

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Efeito do Ranelato de Estrôncio em cultura bidimensional de osteoblastos primários e imortalizados, e em cultura tridimensional, sobre *scaffolds* de Osso Bovino Trabeculado

Cristiane Aparecida de Sousa

Belo Horizonte
2014

Cristiane Aparecida de Sousa

Efeito do Ranelato de Estrôncio em cultura bidimensional de osteoblastos primários e imortalizados, e em cultura tridimensional, sobre *scaffolds* de Osso Bovino Trabeculado

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Prof. Dra. Erika Cristina Jorge

Co-orientadora: Prof. Dra. Gerluza A. B. Silva

Belo Horizonte

2014

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento em parceria com o Laboratório de Biologia Celular e Molecular, do Departamento de Morfologia e com o Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, com apoio financeiro da CAPES, CNPQ e FAPEMIG.

Orientadora: Prof. Dra. Erika Cristina Jorge

Co-orientadora: Prof. Dra. Gerluza A. B. Silva



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE

CRISTIANE APARECIDA DE SOUSA

258/2014/13
entrada
2º/2012
2012750916

As quatorze horas do dia 23 de julho de 2014, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Dissertação, indicada pelo Colegiado de Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "Efeito do ranelato de estrôncio em cultura bidimensional de osteoblastos primários e imortalizados e em cultura tridimensional, em scaffold de osso bovino trabeculado", requisito final para obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, área de concentração: **Biologia Celular**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Erika Cristina Jorge**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	APROVADA
Dra. Kátia Lucy de Melo Maltos	UFMG	APROVADA
Dra. Cynthia Lopes Ferreira	Universidade de Itáina	aprovada

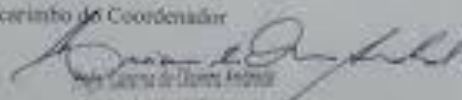
Pelas indicações, a candidata foi considerada: APROVADA
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 23 de julho de 2014.**

Dra. Erika Cristina Jorge (Orientadora) Erika Cristina Jorge

Dra. Kátia Lucy de Melo Maltos Kátia Lucy de Melo Maltos

Dra. Cynthia Lopes Ferreira Cynthia Lopes Ferreira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador


Prof.ª Luciana de Moraes Andrade
Sub-Coordenadora do Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular (PBC)

*À minha mãe
pela presença e apoio;
À tia Vandinha, por tudo
e pela vida de Ana Flávia,
minha afilhada querida e amada, e
ao meu irmão, pelas lutas vida afora!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o doutor de todos os doutores, por me dar força e amparo ao longo do caminho, e à Nossa Senhora, que em muitos momentos me cobriu com seu manto e me fez suportar dores e frustrações!

À Dra. Erika, por ter me orientado e ter me dado força nos momentos em que tudo dava errado: “Vamos lá Cris!”! E também pela paciência diante de minhas limitações. Foram dois anos difíceis, mas de muito aprendizado!

À Dra. Gerluza pelos anos de convívio, por ter proporcionado minha entrada na pesquisa e pelo grande exemplo de solidariedade, humanidade e doação;

À Dra. Kátia que tanto me ensinou, quando eu iniciava minhas investidas na cultura celular e à Dra. Tarcília da Faculdade de Odontologia da UFMG, que me acolheu em seu laboratório e me ajudou na padronização das quantificações;

Ao Museu de Ciências Morfológicas da UFMG por ter me tornado um ser humano melhor e por toda a oportunidade de aprendizado. Aqui começou e onde ainda está uma grande família. Muito obrigada Dra. Maria das Graças, Graciela, Goretti, Sandra e Rozângela, pela amizade e carinho de sempre;

Agradeço a todos os meus familiares, por terem me apoiado nos momentos mais difíceis e por me aturarem nos momentos de mau humor. À minha mãe, que a seu modo cuida de mim e me dá o suporte necessário para continuar a cada dia. À tia K, pelo carinho e delicadeza, à tia Vandinha, pelo amor, apoio e força, e à tia Sônia e tio Paulinho, que me acolheram em sua casa e me deram a estrutura para estar aqui;

A todos os membros do Laboratório de Biologia Oral e do Desenvolvimento, pelo convívio diário, por todo apoio e amizade! Obrigada em especial, ao Chico, à Íria e ao Igor, que mesmo de longe é tão presente. Também ao Bruno e ao Juliano por toda ajuda e apoio. E ao Rayan, por tornar meus dias mais alegres e divertidos e ao Carlos, por toda a competência e colaboração na edição das imagens!

À Dra. Cynthia pela força, fé e incentivo e ao Dr. Fernando, que é para mim um exemplo de vida, de dedicação e de otimismo, que muito me ensina com seu amor pela pesquisa;

Aos amigos da Pós-graduação, em especial ao Marcos e ao Paulo, à Tati, à Prica, ao Matheus, à Luana, à Patrícia, à Mônica e a todos que me ajudaram de alguma forma.

À Família Maia, por ter me acolhido com tanto carinho, especialmente ao saudoso Chico Maia e a D. Olinda, que valorizaram cada esforço e cada vitória alcançada. À Giovana e ao Ralph, pela amizade, abrigo e apoio de sempre, ao Pedro e à Vanessa, pelas conversas e atenção, à Mônica e à Isadora, por terem me dado alento num difícil momento de minha vida;

Ao Paulo, que me apresentou um mundo novo e que esteve comigo em grande parte dessa caminhada, me dando suporte, apoio e carinho. Não tenho palavras pra agradecer tudo o que fez por mim. Você é e será sempre muito especial!

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular, em especial ao Dr. Gregory pelas colaborações e por sua disponibilidade. À Thalita, por toda a ajuda, dedicação e competência e por ter me ensinado muito do que eu sei sobre cultura celular;

Ao Dr. Alfredo, ao Dr. Dawidson, e aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, pelas inúmeras ajudas: à Ju, Alessandra, Ana Claudia, Thaís e em especial à Cíntia, pelo desprendimento, bondade e vontade de ajudar, você foi uma mãe pra mim!

A todos os professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, pelos ensinamentos e apoio durante minha formação acadêmica.

Aos animais experimentais, que tornam o nosso trabalho possível. Ao técnico Carlos e aos bioteristas do CEBIO, especialmente o Frank, pela disponibilidade!

A todos os amigos, presentes e distantes, simplesmente por serem meus AMIGOS, em especial à Grazi, à Thaís, à Duda, ao Carlos, ao Ericson, à Yeli. e com muita gratidão e admiração, ao Luís, que me ajudou MUITO e que tanto facilitou minhas idas e vindas nessa jornada;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, obrigada pela torcida!

À CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo apoio financeiro e a FUMP, pela assistência, fundamental em toda a minha trajetória!

Sem vocês, nada disso seria possível e esta vitória não teria o mesmo valor:

MUITO OBRIGADA!

*“Hoje me sinto mais forte!
Mais feliz?! Quem sabe...
Só levo a certeza de que
Muito pouco eu sei,
Eu nada sei (...)”*

Renato Teixeira

RESUMO

A compreensão dos mecanismos que regulam a osteogênese, bem como da atuação de fármacos e biomateriais que favoreçam o reparo ósseo é de fundamental importância para o estabelecimento de novas terapias de reconstrução óssea, envolvendo os pilares da bioengenharia tecidual. Biomateriais constituídos de osso bovino têm revelado resultados promissores como matrizes de preenchimento ósseo. Fármacos como o ranelato de estrôncio (RE) têm demonstrado efeitos anti-osteoporóticos importantes, e vêm sendo indicado por via oral para prevenção de fraturas, principalmente em mulheres na fase pós-menopausa. Entretanto, os efeitos locais do RE e a possibilidade de sua associação com biomateriais foram pouco investigados. Neste trabalho, analisamos o efeito do RE em culturas de osteoblastos primários (OP), extraídos das calvárias de neonatos de ratos *Wistar* e imortalizados (OI), da linhagem MC3T3-E1, em monocamada ou associados a *scaffolds* de osso bovino, mineralizados (OBM) e desmineralizados (OBD), no intuito de avaliar se essas associações favoreceriam o desempenho celular *in vitro*. Para tanto, utilizamos o RE p.a. em meio de cultura sem suplementação adicional, para verificar sua ação sem a interferência de outros reagentes. O efeito do RE sobre a viabilidade celular foi obtido por uma curva dose-efeito através do ensaio MTT nas doses de 0,025 a 1 mM de RE. Estabelecida a dose ótima de RE a 0,1mM, os efeitos da sua administração local em osteoblastos foram avaliados nas fases de ¹diferenciação celular (pela atividade da fosfatase alcalina e pela expressão dos genes marcadores osteogênicos *Runx2*, *Colágeno I*, *FGFR1* e *Osteocalcina*, por RT-PCRq); na ²deposição de matriz orgânica (por coloração *Sirius Red*) e ³deposição de matriz mineralizada (por coloração de Alizarina). A viabilidade de osteoblastos cultivados sobre os *scaffolds* de OBM e OBD também foi avaliada por ensaios de MTT. Nossos resultados mostram que o RE possui biocompatibilidade, aumenta o metabolismo dos OP e OI e que não apresenta efeito citotóxico quando administrado *in loco*. Além disso, parece acelerar a diferenciação celular, aumentando a atividade da fosfatase alcalina, a expressão de alguns marcadores de diferenciação osteogênica e a síntese de matriz orgânica. Na

fase de mineralização o conteúdo de íons Ca^{2+} diminuiu nos grupos tratados com RE em relação aos grupos controle, possivelmente pela competição e maior disponibilidade de íons estrôncio na formação dos cristais de hidroxiapatita. A matriz de osso bovino desmineralizado apresentou melhores resultados como *scaffold* para OP e OI. Esses resultados fornecem subsídios importantes para a continuidade de estudos *in vivo* com administração local do RE em sítios de reparação óssea. O sucesso da associação do RE com matrizes ósseas desmineralizadas pode possibilitar sua utilização como coadjuvante nas estratégias de bioengenharia tecidual óssea e nas terapias de preenchimento ósseo, inclusive com outros biomateriais.

Palavras-chave: osteoblastos primários, osteoblastos imortalizados, ranelato de estrôncio, osso bovino trabeculado, bioengenharia tecidual óssea

ABSTRACT

Understanding the mechanisms that control osteogenesis, as well as drugs and biomaterials that promote bone repair, is of fundamental importance for the establishment of new therapies for bone reconstruction, representing the pillars of tissue bioengineering. Biomaterials made up of bovine bone have unveiled promising results as arrays for bone filling. Drugs, such as Strontium Ranelate (SR), have demonstrated significant anti-osteoporotic effects, and have been indicated for oral administration for prevention of bone fractures, especially for post-menopausal women. However, so far, few studies have investigated SR local effects, and its use in association with biomaterials. In this work, we investigated SR effects in cultures of primary osteoblasts (PO) obtained from Wistar rats neonates cranial calottes and immortalized osteoblasts (IO) MC3T3-E1 cell line, cultivated in monolayer, or in association with bovine bone as *scaffolds*, as mineralized (MBB) and demineralized (DBB) forms, to evaluate if these associations would promote *in vitro* cell performance. We chose to work with SR (p.a.), using medium without supplementation, to verify its action without the interference of other reagents. SR effect on cell viability (MTT) was determined using a dose-effect curve, with dosis ranging from 0.025 to 1 mM. After establishing 0.1 mM as the optimum dose, the effects of the SR local administration in osteoblasts were evaluated during the following phases: 1. cell differentiation (by measuring alkaline phosphatase activity, and by qRT-PCR, using *Runx2*, *Collagen I*, *FGFR1* and *Osteocalcin* as osteogenic differentiation markers); 2. deposition of organic matrix (using picosirius red Collagen staining); and 3. deposition of mineralized matrix (using alizarin red staining). Cell viability of osteoblasts cultivated onto MBB and DBB *scaffolds* were also obtained using the MTT assay. Our results suggested that SR is biocompatible, improves PO and IO metabolism, and did not present a cytotoxic effect when it is administrated *in loco*. Besides, SR appeared to accelerate cell differentiation, enhancing alkaline phosphatase activity, the expression of osteogenic differentiation markers, and the synthesis of organic matrix. During the mineralization phase, the Ca²⁺ content decreased in the group treated with SR in relation to the control, probably associated with Strontium competition during the hydroxyapatite formation. DBB showed to be better *scaffolds* for PO and IO.

Our results indicated the importance to further investigate the local administration of SR at sites of bone repair. The success of the association of SR and DBB signaled the possibility of using SR as co-adjuvant for bone tissue bioengineering, and in therapies of bone filling with other biomaterials.

Keywords: primary osteoblasts, immortalized osteoblasts, strontium ranelate, trabecular bovine bone, bone tissue bioengineering

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Curva dose-efeito de RE em OP e OI -----	52
Figura 2	Representação gráfica da atividade da enzima FA, pelo ensaio de NBT/BCIP, em OP e OI tratados com RE -----	54
Figura 3	Avaliação da síntese de RNA total e síntese dos cDNAs das amostras de OP e OI tratados com RE -----	56
Figura 4	Teste dos oligos desenhados -----	56
Figura 5	Níveis de expressão de genes quantificados por RT-PCRq em OP e OI tratados com RE -----	59
Figura 6	Quantificação de Colágeno total, determinada pela coloração de <i>Sirius Red</i> , em OP e OI tratados com RE -----	60
Figura 7	Quantificação da deposição de matriz calcificada, determinada pela coloração de vermelho de alizarina -----	61
Figura 8	Quantificação da viabilidade celular, pelo ensaio de MTT, em OP e OI cultivados sobre <i>scaffold</i> de OBM -----	63
Figura 9	Quantificação da viabilidade celular, pelo ensaio de MTT, em OP e OI cultivados sobre <i>scaffold</i> de OBD -----	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Desenho experimental dos períodos de cultivo dos OP e OI para os ensaios <i>in vitro</i> -----	38
Quadro 2	Sequências utilizadas como molde e oligonucleotídeos utilizados nas RT-PCRq -----	44

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

AAsc - Ácido Ascórbico

α -MEM - Minimum Essential Medium Eagle – with Alpha Modification

ATCC® - American Type Culture Collection

BCIP - 5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato p-toluidina

BGF - β -Glicerofosfato

BSA - Albumina do Soro Bovino

CaCl₂ - Cloreto de Cálcio

CaSR - Receptor sensível a cálcio

cDNA - Ácido Desoxirribonucléico Complementar

CEBIO - Centro de Bioterismo

CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais

cm - Centímetro

COEP - Comitê de Ética em Pesquisa

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CTMMO - Células Tronco Mesenquimais de Medula Óssea

DEPC - Dietilpirocarbonato

Dex - Dexametasona

DO - Densidade Óptica

EDTA - Ácido Tetracético Etilenodiamidina

EEF1 - Fator de Elongação Eucariótico 1

FA - Fosfatase alcalina

FGFR1 - Receptor tipo I do Fator de Crescimento Fibroblástico

GAPDH - Gliceraldeído Fosfato Desidrogenase

HA - Hidroxiapatita

HCl - Ácido clorídrico

IGF - Fator de Crescimento semelhante a Insulina

M - Molar

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MI - Microscópio Invertido

ML - Microscopia de Luz

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

MS - Meio de cultura α -MEM10% Suplementado com AAsc, BGF e Dex
mg - Miligrama
mL - Mililitro
mm - Milímetro
mM - Milimolar
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NaOH - Hidróxido de sódio
NBT - Nitroblue tetrazólio clorídrico
ng - Nanograma
nm - Nanômetro
nmol - Nanomols
OBL - Osteoblastos
OBT - Osso Bovino Trabeculado
OBD - Osso Bovino Desmineralizado
OBM - Osso Bovino Mineralizado
OC - Osteocalcina
OI - Osteoblastos Imortalizados
OP - Osteoblastos Primários
OPG - Osteoprotegerina
RE - Ranelato de Estrôncio
PBS - Tampão fosfato de sódio
PCR - Reação em cadeia da polimerase
PDGF - Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PTH - Paratormônio
RANK - Receptor Ativador do fator Nuclear Kappa B, presente na membrana de pré-osteoclastos
RANKL - Ligante do receptor RANK, presente na membrana de pré-osteoblastos
RNA - Ácido Ribonucleico
RUNX2 - Proteína codificada pelo gene Runx2

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Runx2 - Gene osteogênico ligado ao domínio Runt

rpm - Rotações por minuto

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SFB - Soro fetal bovino

TA - Temperatura Ambiente

TGF- β - Fator de crescimento transformante tipo beta (β)

μg - Micrograma

μl - Microlitro

μm - Micrômetro

μM - Micromolar

2D - Culturas bidimensionais ou em monocamada

3D - Culturas tridimensionais em *scaffolds* de OBM ou OBD

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Enxertos ósseos e matriz de osso bovino	20
1.2	Terapias celulares, bioengenharia tecidual e <i>scaffolds</i> ósseos	23
1.3	Ranelato de estrôncio	25
1.4	Identificação da proposta, hipóteses e perspectivas	28
2	OBJETIVOS	31
2.1	Objetivo Geral	31
2.2	Objetivos específicos	32
3	MATERIAL & MÉTODOS	33
3.1	Meio de cultura celular	33
3.2	Obtenção, isolamento e cultivo dos osteoblastos primários	33
3.3	Obtenção e cultivo dos osteoblastos imortalizados	35
3.4	Ranelato de estrôncio	36
3.5	Ensaio <i>in vitro</i>	37
3.6	Curva dose-efeito do RE em OP e OI	39
3.7	Viabilidade celular	39
3.8	Atividade da fosfatase alcalina	40
3.9	Análise da expressão gênica de marcadores osteogênicos	41
3.9.1	Extração de RNA total	41
3.9.2	Síntese de DNA complementar (cDNA)	42
3.9.3	Desenho dos pares de oligonucleotídeos (oligos)	43
3.9.4	Confirmação da síntese de cDNA por RT-PCR	43
3.9.5	RT-PCR quantitativa (RT-PCRq)	45

3.10	Avaliação da síntese de colágeno total	46
3.11	Avaliação da mineralização por Vermelho de Alizarina	47
3.12	Osso bovino trabeculado como <i>scaffold</i> tridimensional	48
3.13	Avaliação Estatística	50
3.13.1	Análise estatística dos ensaios em cultura	50
3.13.2	Análise estatística dos ensaios por RT-PCRq	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Curva Dose-efeito do RE em relação à viabilidade celular	51
4.2	Efeito do tratamento com RE na diferenciação OP e OI em cultura bidimensional	55
4.2.1	Avaliação da atividade da fosfatase alcalina	55
4.2.2	Análise da expressão de marcadores osteogênicos por RT-PCRq	56
4.3	Avaliação da deposição de matriz de colágeno	61
4.4	Avaliação da deposição de matriz calcificada	62
4.5	Efeito do tratamento com RE nas culturas tridimensionais	62
4.5.1	Culturas de osteoblastos sobre osso bovino mineralizado (OBM)	63
4.5.2	Culturas de osteoblastos sobre osso bovino desmineralizado (OBD)	65
5	DISCUSSÃO	68
6	CONCLUSÃO	83
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1 INTRODUÇÃO

As doenças ósseas sempre foram tema de grande relevância e preocupação dentre ortopedistas, geriatras, odontólogos e cirurgiões bucomaxilofaciais. Nos últimos anos, em decorrência do envelhecimento da população brasileira, os problemas ósseos e as possibilidades de tratamento têm recebido maior atenção dos pesquisadores. O Brasil é um país populoso em franco processo de envelhecimento (IBGE, 2010). Os diagnósticos de osteopenia, osteoporose, fraturas ósseas têm aumentado a cada ano e são causas frequentes do afastamento de indivíduos potencialmente produtivos, especialmente aqueles de idade adulta e 3ª idade (GOMES e GARCIA, 2006). Além das sequelas causadas por doenças degenerativas, a perda de tecido ósseo pode ser decorrente de traumas, ressecção de tumores ou infecções ósseas e podem, do mesmo modo, comprometer a produtividade e qualidade de vida, inclusive de indivíduos jovens. A manutenção do tecido ósseo no âmbito da ortopedia e odontologia é um fator determinante para o sucesso do restabelecimento das funções do esqueleto e do sistema estomatognático, seja pela importância do osso como suporte para próteses ou como nicho para inserção de implantes. Neste sentido, inúmeros estudos e investimentos têm sido propostos em busca de terapias viáveis para regeneração e reconstruções ósseas. Um dos recursos mais frequentemente utilizado na clínica médica e odontológica, em pacientes portadores de lesões ósseas, consiste na utilização de enxertos ósseos, especialmente para a restauração da forma, volume e função das áreas ósseas perdidas (DONGIEUX *et al.*, 1998).

1.1 Enxertos ósseos e matriz de osso bovino

Os enxertos podem ser autógenos, quando retirados e transferidos do mesmo indivíduo; homogêneos ou alógenos, se obtidos a partir de doadores da mesma espécie ou xenógenos (heterógenos) se obtidos de doadores de espécies diferentes. O tecido ósseo de origem autógena, por suas propriedades osteogênica, osteoindutora e osteocondutora, é considerado enxerto "gold standard" para a cirurgia óssea reconstrutiva (BURCHARD, 1983; ALAM *et al.*, 2009; SPIN-NETO *et al.*, 201). Dentre as vantagens dessa modalidade, destaca-se a qualidade do osso formado, sua baixa antigenicidade, o menor risco de contaminação cruzada e a maior previsibilidade no reparo de defeitos mais amplos e/ou muito atróficos. Enxertos autógenos são vascularizados e contém células vitais e fatores de crescimento que contribuem com a remodelação óssea, formando uma estrutura unificada com o tecido receptor (TSIGKOU *et al.*, 2010). No entanto, a utilização de ossos humanos retirados do próprio paciente apresenta algumas limitações e desvantagens como a disponibilidade de uma área doadora viável, a abertura de um segundo sítio cirúrgico no mesmo paciente, possibilidade de parestesia, dor, morbidade e a imprevisibilidade no processo de reabsorção do enxerto (JOHANSSON *et al.*, 2001; NKENKE *et al.*, 2001; SPRINGER *et al.*, 2004; WEIBULL *et al.*, 2009; SCHUCKERT *et al.*, 2011). Enxertos ósseos alógenos representam uma boa alternativa, mas existe o risco de imunoreatividade e transmissão de doenças (CHAN *et al.*, 2009). Por essas razões, muitos profissionais têm optado pelos enxertos xenógenos, comercialmente disponibilizados no mercado. Os enxertos xenógenos ou xenoenxertos, oriundos de espécie doadora diferente do indivíduo receptor, são

predominantemente de origem bovina, mas também podem derivar de suínos ou equinos (RODRIGUEZ *et al.*, 2003). Geralmente são matrizes ósseas enxertadas *in natura*, ou seja, são implantados como uma matriz óssea mineralizada, cujo objetivo é funcionar como material de preenchimento ósseo, com propriedades biológicas restritas à osteocondução (DEL CARLO *et al.*, 2003). A estrutura molecular dos enxertos xenógenos é constituída de matriz óssea inorgânica, descelularizada visando eliminar respostas imunes e inflamatórias no indivíduo receptor. A estrutura mineral dos enxertos ósseos xenógenos funciona como um arcabouço para proliferação de células ósseas do hospedeiro. Nesse caso, eles atuam primordialmente como um biomaterial osteocondutor (CONSTANTINO & FREIDMAN, 1994) cuja função é permitir a aderência celular e orientar a migração e proliferação vascular. Nestas condições, o osso nativo cresce lentamente neste meio, sendo a matriz enxertada gradualmente substituída por osso neoformado (NÓIA *et al.*, 2012).

Além das enxertias de matrizes ósseas mineralizadas, alguns estudos têm avaliado o potencial osteogênico da matriz óssea desmineralizada, como *scaffold* ou suporte para o crescimento celular (MAUNEY *et al.*, 2005; LAUREANO FILHO *et al.*, 2007). A fase orgânica das matrizes ósseas guardam propriedades osteoindutoras importantes (DEL CARLO *et al.*, 2003); podem conter informações, tais como sequencias específicas de aminoácidos que facilitam a adesão celular ou manutenção de funções de diferenciação celular e devem interagir de modo favorável, nos processos regenerativos *in vivo* (ABDULLAH *et al.*, 2009). Por exemplo, proteínas que possuem a sequencia Arginina-Glicina-Aspartato, sequência de peptídeos conhecida como “domínio RGD” têm a capacidade de se ligar a receptores de superfície celular,

facilitando a adesão de células ao substrato (CHAN *et al.*, 2009). Proteínas como o colágeno e sialoproteína óssea contêm o domínio RGD e são abundantes componentes da matriz orgânica do tecido ósseo. A sialoproteína óssea possui também a capacidade de nuclear cristais de hidroxiapatita *in vitro* (HUNTER & GOLDBERG, 1993). Esses dados indicam o potencial de matrizes ósseas desmineralizadas como estratégia terapêutica para o reparo de defeitos ósseos por meio de um processo osteoindutivo.

É válido ressaltar que nem sempre a simples enxertia de matrizes ósseas descelularizadas garante o restabelecimento morfológico e funcional da área lesionada. Há situações em que a morfologia e dimensão do defeito são extensas e críticas ao reparo, o que torna o mecanismo regenerativo limitado e, dessa forma, há formação de tecido conjuntivo fibroso em substituição ao tecido ósseo (KIM *et al.*, 2006). O sucesso e a consolidação do reparo ósseo estão condicionadas a determinadas condições, tais como amplo suprimento sanguíneo, estabilidade mecânica, presença de um arcabouço tridimensional e tamanho do sítio lesionado. Diante desses pré-requisitos, a chamada “medicina regenerativa” tem avançado em alguns pontos buscando atender a esses critérios, não somente pela melhoria e aperfeiçoamento dos biomateriais de preenchimento ósseo, mas também pelas propostas de associação desses biomateriais às células e fatores angiogênicos e osteogênicos. A adição de componentes celulares gera uma rede biologicamente funcional no interior dos *scaffolds* como um plexo que favorece a perfusão de vasos e melhora significativamente a qualidade dos enxertos (TSIGKOUA *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* têm avaliado o efeito da colonização ou semeadura de diferentes

linhagens celulares sobre *scaffolds*, no intuito de otimizar, acelerar ou promover uma regeneração óssea mais eficiente.

1.2 Terapias celulares, bioengenharia tecidual e *scaffolds* ósseos

A demanda por terapias capazes de restaurar lesões ósseas incluindo “defeitos ósseos críticos” tem estimulado o refinamento das técnicas de bioengenharia tecidual e terapias celulares. Tais estratégias fundamentam-se não somente na osteocondução, mas nos princípios da osteogênese e osteoindução. A osteogênese é o processo de neoformação óssea por células osteoprogenitoras vivas dentro do auto-enxerto. A osteoindução por outro lado é a estimulação e ativação de células osteoprogenitoras do hospedeiro, a partir de células do tecido circundante (GIANNOUDIS *et al.*, 2005). As terapias celulares preconizam o transplante de células, de modo isolado (em uma solução tampão) ou pré-cultivadas em biomateriais, em matrizes tridimensionais conhecidas como *scaffolds*. A vantagem da incorporação de *scaffolds* às terapias celulares e não apenas a administração de células em solução é o fato de o material prover a estrutura inicial de suporte para reter as células na área defeituosa, além de facilitar a vascularização. Os *scaffolds* são geralmente biomateriais porosos, de natureza biodegradável e que podem reter diferentes fatores de crescimento, drogas, genes, ou as células osteogênicas (CHESMEL *et al.*, 1998).

Na engenharia de tecidos, células e fatores de crescimento são combinados com *scaffolds* biodegradáveis para reparar e regenerar os tecidos. Os *scaffolds* atuam como uma matriz temporária, enquanto as células secretam

uma matriz extracelular que é requerida para a regeneração dos tecidos. Duas vias têm sido propostas para a regeneração óssea por meio das técnicas de bioengenharia tecidual: 1. Uso de *scaffolds* para a formação óssea por células dos tecidos circundantes e 2. O uso de *scaffolds* como carreadores de células osteogênicas, preferencialmente autógenas que são cultivadas em biorreatores e subsequentemente reimplantadas nos pacientes doadores. A primeira alternativa é considerada uma forma de engenharia tecidual *in vivo*, uma vez que o próprio corpo é usado como um bioreator para produzir o tecido ósseo em cima de um *scaffold* implantado. Na segunda modalidade, células osteogênicas são removidas de pacientes e cultivadas sobre os *scaffolds in vitro* e após certo tempo de cultivo, os construtos (células-matriz) são implantados no paciente (CHAN *et al.*, 2009). Diferentes tipos celulares têm sido propostos para essa finalidade, desde células tronco, células da linhagem osteoblástica e células com potencial vasculogênico.

A fim de melhorar as funções biológicas dos *scaffolds*, vários fatores de crescimento, como exemplo, a proteína morfogenética do osso tipo 2 (BMP-2), Fatores de crescimento fibroblástico básico (FGF-2 ou bFGF) e PRPs (Plasma rico em plaquetas), Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) têm sido imobilizados nos *scaffolds* porosos e têm revelado maior formação óssea e melhora significativa da cicatrização (ZHAO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010; SCHUCKERT *et al.*, 2011). A associação de *scaffolds* tridimensionais, células e moléculas bioativas capazes de induzir a diferenciação da linhagem pré-osteoblástica e a proliferação de osteoblastos durante a síntese dos tecidos *in vitro*, constitui a base da bioengenharia tecidual.

O processo de remodelação óssea *in vivo* é regulado por diversos fatores locais e/ou sistêmicos, incluindo estímulo elétrico, força mecânica, hormônios (PTH-paratormônios, hormônios da tireóide, estrógeno, andrógenos, cortisol, calcitonina, hormônio do crescimento), fatores do crescimento (IGF-1) e citocinas (WATTS *et al.*, 1999). Nesse sentido, também como tentativa de melhorar os prognósticos da regeneração óssea, pesquisadores têm avaliado o efeito da administração tópica de alguns fatores de crescimento nos sítios de reparo ósseo. Os trabalhos de ABREU *et al.* (2013) e FERREIRA *et al.* (2013) mostraram que fatores de crescimento, como TGF- β 1, BMP-4, PDGF e IGF-I, aplicados localmente durante o reparo de alvéolos dentários de ratos aumentaram a quantidade de vasos sanguíneos e por consequência induziram maior deposição óssea. Paralelamente aos fatores de ação local, a utilização sistêmica de alguns fármacos tem sido indicada como terapia coadjuvante nos processos de remodelação óssea. Como exemplo desses agentes de administração sistêmica pode-se citar os tradicionais bisfosfonados, como o alendronato e mais recentemente o ranelato de estrôncio.

1.3 Ranelato de estrôncio

Especialmente desenvolvidos para o tratamento das osteoporoses, compostos como alendronato e ranelato de estrôncio (RE) têm sido clinicamente indicados no tratamento da osteoporose pós-menopausa com o objetivo de reduzir o risco de fraturas vertebrais e de pelve na mulher (MEUNIER *et al.*, 2004; REGINSTER *et al.*, 2005; SEEMAN *et al.*, 2006). O RE é a mais recente droga disponibilizada para o tratamento de osteoporose e prevenção de fraturas (FAN *et al.*, 2011). Terapias para osteoporose são

tradicionalmente fundamentadas na inibição de reabsorção óssea com o uso dos bifosfonatos (alendronato, zolendronato) ou pela estimulação de formação óssea pela administração oral de anabólicos ósseos como exemplo, os fragmentos de hormônios paratireóideos (PTH) (JOBKE *et al.*, 2011; CHAPURLAT, 2014). O agente antireabsortivo alendronato reduz o nível de remodelação óssea em cerca de 60%, atuando praticamente na inibição da reabsorção óssea (LIBERMAN *et al.*, 1995). O RE é considerado uma 3^a geração ou classe de agentes anti-osteoporose. Avaliações da dinâmica histomorfométrica (ARLOT *et al.*, 2008) revelaram que o ranelato de estrôncio não reduz o nível de remodelação óssea, mas atua de modo diferente dos alendronatos; possui um modo duplo de ação, agindo concomitantemente na inibição da atividade osteoclástica e estimulando a replicação e maturação osteoblástica (BONNELYE *et al.*, 2008; MARIE, *et al.*, 2011). O estrôncio tem sido amplamente estudado na forma de cloreto ou de ranelato, sendo este último o mais utilizado, por via sistêmica, na prevenção da osteoporose. Estudos *in vitro* sugerem que este fármaco promove a proliferação e diferenciação de osteoblastos (CANALIS *et al.*, 1996; BONNELYE *et al.*, 2008). O RE parece alterar o balanço fisiológico do tecido ósseo no sentido de bloquear a ação dos osteoclastos (MARIE *et al.*, 2011; PRZEDLACKI *et al.*, 2011) e estimular a ação e diferenciação dos osteoblastos (DAHL *et al.*, 2001; MARIE *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2008).

Além do tratamento de osteoporoses com o RE, alguns estudos têm demonstrado também sua utilidade como coadjuvante para acelerar ou melhorar a osteointegração de implantes de titânio e atenuar os sintomas em

pacientes portadores de osteoartrites reumatóides (ANDY *et al.*, 2013; REGINSTER *et al.*, 2013).

O efeito anabólico e os mecanismos de ação celular e molecular do RE sobre o osso são ainda pouco compreendidos e estão sendo amplamente investigados. Estudos *in vitro*, avaliando o comportamento de células sob diferentes condições de tratamento com RE, têm contribuído grandemente para a compreensão de seus efeitos biológicos. Os resultados desses estudos revelaram que o RE aumenta a replicação de células pré-osteoblásticas e a formação de nódulos de mineralização *in vitro* (BONNELYE *et al.*, 2008; BRENNAN *et al.*, 2009). Até o momento, dois mecanismos têm sido propostos para atuação do RE, incluindo a ativação de receptores de cálcio localizados em osteoblastos e osteoclastos e a influência no sistema OPG/RANK L. A exposição do ranelato de estrôncio *in vitro* aumenta a secreção de osteoprotegerina (OPG) e reduz a expressão de ligante do receptor RANK (RANKL), suprimindo a osteoclastogênese induzida por osteoblastos (ATKINS *et al.*, 2009). A osteoprotegerina compete pelos sítios RANKL. Desse modo, há um bloqueio da ligação das células pré-osteoblásticas x pré-osteoclásticas via RANK/RANKL, uma vez que os receptores ativadores do fator nuclear do ligante Kappa B ficam ocupados por sua ligação à osteoprotegerina (OPG/RANKL) (BROWN *et al.*, 2007; ATKINS *et al.*, 2009). Por outro lado, o estrôncio apresenta a capacidade de penetrar nas células, via canais de cálcio e, subsequentemente, unir-se a determinados sítios de ligação intracelulares, tais como o retículo endoplasmático, afetando assim a homeostasia intracelular do cálcio e os processos de mineralização óssea (CABRERA *et al.*, 1999).

Recentes estudos têm demonstrado que o RE aumenta a diferenciação de células tronco mesenquimais coletadas de medula óssea (CTMMO) em osteoblastos (MEUNIER *et al.*, 2004; CHOUDHARY *et al.*, 2007; PENG *et al.*, 2009). Nesse sentido, pesquisadores têm atribuído, ao menos parcialmente, os efeitos anabólicos do RE *in vivo* à indução de diferenciação osteoblástica (PENG *et al.*, 2010). Em relação aos estudos em humanos, análises radiográficas e mensuração de densidade óssea por diferentes tipos de tomógrafos computadorizados têm demonstrado que, após alguns meses (6-12 meses) de uso sistêmico do RE, há um aumento no conteúdo de estrôncio, na dureza de osso e melhoria da qualidade dos cristais minerais (MAIMOUN *et al.*, 2010). Riscos de fraturas ósseas decresceram cerca de 49% após um ano de tratamento com RE (MEUNIER *et al.*, 2004). Contudo, os mecanismos exatos destes efeitos ainda não foram claramente elucidados e requerem estudos adicionais.

1.4 Identificação da proposta, hipóteses e perspectivas

Diante do exposto, subsidiados pelos benefícios documentados em relação ao RE e aos biomateriais de osso bovino, o presente estudo trabalhou com ambas as possibilidades (¹ RE de forma isolada ou ² RE em associação a *scaffolds* de OBT), buscando contribuir no desenvolvimento de alternativas, que sejam promissoras para bioengenharia tecidual óssea. A proposta deste estudo foi investigar o comportamento biológico de duas linhagens de células osteoblásticas (osteoblastos primários e osteoblastos imortalizados) submetidas ao tratamento com ranelato de estrôncio quando cultivadas em monocamada ou sobre uma matriz tridimensional de osso bovino. Os enxertos

de origem bovina, naturais e sintéticos estão entre os biomateriais mais utilizados e pesquisados como substitutos ósseos, mas os possíveis benefícios da associação desse biomaterial com os efeitos osteoindutores do ranelato de estrôncio ainda não foram descritos na literatura. O presente estudo propôs, ainda, avaliar o comportamento dos osteoblastos em matrizes ósseas bovinas desmineralizadas, as quais podem configurar-se como um *scaffold* promissor para bioengenharia tecidual óssea. Trabalhamos com duas hipóteses: 1. da influência positiva de componentes da matriz orgânica sobre as células osteogênicas e 2. de que os efeitos anabólicos do ranelato de estrôncio, documentados após administração sistêmica e em estudos *in vitro* possam favorecer a proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas e osteoblásticas em associação com *scaffolds* de osso bovino.

Além disso, os resultados desse estudo, especialmente referentes à curva dose-efeito do ranelato de estrôncio aplicado nos meios de cultura, à viabilidade das células e à evolução da diferenciação celular devem atestar o nível de citotoxicidade do ranelato de estrôncio para uso local. Poucos estudos têm abordado essa possibilidade. Em 2010, FARIA *et al.* avaliaram os efeitos do cloreto de estrôncio topicamente aplicado em defeitos cirurgicamente induzidos (5 mm x 5 mm) em mandíbulas de coelho. Após 28 dias da aplicação de uma concentração de 2 molar de cloreto de estrôncio, os defeitos tratados estavam completamente preenchidos por tecido ósseo, o que não ocorreu com os animais controle que receberam apenas a solução salina no local da lesão (FARIA *et al.*, 2010). Dados sobre os efeitos locais *in vivo* com a utilização do RE ainda não foram divulgados. Uma perspectiva imediata subsequente ao

presente estudo será a enxertia dos construtos que aqui demonstrarem os melhores resultados nos ensaios propostos em defeitos ósseos *in vivo*. Portanto, o presente estudo configura-se também como uma etapa preliminar, fundamental como prova de princípio para o delineamento dos procedimentos *in vivo*, quando será avaliado o potencial regenerativo das matrizes ósseas colonizadas por células osteoblásticas sob efeito do ranelato de estrôncio *in loco*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do tratamento com Ranelato de Estrôncio (RE) nas fases de adesão, proliferação e diferenciação de osteoblastos primários (OP) e imortalizados (OI), cultivados em monocamada ou associados à matriz de osso bovino trabeculado (Lumina-Bone/ Critéria ®), nas formas mineralizada e desmineralizada.

2.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma curva dose-efeito do RE em culturas de OP e OI através do ensaio de viabilidade celular MTT, para determinar a dose que favorece o melhor desempenho celular *in vitro*.
- Avaliar o efeito do RE durante o processo de diferenciação dos OP e OI *in vitro*, através de ensaios de NBT/BCIP, para verificar a atividade da enzima fosfatase alcalina, após 4 e 7 dias de tratamento.
- Avaliar os efeitos do RE sobre a expressão de genes determinantes no processo de diferenciação dos osteoblastos em OP e OI (Runx2, FGFR1, Colágeno I e Osteocalcina), pelo método de RT-PCR quantitativa, após 0 (grupo controle sem RE), 1, 4 e 7 dias de tratamento.
- Avaliar o efeito do RE sobre a deposição de matriz orgânica em OP e OI, pela coloração *Sirius Red*, e posterior quantificação do colágeno total, após 7 e 10 dias de tratamento.
- Avaliar o efeito do RE sobre a deposição de matriz mineralizada em OP e OI, pela coloração vermelho de alizarina e posterior quantificação, após 7, 14 e 21 dias de tratamento.
- Avaliar o efeito do RE através do ensaio de viabilidade celular MTT, dos OP e OI cultivados em *scaffolds* de osso bovino trabeculado, nas formas mineralizada e desmineralizada, após 1, 2, 3 e 6 dias de tratamento.

3 MATERIAL & MÉTODOS

3.1 Meio de cultura celular

Os OP e OI utilizados neste trabalho foram cultivados segundo DE MELO *et al.* (2014), em meio α MEM - *Minimal Essential Medium*, with alfa modification (Sigma-Aldrich), contendo 10% de soro fetal bovino (Gibco), 5 mM de bicarbonato de sódio (Sigma), 50 μ g/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich), 100 U/mL de penicillina, 100 μ g/mL de streptomina e 0,25 μ g/mL de Fungizona®. O meio foi preparado com 1L de água de injeção (Europharma Laboratórios) e, após equilíbrio do pH a 7.2, o meio foi filtrado em membrana de éster de celulose com poros de 0,22 μ m (Millipore) e estocado a 4 °C.

3.2 Obtenção, isolamento e cultivo dos osteoblastos primários

Os osteoblastos primários foram obtidos de calvárias de ratos neonatos *Wistar* machos, de até cinco dias de vida, seguindo protocolo similar ao descrito por ORRISS *et al.* (2012). Os animais foram obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do ICB-UFMG. Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), sob o protocolo nº. 262/2013. Todos os protocolos utilizados estão de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo CONCEA.

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100mg/100g) e decapitados para a remoção das calvárias e exclusão da região sagital, rica em condroblastos. As calvárias inteiras foram higienizadas em série de 6 banhos de PBS contendo antibióticos e fungicida (*idem* aos utilizados no item 3.1), para

remoção do sangue residual e dos tecidos moles remanescentes. Em seguida, as calvárias foram digeridas em 10 mL de solução estéril contendo Tripsina 0,25% (Gibco) e Colagenase tipo II (1mg/mL, Gibco). A digestão ocorreu por 5 min a 37°C em banho-maria (Polyscience- Dual Action Shaker), sob agitação a 100 rpm. O produto da primeira digestão foi descartado, a fim de minimizar a contaminação por outros tipos celulares, especialmente fibroblastos e condroblastos. Às calvárias foram adicionados 10 mL de solução de digestão fresca, incubada por mais 15 min em banho-maria, nas mesmas condições. O produto da segunda digestão foi duas vezes concentrado por centrifugação a 1656 x g, por 5 min cada, sendo ressuspensos em 5 mL de α MEM 10%. O mesmo procedimento foi realizado para o produto da terceira e última digestão das calvárias, desta vez por 25 min. Os produtos da segunda e terceira digestão foram então, misturados e filtrados em *Cell Strainer* (BD Bioscience) com poros de 70 μ m. As células foram expandidas em garrafas de cultura (T75, TPP®), em α MEM 10%, a 37°C e 5% de CO₂, sendo utilizadas nos experimentos propostos entre a 3^a e a 6^a passagem, após atingirem a confluência de 70-80%. Para o plaqueamento dos experimentos em placas de 24 poços (TPP®), as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de $2,5 \times 10^4$ células por poço em monocamadas e 5×10^4 células, quando cultivadas sobre os *scaffolds* de osso bovino, mineralizado ou desmineralizado. Por se tratar de uma matriz tridimensional, é preconizada a utilização do dobro da quantidade de células em relação às culturas bidimensionais (SHAOHUA GE *et. al.*, 2012). Desta forma, o procedimento para o plaqueamento nos *scaffolds* consistiu em pipetar as células de forma concentrada, diretamente nos fragmentos ósseos (previamente esterilizados e equilibrados, conforme descrito no item 3.12). Ou seja, 5×10^4 células foram concentradas em 100 μ L de

meio α MEM 10%, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 2h. Após a incubação, o volume de meio foi completado para 500 μ L/ poço, volume suficiente para cobrir os fragmentos de osso. As placas foram monitoradas diariamente e o meio de cultura foi substituído três vezes por semana.

3.3 Obtenção e cultivo dos osteoblastos imortalizados

Os osteoblastos imortalizados utilizados neste projeto são da linhagem MC3T3-E1 Subclone 4 (American Type Culture Collection - ATCC® CRL-2593™) e foram gentilmente cedidos pelos professores Dr. Gregory Thomas Kitten (ICB/UFMG) e Dr. Paulo Tambasco (USP/Ribeirão Preto). Esta linhagem celular vem sendo amplamente utilizada como modelo em estudos de diferenciação osteoblástica *in vitro*, se comportando de maneira similar aos osteoblastos primários.

A linhagem MC3T3-E1 foi obtida a partir de uma série de subclones de pré-osteoblastos de calvárias de camundongos (*Mus musculus*) e selecionada de acordo com sua alta ou baixa capacidade de diferenciação osteoblástica e mineralização. O subclone 4 foi selecionado por exibir altos níveis de diferenciação osteoblástica quando cultivados em meio de diferenciação contendo ácido ascórbico e fosfato inorgânico, em torno de 3 a 4 mM. Estes subclones formam matriz extracelular mineralizada após 10 dias de cultivo. As células foram monitoradas diariamente e o meio de cultura foi substituído três vezes por semana. Para o plaqueamento dos experimentos, em placas de 24 poços, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas a uma densidade celular de 2 x 10⁴ por poço nas monocamadas, e 4 x 10⁴ quando cultivadas sobre os *scaffolds* de osso bovino mineralizado e desmineralizado. Esta densidade foi ligeiramente

menor que a dos OP, considerando a maior capacidade proliferativa própria de linhagens imortalizadas. Os procedimentos para plaqueamento nos *scaffolds* mineralizados e desmineralizados transcorreram conforme descrito para os OP, no item 3.2.

3.4 Ranelato de estrôncio

O ranelato de estrôncio (RE) tem sido utilizado no tratamento da osteoporose pós-menopausa pela prescrição do medicamento Protos®, e tem como objetivo principal reduzir o risco de fraturas vertebrais e de quadril (MEUNIER *et al.*, 2004; SEEMAN *et al.*, 2006; REGINSTER *et al.*, 2005). Em sua maioria, os trabalhos utilizando o RE *in vitro*, utilizam-no a 0,1 mM, por corresponder à dose plasmática de íons estrôncio (Sr^{2+}) encontrada em animais e humanos submetidos ao tratamento diário, via oral, com 2g de Protos® (1g de RE). Em trabalhos *in vitro* observa-se também que para a obtenção dos íons estrôncio, têm sido utilizadas associações de cloreto de estrôncio e ranelato de sódio, as formas comerciais mais facilmente encontradas. Neste trabalho, optou-se pela utilização do ranelato de estrôncio puro (p.a.), o verdadeiro componente ativo do Protos®, adquirido junto à BioX Corporation (Ontario, Canadá). Dessa forma, pôde-se verificar o efeito exclusivo do RE na diferenciação e comportamento de osteoblastos *in vitro*, sem a interferência de outros componentes, até mesmo os presentes no Protos®. Segundo informações contidas na bula deste medicamento, a meia-vida do RE é de 60 horas, Portanto, para ser administrado nas culturas de OP e OI o RE puro foi diluído em α MEM sem soro (SFB), na concentração de 5 mM, a cada 48h. Após aferição e equilíbrio do PH, a solução fresca foi filtrada em membrana com poros

de 0,22 μ m (Sarstedt®), e a partir desta foram feitas as demais doses de RE em meio de cultura α MEM 10%, seguindo a equação $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$.

3.5 Ensaios *in vitro*

Os efeitos do RE sobre os osteoblastos em cultura foram avaliados neste trabalho sobre: (1) a diferenciação celular (atividade da fosfatase alcalina e RT-PCRq para genes de diferenciação); (2) a deposição de matriz orgânica e (3) de matriz mineral; e (4) a viabilidade celular na presença de um *scaffold* de osso bovino trabeculado.

Porém, antes de avaliarmos os efeitos do RE sobre as células osteoblásticas, foram realizadas culturas bidimensionais de OP e OI (conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3) em meio osteogênico suplementado com 50 μ g/mL de ácido ascórbico (Sigma) e 10mM de β -Glicerofosfato (Sigma). A partir deste estudo preliminar, foi possível conhecer a dinâmica comportamental e a evolução do processo de maturação dos osteoblastos nas fases de ¹adesão e proliferação, ²deposição de matriz orgânica ou colágena, e ³deposição de matriz inorgânica ou mineralizada. Os resultados revelaram aspectos morfológicos bem similares entre OP e OI ao longo das diferentes fases. No entanto, uma discrepância temporal na evolução do processo foi observada: os OI iniciaram a deposição de matriz orgânica em fase um pouco mais tardia, em relação aos OP. Observamos que os padrões de deposição de colágeno em OP e OI são similares, mas não concomitantes (Anexo). A partir de então, foi possível determinar os períodos mais adequados para o cultivo de OP e OI em cada ensaio/ técnica utilizada, sendo necessária a avaliação em períodos distintos, de acordo com o desenho experimental especificado no Quadro 1:

Quadro 1 - Desenho experimental dos períodos de cultivo para OP e OI

TÉCNICA	OBJETIVO	PERÍODO									
		24h	48h	3d	4d	5d	6d	7d	10d	14d	21d
Ensaio de MTT	Avaliação da viabilidade celular (culturas 2D e 3D)	OP/OI	OP/OI	OP/OI			OP/OI				
Ensaio de NBT/BCIP	Avaliação da atividade da Fosfatase Alcalina				OP			OI			
RT-PCRq	Avaliar o nível de expressão de genes marcadores de linhagem osteogênica (0 dia: controle sem RE)	OP/OI			OP		OI				
Coloração Sirius Red	Avaliação da deposição de colágeno total							OP	OI		
Coloração Vermelho de Alizarina	Avaliação da deposição de matriz inorgânica calcificada							OP		OP/OI	OI

3.6 Curva dose-efeito do RE em OP e OI

Foi estabelecida uma curva dose-efeito de RE para verificar se a dose mais utilizada na literatura também corresponderia à dose ideal para os OP e OI obtidos neste trabalho. A curva dose-efeito foi estabelecida na faixa de concentração de 0,025 a 1 mM, próxima à indicada para outros tipos celulares, utilizando as culturas de OP e OI em monocamada. A partir de uma solução de 5 mM de RE puro, dissolvido em α MEM, foram feitas diluições nas concentrações de 0,025, 0,05, 0,1, 0,5 e 1 mM. O tratamento com RE foi adicionado sempre após 24h do plaqueamento celular, sobre as células já aderidas às placas de cultura. O meio contendo RE foi administrado fresco a cada dois dias, devido à sua meia vida curta. Os efeitos das doses diferentes do RE sobre as culturas de osteoblastos foram determinados de acordo com a resposta do ensaio de viabilidade celular, pelo teste de conversão do MTT, detalhado no item 3.7.

3.7 Viabilidade celular

A viabilidade dos OP e OI foi mensurada pelo ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium), um método colorimétrico que avalia a capacidade de enzimas desidrogenases, presentes em mitocôndrias de células viáveis (MOSMANN, 1983). Estas enzimas convertem o sal de MTT, solúvel em água, em cristais de formazan, insolúveis. Após o cultivo dos OP e OI nos períodos de interesse (ver **Quadro 1**), o meio de cultura foi removido dos poços para a adição de 500 μ L de solução de MTT (0,05 mg/mL, Life Technologies). Em seguida, a placa foi incubada a 37°C e 5% CO₂, por 2 h. A solução de MTT foi então removida e os cristais de formazan foram solubilizados com 500 μ L de

isopropanol-ácido (isopropanol 100 mL: ácido clorídrico 134 μ L) por poço, sob agitação por 5 min. Após esse período, 100 μ L de cada poço foram transferidos, em triplicata, para uma placa de 96 poços de fundo reto (TPP) e a DO foi mensurada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

3.8 Atividade da fosfatase alcalina

A atividade da fosfatase alcalina (FA) foi avaliada pelo ensaio de NBT/BCIP (Life Technologies). Este ensaio é baseado na clivagem de um grupamento fosfato do BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indolilfosfato *p*-toluidina) pela FA produzida pelos osteoblastos. Essa reação produz um próton que reduz o NBT (nitroblue tetrazólio clorídrico), formando um precipitado insolúvel de cor azul (VALÉRIO *et al.*, 2004).

Nos períodos escolhidos para análise (**Quadro 1**), o meio de cultura foi descartado e as células lavadas com PBS. Após descarte do PBS, as células foram incubadas com 200 μ L/poço da solução de NBT/BCIP (Life Technologies) na proporção de 1:1:8 em PBS (20 μ L de NBT: 20 μ L BCIP: 160 μ L de PBS), por 2 h à 37°C e 5% CO₂. Após confirmação da presença de precipitados de cor azul em microscópio de luz, adicionou-se 210 μ L/poço de SDS 10% - HCl 0,1N) sem remoção da solução de NBT/BCIP incubada. Para promover a solubilização dos precipitados, as placas foram incubadas a 37°C e 5% CO₂, por 18 h. Após este período, 100 μ L de cada poço foram transferidos, em triplicata, para uma placa de 96 poços e a DO foi medida em espectrofotômetro em comprimento de onda de 595 nm.

3.9 Análise da expressão gênica de marcadores osteogênicos

A avaliação por RT-PCR quantitativa dos marcadores de diferenciação osteoblástica foi feita após 0, 1 e 4 dias de cultivo para OP e 0, 1 e 6 dias para OI (**Quadro 1**), sendo realizada a extração do RNA total, a síntese do cDNA e a RT-PCRq para quantificar a expressão de transcritos de genes marcadores osteogênicos, tais como Runx2, FGFR1, Colágeno I e Osteocalcina.

O Runx2 é um gene importante nas fases de proliferação e diferenciação e na regulação osteogênica, na formação do esqueleto e na ossificação endocondral e intramembranosa (KOMORI *et al.*, 1997; MUNDLOS *et al.*, 1997; OTTO *et al.*, 1997). O FGFR1 é um gene que codifica o receptor para FGF tipo 1, e segundo demonstrado por CAVERSAZIO e THOUREY (2011) há a ativação deste receptor sensível a cátions, sugerindo um novo mecanismo de ação, independente dos já conhecidos receptores sensíveis a cálcio (CaSR), que pode explicar o aumento da proliferação osteoblástica em grupos tratados com RE.

O gene para Colágeno tipo I é expresso precocemente em células comprometidas com a linhagem osteogênica (AUBIN *et al.*, 2001)

Já a expressão gênica da osteocalcina se dá entre o final da fase de deposição de matriz orgânica, com pico máximo na fase de mineralização, estando presente em fases mais tardias da maturação osteoblástica (STEIN *et al.*, 2004).

3.9.1 Extração de RNA total

O RNA total foi isolado dos OP e OI, conforme instruções dos fabricantes do Trizol® Reagent (Life Technologies). Após o tratamento com RE (itens 3.1 e 3.4) nos períodos determinados (**Quadro 1**), o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS por duas vezes. Após o descarte do PBS, as células foram

removidas dos fundos das placas por pipetagens sucessivas com 1 mL de Trizol® Reagent. O *pool* de células utilizado para a RT-PCRq em cada período de interesse, em ambas as linhagens, foi obtido de um n=3 poços (de placas de 24 poços).

Para a extração efetiva do RNA total, após incubação com o Trizol, por 5 min, à TA, foram adicionados 200 µL de clorofórmio. Após centrifugação por 10 min a 4°C a 12000 x g, a fase superior aquosa foi transferida para tubo novo, onde foi adicionado 1 mL de álcool isopropílico. Após 10 min de incubação a TA, o RNA total foi precipitado por centrifugação por 10 min a 4°C a 10000 x g. Após secagem do *pellet* em bloco aquecedor, o RNA total foi solubilizado em água tratada com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC). A concentração do RNA total foi determinada em Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), pela leitura da absorbância a 260/280nm. As amostras de RNA total foram tratadas com DNase I (Roche) a 37°C por 30 min, em solução tampão. A DNase I foi inativada por purificação com fenol:clorofórmio.

3.9.2 Síntese de DNA complementar (cDNA)

O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA total, utilizando-se o *RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Fermentas), de acordo com as recomendações do fabricante. Resumidamente, cerca de 1 µg de RNA total foi incubado com 0,5 µM de oligo(dT)18, a 70 °C por 5 min e, em seguida, incubadas no gelo. Logo após, foram adicionados 5X *reaction buffer* (250 mM Tris-HCl pH8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 20 U *Ribolock™ Ribonuclease inhibitor*, 10mM dNTP mix, 200 U de *RevertAid H Minus M-MuLV Transcriptase Reversa* (Fermentas), seguida da incubação das amostras por 60 min a 42 °C, para permitir a síntese. A reação foi interrompida pelo aquecimento a 70 °C por 10 min.

3.9.3 Desenho dos pares de oligonucleotídeos (oligos)

Os pares de oligos foram obtidos com base nas sequências de *Rattus norvegicus* dos transcritos de interesse, depositadas no *GenBank* (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov, (**Quadro 2**), utilizando o programa Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>). O desenho utilizando o programa foi padronizado de forma que todos os oligos fossem obtidos com uma temperatura de *melting* média a 60 °C e que gerassem um amplicon (fragmento) de 200 a 300 pb.

3.9.4 Confirmação da síntese de cDNA por RT-PCR

O sucesso na síntese dos cDNAs das amostras foi confirmado por RT-PCR, utilizando um par de oligonucleotídeos desenvolvido para amplificar um gene constitutivo - a β -actina. Para isso, cerca de 50 ng de cada cDNA foi utilizado em uma reação de PCR contendo 0,4 μ M de cada oligo, 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 4 mM de $MgCl_2$ e 0,05 U/ μ L de *Taq*DNA Polimerase (PCR Master Mix 2X, Thermo Scientific). A reação ocorreu em termociclador após desnaturação inicial a 94 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento a 55 °C por 30 s, e extensão a 72 °C por 1 min; a extensão final foi realizada a 72 °C por 5 min. O produto amplificado foi confirmado por eletroforese em gel de agarose 1 %.

Quadro 2. Oligonucleotídeos e sequências utilizadas como molde nos ensaios de RT-PCRq

Gene		Acesso no GenBank	TA (°C)	Amplicon (pb)	Sequência do oligo
Referência	GAPDH	gi 402691727	60	230	F-5'AAGATGGTGAAGGTCGGTGT3'
					R-5'TGGAAGATGGTGTATGGGTTT3'
	B-actina	gi 402744873	60	222	F-5'TGTTGTCCCTGTATGCCTCT3'
					R-5'TAATGTCACGCACGATTTCC3'
	EEF1	gi 28460695	60	299	F-5'ACAGCAAAAATGACCCACCA3'
					R-5'ACGAACAGCAAAACGACCA3'
Alvo	Runx2	gi 511094001	60	250	F-5'GCCACCACTCACTACCACAC3'
					R-5'CAGCGTCAACACCATCATTC3'
	FGFR1	gi 13162332	60	208	F-5'CATCCCAGAGAAAATGGAG3'
					R-5'TTGTGAGAAGGCACCACAGA3'
	Colageno I	gi 158711703	60	257	F-5'ACTGCAACATGGAGACAGGTCAG3'
					R-5'GGCTACGCTGTTCTTGCAGTGAT3'
	Osteocalcina	gi 11761542	60	271	F-5'AGCCTTCATGTCCAAGCAGGAG3'
					R-5'CTAAACGGTGGTGCCATAGATGC3'

Par de Oligos: **F** - Sequência *Foward*; **R** - Sequência *Reverse*

3.9.5 RT-PCR quantitativa (RT-PCRq)

Transcritos que codificam Runx 2, FGFR1, Colágeno I e Osteocalcina foram quantificados nas amostras de OP e OI tratadas com RE nos períodos de interesse, por RT-PCRq. Os grupos 0 dias, foram considerados grupos controles para OP e OI, sem envolvimento do RE (**Quadro 1**). A variação quantitativa da expressão de cada um dos genes alvo em função do tratamento com RE foi determinada de forma relativa em relação aos níveis de expressão de Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β -actina e fator de alongamento eucariótico 1 (EEF1), utilizados como genes referência (**Quadro 2**).

As RT-PCRq foram realizadas em aparelho Rotor Gene 3000 (Corbett Research, Qiagen,) em volume final de 10 μ L, contendo 1 μ L de cDNA na diluição de 1:10 (v:v), de 0,2 a 0,5 μ M de cada oligonucleotídeo, 5 μ L de 2x *Platinum Sybr Green qPCR supermix-UDG* (Life Technologies). As condições de amplificação foram: 50 °C por 2 min, 95 °C por 2 min, seguida de 35 ciclos de 95 °C por 15 seg, 60 °C por 30 seg e 72 °C por 20 seg. A detecção do sinal de fluorescência foi sempre efetuada ao final de cada período de extensão. Ao final de cada programa, foram determinadas as curvas de *melting* ou dissociação de cada produto amplificado, entre 72 e 95 °C. Os resultados foram obtidos pelo programa *Rotor Gene Real time analysis 6.1* (Corbett Research), que forneceu os dados de valores de ciclo limite de leitura (Ct, *cycle threshold*), eficiência da PCR (E) e coeficiente R^2 . Todos os experimentos foram realizados em duplicata, além de conter um controle negativo.

Uma curva de diluição seriada, obtida pelo *pool* dos cDNA nas diluições de 1:10, 1:100 e 1:1000 (v/v), foi utilizada para a determinação da eficiência de

amplificação de cada par de oligonucleotídeos (alvo e referência). O coeficiente R^2 resultante da curva foi considerado ideal com valores acima de 0,95; sendo que a eficiência ideal deve ter valor igual a 1, representando que a cada ciclo de PCR, o par de oligos é capaz de gerar duas fitas novas de DNA (portanto, eficiência de 100%).

3.10 Avaliação da síntese de colágeno total

O ensaio colorimétrico de *Sirius Red* (TULLBERG-REINERT & JUNDT, 1999), foi realizado a fim de avaliar a síntese de colágeno pelos osteoblastos (OP e OI) após 7 (OP) e 10 dias (OI) de tratamento com RE (**Quadro 1**).

Transcorridos os períodos de interesse, o meio de cultura foi desprezado e as células foram lavadas com PBS. As células foram então fixadas com 1 mL do fixador Bouin por 1 h, à 37°C. Em seguida, as células foram lavadas em água destilada por 15 min, para posterior coloração com *Sirius Red* (1 mg/mL do corante *Picro Sirius Red* em solução saturada de ácido pícrico), à 37°C por 30 min. O excesso do corante foi removido dos poços com HCl 0,01 N. Posteriormente, a monocamada foi solubilizada com 300 µL de NaOH 0,5 M, por 30 min sob agitação. Após este período, 100 µL do produto solubilizado foram transferidos para uma placa de 96 poços (fundo reto) e a DO foi mensurada à 540 nm.

Uma curva padrão de concentração de colágeno foi produzida a partir de dosagens estabelecidas de colágeno bovino comercial tipo I. O colágeno em pó foi dissolvido em solução de ácido acético 0,1 N, na concentração de 10 mg/mL e colocado em placa de 24 poços, para secagem à 37°C *overnight*. Em seguida, o colágeno seco distribuído sobre a superfície dos poços da placa foi submetido ao

mesmo procedimento de coloração pelo *Sirius Red* descrito acima. Após a solubilização, foi realizada a diluição seriada também em NaOH, variando de 0 a 10 mg/mL de colágeno. Utilizando esta curva, a quantidade de colágeno total sintetizada pelas células foi inferida a partir da leitura da DO também à 540 nm.

3.11 Avaliação da mineralização por Vermelho de Alizarina

O vermelho de alizarina permite corar e identificar precipitados de cálcio resultantes do processo de mineralização da matriz extracelular. Este método foi utilizado para avaliar os efeitos do RE sobre a deposição de matriz calcificada pelos osteoblastos, após 7 e 14 dias (OP), 14 e 21 dias (OI), períodos descritos no **Quadro 1**.

Conforme método descrito por GREGORY *et al.*, (2004), após lavagem em PBS, foram adicionados 1 mL de álcool 70% e as células foram incubadas por 1 h a 4 °C. Após lavagens com PBS e água Milli-Q, as células foram coradas com 1 mL da solução de vermelho de alizarina 2% (pH 4.2), por 15 min à TA. A alizarina foi removida e a monocamada lavada com água Milli-Q até clarear. Em seguida, as células foram novamente lavadas com PBS e água Milli-Q. Após secagem em TA, a placa foi analisada em microscópio de luz, para observar a presença de nódulos de mineralização corados de vermelho. A marcação foi fotodocumentada, sendo as placas estocadas a -20 °C.

A alizarina incorporada à monocamada foi quantificada conforme descrito por LIN *et al.* (2008). As monocamadas foram eluídas em 500 µL/poço de cloreto de cetilperidínio 10% a 37°C, sob agitação. Posteriormente, 100 µL da solução

foram transferidos, em triplicata, para uma placa de 96 poços (fundo reto), e a DO mensurada à 550 nm.

Uma curva padrão de concentração foi obtida para quantificar a quantidade de alizarina incorporada nos nódulos mineralizados após a coloração. O corante em pó *Alizarin Red S* (Sigma-Aldrich) foi dissolvido em água na concentração de 6000 nmols/mL. Posteriormente foram feitas diluições seriadas em cloreto de cetilperidínio 10%, variando de 0 a 6000 nmols. Através do programa Max-Pro 2.0, os valores da DO foram correlacionados com a curva padrão, de modo a quantificar o conteúdo de alizarina, em nmols/mL. Os valores obtidos foram multiplicados por dois para estimar o conteúdo de cálcio presente nas amostras (de acordo com LIN *et al.* - 2008): 1 nmol de alizarina tem a capacidade de se ligar a 2 nmols de Cálcio).

3.12 Osso bovino trabeculado como *scaffold* tridimensional

O osso bovino trabeculado da marca Lumina-Bone/ Critéria® foi utilizado neste projeto como matriz tridimensional, nas formas mineralizada e desmineralizada. Trata-se de tecido ósseo de origem bovina, preparado em blocos de estrutura porosa. Para a realização dos experimentos, cada bloco fornecido pela empresa foi cortado em 16 pedaços de dimensões aproximadas de 0,5 cm³ cada, utilizando um disco diamantado dupla face, acoplado a um micromotor elétrico (Beltec, LB-100).

Os fragmentos de ossos utilizados na forma mineralizada foram lavados por cinco vezes em PBS contendo antibióticos e fungicida (100 U/mL de penicillina, 100 µg/mL de streptomomicina e 0,25 µg/mL de Fungizona®), e após secos foram

irradiados em luz UV por 30 min. Em seguida, os fragmentos foram colocados nas placas de 24 poços (um fragmento por poço) em meio α MEM 10%, para equilíbrio do pH, por 24 h a 37°C e 5% de CO₂. Os OP e OI foram plaqueados de forma concentrada nos fragmentos ósseos, conforme descrito nos itens 3.2 e 3.3.

A desmineralização dos fragmentos de ossos bovinos (também cortados a 0,5 cm³) se deu por incubação em EDTA 10% estéril, durante 48 h, à temperatura ambiente (TA) em frasco fechado. Em seguida, os fragmentos foram lavados por cinco vezes em PBS contendo antibióticos e fungicida e imediatamente colocados nas placas de 24 poços. O equilíbrio de pH destes fragmentos ocorreu por incubação em meio α MEM 10%, por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. As células foram incubadas junto a este *scaffold* conforme descrito no item 3.2.

3.13 Avaliação Estatística

3.13.1 *Análise estatística dos ensaios em cultura*

Dois ou três experimentos foram realizados para cada teste proposto, sendo cada um deles ensaiado em triplicata. Os resultados foram analisados por meio do programa *Prism statistical software* (Graphpad, San Diego, CA), sendo avaliados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov (com valor de P Dallal-Wilkinson-Lilliefor). Os dados foram representados como média \pm desvio padrão e, estatisticamente comparados usando teste t de *Student* para cada grupo tratado em relação ao grupo controle sem RE. Foi utilizado o teste t pareado quando os valores assumiram distribuição normal e o teste de Mann-Whitney não paramétrico, quando os valores não assumiram distribuição Gaussiana. Intervalos com níveis de confiança maiores que 95% foram considerados significativos ($p < 0,05$).

3.13.2 *Análise estatística dos ensaios por RT-PCRq*

A análise de expressão diferencial foi feita utilizando-se o *software* REST 2009 (desenvolvido por PFAFFL *et al.*, 2002 e PFAFFL *et al.*, 2003). Resumidamente, a análise da expressão gênica relativa utilizou a expressão dos três genes referência para normalizar o nível de expressão de cada um dos genes alvo. O programa foi escolhido por permitir levar em consideração os valores de eficiência de amplificação de cada par de oligos na análise. Níveis de confiança maiores que 95% foram considerados significativos ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Curva Dose-efeito do RE em relação à viabilidade celular

Para avaliação da relação dose-efeito do RE *in vitro*, visando a seleção da dose de RE mais adequada aos demais experimentos propostos, foram realizados ensaios de MTT nos períodos de 1, 2, 3 e 6 dias para culturas de OP e OI, submetidas a cinco concentrações de RE, variando de 1 a 0,025 mM (Figura 1).

Após 1 dia de tratamento, ambas as culturas de OP e OI revelaram níveis de DO similares ou maiores que o grupo controle (sem estímulo de RE), em todas as concentrações testadas (Figura 1A e E). Tais resultados indicaram que o RE não interferiu negativamente durante a fase de aderência e proliferação inicial das células. Os melhores resultados foram obtidos dentro da faixa de concentração de RE entre 0,1 e 0,025 mM, sendo a dose de RE de 0,1 mM estatisticamente superior para ambos grupos celulares (Figura 1A e E). No período de 2 dias, os ensaios de MTT não revelaram ganho significativo ou proporcional de viabilidade celular em função do aumento das doses de RE, ou seja, não foi observado uma curva dose-efeito do RE nesse período (Figura 1B e F). Após 2 dias de tratamento, a faixa de concentração ideal de RE permaneceu entre 0,1 e 0,025 mM para ambas as culturas, com valores da DO superiores às do grupo controle (Figura 1B e F). A dose de 0,1 mM manteve o padrão superior de viabilidade celular, estatisticamente superior às demais doses (Figura 1B e F).

Os ensaios de MTT realizados aos 3 dias revelaram níveis de viabilidade significativamente mais altos em relação ao período anterior, para todas as doses testadas, em ambas as culturas de OP e OI (Figura 1C e G). Este resultado sugere a biocompatibilidade do RE, uma vez que independente da dose utilizada, tanto OP quanto OI aumentaram sua viabilidade celular entre o 2º e o 3º dia, apresentando um aumento de proliferação celular, tal como visto nas amostras controles, não tratadas com RE (Figura 1C e G). Para culturas de OP, a faixa de 0,1 a 0,025 mM permaneceu com valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (Figura 1C). Os índices de viabilidade observados nas culturas de OI tratadas com RE foram superiores aos valores das culturas não tratadas, embora sem suporte estatístico (Figura 1G). Em consonância com os períodos anteriores, aos 3 dias também não observamos evidências da relação dose-efeito do RE na faixa de concentração avaliada.

Após 6 dias de tratamento, concentrações mais altas de RE (1 e 0,5 mM) comprometeram a viabilidade de OI (Figura 1H). Somente a dose de 0,025 mM possibilitou maior viabilidade de OI em relação ao grupo controle (Figura 1H). Para OP, o tratamento com RE com todas as doses testadas induziu maior viabilidade celular. Entretanto, o efeito superior da dose 0,1 mM observada em todos os períodos anteriores (1, 2 e 3 dias), não foi estatisticamente significante no período de 6 dias (Figura 1D). Após 6 dias de cultura, as células já estão em confluência e se encontram em processo de diferenciação, o que possivelmente torna o método de viabilidade celular por MTT, pouco consistente para diagnóstico de diferenças entre os tratamentos. O

resultado mais positivo do RE para OP deveu-se possivelmente ao fato dessa cultura ser mais heterogênea e possuir ainda pré-osteoblastos em fase proliferativa aos 6 dias.

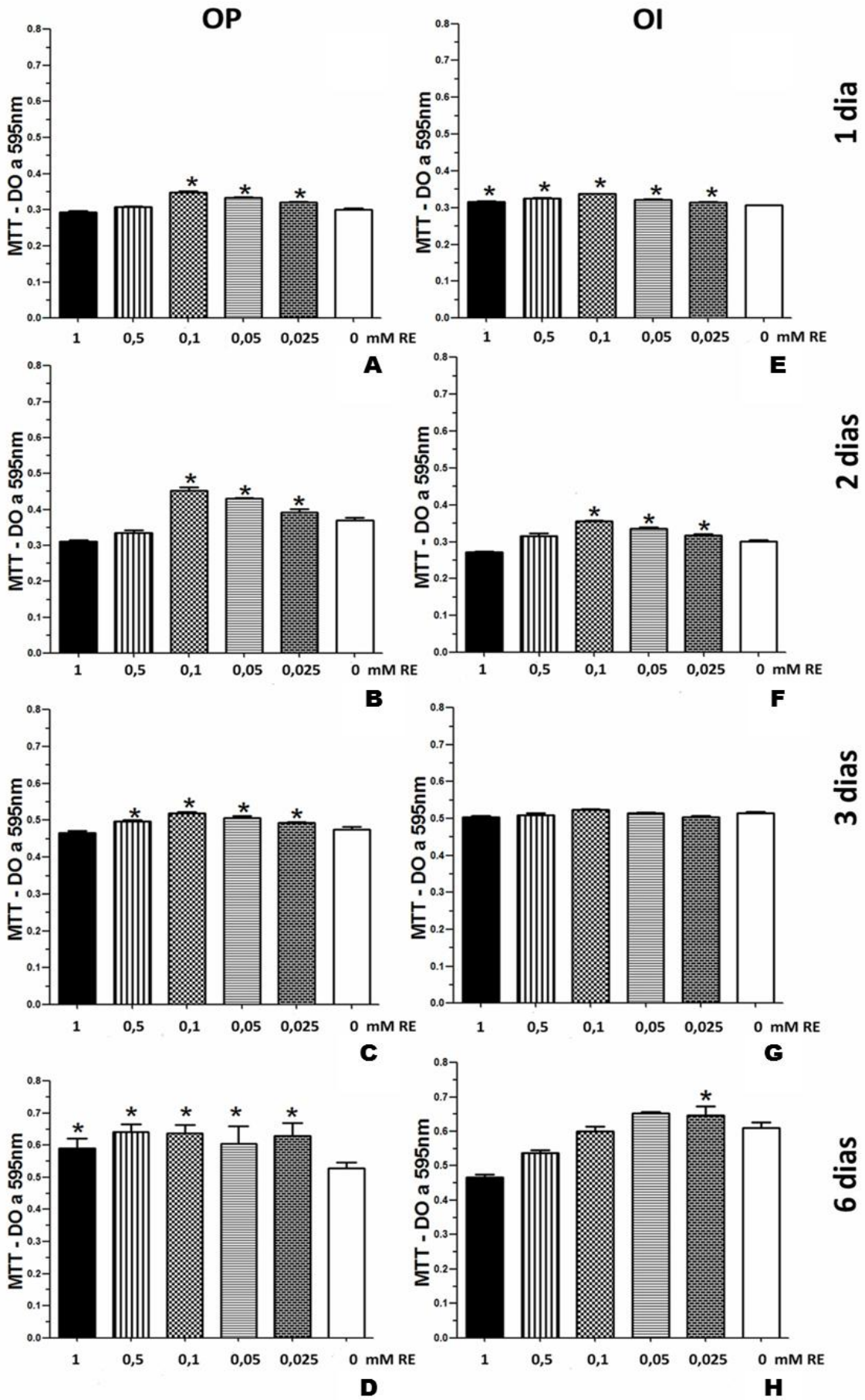


FIGURA 1. Curva dose-efeito do RE em osteoblastos primários (**OP**, A, B, C e D) e osteoblastos imortalizados (**OI**, E, F, G e H). No eixo X, índice de viabilidade celular via MTT, determinado em DO a 595 nm. No eixo Y, curva do RE nas doses de 1, 0,5, 0,1, 0,05, 0,025 e 0 (sem RE) mM. A viabilidade celular foi aferida após 1, 2, 3 e 6 dias de cultivo celular na presença de RE.

Mediante os resultados obtidos a partir da curva dose-efeito, a concentração de escolha para a avaliação dos efeitos do RE nas demais fases da evolução das culturas de OP e OI, foi de 0,1 mM. Esta dose conferiu melhores resultados nos níveis de viabilidade em todos os períodos avaliados, resultados que corroboram dados da literatura.

4.2 Efeito do tratamento com RE na diferenciação OP e OI em cultura bidimensional

4.2.1 Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

A atividade da enzima fosfatase alcalina (FA), considerada um indicador de diferenciação osteoblástica, foi mensurada após 4 dias de cultura de OP e 7 dias de cultura para OI (**Quadro 1**).

Os resultados indicaram que o estímulo do RE a 0,1 mM induziu aumento significativo da atividade de FA em OP (Figura 2A) e OI (Figura 2B), em níveis superiores aos dos grupos controle, não estimulados com RE, indicando aceleração do processo de diferenciação celular (Figura 2).

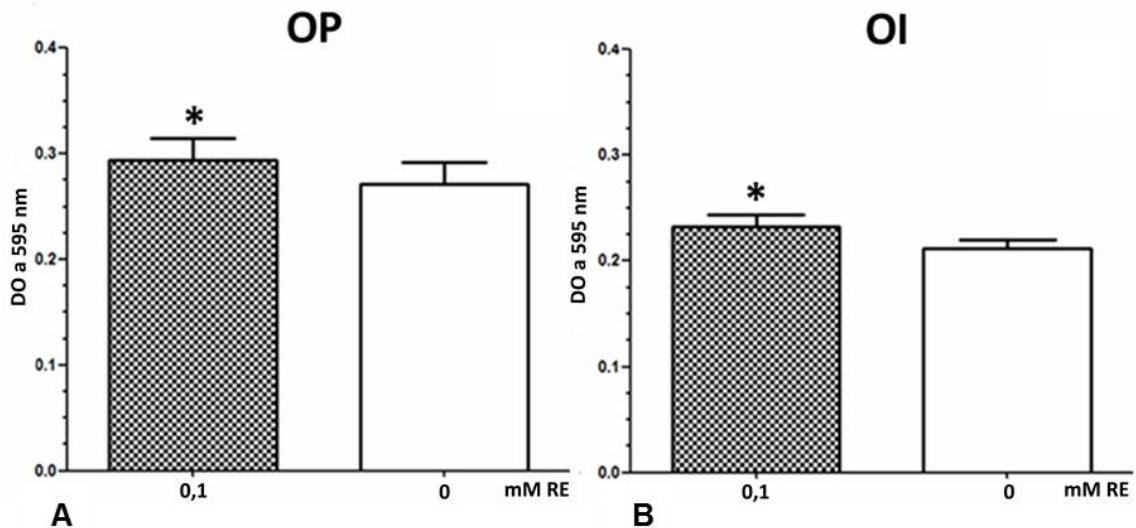


FIGURA 2. Representação gráfica da atividade da enzima fosfatase alcalina, obtida pelo ensaio de NBT/BCIP. Em (A), atividade mensurada em OP após 4 dias de tratamento com RE. Em (B), atividade enzimática em OI após 7 dias de tratamento com RE. (*) diferença significativa em relação ao grupo controle, sem RE ($p < 0,05$).

4.2.2 Análise da expressão de marcadores osteogênicos por RT-PCRq

A expressão de genes marcadores de diferenciação osteogênica (Runx2, FGFR1, Colágeno I e Osteocalcina) foi quantificada por RT-PCRq, a fim de confirmar os efeitos do RE sobre a indução da diferenciação celular, como os observados sobre a atividade da fosfatase alcalina. Os efeitos foram determinados em OP tratados com RE por 1 e 4 dias, e OI por 1 e 7 dias (**Quadro 1**). Os níveis de expressão relativa dos genes alvo foram determinados em função dos níveis detectados para genes referência (normalização de GAPDH, β -actina e EEF1).

4.2.2.1 Avaliações das extrações de RNA total, síntese dos cDNAs e das amplificações com os pares de oligos desenhados neste trabalho

A integridade do RNA total extraído de cada uma das amostras nos períodos de interesse foi avaliada em eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 3A). Após confirmação, uma alíquota de cada um dos RNAs totais

extraídos foi convertida em cDNA; o sucesso da síntese do cDNA também foi confirmado por RT-PCR, utilizando-se o par de oligos desenvolvido para amplificar transcritos de β -actina (Figura 3B).

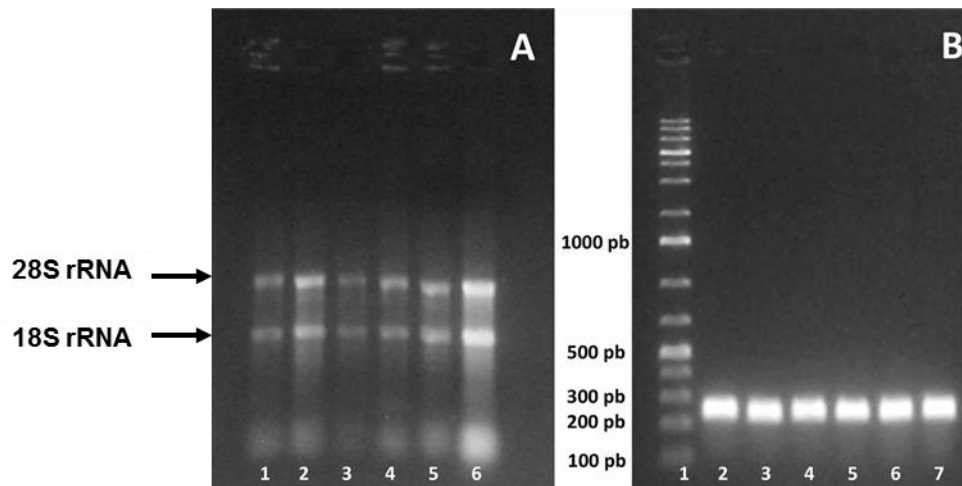


FIGURA 3. Avaliação da síntese de RNA total e síntese dos cDNAs das amostras de OP e OI após tratamento com RE. Em **(A)**, teste de integridade do RNA total extraído de culturas bidimensionais: (1) OP sem tratamento; (2) OP após 1 dia de tratamento; (3) OP após 4 dias de tratamento; (4) OI sem tratamento; (5) OI após 1 dia de tratamento; (6) OI após 6 dias de tratamento. Em **(B)**, amplificação de transcritos de β -actina para confirmar a síntese de cDNA: (1) padrão de peso molecular *GeneRuler1 Kbplus DNA ladder* (Fermentas); (2) OP sem tratamento; (3) OP após 1 dia de tratamento; (4) OP após 4 dias de tratamento; (5) OI sem tratamento; (6) OI após 1 dia de tratamento; (7) OI após 6 dias de tratamento.

Para testar o sucesso na amplificação de transcritos utilizando-se os pares de oligos desenhados neste trabalho, uma RT-PCR foi realizada utilizando-se um cDNA sintetizado a partir de um RNA total extraído de OP cultivados por 7 dias em meio suplementado. A amplificação foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 4). Neste caso, optou-se pela utilização de meio suplementado em fase anterior ao início da mineralização (7 dias) no intuito de maximizar a expressão dos genes osteogênicos. A escolha dos OP, neste caso, foi para que nos certificássemos de que não haveria qualquer variação na expressão gênica, as quais estariam sujeitas células

previamente selecionadas e manipuladas, tais como as de linhagens imortalizadas.

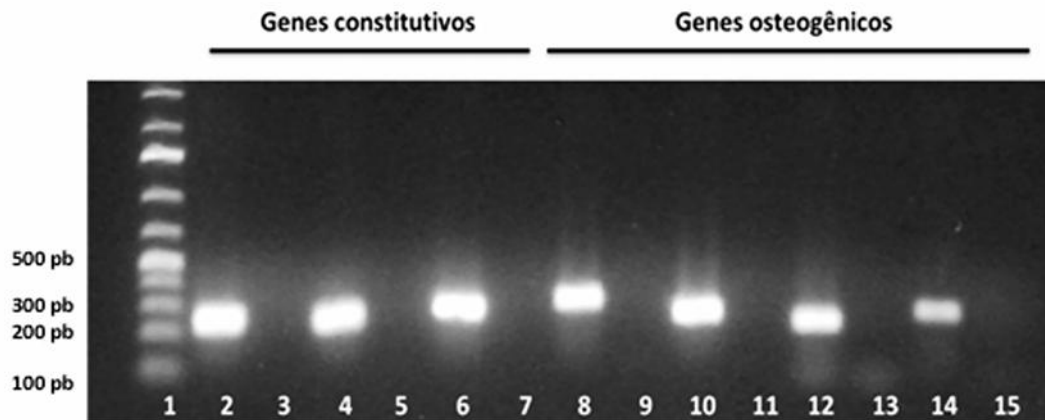


FIGURA 4. Teste dos oligos desenhados. Em (1) padrão de peso molecular *GeneRuler1 Kbps DNA ladder* (Fermentas); (2) amplificação utilizando o par de oligos para β-actina; (3) controle negativo; (4) GAPDH; (5) controle negativo; (6) EEF1; (7) controle negativo; (8) Runx2; (9) controle negativo; (10) FGFR1; (11) controle negativo; (12) Colágeno I; (13) controle negativo; (14) Osteocalcina; (15) controle negativo.

4.2.2.2 RT-PCRq

Pelo método de quantificação relativa, o nível de expressão de um gene alvo (de interesse) é determinado em função do nível de expressão de um gene referência, para que seja possível corrigir para a quantidade de células presentes entre os tratamentos. No entanto, para que essa comparação entre genes (alvo e referência) seja possível, é importante que os oligos desenhados permitam a amplificação dos respectivos genes com a mesma eficiência, ou ao menos que essa eficiência seja considerada nos cálculos de expressão gênica. Esta eficiência de amplificação dos pares de oligos representa a capacidade de geração de fitas novas a cada ciclo da PCR: o ideal é que duas fitas novas sejam geradas a cada ciclo de PCR, o que corresponde a uma eficiência igual a 1. Uma curva de diluição seriada a 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3} foi estabelecida para

permitir a determinação das eficiências de amplificação de cada par de oligo, via coeficiente R^2 . Os resultados indicaram uma eficiência de 0.99 para todos os pares de oligos utilizados nesse trabalho. Os valores de eficiência foram considerados no cálculo da expressão relativa, determinado pelo programa REST 2009.

As expressões relativas dos genes *Runx2*, *Colágeno I*, *FGFR1* e *Osteocalcina* foram determinadas após 1 e 4 dias para OP, e após 1 e 6 dias para OI, sempre em relação ao grupo controle, sem tratamento com RE, cultivado apenas em α MEM 10% por 24 horas (0 dia).

Para OP, os resultados indicaram uma redução significativa nos níveis de *Osteocalcina* após 1 dia de tratamento com RE (Figura 5A). Após 4 dias de tratamento, no entanto, foi possível observar a indução significativa da expressão de todos os genes quantificados nesse trabalho (*Runx2*, *Colágeno I*, *FGFR1* e *Osteocalcina*, Figura 5B).

Um padrão diferente foi observado quando OI foram analisados. A indução a expressão de *FGFR1* foi observada em OI após 1 dia de tratamento com RE (Figura 5C). Após 6 dias de tratamento com RE, os OI mostraram uma indução significativa da expressão de *Runx2* e *FGFR1* (Figura 5D). Não foi observada uma alteração na expressão de *Colágeno I* nos OI tratados com RE. Além disso, os OI aparentemente não expressaram transcritos de *Osteocalcina* até os 6 dias de cultura, mesmo na presença de RE, uma vez que não foi possível amplificar esses transcritos nessas amostras.

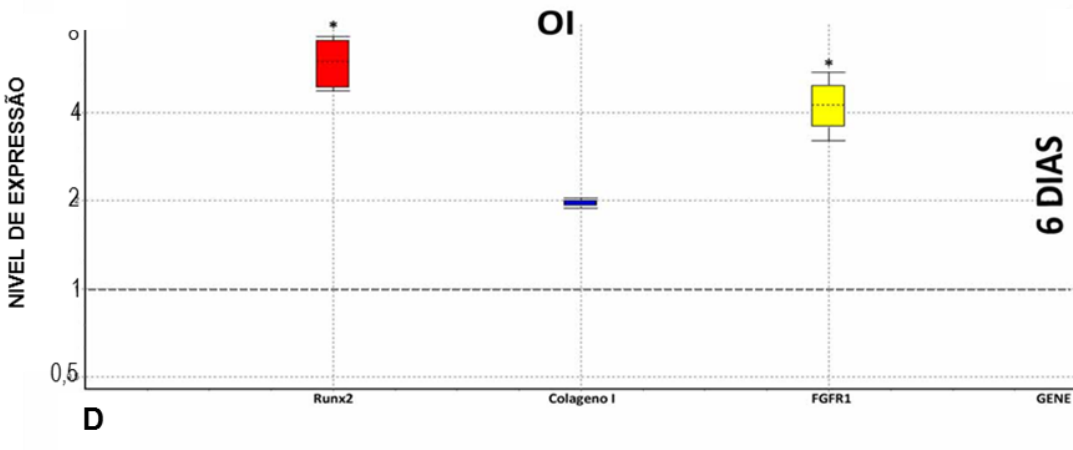
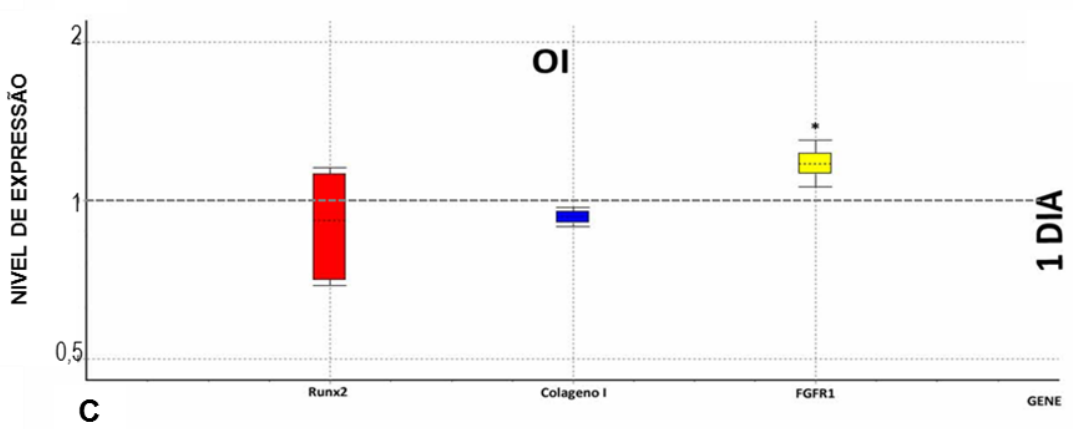
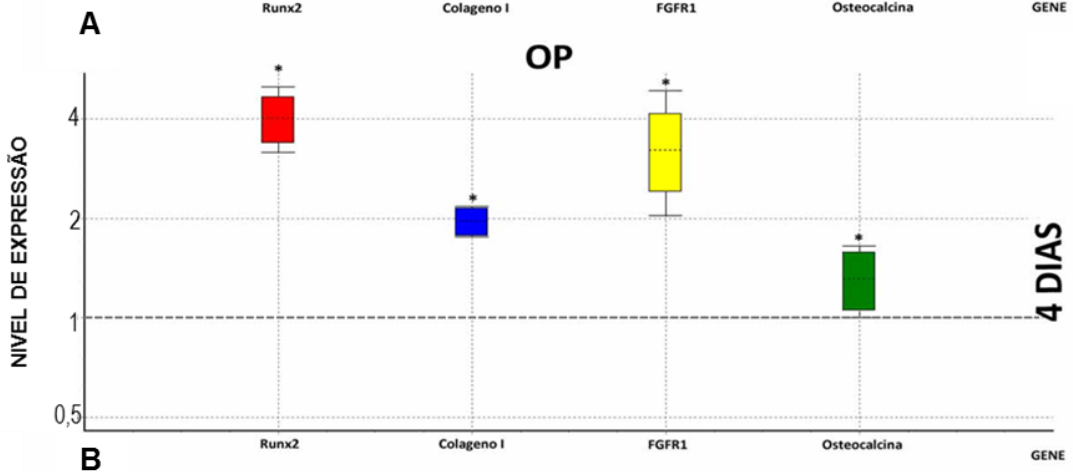
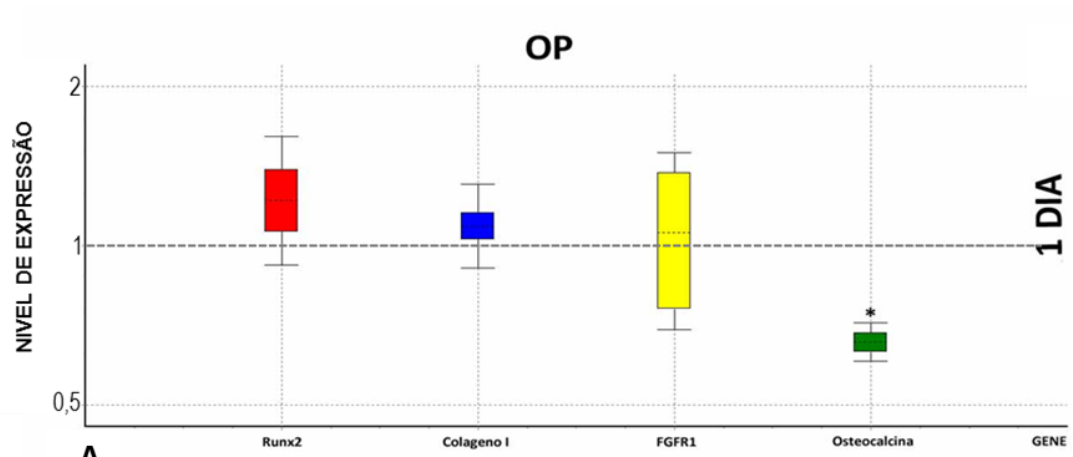


FIGURA 5. Níveis de expressão relativa de *Runx2*, *Colágeno I*, *FGFR1* e *Osteocalcina* quantificados em OP e OI tratados com RE, via programa REST 2009. Em (A), níveis de expressão em OP após 1 dia de tratamento com RE; em (B), OP após 4 dias de tratamento; em (C) níveis em OI após 1 dia de tratamento; em (D), OI após 6 dias de tratamento.

4.3 Avaliação da deposição de matriz de Colágeno

As fases de avaliação da quantidade de colágeno produzida pelos osteoblastos foram estabelecidas aos 7 dias para OP e 10 dias para OI (**Quadro 1**). Foi possível observar um aumento significativo da quantidade de Colágeno produzida pelos OP após 7 dias de cultivo com estímulo do RE a 0,1 mM, em relação ao grupo controle (Figura 6A). Já nos OI, o grupo tratado com RE não apresentou diferença estatisticamente comprovada em relação ao grupo controle (Figura 6B). Os resultados de quantificação de Colágeno em OP e OI após tratamento com RE, corroboraram com os obtidos por RT-PCRq, em que níveis de expressão de Colágeno I significativos foram observados apenas para OP.

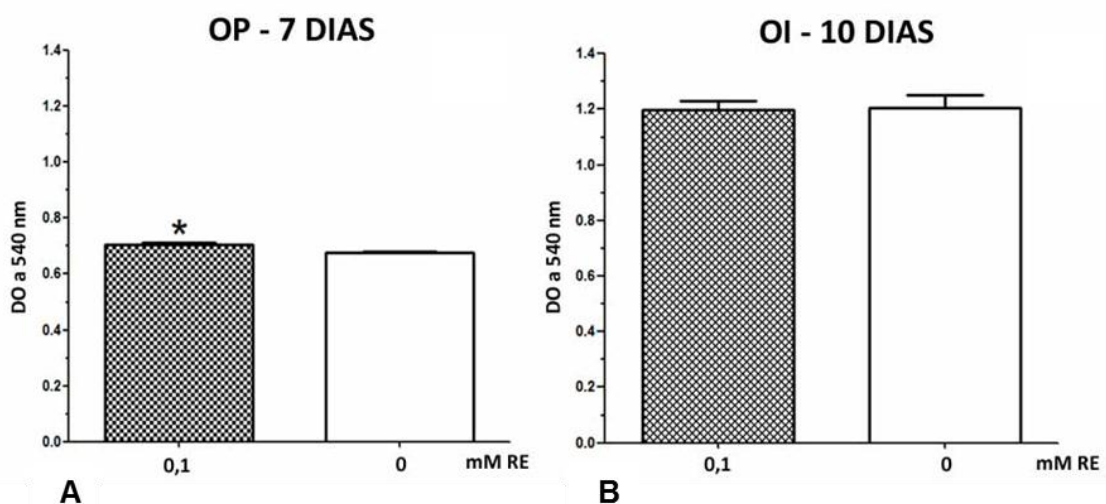


FIGURA 6. Quantificação da produção de Colágeno total, determinada pela coloração de *Sirius red*, induzida pelo tratamento com RE. Em (A), quantificação em OP após 7 dias de tratamento com RE. Em (B), quantificação em OI após 10 dias de tratamento com RE. Significância determinada em $p < 0.05$.

4.4 Avaliação da deposição de matriz calcificada

Os efeitos do tratamento com RE sobre o potencial de deposição de matriz calcificada ou mineralizada pelos OP e OI foram determinados aos 7 e 14 dias para OP e aos 14 e 21 dias para OI (**Quadro 1**). Os resultados indicaram que nos períodos mais tardios o RE foi capaz de influenciar as culturas de OP e OI, levando à diminuição da mineralização, representada pela concentração de íons Ca^{2+} , após a solubilização e quantificação (Figura 7A e B).

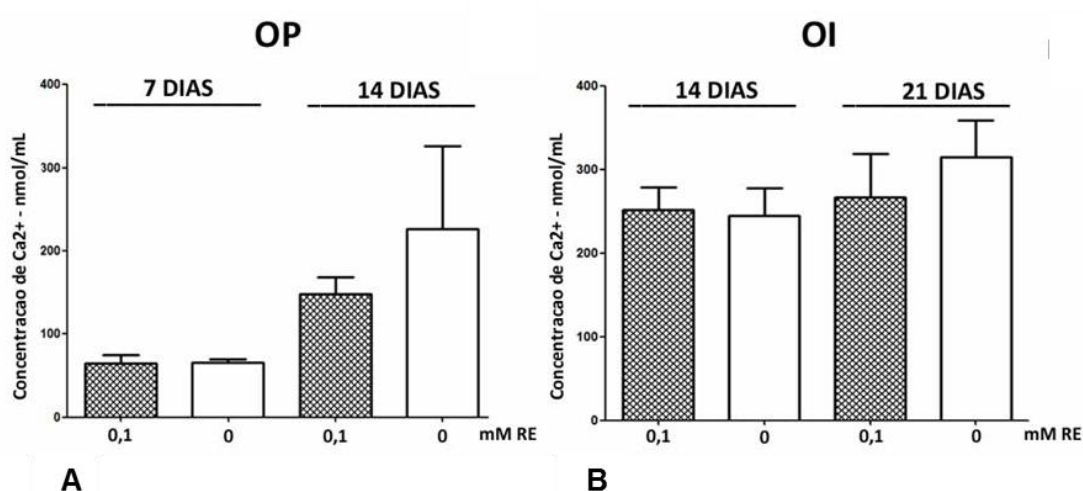


FIGURA 7. Quantificação da deposição de matriz calcificada, determinada pela coloração de vermelho de alizarina, induzida pelo tratamento com RE. Em (A), efeitos na deposição de Ca^{2+} determinados em OP após 7 e 14 dias de tratamento com RE. Em (B), efeitos em OI após 14 e 21 dias de tratamento.

4.5 Efeito do tratamento com RE nas culturas tridimensionais

Fragmentos de ossos bovino trabeculado (OBT) foram utilizados nesse trabalho nas formas mineralizada (OBM) e desmineralizada (OBD) como *scaffolds* para as culturas de OP e OI, na presença ou ausência do tratamento com RE a 0,1 mM. O objetivo aqui foi verificar se o estímulo do RE seria capaz de induzir índices de viabilidade semelhantes também em culturas

tridimensionais. A leitura foi realizada após a retirada dos fragmentos de OBT dos poços nos tempos de cultivo estabelecidos, dessa forma, garantimos que os índices de viabilidade foram determinados apenas nas células que aderiram ao osso.

Os resultados indicaram que independentemente do tipo celular e do *scaffold*, o tratamento com RE sempre induziu uma viabilidade celular superior, quando comparado ao grupo não tratado, em todos os períodos testados, para ambos os tipos celulares (Figuras 8 e 9).

4.5.1 Culturas de osteoblastos sobre osso bovino mineralizado (OBM)

As culturas de OP e OI em OBM apresentaram maior viabilidade quando tratadas com RE em relação ao grupo controle (Figura 8). Embora a diferença tenha sido estatisticamente comprovada, a presença do OBM parece interferir na viabilidade celular, uma vez que o plaqueamento sobre o *scaffold* foi feito com o dobro da quantidade de células plaqueadas em monocamada (sem *scaffold*). O nível de viabilidade celular dos OP, tanto dentro do *scaffold* quanto na monocamada adjacente, mostraram viabilidade celular bem abaixo da observada nos poços bidimensionais, que não receberam o *scaffold* mineralizado.

O efeito negativo do OBM não foi tão evidente nas culturas de OI, uma vez que em todos os períodos avaliados, a viabilidade celular foi superior ao observado nos OP sobre os *scaffolds*.

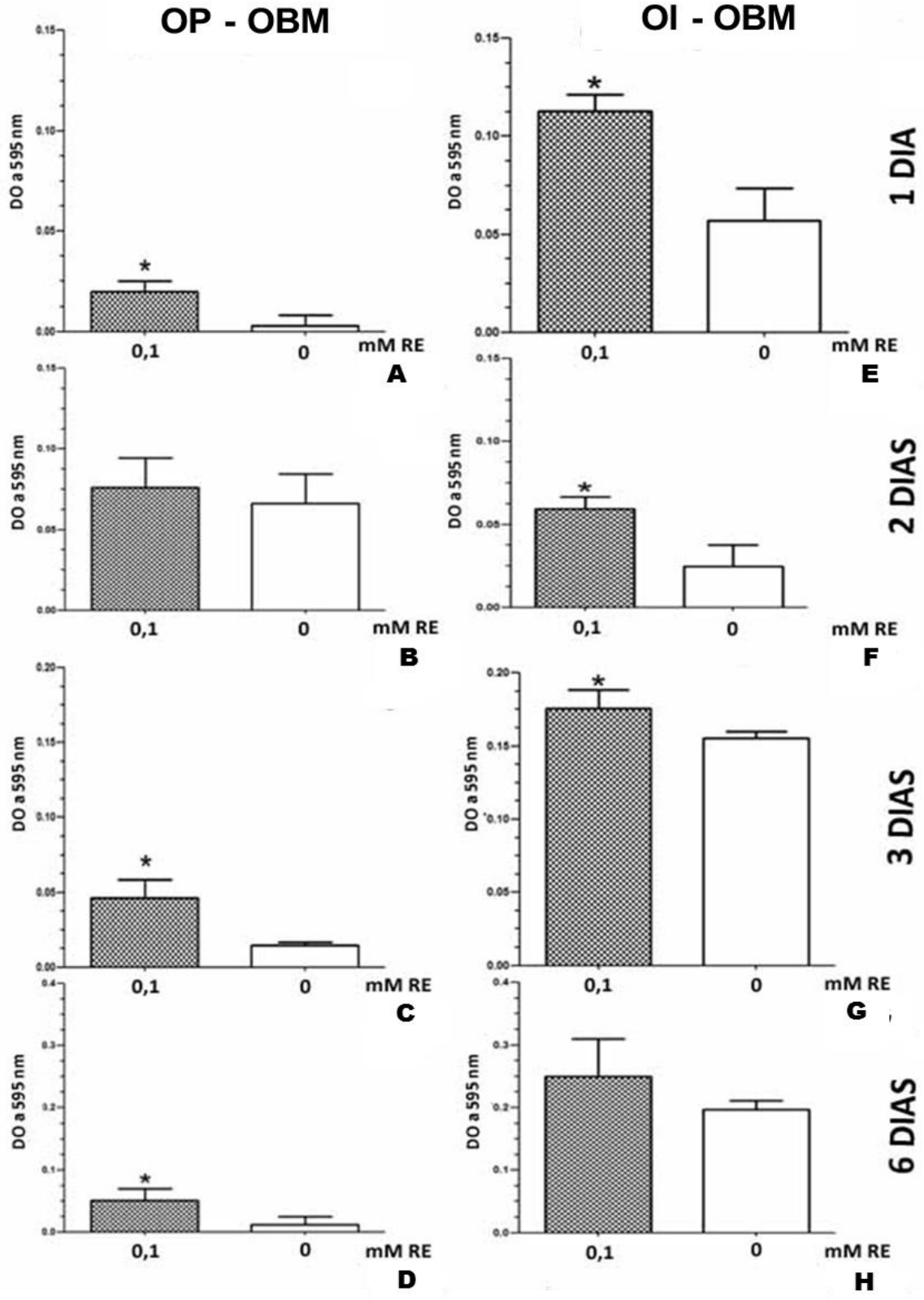


FIGURA 8. Quantificação da viabilidade celular (ensaio de MTT), em OP e OI cultivados sobre *scaffold* de osso bovino mineralizado (OBM), após 1, 2, 3 e 6 dias de tratamento com RE. Em (A), OP em OBM após 1 dia de tratamento; em (B) OP em OBM após 2 dias com RE; em (C) OP em OBM após 3 dias com RE; em (D), OP em OBM após 6 dias com RE; em (E) OI em OBM após 1 dia com RE; em (F), OI em OBM após 2 dias em RE; em (G), OI em OBM após 3 dias com RE; e (H) OI com OBM após 6 dias em RE. Significância a $p < 0.05$.

4.5.2 Culturas de osteoblastos sobre osso bovino desmineralizado (OBD)

Assim como nas análises com OBM, o RE favoreceu a viabilidade celular de OP e OI cultivados sobre o osso bovino desmineralizado (OBD) em todos os períodos de tempo avaliados (Figura 9). Os resultados indicaram que o tratamento com RE induz maior viabilidade dos OP e OI cultivados sobre OBD, uma vez que os índices de viabilidade foram iguais ou superiores ao grupo controle, não tratado (Figura 9).

Comparando-se os dois *scaffolds*, tanto os OP quanto os OI foram mais viáveis quando cultivadas sobre o OBD (Figura 9), em comparação com o OBM (Figura 8). Ao longo do tempo, observou-se um melhor desempenho dos OI sobre os *scaffolds*, visto que este tipo celular mostrou uma tendência de aumento da viabilidade celular sobre o OBM, tal como ocorrido nos ensaios com OBD, apesar da viabilidade ser menor em OBM.

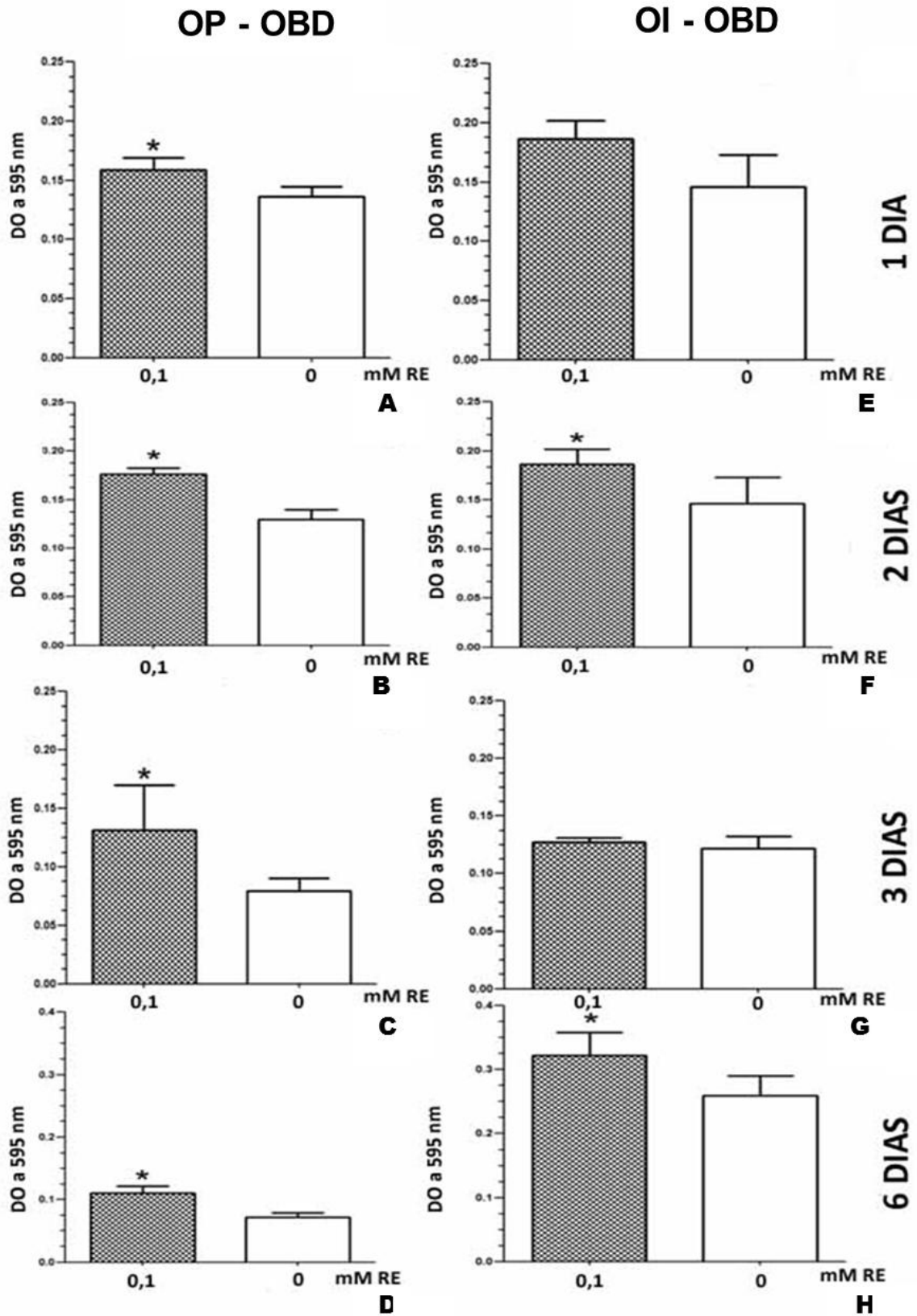


FIGURA 9. Quantificação da viabilidade celular (ensaio de MTT), em OP e OI cultivados sobre *scaffold* de osso bovino desmineralizado (OBD), após 1, 2, 3 e 6 dias de tratamento com RE. Em (A), OP em OBD após 1 dia de tratamento; em (B) OP em OBD após 2 dias com RE; em (C) OP em OBD após 3 dias com RE; em (D), OP em OBD após 6 dias com RE; em (E) OI em OBD após 1 dia com RE; em (F), OI em OBD após 2 dias em RE; em (G), OI em OBD após 3 dias com RE; e (H) OI com OBD após 6 dias em RE. Significância a $p < 0.05$.

5 DISCUSSÃO

O ranelato de estrôncio (RE) é a mais recente droga disponibilizada para o tratamento de osteoporose e prevenção de fraturas (FAN *et al.*, 2011). Estudos *in vitro* sugerem que este fármaco promove a proliferação e diferenciação de osteoblastos (CANALIS *et al.*, 1996; BONNELYE *et al.*, 2008). Porém o efeito anabólico e os mecanismos de ação celular e molecular do RE sobre o osso são ainda pouco compreendidos e estão sendo amplamente investigados. Através de novos parâmetros, utilizados no presente estudo, verificamos se a aplicação do RE favoreceria o metabolismo dos osteoblastos e se proporcionaria benefícios no crescimento e proliferação celular, já amplamente abordados na literatura atual. Ainda vislumbramos averiguar, se ofereceria riscos de citotoxicidade quando aplicado *in loco*, em diferentes concentrações, nas culturas de osteoblastos.

Antes dos tratamentos com RE, foi realizada uma cultura preliminar dos OP isolados segundo protocolo de extração preconizado em nosso laboratório, a partir de calvária de neonatos de ratos *Wistar* e dos OI da linhagem MC3T3-E1. O monitoramento diário dessas culturas nos permitiu conhecer a evolução do processo de diferenciação das células, e compará-lo com os aspectos previamente descritos na literatura. Os aspectos observados, incluindo capacidade de adesão, proliferação e morfologia foram similares aos descritos por ORRISS *et al.* (2011), sugerindo que não houve contaminação por outros tipos celulares nas culturas de OP e que as células cultivadas eram de fato osteoblastos, conforme mostrado nas figuras do Anexo. Na fase de

deposição de matriz orgânica, após 5 dias do plaqueamento, as culturas revelaram estruturas elétron-luscentes descritas na literatura como fase de brilho, com deposição de matriz orgânica (ORRISS *et al.*, 2011) e na fase posterior, de mineralização, a partir de 7 dias de cultura foi possível observar a deposição da matriz calcificada disposta de forma trabecular em estruturas elétron-densas. Como mostrado nas figuras 1, 2 e 3 do anexo, que ilustram os aspectos encontrados em nossa cultura preliminar, foram detectadas diferenças morfológicas e temporais no padrão de maturação e de mineralização entre OP e OI. Por essa razão, os períodos de avaliação escolhidos para a realização das técnicas utilizadas neste trabalho foram distintos, conforme descrito no item 3.5.

Uma vez estabelecidas as culturas de OI e OP passamos ao tratamento com RE. Em divergência com a maioria dos estudos que avaliaram os efeitos do RE em cultura, não utilizamos meio de cultura suplementado com reagentes indutores de diferenciação osteogênica (ATKINS *et al.*, 2009; COULOMBE *et al.*, 2004; VERBERCKMOES *et al.*, 2004). Para tanto, as culturas de OP e OI foram mantidas em meio de cultura α MEM 10% – *Minimal Essential Medium*, with alfa modification (Sigma-Aldrich), conforme descrito no item 3.1 da metodologia. A suplementação do meio com ácido ascórbico, β -glicerofosfato e/ou ainda dexametasona (AAsc, BGF e Dex) poderia induzir a diferenciação de osteoblastos, sem necessariamente envolver o RE ou ainda mascarar os resultados. De fato, os indicadores da maturação ou diferenciação osteogênica revelados neste estudo por meio dos ensaios da fosfatase alcalina e RT-PCR revelaram um efeito positivo do RE no processo de diferenciação dos osteoblastos.

Outro diferencial neste estudo em relação aos demais já publicados refere-se à utilização do reagente puro (P.A.), a fim de investigar exclusivamente os efeitos do RE em cultura de osteoblastos, sem a interferência de outros reagentes químicos. Utilizamos o ranelato de estrôncio p.a. (Especificações do fabricante: Pure *Strontium Ranelate powder*, CAS N^o:135459-87-9, MF:C₁₂H₁₀N₂O₈SSr₂, Molecular weight: 517.52g, Type: Immune Function Agents Promoting bone growth, Grade Standard: Medicine Grade; Fabricante: Baoji Guokang Bio-Technology Co.,Ltd), importado da empresa BioX Corporation, fornecedora do reagente para os laboratórios farmacêuticos que utilizam este mesmo RE na formulação de medicamentos, tais como Protos[®], disponibilizado comercialmente, pelo Laboratório *Servier*. Alguns estudos vêm utilizando o Protos[®] para a avaliação dos efeitos do RE nas culturas ou para o tratamento de animais experimentais. Entretanto, esse medicamento de uso oral possui 2g de RE e 2g de excipientes (aspartame, maltodextrina e manitol), adicionados para tornar o medicamento palatável. Mais uma vez, imaginamos que a utilização de reagentes adicionais nas culturas poderia comprometer o comportamento celular e a interpretação dos resultados. Alguns outros estudos têm utilizado a associação de cloreto de estrôncio, ranelato de sódio ou cloreto de cálcio (ATKINS *et. al.*, 2009; COULOMBE *et. al.*, 2004; VERBERCKMOES *et. al.*, 2004). Do mesmo modo, a opção pelo uso do RE puro, diluído no meio de cultura basal elimina a possibilidade de gerar efeitos sinérgicos ou antagônicos, ou qualquer interferência de outros reagentes ou íons sobre as culturas celulares.

Inicialmente, foi analisado o efeito do RE na viabilidade celular, por meio de uma curva dose-efeito, plotada segundo os valores de densidade óptica

(595 nm) gerados pelo ensaio MTT nas doses de RE variando entre 0,025 a 1mM, em 4 períodos distintos (1, 2, 3 e 6 dias). Todas as concentrações testadas mostraram resultados iguais ou melhores em relação às culturas controle sem o envolvimento do RE, tanto em OP quanto em OI. Um fato interessante foi a ausência de uma relação dose-efeito evidente, ou seja, em todos os períodos avaliados, o aumento das doses de RE não promoveu um aumento proporcional na viabilidade celular. Mas, de um modo geral, até o período de 3 dias, tanto para OI quanto para OP, os maiores níveis de densidade óptica foram observados na concentração de 0,1 mM, que condiz com a dose de RE mais empregada em estudos *in vitro*, por corresponder à dose plasmática circulante de íons estrôncio (Sr^{2+}), em indivíduos submetidos ao tratamento com Protos® por via oral. Percebemos que o efeito superior da dose 0,1 mM, visível em todos os períodos anteriores, não foi evidente aos 6 dias. Isso pode ser justificado por se tratar de um período tardio de proliferação, no qual o método de viabilidade celular não mais se aplica, uma vez que as células já confluíram e entraram na fase inicial de diferenciação, independentemente dos efeitos do RE. Mas, a avaliação da viabilidade celular aos 6 dias nos revelou uma diferença comportamental na evolução das culturas entre OI e OP. Aos 6 dias a viabilidade das células imortalizadas foi influenciada pelas concentrações mais altas de RE. Como observado na Fig.1-H, as doses de 1 e 0,5 mM promoveram uma queda da viabilidade em relação ao grupo controle. Somente a dose de 0,025 mM permaneceu com nível de viabilidade celular superior ao grupo controle. Nos OP, os efeitos do RE em relação à viabilidade celular permaneceram superiores ao grupo controle, em todas as doses. Essas observações tornaram evidentes as diferenças de

metabolismo entre os tipos celulares avaliados, conforme mostrado na literatura. Esperava-se um comportamento diferenciado entre as linhagens estudadas, uma vez que os osteoblastos imortalizados representam uma linhagem mais homogênea. Já a cultura de OP, coletada de calotas cranianas, poderia conter células em diferentes estágios de maturação, e tal heterogeneidade poderia influenciar o metabolismo celular e a resposta aos ensaios realizados, além de justificar diferenças em relação aos resultados observados em OI.

A avaliação da viabilidade das culturas após 1, 2 e 3 dias propiciou também a observação dos efeitos do RE em função do tempo. Entre 2 e 3 dias ocorreu um aumento significativo da viabilidade celular, tanto nas culturas controle, quanto nas culturas tratadas com RE. Esse é um achado importante, pois independente da comparação entre as doses, nota-se que de 2 para 3 dias as células seguiram o processo de diferenciação normalmente, exibindo um aumento da proliferação celular dentro das expectativas. Em outras palavras, o RE se revelou um fármaco biocompatível para uso local, passível de utilização direta sobre osteoblastos, uma vez que não interferiu negativamente no metabolismo das células osteoblásticas em cultura.

A partir da curva dose-efeito a concentração de escolha para avaliação dos efeitos do RE nas demais fases e ensaios foi a de 0,1 mM. A análise da influência do RE na fase de maturação ou diferenciação celular foi avaliada pela quantificação colorimétrica de fosfatase alcalina após ensaio de NBT/BCIP e por RT-PCR quantitativa de alguns marcadores de diferenciação osteogênica. O aumento da atividade da FA, seguido de uma posterior diminuição correlaciona-se com uma fase avançada de mineralização da matriz

e um perfil celular mais maduro (JAISWAL *et al.*, 1997). O ensaio de NBT/BCIP mostrou que o estímulo do RE na dose de 0,1 mM interferiu na atividade da FA, que apresentou níveis de DO superiores aos encontrados nos grupos controle, não tratados com RE, tanto em OP quanto em OI (Figura 2). Estes dados estão de acordo com os encontrados por CHOUDHARY *et al.* (2007) e BONNELYE *et al.* (2007).

Além da análise de atividade da enzima fosfatase alcalina, alguns genes considerados marcadores de diferenciação osteogênica foram selecionados para análise de RT-PCR quantitativa.

De acordo com os resultados mais expressivos das fases indicadas na Figura 3, após a realização dos ensaios por RT-PCRq, as análises foram normalizadas com os genes de referência (**Quadro 2**). As amostras de OP foram coletadas após 1 e 4 dias de estímulo com RE, e as de OI após 1 e 6 dias. Os grupos controle, sem estímulo de RE, foram correspondentes ao período de 0 dias, em ambas as linhagens e representados nos gráficos da figura 5, pelo nível de expressão 1.

O *Runx2*, gene relacionado ao domínio Runt, também conhecido como Cbfa1, está ligado principalmente à proliferação e diferenciação de osteoblastos, sendo obrigatório na regulação osteogênica, na formação do esqueleto, na ossificação endocondral e intramembranosa (KOMORI *et al.*, 1997; MUNDLOS *et al.*, 1997; OTTO *et al.*, 1997). Além disso, HU *et al.* (2013) mostraram por alterações epigenéticas, que os níveis de expressão de *Runx2* são grandemente correlacionados com a habilidade de diferenciação osteogênica em células tronco de tecido adiposo. O nível de expressão quantitativa deste gene chegou a aumentar 4 vezes em OP após 4 dias e

quase 8 vezes em OI após 6 dias de tratamento com RE em relação nível 1 (grupo controle).

A *Osteocalcina* (OC), também conhecida como proteína ácida gama-carboxiglutâmica óssea, é um importante marcador para células de linhagem osteoblástica. Conforme mostrado por STEIN *et al.* (2004) a expressão mais intensa de OC se dá entre o final da fase de deposição de matriz orgânica, com pico máximo na fase de mineralização. Os resultados para OC revelaram uma sub-expressão em OP após 1 dia de tratamento, sendo revertido de modo estatisticamente significativo, acima do nível 1 (grupo controle), após 4 dias. Para as culturas de OI, não houve níveis detectáveis nos períodos avaliados. Considerando que a avaliação por RT-PCRq neste estudo ocorreu nas fases mais precoces da diferenciação osteoblástica (entre 4-6 dias), esses resultados são bastante coerentes, pois nessa fase as células ainda estão na fase final de proliferação e início de diferenciação celular. A diminuição da expressão de OC após 1 dia de tratamento com RE também nos oferece subsídios para justificar a diminuição da capacidade da deposição mineral pelos OP e OI, em fases posteriores, avaliadas pela quantificação dos conteúdos de Ca^{2+} após coloração Vermelho de Alizarina. A OC é uma proteína importante para a fase de mineralização, que se iniciou por volta do 7º dia nas culturas de OP e no 10º dia nas culturas de OI, conforme observado em nossos estudos preliminares (Anexo). Dessa forma, seria necessário avaliar esse marcador gênico em fases mais tardias da diferenciação osteoblástica.

Um dos mecanismos de ação do RE relatado na literatura, que culmina no aumento da proliferação celular nos osteoblastos é a ativação de receptores sensíveis a cálcio - CaSR (BROWN *et al.*, 2004, FERNÁNDEZ *et al.*, 2013).

Os dados de CAVERZASIO e THOUVEREY (2011) confirmam este mecanismo, sugerindo ainda que o RE, através de um novo mecanismo sensível a cátion independente de CaSR, é capaz de aumentar a expressão de *FGFR1*, podendo justificar o aumento da proliferação celular. Por essa razão, a avaliação de expressão quantitativa desse receptor, em níveis aumentados em nossas culturas, pode sugerir a atuação do RE por esse mecanismo de ação.

Já o Colágeno tipo I, é um dos marcadores mais rapidamente expressos em células comprometidas com a linhagem de osteoblastos, sendo a deposição na matriz extracelular um evento relativamente inicial na via de diferenciação de osteoblastos (AUBIN, 2001). Nas culturas de OP, houve aumento significativo do nível de expressão de Colágeno I em OP após 4 dias de tratamento com RE. Nos demais grupos, não houve diferença estatística, o que está de acordo com os resultados da quantificação de colágeno total, por Sirius Red, que foram significativos em OP aos 7 dias e sem diferença em OI aos 10 dias.

Numa análise temporal, observamos que após 24 h de estímulo com RE a expressão dos marcadores *Runx2*, *Col I* e *FGFR1* tiveram sua expressão inalterada em OP, já os resultados dos OI neste período, mostraram que a expressão de *FGFR1* foi supra estimulada na presença do RE, sendo o nível de expressão inalterado para os demais marcadores. Estes resultados sugerem que apenas 24 h de estímulo com RE não foram suficientes para alterar o nível de expressão dos marcadores em OP. Já o resultado diferenciado para *FGFR1* em OI, pode ser justificado pela maior capacidade proliferativa própria das linhagens imortalizadas. Os resultados para OC

mostraram que o período de avaliação se deu antes da fase de mineralização, o que justificaria sua expressão não detectável em OI.

Após 4 dias, o estímulo do RE foi capaz de aumentar o nível de expressão dos marcadores *Runx2*, *Col 1* e *FGFR1* em OP. E aos 6 dias houve maior expressão de *Runx2* e *FGFR1* nas amostras de OI.

A avaliação da deposição de matriz orgânica após coloração de *Sirius Red*, mostrou um aumento da síntese de colágeno total após 7 dias de estímulo com RE, nas culturas de OP. Como mostrado nos ensaios de MTT, o RE foi capaz de aumentar a viabilidade celular, portanto, podemos inferir que os OP sob estímulo do RE atingiram a fase de deposição de matriz orgânica antecipadamente, o que pode ter promovido o aumento observado na síntese de colágeno. Esses resultados vão ao encontro de dados similares publicados por BARBARA *et al.* (2004). Já aos 10 dias, nas culturas de OI, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle. Este resultado está de acordo com os resultados de YAN *et al.* (2013), que mostraram que a capacidade de síntese dos OI (linhagem MC3T3-E1 da ATCC) diminui com o avanço das passagens. Em nosso estudo, as células imortalizadas (OI), foram descongeladas, expandidas, e utilizadas entre a 3ª e a 6ª passagem, porém não se sabe ao certo a exata passagem na qual se encontram desde sua aquisição junto a ATCC. Soma-se também o fato das células utilizadas nesse estudo terem sido doadas entre laboratórios e passarem por processos de congelamento e descongelamento constantes, o que pode diminuir sua capacidade de diferenciação osteogênica (YAN *et al.*, 2013). Além disso, o período de 10 dias pode ter sido tardio para detectar variações na dinâmica de deposição do colágeno.

Neste estudo, os efeitos do RE na fase de deposição de minerais pelos osteoblastos foram avaliados e quantificados por métodos colorimétricos. Delicados grânulos de mineralização foram observados nas culturas por microscopia direta e o conteúdo de cálcio foi quantificado após coloração com Vermelho de Alizarina (Figura 7). Tanto nas culturas de OP, quanto nas de OI, o conteúdo de íons Ca^{2+} diminuiu nos grupos tratados com RE em relação aos grupos controle, principalmente nos períodos tardios (OP - 14 dias e OI - 21 dias). Estes dados, aparentemente incoerentes com os benefícios do RE na aceleração da maturação osteoblástica, identificada nas fases anteriores (fases de proliferação e maturação), são semelhantes a outros estudos envolvendo RE *in vitro*, onde nenhuma dose testada mostrou aumento na mineralização em relação ao grupo controle sem RE (VERBERCKMOES *et. al.*, 2003, 2004; BARBARA *et. al.*, 2004). Esses resultados podem ser justificados pela manutenção das nossas culturas em meio basal, sem os suplementos necessários às etapas de mineralização. A deposição de matriz mineralizada pelos osteoblastos *in vitro* é dependente da presença do ácido ascórbico (AAsc) e β -glicerofosfato (BGF). Tais suplementos, AAsc e BGF, são fundamentais para o suprimento iônico necessário para a formação dos cristais de hidroxiapatita - HA (BELLOWS *et. al.*, 1986). Nas culturas mantidas apenas com o meio basal há escassez de íons Ca^{2+} e de suprimento de fosfato para formação inicial dos depósitos mineralizados. Somado a ausência de íons cálcio disponíveis no meio, é importante ressaltar que o estrôncio compete com o cálcio na formação da hidroxiapatita. Sabe-se que na formação dos cristais de HA *in vivo*, a cada 10 íons Ca^{2+} (raio atômico: 0,99 Å) é incorporado 1 íon Sr^{2+} (raio atômico: 1,13 Å). Essa troca iônica confere maior densidade óssea

após o tratamento com RE (BOIVIN, 2009). Podemos inferir que nos nossos tratamentos, como os íons Sr^{2+} estão disponibilizados em abundância nos grupos tratados com RE e são da mesma família dos íons Ca^{2+} , na tabela periódica (Família 2A - Metais alcalinos terrosos), eles podem estar competindo pelos sítios de cristalização, devido à similaridade iônica. Desse modo, em nossas culturas controle, mesmo com baixa disponibilidade de cálcio, devida a ausência dos suplementos, o nível de deposição de fosfato de cálcio deve ser maior que nas culturas tratadas com RE, onde teoricamente os grânulos devem conter mais estrôncio e menos cálcio. Contrapondo-se aos nossos achados, alguns estudos têm demonstrado um aumento de mineralização em amostras tratadas com RE (ATKINS *et. al.*, 2009; BONNELYE *et. al.*, 2007). Entretanto as discrepâncias entre os resultados podem ser justificadas pela diferença dos métodos de detecção de cálcio por análises histomorfométricas ou semi-quantitativas (ATKINS *et. al.*, 2009; BONNELYE *et. al.*, 2007). Além disso, a utilização de meios de cultura com os suplementos osteogênicos padrão, limitam extrapolar o mérito dos resultados exclusivamente ao RE.

Nas culturas tridimensionais, tal como verificado nas culturas em monocamadas, o efeito do tratamento com RE mostrou índices de viabilidade celular sempre superiores aos dos grupos sem RE, em todos os períodos testados. Entretanto, a comparação entre os *scaffolds* (osso bovino mineralizado x desmineralizado) revelou um dado curioso. A matriz mineralizada (OBM), da marca comercial utilizada nesse estudo (Lumina-Bone®), parece interferir negativamente na viabilidade celular *in vitro*. Já nas culturas tridimensionais sobre osso bovino desmineralizado (OBD), em todos os períodos avaliados, os resultados revelaram benefícios pós-tratamento com

RE, tanto para OP quanto para OI, cuja viabilidade foi igual ou superior àquela de células não tratadas. Uma hipótese sobre o motivo da menor viabilidade das células cultivadas sobre matriz óssea mineralizada pôde ser construída a partir de uma análise preliminar (dados não mostrados) realizada nesse estudo. A fim de equilibrar ou condicionar as matrizes ósseas nos meios de cultura, antes da colonização pelos osteoblastos, blocos de OBM e OBD foram imersos em meio de cultura por uma noite, sendo este substituídos por 3 vezes antes do plaqueamento celular. A presença do vermelho de fenol no meio de cultura é um indicador de alterações no equilíbrio ácido-base, sinalizando pH básico com tons róseos, pH neutro com tons avermelhados e pH ácido com tons variando de alaranjado a amarelo, quanto menor o pH. Observamos que os fragmentos ósseos mineralizados promoviam a acidificação do meio de cultura, sinalizada pela mudança na tonalidade do meio, de vermelho para tons amarelados. Trabalhamos com a hipótese de que a matriz do OBM *in natura* (pronta pra uso), no formato de blocos trabeculados mineralizados, como chega às mãos dos cirurgiões para a enxertia, deve liberar alguns produtos/resíduos quando colocados em solução. Possivelmente, em condições *in vivo*, as alterações visualizadas no meio de cultura e suas consequências sobre a viabilidade celular podem não ter significado clínico ou podem ser dissipadas ou contornadas pelas condições biológicas dos sítios de enxertia. No caso das matrizes desmineralizadas, o efeito de alteração do pH do meio na fase de condicionamento de matrizes desmineralizadas não foi observado. Nas culturas tridimensionais sobre osso bovino desmineralizado (OBD), em todos os períodos avaliados, os resultados revelaram benefícios pós-tratamento com RE, tanto para OP quanto para OI, cuja viabilidade foi igual ou superior àquela

de células não-tratadas. Possivelmente, a desmineralização das matrizes em EDTA e as inúmeras lavagens dos fragmentos em água estéril antes de chegar à fase do condicionamento em meio de cultura, devem ter contribuído para a remoção de possíveis resíduos provenientes das matrizes ósseas mineralizadas.

O efeito negativo dos *scaffolds* mineralizados foi menos evidente nas culturas de OI, quando comparamos os níveis de viabilidade observados para OP cultivados nas mesmas condições. Mais uma vez, o comportamento celular, o metabolismo e resistência dos OI foram distintos das culturas de OP. Estes últimos se mostraram mais sensíveis, com menor viabilidade celular quando cultivadas sobre *scaffolds* de matrizes ósseas mineralizadas. Essa dedução também pôde ser confirmada quando observamos ou comparamos o comportamento dos OP cultivados em monocamada. Essas células mostraram maior capacidade proliferativa e de adaptação nas culturas em monocamada, com maiores níveis de DO, do que quando cultivadas nas culturas tridimensionais. Em outras palavras, o *scaffold* tridimensional de matriz óssea mineralizada não foi tão atrativo ou competitivo para os OP quanto a superfície plana de natureza plástica das placas de cultura.

Por outro lado, os *scaffolds* de OBD – matrizes desmineralizadas foram mais favoráveis às culturas de OP e OI, independentemente do tratamento com RE, quando comparadas com aquelas cultivadas em OBM, resultado similar ao encontrado por TRENTZ *et al.* (2003). Estes autores demonstraram que osteoblastos primários se adequaram melhor a *scaffolds* desmineralizados, os quais possuem boa estrutura osteocondutora e biocompatibilidade para o crescimento celular. Do mesmo modo, no trabalho realizado por MAUNEY *et*

al. (2005), *scaffolds* de osso bovino parcialmente mineralizados e desmineralizados revelaram maior habilidade no aporte de células de estroma de medula óssea do que matrizes completamente mineralizadas. Pelo exposto, sugere-se que componentes orgânicos da matriz óssea devem influenciar positivamente a adesão e diferenciação osteogênica *in vitro*. Estudos em nosso laboratório já estão sendo conduzidos no sentido de detectar ou avaliar quais componentes orgânicos são preservados nas matrizes de osso bovino após a fase de desmineralização e que possam contribuir positivamente para a adesão e proliferação celular sobre estes *scaffolds*. As proteínas morfogenéticas do osso, BMPs, em especial a BMP4 tem sido investigada e há fortes evidências de sua participação como um potencial atrativo para adesão de células osteogênicas (FERREIRA *et al.*, 2013).

De um modo geral, nas culturas 3D, até 2 dias, os níveis de OP e OI são muito similares. A partir do 3º dia de cultivo, os OI parecem se adaptar muito bem a presença do *scaffold*, com estímulo ou não do RE, apresentando viabilidade ascendente ao longo do tempo; diferente do observado nos OP, onde tanto com ou sem RE, existe uma queda da viabilidade com o passar do tempo. Essa adaptação dos OI à presença de matrizes 3D, pode ser devida a sua maior capacidade proliferativa, uma vez que são selecionados a partir de subclones com maior capacidade replicativa e de diferenciação.

Em suma, o presente estudo reitera os benefícios do RE divulgados previamente em relação aos efeitos sob a proliferação e diferenciação osteoblástica. Mais que isto, abre perspectivas promissoras para continuidade de estudos com o uso tópico do RE diretamente em sítios de lesão óssea, e abre também um leque de possibilidades para associação desse fármaco com

inúmeros biomateriais já testados como *scaffolds* para bioengenharia tecidual óssea.

6 CONCLUSÃO

O ranelato de estrôncio puro (p.a.) é um fármaco biocompatível, que não apresentou efeitos citotóxicos para uso *in loco* na faixa de concentração entre 0,025 a 1mM. Nossos resultados reiteram os efeitos positivos do RE sobre osteoblastos, especialmente para sua maturação e diferenciação celular. O sucesso da associação do RE com matrizes ósseas desmineralizadas pode possibilitar sua utilização como coadjuvante nas estratégias de bioengenharia tecidual óssea e nas terapias de preenchimento ósseo, abrindo também perspectivas de associação com outros tipos de matrizes tridimensionais naturais ou sintéticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdullah B, Shibghatullah AH, Hamid SS, Omar NS, Samsuddin AR. The microscopic biological response of human chondrocytes to bovine bone scaffold. *Cell Tissue Bank*. 2009; 10(3):205-13.

Abreu FAM, Ferreira CL, Silva GAB, Paulo CO, Miziara MN, Silveira FF, Alves JB. Effect of PDGF-BB, IGF-I growth factors and their combination carried by liposomes in tooth socket healing. *Braz Dent J*. 2013; 24(4):299-307.

Alam N, St-Arnaud R, Lauzier D, Rosen V, Hamdy RC. Are Endogenous BMPs Necessary for Bone Healing during Distraction Osteogenesis? *Clin Orthop Relat Res*. 2009; 467(12):3190-8.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*. 2001; 10(2):S96-S101.

Andy Wee AT, Morrey BF, Sanchez-Sotelo J. The fate of elbows with unexpected positive intraoperative cultures during revision elbow arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2013; 95(2):109-16.

Arlot M, Jiang Y, Genant H. Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. *J Bone Miner Res*. 2008; 23(2):215-222.

Atkins GJ, Welldon KJ, Halbout P, Findlay DM. Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. *Osteoporos Int*. 2009; 20(4):653-64.

Aubin JE. Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: Role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem*. 1999; 72(3):396-410.

Barbara A, Delannoy P, Denis B, Marie P. Normal matrix mineralization induced by strontium ranelate in MC3T3-E1 osteogenic cells. *Metabolism*. 2004; 53(4):532-7.

Brennan TC, Rybchyn MS, Green W, Atwa S, Conigrave AD, Mason RS. Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. *Brit L Pharmacol*. 2009; 157(7):1291-1300.

Boivin G, Farlay D, Khebbab MT, Jaurand X, Delmas PD, Meunier PJ. In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization. *Osteoporos Int*. 2010; 21(4):667-77.

Bonnelye E, Chabadel A, Saltel F, Jurdic P. Dual effect of strontium ranelate: Stimulation of osteoblast differentiation and inhibition of osteoclast formation and resorption in vitro. *Bone*. 2008; 42(1):129-38.

Burchard KW, Minor LB, Slotman GJ, Gann DS. Fungal sepsis in surgical patients. *Arch Surg*. 1983; 118(2):217-21.

Cabrera WE, Schrooten I, De Broe ME, D'Haese PC. Strontium and bone. *J Bone Miner Res*. 1999; 14(5):661-8.

Canalis E, Hott M, Deloffre P, Tsouderos Y, Marie PJ. The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. *Bone*. 1996; 18(6):517-23.

Caverzasio J, Thouverey C. Activation of FGF receptors is a new mechanism by which strontium ranelate induces osteoblastic cell growth. *Cell Physiol Biochem*. 2011; 27(3-4):243-50.

Brown EM, Chattopadhyay N, Quinn SJ, Kifor OYC,. The calcium-sensing receptor (CaSR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. *Biochem Pharmacol*, 2007; 74(3):438-447.

Chan KS, Chan CK, Nicolella DP. Relating crack-tip deformation to mineralization and fracture resistance in human femur cortical bone. *Bone*. 2009; 45(3):427-34.

Chapurlat RD. Treatment of postmenopausal osteoporosis with odanacatib. *Expert Opin Pharmacother*. 2014; 15(4):559-64.

Chen L, He Z, Chen B, Yang M, Zhao Y, Sun W. Loading of VEGF to the heparin cross-linked demineralized bone matrix improves vascularization of the scaffold. *J Mater Sci Mater Med*. 2010; 21(1):309-17.

Chesmel KD, Branger J, Wertheim H, Scarborough N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *J Oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 1998; 56(7):857-63.

Choudhary S, Halbout P, Alander C, Raisz L, Pilbeam C. Strontium Ranelate Promotes Osteoblastic Differentiation and Mineralization of Murine Bone Marrow Stromal Cells: Involvement of Prostaglandins. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(7):1002-10.

Costantino PD, Friedman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am*. 1994; 27(5):1037-74.

Coulombe J, Faure H, Robin B, Ruat M. In vitro effects of strontium ranelate on the extracellular calcium-sensing receptor. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 323(4):1184-90.

Dahl S, Allain P, Marie P, Mauras Y, Boivin G, Ammann P. Incorporation and distribution of strontium in bone. *Bone*. 2001; 28(4):446-53.

De Melo WM, de Oliveira FS, Marcantonio E Jr, Beloti MM, de Oliveira PT, Rosa AL. Autogenous bone combined with anorganic bovine bone for maxillary

sinus augmentation: analysis of the osteogenic potential of cells derived from the donor and the grafted sites. *Clin Oral Implants Res.* 2014; 25(5):603-9.

Del Carlo B, Pellegrini M, Pellegrino M. Modulation of Ca²⁺-activated K⁺ channels of human erythrocytes by endogenous protein kinase C. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr.* 2003; 1612(1):107-16.

Dongieux JW¹, Block MS, Morris G, Gardiner D, Dean K. The effect of different membranes on onlay bone graft success in the dog mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998; 86(2):145-51.

Fan Y, Fan Y, Li Z, Loan M, Lv C, Bo Z. Optimal principle of bone structure. *PLoS One.* 2011; 6(12):e28868.

Faria MA, Villa N, Carbonel AAF, Simões RS, Hadad S, Faraco FN. Análise histológica da lesão óssea de mandíbula de coelho após aplicação local de cloreto de estrôncio. *Rev Gaúcha Odontol.* 2010; 58(4):487-490

Fernández JM, Molinuevo MS, Sedlinsky C, Schurman L, Cortizo AM, McCarthy AD. Strontium ranelate prevents the deleterious action of advanced glycation endproducts on osteoblastic cells via calcium channel activation. *Eur J Pharmacol.* 2013; 706(1-3):41-47.

Ferreira CL, Abreu FAM, Silva GAB, Silveira FF, Barreto LBA, Paulino TP, Miziara MN, Alves JB. TGF- β 1 and BMP-4 carried by liposomes enhance the healing process in alveolar bone. *Arch of Oral Biology.* 2013; 487-490.

Fonseca MA, Hong C. An Overview of Chronic Oral Graft-Vs-Host Disease Following Pediatric Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Pediatr Dent.* 2008; 30(2):98-104.

Ge S, Zhao N, Wang L, Yu M, Liu H, Song A, Huang J, Wang G, Yang P. Bone repair by periodontal ligament stem cell-seeded nanohydroxyapatite-chitosan scaffold. *Int J Nanomedicine.* 2012; 54- 65.

Giannoudis PV1, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005; 36 Suppl 3:S20-27.

Gomes JM, Garcia CJ. Bone mineral density and androgen levels in elderly males. *Calcif Tissue Int*. 2006; 65(2):417-21.

Gregory CA, Grady GW, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. *Anal Biochem*. 2004; 329(1):77-84.

Helfrich MH, Ralston SH, Totowa NJ. Bone Research protocols, *Methods in Molecular Medicine*. Human Press. 2012; 80(3):129-144.

Hunter GK, Goldberg HA. Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(18):8562-5.

Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997; 64(2):295-312.

Jobke B, Burghardt AJ, Muche B, Hahn M, Semler J, Amling M, Majumdar S, Busse B. Trabecular reorganization in consecutive iliac crest biopsies when switching from bisphosphonate to strontium ranelate treatment. *PLoS One*. 2011; 6(8):e23638.

Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol*. 2001; 30(3):157-61.

Kim CH, You L, Yellowley CE, Jacobs CR. Oscillatory fluid flow-induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling. *Bone*. 2006; 39(5):1043-47.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, Shimizu Y, Bronson RT, Gao YH, Inada M, Sato M, Okamoto R, Kitamura Y, Yoshiki S and Kishimoto T. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997; 89(5):755-764.

Laureano FJR, Castelo BBL, Andrade ESS, Barbosa JRA. Comparação histológica entre o osso desmineralizado e polímero de mamona sobre a regeneração óssea. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2007; 73(2):186-92.

Lian JB, Stein GS. Runx2/Cbfa1: a multifunctional regulator of bone formation. *Curr Pharm Des*. 2003; 9(32):2677-85.

Liberman UA, Weiss SR, Bröll J. Effect of oral alendronate on bone mineral density and the incidence of fractures in postmenopausal osteoporosis, The Alendronate Phase III Osteoporosis Treatment Study Group. *N Engl J Med*. 1995; 333(22):1437-1443.

Lin TH, Yang RS, Tang CH, Wu MY, Fu WM. Regulation of the maturation of osteoblasts and osteoclastogenesis by glutamate. *Eur J Pharmacol*. 2008; 589(1-3):37-44.

Maïmoun L, Brennan TC, Badoud I, Dubois-Ferriere V, Rizzoli R, Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. *Bone*. 2010; 46(5):1436-41.

Marie PJ, Felsenberg D, Brandi ML. How strontium ranelate, via opposite effects on bone resorption and formation, prevents osteoporosis. *Osteoporos Int*. 2011; 22(6):1659-67.

Marie PJ. Cell and gene therapy for bone repair. *Osteoporos Int*. 2011; 22(6):2023-6.

Marie PJ1, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur J Endocrinol*. 2011; 165(1):1-10.

Mauney JR, Jaquiéry C, Volloch V, Heberer M, Martin I, Kaplan DL. In vitro and in vivo evaluation of differentially demineralized cancellous bone scaffolds combined with human bone marrow stromal cells for tissue engineering. *Biomaterials*. 2005; 26(16):3173-85.

Meunier PJ, Roux C, Seeman E, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2004; 350(5):459-68.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983; 65(1-2):55-63.

Mundlos S1, Otto F, Mundlos C, Mulliken JB, Aylsworth AS, Albright S, Lindhout D, Cole WG, Henn W, Knoll JH, Owen MJ, Mertelsmann R, Zabel BU, Olsen BR. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*. 1997; 89(5):773-779.

Nkenke E, Schultze-Mosgau S, Kloss F, Neukam FW, Radespiel-Tröger M. Morbidity of harvesting of chin grafts: a prospective study. *Clin Oral Implants Res*. 2001; 12(5):495-502.

Nóia CF, Ortega-Lopes R, Mazzonetto R, Chaves Netto HD. Segmental osteotomy with interpositional bone grafting in the posterior maxillary region. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 41(12):1563-5.

Orriss IR, Taylor SEB, Arnett TR. Rat Osteoblast Cultures. *Bone Res. Protocols, Methods in Molecular Biology*. 2012; 816 (3): 31-41.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997; 89(5):765-71.

Peng S, Xiaowei SL, Wang T, Zhaoyang L, Zhou G, Keith DKL, Guo X E. In Vivo Anabolic Effect of Strontium on Trabecular Bone Was Associated with Increased Osteoblastogenesis of Bone Marrow Stromal Cells. *J Orthop Res.* 2010; 28:1208-1214.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(9):e36-e36.

Pfaffl M., Lange I., Meyer HH. The gastrointestinal tract as target of steroid hormone action: Quantification of steroid receptor mRNA expression (AR, ER α , ER β and PR) in 10 bovine gastrointestinal tract compartments by kinetic RT-PCR. *Proc 15th Int Symp J Steroid Biochem Mol Biol - Poster Present.* 2003; 84(2-3):159-66.

Przedlacki J. Strontium ranelate in post-menopausal osteoporosis. *Pol J End* 2011; 62(3):65-71.

Reginster JY, Deroisy R, Neuprez A, Hiligsmann M, Zegels B, Bruyere O. Strontium ranelate: new data on fracture prevention and mechanisms of action. *Curr Osteoporos Rep.* 2009; 7(3):96-102.

Reginster JY, Kaufman J-M, Goemaere S, Devogelaer JP, Benhamou CL, Felsenberg D. Maintenance of antifracture efficacy over 10 years with strontium ranelate in postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int.* 2012; 23(3):1115-22.

Rizzoli R, Laroche M, Krieg MA, Frieling I, Thomas T, Delmas P, Felsenberg D. Strontium ranelate and alendronate have differing effects on distal tibia bone microstructure in women with osteoporosis. *Rheumatol Int.* 2010; 30(10):1341-48.

Rodriguez LEA, Carvalho AAVF, Azevedo ALM, Cruz CBBV, Maia AWC. Odontologic use of copper/aluminum alloys: mitochondrial respiration as sensitive parameter of biocompatibility. *Braz Dent J.* 2003; 14:32-36.

Schuckert KH, Jopp S, Osadnik M. The Use of Platelet Rich Plasma, Bone Morphogenetic Protein-2 and Different Scaffolds in Oral and Maxillofacial Surgery - Literature Review in Comparison with Own Clinical Experience. *J Oral Maxillofac Res.* 2011; 2(1): 55-63.

Seeman E, Meunier PJ, Roux C, Ortolani S, Badurski JE, Spector TD. The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med.* 2006; 459-68.

Spin-Neto R, Landazuri Del Barrio RA, Pereira LAVD, Marcantonio RAC, Marcantonio E, Marcantonio Jr E. Clinical Similarities and Histological Diversity Comparing Fresh Frozen Onlay Bone Blocks Allografts and Autografts in Human Maxillary Reconstruction. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2013; 15(4):490-497.

Springer ING, Terheyden H, Geiß S, Härle F, Hedderich J, Açil Y. Particulated bone grafts – effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res.* 2004; 15(2):205-12.

Stein GS, Lian JB, Wijnen AJ van, Stein JL, Montecino M, Javed A. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene.* 2004; 23(24):4315-29.

Stepan JJ. Strontium ranelate: in search for the mechanism of action. *J Bone Miner Metab.* 2013; 31(6):606-12.

Trentz OA, Hoerstrup SP, Sun LK, Bestmann L, Platz A, Trentz OL. Osteoblasts response to allogenic and xenogenic solvent dehydrated cancellous bone in vitro. *Biomaterials.* 2003; 24(20):3417-26.

Tsigkou O, Pomerantseva I, Spencer JA, Redondo PA, Hart AR, O'Doherty E, Lin Y, Friedrich CC, Daheron L, Lin CP, Sundback CA, Vacanti JP, Neville C. Engineered vascularized bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107(8):3311-6.

Valerio P, Pereira MM, Goes AM, Leite MF. The effect of ionic products from bioactive glass dissolution on osteoblast proliferation and collagen production. *Biomaterials*. 2004; 25(15):2941-8.

Verberckmoes SC, De Broe ME, D'Haese PC. Dose-dependent effects of strontium on osteoblast function and mineralization. *Kidney Int*. 2003; 64(2):534-43.

Verberckmoes SC, Behets GJ, Oste L, Bervoets AR, Lamberts LV, Drakopoulos M. Effects of Strontium on the Physicochemical Characteristics of Hydroxyapatite. *Calcif Tissue Int*. 2004; 75(5):405-15.

Watts D, Eliades T, Eliades G. Structural conformation of in vitro and in vivo aged orthodontic elastomeric modules. *Eur J Orthod*. 1999; 21(6):649-58.

Weibull L, Widmark G, Ivanoff C-J, Borg E, Rasmusson L. Morbidity after Chin Bone Harvesting – A Retrospective Long-Term Follow-Up Study. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2009; 11(2):149-57.

Zhao Y, Lin H, Zhang J, Chen B, Sun W, Wang X. Crosslinked three-dimensional demineralized bone matrix for the adipose-derived stromal cell proliferation and differentiation. *Tissue Eng Part A*. 2008; 15(1):13–21.