênica de Runx2, Osterix e β -catenina. **57**
- Figura 6** - Quantificação relativa (RQ) da expressão gênica de fosfatase alcalina (Alp), Osteopontina (Opn), Osteocalcina (Ocn) e Sialoproteína óssea (Bsp). **59**
- Figura 7** - Atividade da MMP-2 no sobrenadante de células tronco mesenquimais oriundas de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos após 7 dias de diferenciação osteogênica **61**
- Figura 8** - Fosforilação das proteínas da sinalização MAPKs **62**

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μA - Microampere

μL - Microlitro

μm - Micrometro

Actb - Beta actina

Adrb1 - Receptor β1-adrenérgico

Adrb2 - Receptor β2-adrenérgico

Alp - *Bone alkaline phosphatase*

ANOVA - *Analysis of variance*, análise de variância

ASB - Albumina sérica bovina

Bmp2 - *Bone morphogenetic protein 2*

Bsp/lbsp - *Bone sialoprotein / Integrin-binding sialoprotein*

Catnb - *β-catenin / Cadherin associated protein beta*

cDNA - *Complementary deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico complementar

Col1a1 - *Collagen type I alpha 1*

CME-MO - Célula mesenquimal estromal da medula óssea

Ct - *Cycle threshold*, Ciclo limiar

CTM - Células tronco mesenquimais

DNA - *Deoxyribonucleic acid*, Ácido desoxirribonucleico

DNase - Desoxirribonuclease

IL-10 - *Interleukin-10*, Interleucina-10

IL-6 - *Interleukin-6*, Interleucina-6

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm - Milímetro

Mmp2 - *Matrix metalloproteinase 2*

Ocn/Bglap - *Osteocalcin / Bone gamma-carboxyglutamate protein*

Opg - *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11b*

Opn/Spp1 - *Osteopontina / secreted phosphoprotein 1*

Osx/Sp7 - *Osterix/Sp7 transcription factor*

p - Probabilidade

PBS - *Phosphate-buffered saline*, Tampão fosfato salino

qRT-PCR - *Reverse transcription polymerase chain reaction quantitative real time*, Reação de transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real

Rank - *Tumor necrosis factor receptor superfamily member 11a*

Rankl - *Tumor necrosis factor ligand superfamily member 11*

RNA - *Ribonucleic acid*, Ácido ribonucleico RNase - Ribonuclease ROI - Region of interest, Região de interesse

RQ - *Relative quantitation*, Quantificação relativa

Runx2 - *Runt-related transcription factor 2*

SC - Grupo experimental SHR controle

SMO - Grupo experimental SHR tratado com meio osteogênico

SEM - *Standard error of the mean*, Erro padrão da média

SHR - *Spontaneously hypertensive rat*, Rato espontaneamente hipertenso

SCv - Grupo experimental SHR tratado com Carvedilol

SNb - Grupo experimental SHR tratado com Nebivolol

WC - Grupo experimental Wistar controle

WMO - Grupo experimental Wistar tratado com meio osteogênico

WCv - Grupo experimental Wistar tratado com Carvedilol

WNb - Grupo experimental Wistar tratado com Nebivolol

SUMÁRIO

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	25
1. INTRODUÇÃO.....	26
PROPOSIÇÃO.....	31
2. PROPOSIÇÃO.....	32
OBJETIVOS.....	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo geral	34
3.2. Objetivos específicos	34
MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1. Animais	37
4.2. Obtenção de cultura de células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea (CME-MO).....	37
4.2.1. Indução osteogênica	38
4.2.2. Bloqueio dos receptores adrenérgicos	38
4.3. Avaliação da diferenciação osteogênica	38
4.3.1. Avaliação da proliferação celular.....	38
4.3.2. Análise do conteúdo de proteínas totais.....	40
4.3.3. Avaliação da atividade específica de fosfatase alcalina.....	40
4.4. Análise de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.....	41
4.4.1. Coleta das amostras.....	41
4.4.2. Extração e quantificação do RNA total.....	42
4.4.3. Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real	42
4.4.4. Análise dos dados de expressão gênica	44
4.5. Detecção e quantificação da mineralização biológica	44
4.6. Análise da atividade de metaloproteinase de matriz (MMP-2)	45
4.7. Análise por Western Blot	45
4.8. Análise Estatística	46
RESULTADOS	49
5. RESULTADOS	50
5.1. Carvedilol e Nebivolol não são citotóxicos em células tronco mesenquimais de Wistar e SHR	50
5.2. O tratamento com β -bloqueadores reduz a atividade de fosfatase alcalina de células osteoblásticas de ratos Wistar.....	51

5.3.	O bloqueio seletivo de receptores reduz a deposição mineral em células de ratos normotensos.....	53
5.4.	O tratamento com Nebivolol reduz a expressão gênica do receptor Adrb1 e Adrb2 em osteoblastos de Wistar.....	55
5.5.	O bloqueio de receptores β -adrenérgicos reduz a expressão dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação osteoblástica.....	56
5.6.	O bloqueio de receptores β -adrenérgicos reduz a expressão gênica de proteínas relacionadas à diferenciação osteogênica <i>in vitro</i>	58
5.7.	O bloqueio seletivo β 1-adrenérgico reduz a atividade de MMP-2 em células de animais normotensos.....	60
5.8.	O bloqueio do receptor β 1-adrenérgico reduz a fosforilação das vias da MAPK.....	62
DISCUSSÃO.....		67
6.	Discussão.....	68
CONCLUSÃO.....		77
7.	Conclusão.....	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....		80

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que abrange funções mecânicas, relacionadas à sustentação e proteção de áreas vitais, funções metabólicas, como homeostase mineral, além funções endócrinas e hematopoiéticas, referente ao compartimento medular dos ossos longos e vértebras, preenchido por tecido esponjoso, a medula óssea, onde se encontram os precursores hematopoiéticos e mesenquimais (Burr and Allen, 2014).

Diversos estudos têm demonstrado a importância dos osteoblastos, tanto na prática clínica associada à engenharia de tecidos quanto em associação a fatores exógenos ou moleculares, que através de alguma via regulam o processo de diferenciação osteoblástica (Tang et al. 2010; J. Yang et al. 2010; Hu e Olsen 2016; D. Chen e Wang 2017). Nos modelos experimentais *in vitro*, a diferenciação da célula-tronco mesenquimal para a linhagem osteogênica requer basicamente meio suplementado com soro fetal bovino, ácido ascórbico, β -glicerofosfato e dexametasona, o que resultará, posteriormente, em aumento da atividade de fosfatase alcalina e deposição mineral de cálcio (Augello e De Bari 2010). No decorrer do processo de diferenciação osteogênica existem alguns marcadores, tais como os fatores de transcrição, expressos em etapas específicas da diferenciação celular a fim de garantir que a célula imatura alcance sua maturidade para o exercício de suas metas funcionais (Fakhry, 2013).

A diferenciação osteoblástica *in vitro* é, conceitualmente, dividida em três períodos principais: proliferação, maturação da matriz extracelular e mineralização. Entre os períodos existem duas fases de transição: a finalização do período

proliferativo e o aumento da expressão de genes que engatilham o processo de mineralização (Quarles, Yohay, Lever, Caton, & Wenstrup, 2009). Durante o processo de diferenciação e maturação dos osteoblastos ocorre a síntese de proteínas ósseas específicas, como colágeno tipo I, proteína que garante estabilidade térmica e resistência mecânica (Shoulders e Raines 2009), fosfatase alcalina, expressa logo no início do desenvolvimento ósseo e envolvida na mineralização biológica ao aumentar a disponibilidade de fosfato livre (Simão et al., 2007); osteopontina, componente das matrizes extracelulares mineralizadas e expressa em vários tecidos, como ossos e dentes (Sodek, Ganss e McKee 2000); sialoproteína óssea, proteína extracelular expressa no início da mineralização óssea com potencial de nucleação dos cristais de hidroxiapatita (Ganss, Kim e Sodek 1999) e osteocalcina, a mais abundante proteína não-colágena do osso, importante para o metabolismo ósseo e utilizada como marcador de remodelação (Hoang, Sicheri, Howard, & Yang, 2003). Tais proteínas são frequentemente utilizadas como marcadores para o estudo dos estágios de desenvolvimento dos osteoblastos, visto que a expressão segue uma hierarquia cronológica (Nefussi, Bami, Modrowski, Obcuf, & Forest, 1997).

Uma ampla variedade de fatores locais e sistêmicos é considerada capaz de regular a proliferação e diferenciação dos osteoprogenitores, um processo que é caracterizado por uma série de eventos celulares e moleculares e distinguido pela expressão sequencial de genes associados aos osteoblastos, fatores de transcrição, proteínas relacionadas ao ciclo celular, moléculas de adesão e proteínas de matriz (Aubin, 2001). Alguns estudos já relataram a existência de uma diversidade de receptores presentes em células osteoblásticas de linhagens *in vitro*, o que a torna

biologicamente competente para responder à ação de mediadores que podem atuar através desses receptores modulando a atividade intracelular (Pun, Lau e Ho 2009; Orwoll et al. 1991). Tais achados demonstram que a diferenciação osteoblástica pode ser mediada por fatores locais e sistêmicos devido à expressão de receptores específicos na superfície celular do osteoblasto, como já demonstrado em alguns modelos experimentais (Castillo et al. 2014; Contaldo et al. 2014; Lin et al. 2014; Moriya et al. 2015).

O sistema nervoso autônomo, através de seus neurotransmissores, também constitui um dos fatores sistêmicos de regulação do metabolismo ósseo (Togari, 2002). Alguns trabalhos evidenciam que as células ósseas apresentam receptores para vários fatores, assim denominados, neuro-osteogênicos, propondo que moléculas sinalizadoras no sistema nervoso podem participar no controle do metabolismo ósseo (Togari e Arai 2008).

Estudos prévios identificaram em culturas de células osteoblásticas a presença de receptores adrenérgicos, os quais medeiam muitas das respostas fisiológicas as catecolaminas endógenas (Moore, Smith, Bailey, Voelkel, & Tashjian, 1993). A existência desses receptores adrenérgicos na superfície dos osteoblastos bem como o potencial de interação desses receptores com substâncias agonistas e antagonistas foram descritos em diversos trabalhos. De acordo com Suzuki et al. (1999) a epinefrina, agonista adrenérgico não-seletivo, é apontada como um potente agente mitogênico em celular MC3T3-E1, sendo possível que um dos mecanismos envolvidos nessa resposta seja a estimulação da síntese de DNA e conseqüentemente ao aumento da proliferação celular. Outros trabalhos demonstraram respostas mediadas pelos

receptores β -adrenérgicos. Takeuchi et al. (2001) mostraram que um estímulo farmacológico adrenérgico através de um agonista β -adrenérgico levou à maior expressão de mediadores ligados a osteoclastogênese. Outros autores avaliaram o efeito de diferentes doses de isoprenalina, um agonista β -adrenérgico não específico, administrada subcutaneamente, o que levou a uma diminuição do volume do trabeculado femoral (Kondo & Togari, 2011). Neste sentido é possível observar a integração neuro-osteogênica, mediada principalmente pelo sistema nervoso simpático e sua atuação periférica via receptores adrenérgicos.

No estudo de Pierroz et al. 2012a foi demonstrado que os receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ tem efeitos opostos em camundongos *knockout* para tais receptores (*Adrb1^{-/-}*, *Adrb2^{-/-}*, *Adrb1b2^{-/-}*) quando submetidos a estímulos mecânicos, sendo os receptores $\beta 1$ relacionados a respostas anabólicas de crescimento e em resposta a carga, enquanto receptores $\beta 2$ foram relacionados a reabsorção óssea, prejudicando a microarquitetura tecidual, o que corrobora com os estudos de Bonnet, Pierroz e Ferrari (2008) que confirmou os efeitos catabólicos mediados pelo receptor $\beta 2$.

Dentre os estudos acerca dos efeitos mediados pelos agonistas adrenérgicos surgiram trabalhos que propõem que os antagonistas adrenérgicos são capazes de reverter os efeitos deletérios causados pelo agonista correspondente (Bonnet, Pierroz, e Ferrari 2008). Esta proposta corrobora com os resultados obtidos em um estudo de coorte, no qual evidenciou-se uma redução no risco de fraturas de quadril em pacientes que faziam uso de β -bloqueadores adrenérgicos (Ruths et al., 2015).

Diante da possível perda óssea induzida por agonistas β -adrenérgicos, alguns autores sugerem que β -bloqueadores poderiam ser utilizados como agentes anti-

catabólicos para o tratamento ou prevenção de desordens que levam a perda de massa óssea (Ma et al., 2011b). Dessa forma, o presente trabalho consistiu em avaliar o papel do receptor adrenérgico sobre o metabolismo ósseo de células-tronco mesenquimais estromais derivadas da medula óssea de ratos normotensos e hipertensos. Para tanto foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e que, além de serem hipertensos, apresentam desordens ósseas, condições que podem estar associadas à hiperatividade do sistema nervoso simpático nestes animais (Touw et al. 1980; Landim de Barros et al. 2016).

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

Como já abordado acima, diversos fatores podem regular a diferenciação osteoblástica. É sabido que estímulos adrenérgicos têm ação sobre a atividade de osteoblastos, entretanto trabalhos que avaliem o papel dos receptores adrenérgicos envolvidos no referido processo de diferenciação osteogênica de precursores mesenquimais oriundos da medula óssea ainda são em animais espontaneamente hipertensos são raros. Neste sentido, o presente trabalho propõe avaliar o papel dos receptores β -adrenérgicos no processo de diferenciação osteoblástica *in vitro* frente a um estímulo simpatomimético, um antagonista β -adrenérgico em cultura de células tronco da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o papel do receptor β -adrenérgico sobre o metabolismo ósseo de células-tronco mesenquimais estromais derivadas da medula óssea de ratos espontaneamente hipertensos e normotensos.

3.2 Objetivos específicos

Para cumprir o objetivo proposto dispomos das seguintes estratégias:

a) Avaliar o papel dos receptores β_1 e β_2 adrenérgicos sobre a diferenciação osteoblástica de células-tronco mesenquimais estromais *in vitro* de animais normotensos e espontaneamente hipertensos;

b) Avaliar parâmetros bioquímicos da diferenciação osteogênica dos grupos experimentais nos dias 7, 10 e 14 utilizando ensaio de MTT para avaliação da proliferação celular, dosagem da atividade de fosfatase alcalina e dosagem de conteúdo de proteínas totais.

c) Avaliar a mineralização biológica por Alizarina Vermelha S no dia 14.

d) Avaliar parâmetros moleculares da diferenciação osteogênica no dia 7 utilizando a análise da expressão do RNA para os marcadores relacionados: Runx2, β -catenina e osterix; osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea e proteína morfogenética óssea.

e) Avaliar a atividade de metaloproteinase 2 nas células osteoblásticas tratadas e não tratadas com antagonistas adrenérgicos.

f) Avaliar a fosforilação das proteínas da via MAPK envolvidas na diferenciação osteogênica.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*) e ratos Wistar, adultos (70 dias), oriundos do Biotério do Departamento de Ciências Básicas, da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP. Os animais Wistar e SHR foram mantidos em salas separadas, com umidade e temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12 horas), 3-4 animais por caixa plástica forradas com maravalha, consumindo o mesmo tipo de ração (Labina, Nestlé, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão Local de Ética para Experimentação Animal (Protocolo CEUA/FOA nº 00686-2016)

4.2 Obtenção de cultura de células mesenquimais estromais derivadas da medula óssea (CME-MO)

O método de obtenção da cultura de CME-MO baseia-se na sua capacidade de aderência em superfície plástica, como previamente descrito (Friedenstein, Chailakhyan, Latsinik, Panasyvk, & Keiliss-Borok, 1974). Os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico inalatório (isoflurano) e borrifados com solução de gluconato de clorexidina 2%, para fins assépticos. A pele dos membros inferiores foi removida, no intuito de evitar contato o pelo do animal (fonte de contaminação), posteriormente os fêmures foram dissecados a partir da articulação do joelho até a articulação coxofemoral, cuidadosamente, não comprometendo a integridade dos ossos, os quais foram mantidos em meio de cultura contendo 5 vezes a concentração normal de antibióticos, até os próximos procedimentos. O meio de cultura

utilizado neste trabalho compreende o Meio Essencial Mínimo Eagle (MEM, Sigma-Aldrich®, St. Luis, MO, USA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco®, Grand Island, NE, USA), L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sódio 3,7 g/mL e os antibióticos Penicilina G 100 U/mL (Sigma®) e Estreptomicina 100 µg/mL (Sigma®).

O material coletado foi levado para o fluxo laminar, onde os fêmures foram limpos dos tecidos adjacentes. As epífises foram então cortadas e a medula óssea coletada em meio de cultura com auxílio de uma agulha (40 x 1,2 mm) acoplada à seringa de 20 mL. A medula coletada foi desagregada e a suspensão celular, centrifugada, ressuspendida e dividida em frascos de cultura de 75 cm² (Corning Inc., USA) contendo 15 mL de meio de cultura, as quais foram mantidas em atmosfera e temperatura controlada (CO₂ 5%, 37 °C). A primeira troca do meio de cultivo foi realizada após 24 horas com lavagem dos frascos de cultura com tampão salino fosfato (pH 7,4). As demais trocas foram feitas a cada 3 dias. Ao atingir a sub confluência (70-80%) as culturas primárias foram gentilmente lavadas com tampão salino fosfato (pH 7,4) e tratadas com solução de tripsina 0,25% e EDTA 1 mM (Gibco®) para obtenção de suspensão celular que foi plaqueada em placas de cultura celular de 24 poços (Corning Inc., USA) na densidade de 40000 células/cm². Todos os experimentos seguintes foram realizados com a subcultura (primeira passagem). As culturas foram realizadas separadamente e por etapas, para que sejam comparados posteriormente os resultados com células oriundas de ratos SHR e de ratos Wistar. Os procedimentos de cultivo celular e análise dos parâmetros de diferenciação celular serão os mesmos.

4.2.1 Indução osteogênica

Após as culturas atingirem subconfluência (70-80%), na placa de 24 poços, a diferenciação osteogênica foi induzida pela adição do meio osteogênico, que compreende o meio de cultura suplementado com ácido ascórbico 50 µg/mL (Sigma[®]), β-glicerofosfato 10 mM (Sigma[®]) e dexametasona 10⁻⁸M (Sigma[®]), indutores osteogênicos clássicos. Todos os grupos experimentais, com exceção do grupo controle, receberão a indução osteogênica com ou sem os demais tratamentos concomitantemente, conforme o delineamento experimental.

4.2.2 Bloqueio dos receptores adrenérgicos

A partir de uma concentração pré-estabelecida através de ensaios de citotoxicidade prévios (MTT), foram adicionados os β-bloqueadores adrenérgicos Nebivolol (bloqueador β1 seletivo), na concentração de 0,1 µM e Carvedilol (antagonista adrenérgico não-seletivo), na concentração de 1µM às culturas, as quais foram tratadas desde o dia 0 até o final do 14^o dia, com troca do meio a cada três dias.

4.2.3 Estímulo com isoprenalina

O estímulo nas células foi realizado com Isoprenalina (agonista β-adrenérgico não seletivo) na concentração de 0,01 µM após 1h de bloqueio com os respectivos agentes antagônicos (Carvedilol e Nebivolol). Tal experimento foi realizado para fim de elucidar se o efeito isolado dos antagonistas seria similar na presença de uma droga agonista do receptor β-adrenérgico .

4.3 Avaliação da diferenciação osteogênica

Nas placas de cultura de 24 poços foram organizados os 8 grupos experimentais: Grupo Wistar: 1) Meio controle (WMC); 2) Meio osteogênico (WMO); 3) MO + Carvedilol (WCv); 4) MO + Nebivolol.(WNb). Grupo SHR: 1) Meio controle (SMC); 2) Meio osteogênico (SMO); 3) MO + Carvedilol (SCv); 4) MO + Nebivolol.(SNb).

Os grupos tratados com isoprenalina foram delineados da seguinte forma: Meio controle (MC); 2) Meio osteogênico (MO); 3) MO + Isoprenalina; 4) MO + Carvedilol + Isoprenalina; 5) MO + Nebivolol + Isoprenalina.

4.3.1 Avaliação da proliferação celular

A proliferação celular foi avaliada nos dias 7, 10 e 14, a partir do início dos tratamentos, pelo ensaio do MTT. O meio será substituído por 500 µL de solução de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide 0,5 mg/mL em meio de cultura sem soro fetal bovino), seguido de incubação de 2 horas em temperatura e atmosfera controlada (37 °C, 5% CO₂). Posteriormente a solução de MTT foi removida e o formazan intracelular foi liberado/solubilização com 1 mL de etanol. As placas foram agitadas por 5 minutos e a absorbância da solução foi mensurada em 570 nm.

4.3.2 Análise do conteúdo de proteínas totais

Para determinação do conteúdo de proteínas total foi utilizado um ensaio colorimétrico, com metodologia adaptada de Lowry (Lowry, 1951). Resumidamente, um homogenato da cultura foi preparado com tampão de lise, o qual foi adicionado no volume de 0,5 mL a cada poço (solução de sódio dodecil sulfato 1%). A amostra foi

então incubada por 10 minutos com solução de Lowry modificada (carbonato de sódio 2%, hidróxido de sódio 0,1 M, sulfato de cobre 0,5%, citrato de sódio 1%) e posteriormente foi adicionado o reagente Follin na proporção 1:1 seguido por incubação de 30 minutos. A absorbância foi determinada a 660 nm e a quantidade de proteínas totais foi determinada a partir de uma curva padrão de albumina.

4.3.3 Análise da atividade específica de fosfatase alcalina

Para análise da atividade de fosfatase alcalina presente na membrana das células foi realizado o processo de lise celular com solução de sódio dodecil sulfato 1%, resultando em um homogenato de células. Foram utilizados 50 µL de cada amostra, adicionadas a tubos de ensaios contendo um mix de cofatores de reação (MgCl₂; Glicina e água 1:1:7, respectivamente) em banho-maria a 37°C. Após incubação por 2 minutos, adicionou-se 25 µL de p-nitrofenilfosfato a 0,05 M. Após 30 minutos, a reação foi finalizada com NaOH 1 M. O conteúdo dos tubos de ensaio foi transferido para placas de leitura, onde determinou-se a absorbância a 405 nm. Os resultados foram calculados e normalizados de acordo com a concentração de proteínas correspondente a cada amostra.

4.4 Análise de expressão gênica por RT-qPCR em tempo real

4.4.1 Coleta das amostras

Para a análise de expressão gênica por RT-qPCR foi necessária a coleta das células aderidas ao poço no dia 7, utilizando reagente Trizol. Após a raspagem do poço para coleta das células, as amostras foram armazenadas em -80°C até proceder a análise.

4.4.2 Extração e quantificação do RNA total

Para a extração do RNA o volume de Trizol LS foi completado a 1 mL e adicionou-se 200 μ L de clorofórmio (Merck Millipore) em cada tubo. Na sequência, os tubos foram vigorosamente agitados por 30 segundos em vórtex, e logo após, mantidos em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 13.000 g a 4°C por 15 minutos e a fase translúcida foi então coletada em tubos de 1,5 mL e mantida em gelo picado. Para precipitação do RNA, adicionou-se 1 mL de isopropanol (Merck Millipore) gelado, para cada mL de fase aquosa coletada. As amostras foram mantidas a -20 °C *overnight*, e posteriormente os tubos foram centrifugados a 13.000 g, a 4°C por 15 minutos, para obtenção do precipitado que foi então ressuspenso em etanol 70% (Merk Millipore), e centrifugado novamente a 7.500 g, 4°C, 5 minutos. Todo o sobrenadante foi desprezado e os tubos ficaram em temperatura ambiente por 5 minutos para evaporação do álcool residual. O precipitado formado foi dissolvido em 15 μ L de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC - AppliedBiosystems Life Technologies).

Uma alíquota de 2 μ L do RNA obtido foi retirada e diluída em 98 μ L de água DEPC, para quantificação por espectrofotometria. Foram consideradas as leituras nos comprimentos de onda de 260 nm (para ácidos nucleicos) e 280 nm (para proteínas) e a razão 260/280, para verificar a pureza das amostras, foi considerada satisfatória quando entre 1,8 e 2,1. Com o propósito de eliminar a contaminação por DNA genômico, as amostras foram tratadas com DNase I (Sigma Aldrich).

4.4.3 Síntese do DNA complementar e reação em cadeia da polimerase em tempo real

O DNA complementar (DNAc) foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total, por reação de transcrição reversa, utilizando uma transcriptase reversa High Capacity Kit RNA-to-cDNA (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific). A quantificação comparativa da expressão do RNAm para os diferentes alvos foi realizada por meio de reações de PCR em tempo real, utilizando-se o sistema Taqman® (AppliedBiosystems Life Technologies) em um aparelho StepOne™ Real-Time PCR System (AppliedBiosystems Life Technologies). Para esta reação foram utilizados primers e sondas inventoriadas marcadas com fluoróforo FAM conforme recomendação do fabricante para os alvos descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos ensaios TaqMan™ utilizados

Fatores de transcrição		
<i>Runx2</i>	runt-related transcription factor 2	<i>Rn01512298_m1</i>
<i>Osx/Sp7</i>	osterix/Sp7 transcription factor	<i>Rn02769744_s1</i>
<i>Bcatn</i>	β -catenin/cadherin associated protein beta 1	<i>Rn00584431_g1</i>
Marcadores de formação óssea		
<i>Opn/Spp1</i>	osteopontin/secreted phosphoprotein 1	<i>Rn00681031_m1</i>
<i>Ocn/Bglap</i>	osteocalcin/bone gamma-carboxyglutamate protein	<i>Rn00566386_g1</i>
<i>Bsp/Ibsp</i>	bone sialoprotein/integrin-binding sialoprotein	<i>Rn00561414_m1</i>
<i>Bmp2</i>	bone morphogenetic protein 2	<i>Rn00567818_m1</i>
Receptores β-adrenérgicos		
<i>Adrb1</i>	adrenoreceptor beta 1	<i>Rn00824536_s1</i>
<i>Adrb2</i>	adrenoreceptor beta 2	<i>Rn00560650_s1</i>
Gene constitutive (<i>housekeeping gene</i>)		
<i>Actb</i>	beta actin	<i>Rn00997869 m1</i>

Para verificar e selecionar a melhor eficiência da reação, foram realizadas diluições seriadas de um pool de DNAC das amostras (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32), utilizando as concentrações do reagente Taqman® determinadas previamente. Alíquotas de 2 μ L do DNAC, nas diluições 1:8 foram utilizadas juntamente com reagentes Taqman® Gene Expression Master Mix (AppliedByosistemas Life Technologies), primers e sondas como determinado pelo fabricante, num volume final de reação de 10 μ L. A reação de amplificação compreende 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60°C, conforme recomendação do fabricante.

4.4.4 Análise dos dados de expressão gênica

A determinação dos níveis de expressão dos genes alvos foi realizada pela quantificação relativa (RQ), utilizando a equação $RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$. (Livak & Schmittgen, 2001). Para a RQ de cada amostra, foi utilizado o valor de CT (*cyclethreshold* ou ciclo limiar), o qual representa o ponto em que o sinal de amplificação é detectável, tanto para o gene alvo quanto para o gene constitutivo (β -actina). O valor do CT do gene constitutivo é subtraído do valor do CT do gene alvo e resulta no valor de ΔCT . O valor de ΔCT do gene alvo é, então, subtraído do valor do ΔCT da amostra de referência, e é encontrado o valor de $\Delta\Delta CT$. Este valor será utilizado na fórmula do nível de expressão, onde o número 2 representa a somatória da eficiência do gene alvo e do constitutivo, considerando que ambos os genes possuem 100% de eficiência.

4.5 Detecção e quantificação da mineralização biológica

A avaliação da mineralização biológica foi realizada ao final de 14 dias. Os poços foram lavados três vezes com tampão salino fosfato (pH 7,4) aquecido a 37 °C e fixadas com formol tamponado neutro a 4%. Em seguida, as culturas foram coradas com vermelho de Alizarina S (Sigma©) (Solução de vermelho de Alizarina 0,02 g/mL; pH 4,2), que cora em vermelho as áreas de mineralização ricas em cálcio. As placas foram digitalizadas em scanner de mesa (Scanjet G2410 Flatbed Scanner, HP®) para obtenção de imagens macroscópicas das culturas. As imagens adquiridas serão processadas utilizando o software de edição de imagens Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, EUA, versão 13.0 para Windows) para ajuste de

brilho e contraste, e a porcentagem de área marcada foi determinada utilizando o software de análise ImageJ (v.1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD; USA).

4.6 Análise da atividade de metaloproteinase de matriz (MMP-2)

A atividade de MMP-2 foi analisada no dia 7, no sobrenadante da cultura celular através da zimografia em gel gelatina como previamente descrito (Chaves Neto et al., 2018a). Brevemente, um tampão não-redutor (0.05% azul de bromofenol, 10% SDS, 1.5M Tris, 50% glycerol) foi adicionado a todas as amostras antes de serem adicionadas ao gel. Quantidades iguais de proteínas foram administradas nos géis 10% poliacrilamida contendo 0.8% de gelatina a 4°C. Os géis foram renaturados em 2% de solução Triton-X e incubadas em 50 mM Tris-HCl / 10 mM de tampão cloreto de cálcio pH 7.4 por 12 horas em 37°C. Os géis foram lavados com água deionizada duas vezes e incubados por uma hora com corante Comassie blue (10% ácido acético, 30% metanol, 0.5% Comassie Blue) e depois descorados (30% metanol e ácido acético 10%). Os géis foram escaneados em escala de cinza, a cor das imagens foi invertida no software Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., São José, CA, USA) e a quantificação das bandas foi realizada utilizando o software Image J (v.1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD; USA).

4.7 Análise por Western Blot

Após alcançar o sétimo dia dos respectivos tratamentos as culturas celulares foram coletadas e lisadas com tampão de lise [Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), Tween 20 1%, deoxicolato de sódio 0,25%, NaCl 150 mM, EGTA 1 mM, Na₃VO₄ 1 mM, NaF 1 mM e

inibidores de proteases (aprotinina 1 $\mu\text{g/ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g/ml}$ e PMSF 1 mM) e deixadas em banho de gelo por 2 h com agitação em vortex a cada 15 minutos. Em seguida o extrato foi clarificado por centrifugação a 16.000 rpm por 25 minutos e a concentração de proteína determinada pelo Método de Lowry (Lowry, Rosebrough et al. 1951). O precipitado foi descartado e ao sobrenadante foi adicionado o tampão de amostra na proporção de 1:1 [Tris– HCl 100 mM (pH 6,8), DTT 200 mM, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1 % e glicerol 20%]. As amostras foram aquecidas por 5 min e aplicadas em gel de poliacrilamida (10 %) contendo SDS (SDS-PAGE). Após a corrida, realizou-se a transferência para membranas de PVDF. As membranas foram bloqueadas com leite (5%) preparado em tampão Tris contendo tween 20 (0,05%) - TBST e incubadas overnight com os anticorpos primários (p-ERK1/2Thr202/Tyr204, pSAPK/JNKThr183/Tyr185, p-p38Thr180/Tyr182 e β -actina – Santa Cruz Biotechnology) diluídos 1:500. Em seguida as membranas foram lavadas com TBST e incubadas com anticorpos secundários anti-mouse ou anti-coelho (1:1000) por 1h. Após lavagem das membranas com TBS, as bandas foram detectadas por quimioluminescência. Os filmes radiográficos foram digitalizados com resolução de 1200 dpi e as bandas foram quantificadas através da análise densitométrica usando o software Image J (v.1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD; USA). A expressão relativa da proteína alvo foi determinada em relação a β -actina da mesma amostra.

4.8 Análise Estatística

A normalidade dos dados foi determinada a partir da análise de variância de um fator (one-way ANOVA), seguido de teste post hoc de Dunnett para comparação entre os tratamentos experimentais dentro da mesma espécie (Wistar ou SHR).

Os gráficos representam os dados como a média e o erro padrão da média (SEM, standard error of the mean) Os níveis de significância são indicados pelo valor ajustado de p, como *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ e ****: $p < 0.0001$. As análises foram realizadas no software estatístico Graph Pad Prism v7.0 (GraphPad Software Inc.; San Diego, Califórnia, USA)

RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Isoprenalina, Carvedilol e Nebivolol não são citotóxicos em células tronco mesenquimais de Wistar e SHR.

O ensaio de MTT (fig. 1A) demonstrou redução na viabilidade das células de Wistar e SHR, promovidas pela introdução do meio osteogênico. O tratamento com isoprenalina também reduz tal parâmetro. A adição de β -bloqueadores alterou a viabilidade celular em relação à isoprenalina de maneira sutil, sem grandes alterações ao longo dos períodos em ambas as linhagens, demonstrando que não há efeitos citotóxicos comprometedores das drogas sobre a cultura.

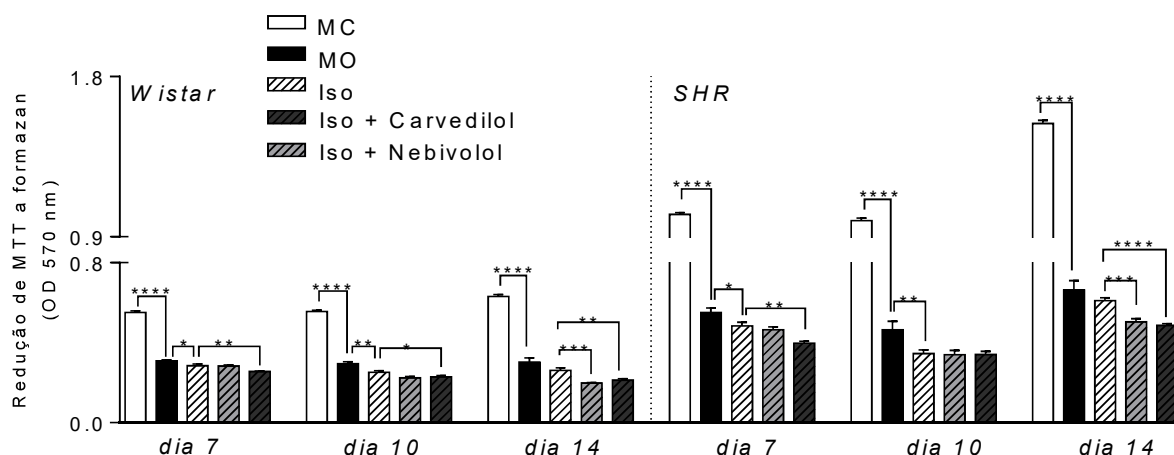


Figura 1: Taxa de viabilidade celular de células tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos durante a diferenciação osteogênica nos grupos tratados com Carvedilol e Nebivolol associados à isoprenalina. A taxa de proliferação celular foi avaliada durante os dias 7, 10 e 14 da diferenciação osteogênica pelo ensaio de MTT. Os resultados foram mostrados como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por* (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), e **** (p<0.0001).

5.2 O tratamento com β -bloqueadores reduz a atividade de fosfatase alcalina de células osteoblásticas de ratos Wistar

A avaliação da atividade específica de fosfatase alcalina demonstrou, no período inicial, maior atividade enzimática no grupo SC (fig. 2A). Entretanto, a diferença não perdura no período intermediário. Quando as células recebem o estímulo para diferenciação ocorre aumento da atividade enzimática no grupo WMO no período inicial, enquanto no grupo SMO ocorre uma redução significativa que é mantida ao longo dos períodos. O tratamento com isoprenalina reduz a fosfatase alcalina na linhagem de células wistar nos dois primeiros períodos, e ao final de 14 dias apresenta

um aumento significativo. A adição dos β -bloqueadores reverte tal resposta ao final de 14 dias e, em 7 dias, o Carvedilol corrigiu a redução na atividade enzimática. Nas células de SHR, a Isoprenalina proporciona aumento da atividade de fosfatase alcalina no período intermediário. A adição de Nebivolol inibe essa resposta neste mesmo período e, em 7 dias, é capaz de reverter a redução causada pela Isoprenalina.

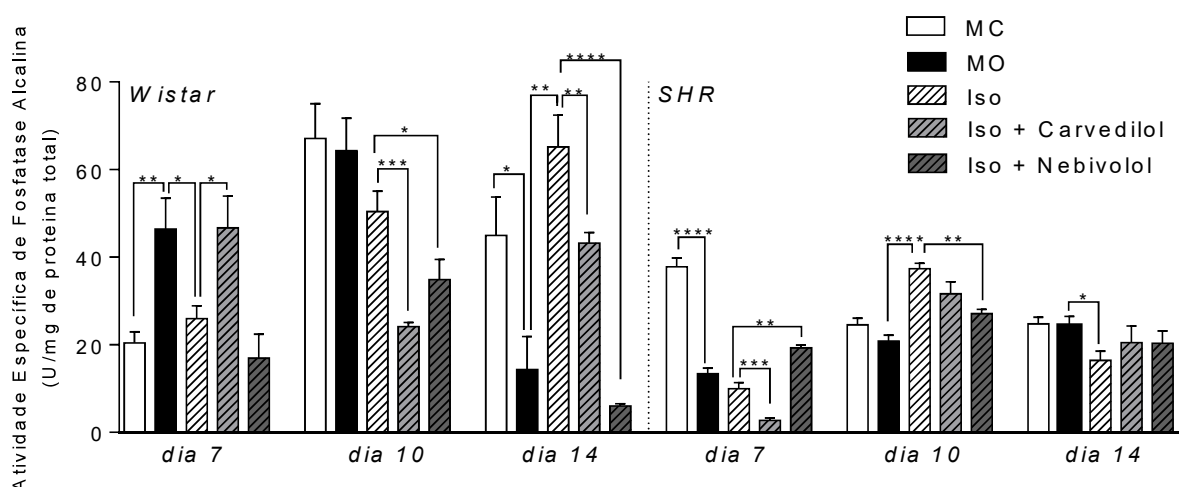


Figura 2: Atividade específica de fosfatase alcalina de células tronco mesenquimais de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos durante a diferenciação osteogênica nos grupos tratados com antagonistas Carvedilol e Nebivolol associados à isoprenalina. A taxa de proliferação celular foi avaliada durante os dias 7, 10 e 14 da diferenciação osteogênica pelo ensaio de MTT. Os resultados foram mostrados como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por *, * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), e **** (p<0.0001).

5.3 O bloqueio seletivo de receptores β 1 reduz deposição mineral em células de ratos normotensos

Na observação microscópica após coloração com Vermelho de Alizarina, é possível notar diferenças na monocamada de células do grupo SC, em relação ao WC (fig. 3 A-H). No grupo WMO, nota-se intensa deposição mineral, marcada em vermelho pela coloração. Tais achados foram comprovados posteriormente pela quantificação da porcentagem de área corada. O bloqueio seletivo de receptores β 1 demonstrou reduzir significativamente a deposição mineral nas células de animais normotensos, enquanto que as células de SHR não demonstraram diferenças significativas entre grupos, o que corrobora com os resultados observados no ensaio de fosfatase alcalina.

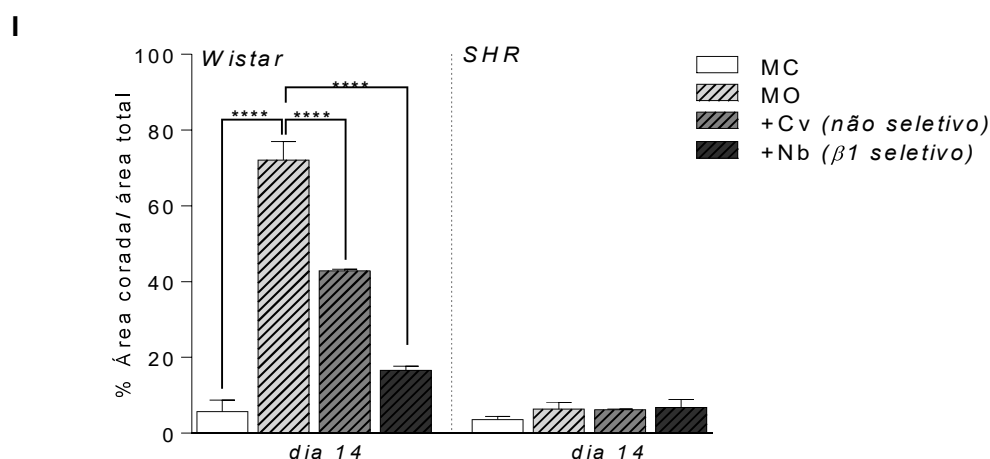
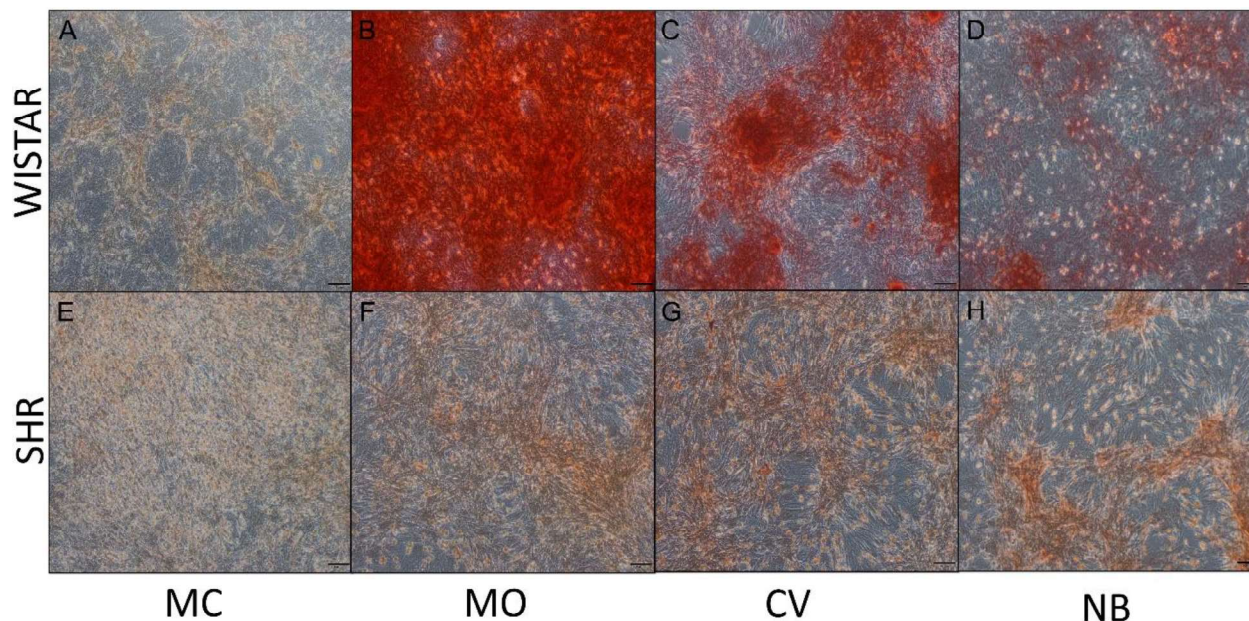


Figura 3: Mineralização biológica avaliada com o vermelho de Alizarina S. A mineralização biológica foi avaliada em ambas as linhagens de animais ao final do 14º dia de diferenciação osteogênica, com a coloração por vermelho de alizarina S e posterior escaneamento e quantificação das imagens utilizando o software ImageJ para detecção e quantificação da área corada em vermelho. As imagens das culturas foram obtidas a partir de sistema de captura de imagens acoplado a um microscópio invertido de contraste de fase em aumento de 10x. Imagens representativas dos grupos: (A) WC, (B) WMO, (C) WCV, (D) WNB, (E) SC, (F) SMO, (G) SCV, (H) SNB. (I): Quantificação da mineralização baseado na captura da área corada em vermelho através do software Image J. Os resultados foram mostrados como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por **** ($p < 0.0001$).

5.4 O tratamento com Nebivolol reduz a expressão gênica do receptor Adrb1 e Adrb2 em osteoblastos de Wistar

A expressão de receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos no 7º dia de diferenciação osteogênica foi avaliada nos grupos sem o tratamento prévio com a Isoprenalina. Para compreender a expressão gênica dos receptores sem o estímulo de um agente agonista. A expressão de receptores $\beta 1$ foi maior nos grupos WMO e SMO, comparados aos controles (fig. 4A). O tratamento com Nebivolol foi capaz de reduzir a expressão gênica dos receptores $\beta 1$ adrenérgico, apenas nas células de animais Wistar. A expressão do receptor $\beta 2$ -adrenérgico não foi alterada nos grupos WMO e SMO, comparados aos respectivos controles, entretanto, o tratamento com Nb reduziu sua expressão em ambas as linhagens de células.

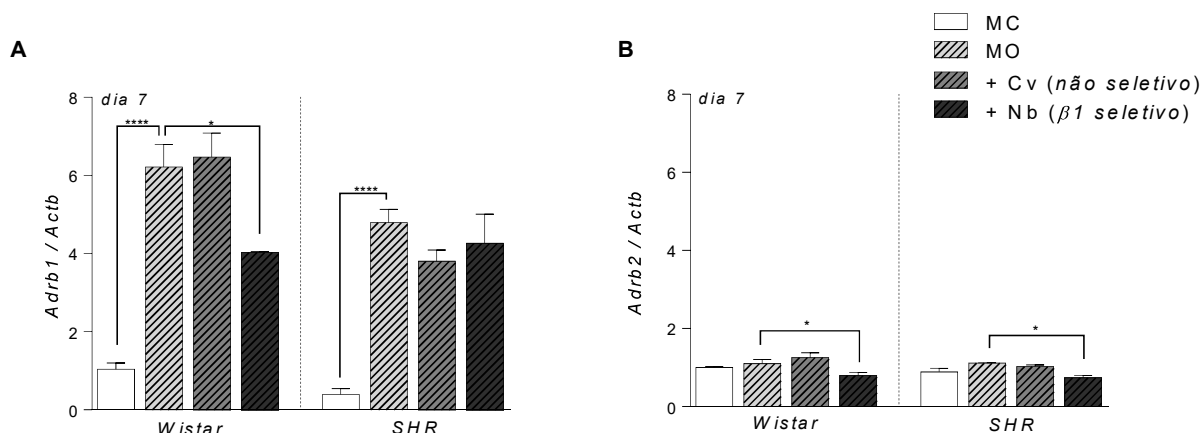


Figura 4: Quantificação relativa (RQ) da expressão gênica do receptor $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgico (Adrb1 e Adrb2). A expressão gênica do Adrb1 e Adrb2 foi avaliada no 7º dia após o início dos tratamentos, por RT-PCR em tempo real. O gene β -actina foi utilizado como controle endógeno para normalização dos demais alvos e as células de animais Wistar em meio controle foi considerado o grupo calibrador para os demais grupos. Os resultados foram mostrados como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por * ($p < 0.05$), *** ($p < 0.001$), e **** ($p < 0.0001$).

5.5 O bloqueio de receptores β -adrenérgicos reduz a expressão dos fatores de transcrição envolvidos na diferenciação osteoblástica

Posteriormente, no intuito de melhor compreender o efeito do Carvedilol e do Nebivolol mediante estímulo da Isoprenalina na diferenciação, avaliamos a expressão gênica de fatores de transcrição relacionados a diferenciação osteogênica, Runx2, Osterix e β -catenina (fig. 5). A Isoprenalina aumenta a expressão de todos os fatores de transcrição em ambas as linhagens, com exceção apenas de β -catenina em células Wistar. O tratamento prévio com Carvedilol reduz Runx2 em ambas as espécies, reduz Osterix apenas em Wistar e β -catenina apenas em SHR. O tratamento com Nebivolol reduz Runx2 e Osterix apenas em Wistar.

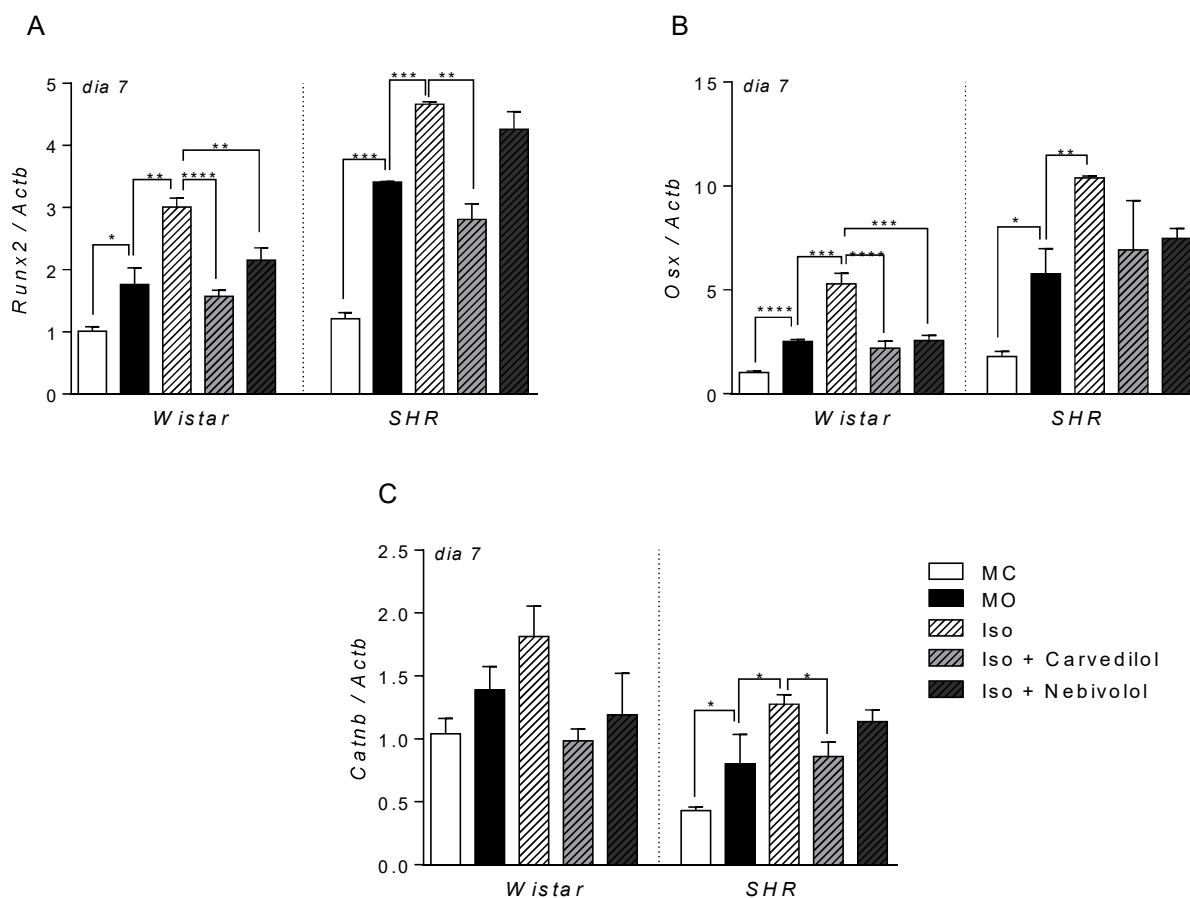


Fig. 5: Quantificação relativa (RQ) da expressão gênica de Runx2, Osterix e β -catenina nos grupos tratados com antagonistas Carvedilol e Nebivolol associados à isoprenalina. A expressão gênica dos fatores de transcrição Runx2, Osterix e β -catenina foi avaliada no 7º dia, após o início dos tratamentos, por RT-PCR em tempo real. O gene β -actina foi utilizado como controle endógeno para normalização dos demais alvos e as células de animais Wistar em meio controle foi considerado o grupo calibrador para os demais grupos. Os resultados foram mostrados como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), e **** (p<0.0001).

5.6 O bloqueio de receptores β -adrenérgicos reduz a expressão gênica de proteínas relacionadas à diferenciação osteogênica *in vitro*

Assim como os fatores de transcrição, as proteínas de matriz apresentaram expressão aumentada nos grupos WMO e SMO (fig. 6), e relação aos respectivos controles. A Isoprenalina aumenta a expressão de Opn, Ocn e BSP nas células de animais Wistar, e em SHR aumenta apenas Ocn. O tratamento com Carvedilol corrige o aumento das proteínas mediado pela Isoprenalina nas células de Wistar e nas células de SHR que tiveram a expressão de Ocn aumentada pela Isoprenalina. Na expressão de Opn, o Carvedilol mediou aumento de sua expressão nas células de SHR. Em relação ao Nebivolol, apenas nota-se redução da expressão de BSP em células de SHR.

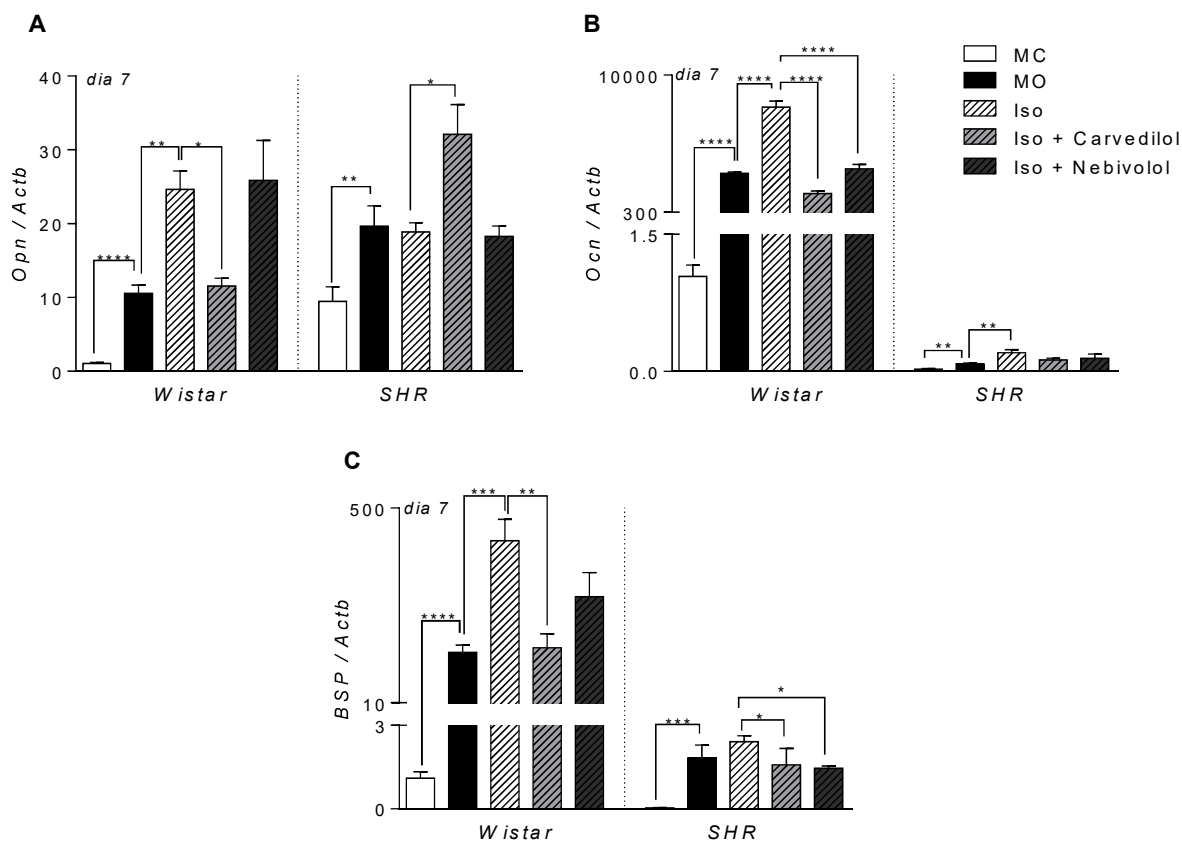


Fig. 6: Quantificação relativa (RQ) da expressão gênica de fosfatase alcalina (Alp), Osteopontina (Opm), Osteocalcina (Ocn) e Sialoproteína óssea (Bsp) nos grupos tratados apenas com antagonistas Carvedilol e Nebivolol (A-D) e associados à isoprenalina (E-G). As proteínas relacionadas ao processo de diferenciação osteogênica foram avaliadas no 7º dia, após o início dos tratamentos, por RT-PCR em tempo real. O gene β -actina foi utilizado como controle endógeno para normalização dos demais alvos e as células de animais Wistar em meio controle foi considerado o grupo calibrador para os demais grupos. Os resultados foram mostrados como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por * (p<0.05), ** (p<0.01), *** (p<0.001), e **** (p<0.0001).

5.7 O bloqueio seletivo β 1-adrenérgico reduz a atividade de MMP-2 em células de animais normotensos

No 7º dia após o início da diferenciação osteogênica foi avaliada a atividade de MMP-2 no sobrenadante das células em cultura tratadas apenas com os antagonistas adrenérgicos (fig. 7). Não observamos aumento nos grupos com MO, em relação aos controles, no período avaliado. O tratamento com Cv não levou a alterações na atividade da enzima, entretanto, Nebivolol promoveu redução na atividade da enzima em células de animais Wistar.

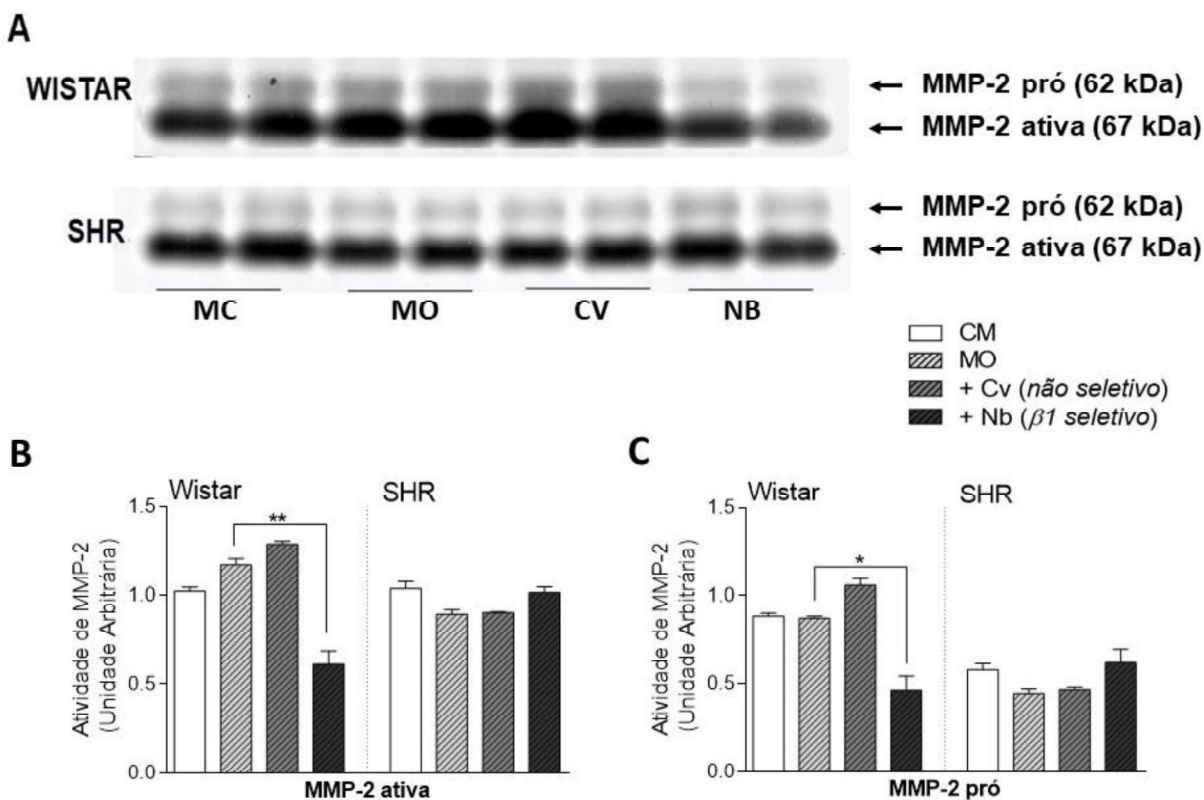


Fig. 7: Atividade da MMP-2 no sobrenadante de células tronco mesenquimais oriundas de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos após 7 dias de diferenciação osteogênica. A atividade de MMP-2 foi avaliada através do sobrenadante obtido das culturas ao final de 7 dias de diferenciação e tratamento. (A) Recorte da imagem original referente a posição das bandas de interesse (MMP-2), em escala de cinza e contraste automático. (B) Respective gráficos referentes as análises densitométricas, através do software Image J (v.1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD; USA). Os resultados são expressos como a média \pm erro padrão da média de cada grupo (n=3). Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por * (p<0.05) e ** (p<0.01).

5.8 O bloqueio do receptor $\beta 1$ adrenérgico reduz a fosforilação das vias da MAPK

Após 7 dias de diferenciação osteogênica procedeu-se a análise de proteínas fosforiladas da via da MAPK em células tratadas sem o agonista adrenérgico (fig. 8). No grupo WMO a fosforilação da p38 é reduzida em relação a WC, já grupo SMO observou-se redução de p-ERK, p-JNK e p-38, em relação a SC. Nas células de Wistar, o tratamento com Cv levou a redução significativa de p-ERK e p-JNK, enquanto o Nb reduziu apenas p-p38. Nas células de SHR não foi observado um perfil similar.

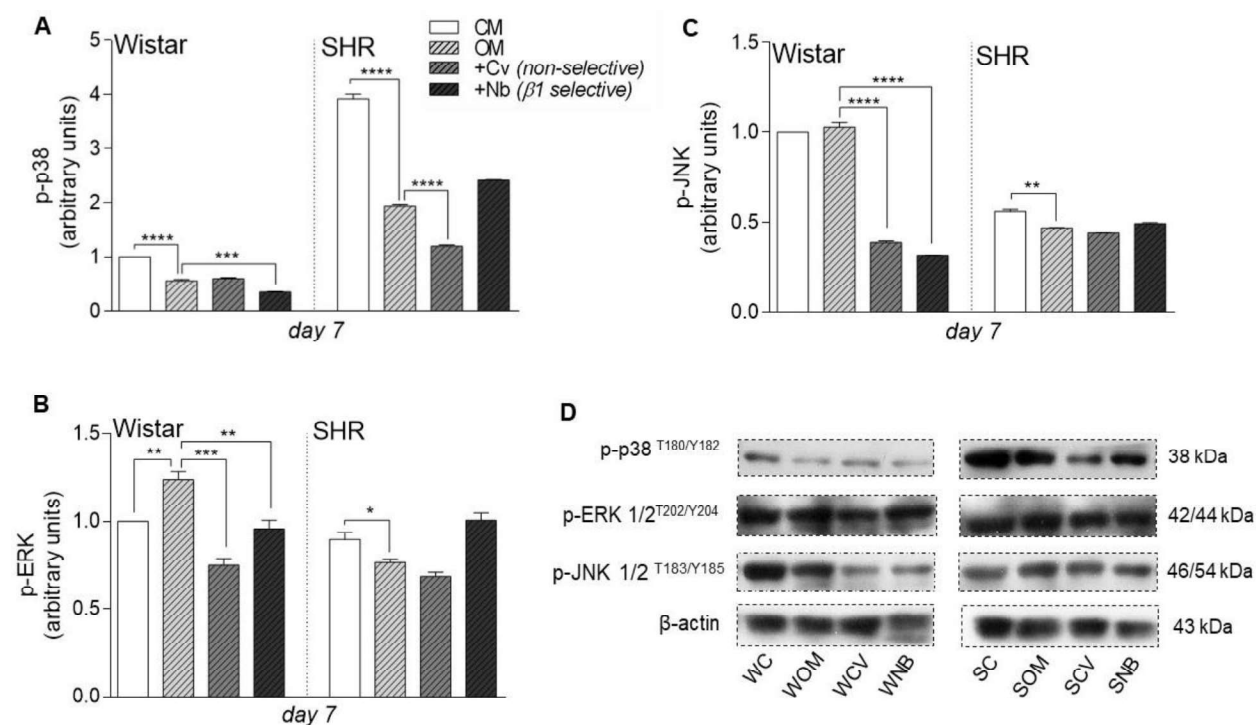


Fig. 8: Fosforilação das proteínas da sinalização MAPKs (pp38Thr180/Tyr182, pERK1/2Thr202/Tyr204, p-SAPK/JNKThr183/Tyr185) nas células-tronco mesenquimais da medula óssea após 7 dias da indução osteogênica por meio da técnica da Western Blot. Os filmes foram digitalizados e tiveram suas bandas de interesse recortadas e quantificadas através da análise densitométrica utilizando o software Image J (v.1.47, National Institutes of Health, Bethesda, MD; USA). A expressão relativa da proteína alvo foi determinada em relação à β -actina, usada como controle interno, da mesma amostra. Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média, sendo (A): pp38Thr180/Tyr182, (B): pERK1/2Thr202/Tyr204 e (C): p-SAPK/JNKThr183/Tyr185. Amostras em triplicata foram analisadas. Foi utilizado o teste one-way ANOVA para a comparação entre os grupos dentro do mesmo período e espécie com teste post-hoc de Dunnet. Valores significativos estão representados por * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$), *** ($p < 0.001$), e **** ($p < 0.0001$).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o papel dos receptores β -adrenérgicos na diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais da medula óssea de ratos normotensos e espontaneamente hipertensos. Nossos resultados sugerem que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos foi capaz de modular a expressão gênica de marcadores osteogênicos e o processo de mineralização biológica, especialmente em células de animais normotensos. Os experimentos inicialmente foram conduzidos utilizando uma droga agonista dos receptores β -adrenérgicos, entretanto, foi notado que sua participação era apenas um coadjuvante nas respostas, no sentido de que as respostas relevantes para alcançar o objetivo proposto eram mediadas principalmente pelos antagonistas, não sendo necessário portanto, o uso de Isoprenalina. A partir daí, os experimentos foram realizados utilizando apenas Carvedilol e Nebivolol, nas mesmas concentrações estabelecidas previamente, regidos pelo princípio de que é possível que exista um agonista adrenérgico endógeno na célula.

A participação dos receptores β -adrenérgicos no processo de formação e reabsorção óssea tem sido estudada buscando de elucidar os mecanismos envolvidos na integração neuro-osteogênica mediada pelo Sistema Nervoso Simpático. Estudos prévios demonstraram que o bloqueio dos receptores β -adrenérgicos através do uso de antagonistas resulta em efeito protetor contra agonistas adrenérgicos, descritos como potenciais comprometedores do metabolismo ósseo (Majeska et al. 1992; Frediani et al. 1996). Segundo os estudos de Pierroz et al. (2012) utilizando camundongos nocautes para os receptores adrenérgicos, *Adrb1* e *Adrb2* exercem efeitos opostos no

metabolismo ósseo, sendo o primeiro mais relacionado aos efeitos anabólicos enquanto que o segundo atua predominantemente na regulação da reabsorção óssea. Desta forma, o bloqueio dos receptores β_1 adrenérgicos culminaria em desequilíbrios no processo de diferenciação osteogênica, similar ao demonstrado por nossos resultados. A primeira fase do processo de diferenciação celular é a proliferação das células, o que posteriormente contribuirá para uma estrutura densa para a formação de matriz (Owen et al., 1990).

As células oriundas de ratos SHR demonstraram diferentes taxas de viabilidade celular em todos os grupos e períodos avaliados em relação às dos animais controle. Trabalhos prévios já demonstraram que fibroblastos isolados da aorta torácica e células musculares lisas de animais SHR apresentam hiperproliferação, levando a proposição de que células mesenquimais destes animais podem ser alteradas geneticamente em termos de proliferação (Battle, Arnal e Michel 1994). A introdução do meio osteogênico reduziu a viabilidade celular de ambas as linhagens em todos os períodos, o que pode ser explicado por estudos que demonstram que a proliferação das células não ocorre simultaneamente ao processo de diferenciação, ou seja, ao receber estímulos para se diferenciar, o processo de multiplicação celular é alterado em decorrência do comprometimento ao fenótipo de diferenciação (Brown, Hughes e Mitchell 2003).

O tratamento com o bloqueador seletivo β_1 adrenérgico não induziu mudanças significativas nos parâmetros de viabilidade celular. Entretanto, o bloqueio não seletivo dos receptores adrenérgicos mediado pelo Carvedilol propiciou aumento da viabilidade celular nas células de animais normotensos. Estudos recentes demonstraram que o Carvedilol tem efeito protetor contra a morte celular induzida por peróxido de

hidrogênio em células tronco de medula óssea. Este efeito pode ser decorrente de suas propriedades antioxidantes, o que melhora a sobrevivência celular e o estresse oxidativo em microambientes celulares (M. Chen, Chen e Lin 2016).

A fim de avaliar o processo da diferenciação celular, foi analisada a atividade de fosfatase alcalina, um marcador descrito como precursor da diferenciação osteoblástica. Esta enzima é expressa por células que se encaminham para a segunda fase do processo de formação óssea: a maturação da matriz extracelular (Owen et al. 1990; Weinreb, Shinar e Rodan 2009). Tal característica é coerente com nossos resultados, visto que os períodos com maior atividade da enzima são os períodos iniciais, com destaque ao grupo WMO, que atinge um pico ao sétimo dia. As células oriundas de animais hipertensos não demonstraram mudanças significativas ao longo dos períodos estudados, possivelmente devido à maior atividade proliferativa dessas células, como já discutido acima.

Estudos prévios investigaram o papel do propranolol (antagonista β -adrenérgico não seletivo) administrado isoladamente em culturas de ROS 17/2.8. Os resultados demonstraram que tal antagonista é capaz de induzir *per se* modificações intracelulares que culminam em alterações no processo de diferenciação celular, sendo uma dessas, redução na atividade de fosfatase alcalina (Majeska et al., 1992). Nossos resultados corroboram com tais achados, visto que o tratamento com β -bloqueadores foi capaz de reduzir a fosfatase alcalina nas células de animais normotensos, principalmente o bloqueio seletivo β_1 -adrenérgico, que acentuou esta resposta. Desta forma, é possível sugerir que o receptor β -adrenérgico pode estar envolvido na regulação da atividade enzimática de fosfatase alcalina em células de animais normotensos.

Seguindo a linha cronológica do processo, a terceira etapa da diferenciação osteogênica culmina na deposição de nódulos minerais, confirmando um estágio avançado de diferenciação celular (Owen et al., 1990). Nossos resultados refletem o padrão observado na atividade de fosfatase alcalina, na qual as células do grupo WMO foram capazes de formarem matriz mineral, ao contrário das células de SHR, que ao final de 14 dias ainda não demonstraram sinais de mineralização. Alguns autores associam a doença sistêmica inerente à linhagem hipertensa como possível cofator estimulante do turnover ósseo, gerando desordens osteometabólicas. (Barbagallo et al. 1991; Izawa et al. 1985). Além disso, estudos que avaliaram a diferenciação osteoblástica de animais espontaneamente hipertensos demonstram que a espécie é detentora de um atraso biológico na deposição de nódulos minerais ao longo de processo de diferenciação osteoblástica, possivelmente em decorrência da matriz extracelular de baixa qualidade sintetizada pelas células oriundas desses animais (Chaves Neto et al. 2018; Landim de Barros et al. 2016).

O bloqueio não seletivo do receptor β -adrenérgico reduziu parcialmente a mineralização das células dos animais Wistar. Isso demonstra que a redução de fosfatase alcalina apresentada por este grupo foi capaz de comprometer o processo de deposição mineral, porém, de maneira menos acentuada do que as células do grupo WNB. Tal receptor, apesar de ser descrito como pouco participativo no processo de remodelação óssea demonstrou ação diferencial em nosso estudo, principalmente nas células de animais normotensos (Gonzalez-Rozas, Dueñas-Laita e Perez-Castrillon 2015). O receptor *Adrb1* ainda tem seu papel pouco estudado no metabolismo ósseo. Grande parte dos autores atribuem os efeitos deletérios do SNS sobre o turnover ósseo

ao receptor $\beta 2$ (Ma et al. 2011; Huang et al. 2009). Com a finalidade de elucidar o papel de tal receptor, os estudos de Swift et al. (2014) demonstraram que o tratamento com Dobutamina (agonista $\beta 1$ -adrenérgico) foi capaz de preservar a massa óssea de ratos com desuso de membros inferiores. Além disso, o tratamento reduziu a apoptose de osteócitos e protegeu a densidade mineral óssea. Este trabalho corrobora com nossos resultados, visto que ao inibir o receptor $\beta 1$ a deposição mineral foi intensamente reduzida, demonstrando o papel fundamental desse receptor na homeostase mineral óssea.

A fim de confirmar a participação do receptor β -adrenérgico, foi caracterizada a expressão dos receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ adrenérgicos através do ensaio de qRT-PCR em tempo real para análise de sua expressão gênica nas células de ambas as linhagens de animais. Como esperado, a indução osteogênica aumentou a expressão do receptor do tipo 1 em ambas as linhagens, visto que este receptor está relacionado com processos anabólicos na massa óssea (Pierroz et al. 2012; Ma et al. 2011). Alguns autores relatam que a expressão de receptores $\beta 1$ -adrenérgicos não é detectável em algumas linhagens de células osteoblásticas (Bonnet, Pierroz e Ferrari 2008). Entretanto, a literatura é controversa neste quesito, visto que trabalhos prévios já demonstraram a expressão do receptor tipo 1 em algumas linhagens e em células osteoblásticas humanas (Kellenberger et al. 1998; Togari et al. 1997). O tratamento com Nebivolol reduziu a expressão gênica do receptor $\beta 1$ apenas no grupo WNB enquanto que ambos os tratamentos não induziram mudanças nas células de SHR. A expressão gênica do *Adrb2* foi reduzida com o Nebivolol. Estudos recentes mostraram que existe uma relação direta entre a expressão de ambos os receptores.

Experimentos com células de linhagem de cardiomiócitos de rato infectadas para super expressar ou reduzir a expressão de *Adrb1* demonstraram que quando *Arb1* está menos expresso, a expressão de *Adrb2* é significativamente diminuída (Shu et al., 2017). Além disso, Pierroz et al. (2012) relatou que a expressão de *Adrb2* é reduzida em camundongos *Arb1* $-/-$.

Recentemente tem sido discutido a participação do receptor Axl na biologia óssea, relacionado principalmente à casos metastáticos. Tal receptor é pertencente à categoria de receptores de tirosina quinase e liga-se também à noradrenalina, um agonista adrenérgico (Fujimori et al., 2015). O receptor Axl pode estar mediando as respostas celulares do grupo SHR, visto que ele está amplamente envolvido no remodelamento vascular de ratos hipertensos (Korshunov, Daul, Massett, & Berk, 2007). No entanto futuros estudos serão necessários para investigar a participação em nosso modelo SHR.

A formação óssea é um processo complexo envolvendo a diferenciação da célula tronco mesenquimal para a célula osteoblástica. Este processo requer múltiplos passos mediados por vias moleculares reguladas por diferentes fatores de transcrição e proteínas de sinalização (Zhang, 2010). Runx2 é o primeiro fator de transcrição requerido para a linhagem osteoblástica, induzindo a diferenciação das células mesenquimais para a linhagem de osteoblastos imaturos (Komori, 2009). Osterix é o segundo fator de transcrição mais importante no processo diferenciação, sendo ele *downstream* ao Runx2 (Nakashima et al., 2002). β -catenina é um cofator de transcrição *downstream* a via Wnt, além de ser essencial para a manutenção do fenótipo osteoblástico. A ausência deste fator nas células mesenquimais bloqueia a

diferenciação osteoblástica e encaminha as células para a diferenciação condroblástica. Portanto, Runx2 direciona a célula mesenquimal para a linhagem osteoblástica, enquanto que Osterix e β -catenina encaminham o pré-osteoblasto a osteoblasto imaturo garantindo que ele não se dirija à linhagem condrocítica (Komori, 2006). Em nossos resultados é possível demonstrar que todas as células tratadas com meio osteogênico estão definitivamente em vias de diferenciação, apesar de evidentes as diferenças de expressão gênica de fatores relacionados ao processo entre as células de animais normotensos e espontaneamente hipertensos, como já demonstrado em trabalhos prévios do nosso grupo (Landim de Barros et al., 2016). O grupo WCv apresentou uma redução de todos os fatores de transcrição avaliados enquanto que no grupo SCv houve redução apenas de Runx2. O grupo WNb também apresentou redução da expressão de todos os fatores, diferente do grupo SNb, cuja redução foi apenas na expressão de Osx. Alguns trabalhos já associaram a participação dos β -receptores aos fatores de transcrição expressos durante o processo de diferenciação osteogênica. Segundo Hajifathali et al. (2014) os receptores adrenérgicos controlam a resposta intracelular de PKA, responsável por fosforilar proteínas alvo como fatores de transcrição e kinases, modulando sua expressão. Desta forma, nossos resultados sugerem que os efeitos negativos na diferenciação osteoblástica causados pelo β -bloqueio podem ser devido a regulação negativa dos fatores de transcrição, principalmente nas células de animais normotensos, destacando um possível mecanismo que atua diferencialmente entre as linhagens.

A diferenciação osteogênica compreende proteínas que demarcam os estágios do processo de maneira temporal, como por exemplo, a osteopontina, responsável pela

adesão celular e a osteocalcina, que se liga ao cálcio para promover deposição mineral (Ganss et al., 1999; Singh et al., 1999; Lian et al., 1998). Em nossos resultados é possível visualizar que Opn e Ocn estão aumentadas nos grupos WMO e SMO, entretanto, o tratamento com Carvedilol reduziu a expressão de Opn no grupo Wistar e o tratamento com Nebivolol não ocasionou mudanças. Isto sugere que para a expressão de Opn nas células de animais Wistar se faz necessário a expressão do receptor β 2-adrenérgico. No metabolismo ósseo, Opn regula a sinalização do Adrb2 a nível intracelular fazendo com que aconteça possíveis aumentos na atividade osteoclástica e redução na atividade osteoblástica através da modulação do Adrb2. Portanto, a Opn pode ser um regulador chave da massa óssea através do tônus simpático (Nagao et al., 2011).

A osteocalcina é uma proteína que se liga ao cálcio com a finalidade de promover deposição mineral (Lian et al., 1998). Nossos resultados mostraram aumento da expressão de Ocn apenas no grupo WMO. O tratamento com ambos os antagonistas foi capaz de modular e reduzir a expressão de Ocn apenas no grupo Wistar. Alguns autores relataram que o tratamento com antagonistas β -adrenérgicos é capaz de induzir mudanças na expressão de c-fos, o que pode ter consequências na regulação de genes como osteocalcina, resultando em efeitos no crescimento e remodelamento ósseo (Kellenberger et al., 1998).

A sialoproteína óssea (BSP) é um componente exclusivo de tecidos mineralizados, atuando como potencial nucleador de hidroxiapatita e um marcador específico da diferenciação osteoblástica (Ganss, Kim e Sodek 1999). Nossos resultados demonstraram o papel promotor e esperado para a BSP nas células do

grupo WMO, entretanto, o mesmo não foi observado no grupo SMO. O tratamento com β -bloqueador seletivo resultou em significativa redução da expressão de BSP, sugerindo que o receptor *Adrb1* é necessário para a expressão de BSP. Possivelmente, tal expressão é dependente de cAMP, o que já foi demonstrado por estudos utilizando tratamento com paratormônio (PTH) em células de linhagem ROS 17/2.8 (Shimizu et al., 2006)

A proteína morfogenética óssea (*Bmp2*) tem, como papel fundamental, induzir a diferenciação de células mesenquimais à linhagem osteoblástica e, conseqüentemente, promover a função e maturação osteoblástica (Rosen, 2009). Nossos resultados mostraram que ambos os grupos, WMO e SMO tiveram um aumento na expressão de *Bmp2*, porém menos pronunciado em SMO. Ambos os tratamentos com β -bloqueadores foram capaz de reduzir a expressão de *Bmp2* apenas no grupo Wistar. Não foram encontradas evidências que associem a expressão de *Bmp2* à via adrenérgica, entretanto é sábio que *Bmp2* tem sua atividade mediada por *Runx2*, e ambos mostraram um perfil de expressão similar sugerindo que existe uma associação entre eles (Canalis et al., 2003).

Metaloproteinases são enzimas capazes de degradar a matriz orgânica óssea através de sua atividade proteolítica. Vários tipos de MMPs já foram identificados em mamíferos, entretanto, o processo de remodelamento ósseo tem como background a participação da MMP-2 e MMP-9 (Kusano et al., 1998). A MMP-2 desempenha papel fundamental na osteogênese. Estudos prévios demonstraram que camundongos *Mmp-2* *-/-* exibem progressiva perda da densidade mineral óssea e crescimento anormal dos ossos (Mosig et al., 2007). Outros autores também demonstraram que a atividade de

MMP-2 está relacionada ao estímulo de receptores β -adrenérgicos em carcinomas, demonstrando que existe uma associação estreita entre a atividade enzimática de metaloproteinase 2 e receptores β -adrenérgicos (Yang et al. 2006; Cole and Sood 2012). Dessa maneira, nossos resultados mostram que o bloqueio seletivo β 1-adrenérgico em células de ratos Wistar é responsável pela diminuição da atividade de MMP-2 e conseqüentemente, pela redução da deposição mineral mostrada previamente.

Após a elucidação do efeito mediado pelo bloqueio do receptor β 1 em células osteoblásticas de animais normotensos, surgiu a necessidade de avaliar o envolvimento das vias da MAPK para esclarecer quais mecanismos atuam diferencialmente entre as espécies na tentativa de compreender as respostas distintas observadas entre elas. Os resultados obtidos demonstraram um efeito antagônico do Nebivolol entre as células de Wistar e SHR. Na linhagem de células Wistar o Nebivolol promoveu a redução da fosforilação das proteínas, enquanto que na linhagem hipertensa foi observado aumento da fosforilação.

Trabalhos já mostraram a participação das referidas MAPK na diferenciação osteogênica in vitro, sendo possível associar diferenças observadas entre as células de Wistar e SHR às alterações da diferenciação no modelo (Landim de Barros et al., 2016). Entretanto, em se tratando de vias intimamente ligadas a sobrevivência, proliferação e resposta ao estresse em diferentes condições experimentais, é pouco provável evidenciar uma via de sinalização a qual possa ser atribuída maior significância, mas sim considerar a soma dos efeitos da ativação conjunta das mesmas (Zhang e Liu 2002).

O meio osteogênico é descrito como potencial ativador de ERK, sendo sua inibição potencialmente prejudicial para a diferenciação osteoblástica e mineralização (Jaiswal et al., 2000). A ativação de JNK e p38 também se fazem necessárias para a diferenciação de células osteoprogenitoras, sendo a ativação de ERK prévia à ativação de p38 e JNK (Y. Hu et al. 2003; Jaiswal et al. 2000). Nossos resultados mostraram que a redução da fosforilação de tais vias está, de fato, correlacionada a redução da diferenciação celular, como observado nos grupos SMO. O atraso biológico da diferenciação das células da espécie hipertensa pode justificar a baixa ativação de ERK, a qual apresenta maior atividade nos períodos iniciais da diferenciação, bem como na etapa proliferativa (A Suzuki et al., 2002). O Nebivolol e o Carvedilol atuaram de maneira similar nos grupos WNb e WCv, o que culminou efeitos negativos sobre a diferenciação das células. A atividade de p38 e JNK é descrita como mais tardia durante o processo de diferenciação (A Suzuki et al., 2002). Entretanto, os efeitos deletérios causados pelos antagonistas β -adrenérgicos nas células de animais Wistar são visíveis, reforçando o envolvimento da via adrenérgica com as vias regulatórias de proliferação e diferenciação da célula. Apesar de negativamente influenciar a diferenciação das células de Wistar, os antagonistas β -adrenérgicos mostraram nas células de SHR modular a fosforilação das proteínas MAPK de maneira a aproximá-las do controle basal. Tratando-se de uma célula detentora de atrasos em seu metabolismo pode-se sugerir de que os antagonistas adrenérgicos exerçam um papel deletério no desenvolvimento dessa célula quando a mesma atinge a maturidade análoga à sua espécie progenitora.

Tomados em conjunto nossos dados sugerem que o receptor β -adrenérgico atua de maneira fundamental na diferenciação osteogênica de células de animais Wistar. Em contrapartida, em células da espécie hipertensas o papel de tal receptor é menor, possivelmente devido ao atraso biológico da célula ou pela sua condição patológica. Futuros estudos são necessários para elucidar tal diferença nas respostas mediadas por estes receptores e se há uma via intracelular responsável por modular seu papel.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

O receptor β -adrenérgico está envolvido na diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais de ratos normotensos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aubin, J. E. (2001). Regulation of Osteoblast Formation and Function. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2(1), 81–94.
<https://doi.org/10.1023/A:1010011209064>
- Augello, A., & De Bari, C. (2010). The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Human Gene Therapy*, 21(10), 1226–1238.
<https://doi.org/10.1089/hum.2010.173>
- Barbagallo, M., Quaini, F., Baroni, M. C., Barbagallo, C. M., Boiardi, L., Passeri, G., ... Passeri, M. (1991). Histological evidence of increased turnover in bone from spontaneously hypertensive rats. *Cardioscience*, 2(1), 15–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1888878>
- Battle, T., Arnal, J.-F., & Michel, J.-B. (1994). HYPERPROLIFERATION OF AORTIC SMOOTH MUSCLE CELLS AND FIBROBLASTS FROM YOUNG SHR RATS IS NOT SHARED BY ENDOTHELIAL CELLS. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 21(12), 981–989. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1681.1994.tb02660.x>
- Bellido, T., & Hill Gallant, K. M. (2014). Basic and Applied Bone Biology 15. In *Basic and Applied Bone Biology*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416015-6.00015-0>
- Bonnet, N., Pierroz, D. D., & Ferrari, S. L. (2008). Adrenergic control of bone remodeling and its implications for the treatment of osteoporosis. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 8(2), 94–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18622078>
- Brown, G., Hughes, P. J., & Michell, R. H. (2003). Cell differentiation and proliferation—simultaneous but independent? *Experimental Cell Research*, 291(2), 282–288.
[https://doi.org/10.1016/S0014-4827\(03\)00393-8](https://doi.org/10.1016/S0014-4827(03)00393-8)
- Canalis, E., Economides, A. N., & Gazzerro, E. (2003). Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocrine Reviews*, Vol. 24, pp. 218–235.
<https://doi.org/10.1210/er.2002-0023>
- Castillo, A. B., Triplett, J. W., Pavalko, F. M., & Turner, C. H. (2014). Estrogen receptor- β regulates mechanical signaling in primary osteoblasts. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 306(8), E937–E944.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00458.2013>
- Chaves Neto, A. H., Brito, V. G. B., Landim de Barros, T., do Amaral, C. C. F., Sumida, D. H., & Oliveira, S. H. P. (2018a). Chronic high glucose and insulin stimulate bone-marrow stromal cells adipogenic differentiation in young spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6853–6865.
<https://doi.org/10.1002/jcp.26445>
- Chaves Neto, A. H., Brito, V. G. B., Landim de Barros, T., do Amaral, C. C. F., Sumida,

- D. H., & Oliveira, S. H. P. (2018b). Chronic high glucose and insulin stimulate bone-marrow stromal cells adipogenic differentiation in young spontaneously hypertensive rats. *Journal of Cellular Physiology*, 233(9), 6853–6865. <https://doi.org/10.1002/jcp.26445>
- Chen, D., & Wang, Z. (2017). Adrenaline inhibits osteogenesis via repressing miR-21 expression. *Cell Biology International*, 41(1), 8–15. <https://doi.org/10.1002/cbin.10685>
- Chen, M., Chen, S., & Lin, D. (2016). Carvedilol protects bone marrow stem cells against hydrogen peroxide-induced cell death via PI3K-AKT pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 78, 257–263. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.01.008>
- Cole, S. W., & Sood, A. K. (2012). Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(5), 1201–1206. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0641>
- Contaldo, C., Myers, T. J., Zucchini, C., Manara, M. C., Chiodoni, C., Colombo, M. P., ... Spagnoli, A. (2014). Expression levels of insulin receptor substrate-1 modulate the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and osteosarcoma cells. *Growth Factors*, 32(1), 41–52. <https://doi.org/10.3109/08977194.2013.870168>
- Fakhry, M. (2013). Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. *World Journal of Stem Cells*, 5(4), 136. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v5.i4.136>
- Frediani, U., Becherini, L., Lasagni, L., Tanini, A., & Brandi, M. L. (1996). Catecholamines modulate growth and differentiation of human preosteoclastic cells. *Osteoporosis International: A Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 6(1), 14–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8845594>
- Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., & Keiliss-Borok, I. V. (1974). Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*. <https://doi.org/10.1097/00007890-197404000-00001>
- Fujimori, T., Grabiec, A. M., Kaur, M., Bell, T. J., Fujino, N., Cook, P. C., ... Hussell, T. (2015). The Axl receptor tyrosine kinase is a discriminator of macrophage function in the inflamed lung. *Mucosal Immunology*, 8(5), 1021–1030. <https://doi.org/10.1038/mi.2014.129>
- Ganss, B., Kim, R. H., & Sodek, J. (1999). Bone Sialoprotein. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 10(1), 79–98. <https://doi.org/10.1177/10454411990100010401>
- Gonzalez-Rozas, M., Dueñas-Laita, A., & Perez-Castrillon, J. L. (2015). The β -Adrenergic System and Bone Mineral Remodeling. *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism*, 13(3), 114–124. <https://doi.org/10.1007/s12018-015-9183-z>

- Hajifathali, A., Saba, F., Atashi, A., Soleimani, M., Mortaz, E., & Rasekhi, M. (2014). The role of catecholamines in mesenchymal stem cell fate. *Cell and Tissue Research*, 358(3), 651–665. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1984-8>
- Hoang, Q. Q., Sicheri, F., Howard, A. J., & Yang, D. S. C. (2003). Bone recognition mechanism of porcine osteocalcin from crystal structure. *Nature*, 425(6961), 977–980. <https://doi.org/10.1038/nature02079>
- Hu, K., & Olsen, B. R. (2016). Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *Journal of Clinical Investigation*, 126(2), 509–526. <https://doi.org/10.1172/JCI82585>
- Hu, Y., Chan, E., Wang, S. X., & Li, B. (2003). Activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Is Required for Osteoblast Differentiation. *Endocrinology*, 144(5), 2068–2074. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220863>
- Huang, H. H., Brennan, T. C., Muir, M. M., & Mason, R. S. (2009). Functional α 1- and β 2-adrenergic receptors in human osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology*, 220(1), 267–275. <https://doi.org/10.1002/jcp.21761>
- Izawa, Y., Sagara, K., Kadota, T., & Makita, T. (1985). Bone disorders in spontaneously hypertensive rat. *Calcified Tissue International*, 37(6), 605–607. <https://doi.org/10.1007/BF02554916>
- Jaiswal, R. K., Jaiswal, N., Bruder, S. P., Mbalaviele, G., Marshak, D. R., & Pittenger, M. F. (2000). Adult Human Mesenchymal Stem Cell Differentiation to the Osteogenic or Adipogenic Lineage Is Regulated by Mitogen-activated Protein Kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 275(13), 9645–9652. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.13.9645>
- Kellenberger, S., Muller, K., Richener, H., & Bilbe, G. (1998). Formoterol and isoproterenol induce c-fos gene expression in osteoblast-like cells by activating beta2-adrenergic receptors. *Bone*, 22(5), 471–478. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9600780>
- Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 99(5), 1233–1239. <https://doi.org/10.1002/jcb.20958>
- Komori, T. (2009). *Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2*. https://doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9_5
- Kondo, H., & Togari, A. (2011). Continuous Treatment with a Low-Dose β -Agonist Reduces Bone Mass by Increasing Bone Resorption Without Suppressing Bone Formation. *Calcified Tissue International*, 88(1), 23–32. <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9421-9>
- Korshunov, V. A., Daul, M., Massett, M. P., & Berk, B. C. (2007). Axl mediates vascular remodeling induced by deoxycorticosterone acetate-salt hypertension. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 50(6), 1057–1062. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.096289>

- Kusano, K., Miyaura, C., Inada, M., Tamura, T., Ito, A., Nagase, H., ... Suda, T. (1998). Regulation of Matrix Metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by Interleukin-1 and Interleukin-6 in Mouse Calvaria: Association of MMP Induction with Bone Resorption¹. *Endocrinology*, *139*(3), 1338–1345. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5818>
- Landim de Barros, T., Brito, V. G. B., do Amaral, C. C. F., Chaves-Neto, A. H., Campanelli, A. P., & Oliveira, S. H. P. (2016). Osteogenic markers are reduced in bone-marrow mesenchymal cells and femoral bone of young spontaneously hypertensive rats. *Life Sciences*, *146*, 174–183. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.01.015>
- Lian, J. B., Stein, G. S., Stein, J. L., & van Wijnen, A. J. (1998). Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, *30–31*, 62–72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9893257>
- Lin, Y. Y., Chen, C. Y., Chuang, T. Y., Lin, Y., Liu, H. Y., Mersmann, H. J., ... Ding, S. T. (2014). Adiponectin receptor 1 regulates bone formation and osteoblast differentiation by GSK-3 β / β -Catenin signaling in mice. *Bone*, *64*, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2014.03.051>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Lowry. (1951). Lowry Protein Assay. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1021/jf1005935>.
- Ma, Y., Nyman, J. S., Tao, H., Moss, H. H., Yang, X., & Elefteriou, F. (2011a). β 2-Adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone. *Endocrinology*, *152*(4), 1412–1422. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0881>
- Ma, Y., Nyman, J. S., Tao, H., Moss, H. H., Yang, X., & Elefteriou, F. (2011b). β 2-Adrenergic Receptor Signaling in Osteoblasts Contributes to the Catabolic Effect of Glucocorticoids on Bone. *Endocrinology*, *152*(4), 1412–1422. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0881>
- Majeska, R. J., Minkowitz, B., Bastian, W., & Einhorn, T. A. (1992). Effects of β -adrenergic blockade in an osteoblast-like cell line. *Journal of Orthopaedic Research*, *10*(3), 379–384. <https://doi.org/10.1002/jor.1100100310>
- Moore, R. E., Smith, C. K., Bailey, C. S., Voelkel, E. F., & Tashjian, A. H. (1993). Characterization of beta-adrenergic receptors on rat and human osteoblast-like cells and demonstration that beta-receptor agonists can stimulate bone resorption in organ culture. *Bone and Mineral*, *23*(3), 301–315. [https://doi.org/10.1016/S0169-6009\(08\)80105-5](https://doi.org/10.1016/S0169-6009(08)80105-5)
- Moriya, S., Hayata, T., Notomi, T., Aryal, S., Nakamaoto, T., Izu, Y., ... Noda, M. (2015). PTH Regulates β 2-Adrenergic Receptor Expression in Osteoblast-Like

- MC3T3-E1 Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(1), 142–148.
<https://doi.org/10.1002/jcb.24953>
- Mosig, R. A., Dowling, O., DiFeo, A., Ramirez, M. C. M., Parker, I. C., Abe, E., ... Martignetti, J. A. (2007). Loss of MMP-2 disrupts skeletal and craniofacial development and results in decreased bone mineralization, joint erosion and defects in osteoblast and osteoclast growth. *Human Molecular Genetics*, 16(9), 1113–1123. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm060>
- Nagao, M., Feinstein, T. N., Ezura, Y., Hayata, T., Notomi, T., Saita, Y., ... Noda, M. (2011). Sympathetic control of bone mass regulated by osteopontin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(43), 17767–17772. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109402108>
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrugge, B. (2002). The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell*, 108(1), 17–29. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00622-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00622-5)
- Nefussi, J. R., Bрами, G., Modrowski, D., Obcuf, M., & Forest, N. (1997). Sequential Expression of Bone Matrix Proteins During Rat Calvaria Osteoblast Differentiation and Bone Nodule Formation In Vitro. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 45(4), 493–503. <https://doi.org/10.1177/002215549704500402>
- Orwoll, E. S., Stribrska, L., Ramsey, E. E., & Keenan, E. J. (1991). Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcified Tissue International*, 49(3), 183–187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1933584>
- Owen, T. A., Aronow, M., Shalhoub, V., Barone, L. M., Wilming, L., Tassinari, M. S., ... Stein, G. S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology*, 143(3), 420–430. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041430304>
- Pierroz, D. D., Bonnet, N., Bianchi, E. N., Bouxsein, M. L., Baldock, P. A., Rizzoli, R., & Ferrari, S. L. (2012a). Deletion of β -adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(6), 1252–1262. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1594>
- Pierroz, D. D., Bonnet, N., Bianchi, E. N., Bouxsein, M. L., Baldock, P. A., Rizzoli, R., & Ferrari, S. L. (2012b). Deletion of β -adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27(6), 1252–1262. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1594>
- Pun, K. K., Lau, P., & Ho, P. W. M. (2009). The characterization, regulation, and function of insulin receptors on osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. *Journal of Bone and Mineral Research*, 4(6), 853–862. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650040610>
- Quarles, L. D., Yohay, D. A., Lever, L. W., Caton, R., & Wenstrup, R. J. (2009). Distinct

- proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: An in vitro model of osteoblast development. *Journal of Bone and Mineral Research*, 7(6), 683–692. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650070613>
- Rosen, V. (2009). BMP2 signaling in bone development and repair. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, Vol. 20, pp. 475–480. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2009.10.018>
- Ruths, S., Bakken, M. S., Ranhoff, A. H., Hunskaar, S., Engesæter, L. B., & Engeland, A. (2015). Risk of hip fracture among older people using antihypertensive drugs: a nationwide cohort study. *BMC Geriatrics*, 15(1), 153. <https://doi.org/10.1186/s12877-015-0154-5>
- Shimizu, E., Nakayama, Y., Nakajima, Y., Kato, N., Takai, H., Kim, D. S., ... Ogata, Y. (2006). Fibroblast growth factor 2 and cyclic AMP synergistically regulate bone sialoprotein gene expression. *Bone*, 39(1), 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2005.12.011>
- Shoulders, M. D., & Raines, R. T. (2009). Collagen Structure and Stability. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1), 929–958. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833>
- Shu, J. X., Wen, G. Y., Liu, H. Y., Zhong, J., Chen, Z. Y., Huang, L. H., ... Yuan, H. (2017). Relationship between the β 1-adrenergic receptor and the β 2-adrenergic receptor in hypertension. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 10(3), 3949–3956.
- Simão, A. M. S., Beloti, M. M., Cezarino, R. M., Rosa, A. L., Pizauro, J. M., & Ciancaglini, P. (2007). Membrane-bound alkaline phosphatase from ectopic mineralization and rat bone marrow cell culture. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 679–687. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.05.008>
- Singh, K., Sirokman, G., Communal, C., Robinson, K. G., Conrad, C. H., Brooks, W. W., ... Colucci, W. S. (1999). Myocardial osteopontin expression coincides with the development of heart failure. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 33(2), 663–670. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10024324>
- Sodek, J., Ganss, B., & McKee, M. D. (2000). Osteopontin. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 11(3), 279–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021631>
- Suzuki, A., Guicheux, J., Palmer, G., Miura, Y., Oiso, Y., Bonjour, J. P., & Caverzasio, J. (2002). Evidence for a role of p38 MAP kinase in expression of alkaline phosphatase during osteoblastic cell differentiation. *Bone*, 30(1), 91–98. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792570>
- Suzuki, Atsushi, Palmer, G., Bonjour, J.-P., & Caverzasio, J. (1999). Regulation of Alkaline Phosphatase Activity by p38 MAP Kinase in Response to Activation of Gi Protein-Coupled Receptors by Epinephrine in Osteoblast-Like Cells ¹.

- Endocrinology*, 140(7), 3177–3182. <https://doi.org/10.1210/endo.140.7.6857>
- Swift, J. M., Swift, S. N., Allen, M. R., & Bloomfield, S. A. (2014). Beta-1 Adrenergic Agonist Treatment Mitigates Negative Changes in Cancellous Bone Microarchitecture and Inhibits Osteocyte Apoptosis during Disuse. *PLoS ONE*, 9(9), e106904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106904>
- Takeuchi, T., Tsuboi, T., Arai, M., & Togari, A. (2001). Adrenergic stimulation of osteoclastogenesis mediated by expression of osteoclast differentiation factor in MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Biochemical Pharmacology*, 61(5), 579–586. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(00\)00591-8](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(00)00591-8)
- Tang, D.-Z., Hou, W., Zhou, Q., Zhang, M., Holz, J., Sheu, T.-J., ... Wang, Y.-J. (2010). Osthole stimulates osteoblast differentiation and bone formation by activation of β -catenin-BMP signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 25(6), 1234–1245. <https://doi.org/10.1002/jbmr.21>
- Togari, A. (2002). Adrenergic regulation of bone metabolism: Possible involvement of sympathetic innervation of osteoblastic and osteoclastic cells. *Microscopy Research and Technique*, 58(2), 77–84. <https://doi.org/10.1002/jemt.10121>
- Togari, A., & Arai, M. (2008). Pharmacological topics of bone metabolism: the physiological function of the sympathetic nervous system in modulating bone resorption. *Journal of Pharmacological Sciences*, 106(4), 542–546. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18431037>
- Togari, A., Arai, M., Mizutani, S., Mizutani, S., Koshihara, Y., & Nagatsu, T. (1997). Expression of mRNAs for neuropeptide receptors and β -adrenergic receptors in human osteoblasts and human osteogenic sarcoma cells. *Neuroscience Letters*, 233(2–3), 125–128. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)00649-6](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)00649-6)
- Touw, K. B., Haywood, J. R., Shaffer, R. A., & Brody, M. J. (1980). Contribution of the sympathetic nervous system to vascular resistance in conscious young and adult spontaneously hypertensive rats. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 2(4), 408–418. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7399624>
- Weinreb, M., Shinar, D., & Rodan, G. A. (2009). Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(8), 831–842. <https://doi.org/10.1002/jbmr.5650050806>
- Yang, J., Zhang, X., Wang, W., & Liu, J. (2010). Insulin stimulates osteoblast proliferation and differentiation through ERK and PI3K in MG-63 cells. *Cell Biochemistry and Function*, 28(4), 334–341. <https://doi.org/10.1002/cbf.1668>
- Yang, E. V., Sood, A. K., Chen, M., Li, Y., Eubank, T. D., Marsh, C. B., ... Glaser, R. (2006). Norepinephrine up-regulates the expression of vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase (MMP)-2, and MMP-9 in nasopharyngeal carcinoma tumor cells. *Cancer Research*, 66(21), 10357–10364. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-2496>

Zhang, C. (2010). Transcriptional regulation of bone formation by the osteoblast-specific transcription factor *Osx*. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, 5, 37.
<https://doi.org/10.1186/1749-799X-5-37>

ZHANG, W., & LIU, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, 12(1), 9–18.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>