

Bruno Muzzi Camargos

Expressão de ativina A em células-tronco embrionárias de camundongo durante o processo de diferenciação em osteoblastos

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do Título de Doutor em Medicina

Belo Horizonte
2013

Bruno Muzzi Camargos

Expressão de ativina A em células-tronco embrionárias de camundongo durante o processo de diferenciação em osteoblastos

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação da
Universidade Federal de Minas Gerais
para obtenção do Título de Doutor em Medicina

Orientador: Prof. Dr. Fernando Marcos dos Reis
Co-orientador: Prof. Dr. Rubens Lene Carvalho Tavares

Belo Horizonte
2013

Camargos, Bruno Muzzi.
C171e Expressão da Ativina A em células-tronco embrionárias de camundongo durante o processo de diferenciação em osteoblastos [manuscrito]. / Bruno Muzzi Camargos. -- Belo Horizonte: 2013. 58f.: il.
Orientador: Fernando Marcos dos Reis.
Co-Orientador: Rubens Lene Carvalho Tavares.
Área de concentração: Saúde da Mulher.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Células-Tronco Embrionárias. 2. Ativinas. 3. Osteoblastos. 4. Proteína Morfogenética Óssea 4. 5. Osteocalcina. 6. Osteoporose. 7. Dissertações Acadêmicas. I. Reis, Fernando Marcos dos. II. Tavares, Rubens Lene Carvalho. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 328

Universidade Federal de Minas Gerais
Pós-Graduação em Medicina
Programa Saúde da Mulher
Laboratório de Reprodução Humana Aroldo F. Camargos
Hospital das Clínicas - Belo Horizonte / MG

Chefe do Departamento:
Prof. Dr. Cezar Alencar de Lima Rezende

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:
Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral



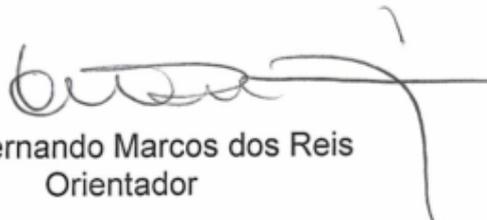
**FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores Fernando Marcos dos Reis, Maria Marta Sarquis Soares, Márcia Mendonça Carneiro, Ricardo Mello Marinho e Beatriz Santana Soares Rocha, aprovou a defesa da Tese intitulada **“Expressão da Ativina A em células-tronco embrionárias de camundongo durante o processo de diferenciação em osteoblastos”**, apresentada pelo doutorando **Bruno Muzzi Camargos**, para obtenção do título de Doutor em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica e Reprodução da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 01 de março de 2013.



Prof. Fernando Marcos dos Reis
Orientador



Profa. Maria Marta Sarquis Soares



Profa. Márcia Mendonça Carneiro



Prof. Ricardo Mello Marinho



Profa. Beatriz Santana Soares Rocha

DEDICATÓRIA

À minha família e amigos, que acompanharam todo o processo; absorvendo minhas ausências, compartilhando angústias e comemorando pelos resultados.

AGRADECIMENTOS

Aroldo Fernando Camargos e Fernando Marcos dos Reis, mentores, responsáveis pela oportunidade de aprendizado acadêmico e pessoal.

Rubens Lene Carvalho Tavares, parceiro de banca e professor que me apresentou o universo do cultivo celular.

Helen Lima Del Puerto, experiente doutora, fundamental na análise por biologia molecular.

Luciana de Oliveira Andrade, pesquisadora e doutora, pela valiosa colaboração com a imunocitoquímica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

A todos os integrantes do Laboratório de Reprodução Humana Aroldo Fernando Camargos, do Hospital das Clínicas / MG, que me receberam com carinho durante todos esses anos.

À família Salvador Silva, por ter sido um divisor de águas no meu futuro profissional.

Ao Sergio Rais Eis, a partir de quem eu conheci o mundo do osteometabolismo.

Obrigado meu Deus, sempre presente; em todos os momentos, em todas as suas formas.

"...A gratidão é a única coisa que eu nunca quis ensinar..."

Aroldo Fernando Camargos

<http://www.febrasgo.org.br/site/?p=1033>

COLABORADORES E FINANCIADORES

O cultivo e a diferenciação celular neste trabalho foram realizados no Laboratório de Reprodução Humana Professor Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a supervisão do Prof. Rubens Lene Carvalho Tavares. Os experimentos de PCR em tempo real foram realizados no mesmo laboratório, com a supervisão e participação direta da Dra. Helen Lima Del Puerto. A imunocitoquímica e as imagens de microscopia foram obtidas com a colaboração da Professora Luciana de Oliveira Andrade, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por meio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) Hormônios e Saúde da Mulher, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

SUMÁRIO

| | |
|--|----------------------|
| DEDICATÓRIA..... | v |
| AGRADECIMENTOS | vi |
| COLABORADORES E FINANCIADORES | vii |
| SUMÁRIO..... | viii |
| LISTAS (ABREVIATURAS, FIGURAS, GRÁFICOS, TABELAS) | ix, x, xi, xii, xiii |
| RESUMO (ABSTRACT)..... | xiv, xv |
| INTRODUÇÃO..... | 01 |
| 1. REVISÃO DA LITERATURA..... | 02 |
| 1.1. Componentes da Matriz Óssea..... | 02 |
| 1.2. Remodelação Óssea | 04 |
| 1.3. Células-Tronco Embrionárias..... | 05 |
| 1.4. Osteoporose | 05 |
| 1.4.1. Conceito | 05 |
| 1.4.2. Apresentação Clínica | 06 |
| 1.4.3. Epidemiologia | 06 |
| 1.4.4. Tratamento | 07 |
| 1.4.4.1. Agentes Anabolizantes..... | 07 |
| 1.4.4.2. Agentes Antirreabsortivos..... | 08 |
| 1.4.4.3. Terapia Hormonal | 08 |
| 1.4.5. Faturas Subtrocanterianas Atípicas..... | 08 |
| 1.5. Ativinas e Metabolismo Ósseo..... | 09 |
| 2. OBJETIVOS..... | 11 |
| 2.1. Objetivo Geral..... | 11 |
| 2.2. Objetivos Específicos | 11 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS..... | 12 |
| 3.1. Grupos Amostrais | 13 |
| 3.2. Obtenção das Células-Tronco Embrionárias | 14 |
| 3.3. Detalhamento Técnico do Cultivo Celular | 14 |
| 3.4. Meios de Cultura Utilizados | 16 |
| 3.5. Preparo do Material para Análise | 18 |
| 3.6. Extração de RNA e PCR em Tempo Real | 18 |
| 3.7. Imunocitoquímica | 22 |
| 4. RESULTADOS | 25 |
| 4.1. Indicadores de Qualidade das reações de PCR em Tempo Real | 25 |
| 4.2. Expressão de marcadores de indiferenciação celular | 26 |
| 4.3. Expressão de marcadores de diferenciação óssea..... | 26 |
| 4.4. Expressão gênica de ativina A..... | 28 |
| 4.5. Imunocoloração para ativina A..... | 28 |
| 5. DISCUSSÃO..... | 29 |
| 5.1. Cultivo e Diferenciação Celular | 29 |
| 5.2. PCR em Tempo Real | 29 |
| 5.3. Imunocitoquímica | 32 |
| 6. CONCLUSÕES | 33 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 34 |
| 8. ANEXOS..... | 42 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|---|
| AA | ácido ascórbico |
| Act | activin (ativina) |
| ALP | alkaline phosphatase (fosfatase alcalina) |
| AR | ácido retinóico |
| bALP | bone alkaline phosphatase (fosfatase alcalina óssea) |
| BMP | bone morphogenetic protein |
| BMP | bone morphogenetic protein (proteína morfogenética óssea) |
| BMSC | bone marrow stromal cell |
| Cbfa-1 | core binding factor alpha 1 |
| CE | corpos embrióides |
| COL1 | collagen 1 (colágeno tipo 1) |
| CT | célula-tronco |
| CT-4 | linhagem de célula-tronco embrionária |
| CTA | célula-tronco adulta |
| CTE | célula-tronco embrionária |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle medium |
| DMSO | dimetilsulfóxido |
| DNA | deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico) |
| DSH | dishevelled |
| EB | embryoid body (corpo embrióide) |
| ECM | extracellular matrix |
| EDTA | ácido etilenodiamino tetra-acético |
| EGF | epidermal growth factor |
| FCS | fetal calf serum (soro fetal bovino) |
| FGF | fibroblast growth factor |
| Fn | fibronectina |
| Gla | gama-carboxiglutamato |
| GMEM | Glasgow Minimum Essential Medium |
| hCG | gonadotrofina coriônica humana |
| BSP | bone sialoprotein |
| ICB | Instituto de Ciências Biológicas |
| IGF | insulin growth factor |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------|---|
| KOSR | Knockout Serum Replacement |
| LIF | leukemia inhibitory factor |
| LRP | lipoprotein receptor-related protein |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| MMP | matrix metalloproteinase |
| MSC | mesenchymal stem cell |
| NEAA | aminoácidos não essenciais |
| NANOG | transcription factor in embryonic stem cells |
| OC | osteocalcina |
| Oct-3/4 | octamer-binding transcription factor 3/4 |
| ON | osteonectin (osteonectina) |
| OP | osteopontin (osteopontina) |
| OPG | osteoprotegrina (osteoprotegrin) |
| p | valor de probabilidade |
| PBS | Phosphate Buffer Saline |
| PCR | polymerase chain reaction |
| RA | retinoic acid |
| RANKL | receptor activator of NF-kappa-B ligand |
| RNA | ribonucleic acid (ácido ribonucléico) |
| RP-HPLC | reverse-phase high-performance liquid chromatography |
| RT-PCR | real-time polymerase chain reaction (PCR de tempo real) |
| RT-PCR | reverse transcription polymerase chain reaction |
| Runx-2 | runt-related transcription factor 2 |
| SPN | sialoprotein (sialoproteína) |
| TGF- β | transforming growth factor beta |
| UFMG | Universidade Federal de Minas Gerais |
| WNT | Wingless (gene) |
| β ME | beta mercaptoetanol |
| μ g | micrograma |
| μ l | microlitro |
| μ m | micrômetro |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 01 - Diagrama com os componentes orgânicos e minerais do tecido ósseo | 03 |
| Figura 02 - Ilustração das etapas do ciclo de remodelação óssea | 04 |
| Figura 03 - Cultivo celular em gotas invertidas (E) e em suspensão tradicional (D)..... | 12 |
| Figura 04 - Fluxograma do estudo. Grupos CT, SEM BMP e COM BMP | 14 |
| Figura 05 - Diagrama ilustrativo das etapas envolvidas na imunocitoquímica | 22 |
| Figura 06 - Fotomicrografias da imunocitoquímica para ativina A: células-tronco indiferenciadas (A), células em estágio intermediário SEM BMP (B) e células que completaram todo o protocolo de diferenciação óssea, COM BMP (C). | 28 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 01 - Amplificação da Beta-Actina. Cycle Threshold (Ct) | 25 |
| Gráfico 02 - Curvas de desnaturação: β -Actina (A), fosfatase alcalina óssea (B), osteocalcina (C), ativina β A (D), Oct-4 (E), Nanog (F), Runx-2 (G)..... | 25 |
| Gráfico 03 - Expressão gênica dos marcadores de indiferenciação celular Oct-4 (A) e Nanog (B) em células-tronco indiferenciadas (CT) e corpos embrionários que receberam estímulo intermediário de diferenciação (sem BMP) | 26 |
| Gráfico 04 - Expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteobástica: osteocalcina (A), fosfatase alcalina óssea (B), RUNX-2 (C) no processo de diferenciação celular | 27 |
| Gráfico 05 - Expressão gênica da ativina A (subunidade beta-A) durante processo de diferenciação celular..... | 28 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Nomenclatura, Composição e utilização dos meios de cultura utilizados 17

Tabela 02 - Oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* utilizados para PCR 20

RESUMO

A busca de agentes anabolizantes tem sido alvo da pesquisa na terapia da osteoporose. As células-tronco embrionárias (CTE), diferenciadas em osteoblastos, têm sido utilizadas para o estudo da fisiologia celular. Protocolos de diferenciação celular em osteoblastos têm sendo utilizados com sucesso. Um estímulo comum aos protocolos de diferenciação osteoblástica é a proteína morfogenética óssea (BMP). Ativina A, um fator de crescimento que tem estrutura e função parcialmente homólogas ao BMP, apresenta efeitos importantes sobre a proliferação de osteoblastos e a remodelação óssea. Contudo, a definição do momento em que Ativina A passa a agir sobre a minealização óssea demanda maiores estudos. OBJETIVO: avaliar a expressão de Ativina A em CTE de camundongo durante protocolo de diferenciação celular para osteoblastos. MATERIAL e MÉTODOS: adaptamos técnicas de cultivo celular adotadas em protocolo de diferenciação de CTE em osteoblastos (Kawaguchi, 2006) e acompanhamos a diferenciação fenotípica *in vitro* de uma linhagem de células-tronco embrionárias (CT-4), isolada no Laboratório de Reprodução Humana Prof. Aroldo Fernando Camargos do Hospital das Clínicas da UFMG. Aplicamos o método de reação da cadeia de polimerase (PCR) em tempo real em diferentes fases do processo para evidenciar a expressão gênica de marcadores de indiferenciação celular (Oct-4 e Nanog), marcadores de diferenciação osteoblástica (osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e RUNX-2 e da Ativina A. Correlacionamos a expressão de todos esses genes-alvo em diferentes fases do processo de diferenciação. RESULTADOS: constatamos que a expressão de marcadores de diferenciação para a linhagem osteoblástica aumentou à medida em que a cultura avançou no sentido da diferenciação terminal em osteoblastos. A expressão da Ativina A acompanhou, num relação direta, o padrão de expressão verificado nesses marcadores de formação e diferenciação óssea. O protocolo favoreceu a diferenciação de precursores celulares de osteoblastos. CONCLUSÃO: a Ativina A foi expressa em cultivos celulares de CTE de camundongos em estágio intermediário de diferenciação em osteoblastos, acompanhando o padrão de expressão celular verificado para outros marcadores de formação óssea como a osteocalcina.

PALAVRAS-CHAVE

células-tronco embrionárias, ativina, osteoblasto, proteína morfogenética óssea 4 (BMP-4), osteocalcina, osteoporose.

ABSTRACT

The search for anabolic agents has been widely researched for osteoporosis therapy. Embryonic stem cells (ESC), differentiated into osteoblasts, have been used for the study of cell physiology. Protocols osteoblastic cell differentiation have been successfully performed. A common stimulus used on most osteoblastic differentiation protocols is bone morphogenetic protein (BMP) . Activin A, a growth factor with structure and function homologous to BMP, has important effects on the proliferation of osteoblasts and bone remodeling. However, the definition of the exact moment when activin A acts on bone mineralization demand studies. **OBJECTIVE:** To evaluate the expression of activin A on a mouse ESC protocol used to differentiate them into osteoblasts. **MATERIAL AND METHODS:** Adopt a technical modification to an osteoblastic ESC culture differentiation protocol (Kawaguchi, 2006), isolated at the Laboratory of Human Reproduction Prof. Aroldo Fernando Camargos - Hospital das Clínicas / UFMG. Real time polymerase chain reaction (PCR) evaluated genic expression at different stages during the protocol for markers of celular indifferenciation (Oct -4, Nanog), markers of osteoblastic differentiation (osteocalcin, bone alkaline phosphatase, RUNX2) and Activin A at different stages of differentiation protocol. **RESULTS:** Markers of osteoblast differentiation increased as the culture moved towards osteoblastic differentiation. Activin A expression showed a direct association to the markers of bone formation. The protocol favored the differentiation of osteoblasts precursor cells. **CONCLUSION:** Activin A was expressed in cell cultures of mice ESC since an intermediate stage of differentiation into osteoblasts, following the pattern of cellular expression observed for other markers of bone formation, such as osteocalcin, during the differentiation protocol.

KEY WORDS

embryonic stem cells, activin, osteoblasts, bone morphogenetic proteins, osteocalcin, osteoporosis.

INTRODUÇÃO

O esqueleto é o arcabouço do corpo humano, protege órgãos vitais e possibilita a locomoção. Sua estrutura é composta por ossos que, além das evidentes propriedades mecânicas, produzem células, funcionam como um órgão endócrino e armazenam minerais como cálcio e fósforo. As células do tecido ósseo são: osteoclastos, osteoblastos e osteócitos. Suas ações se complementam proporcionando uma renovação em torno de 5 a 10% da massa óssea total do esqueleto a cada ano (SANDHU e KHAN, 2002).

Da infância à idade adulta, o esqueleto humano normal adquire massa óssea que, por volta dos 20 anos de idade, atinge seu pico máximo. Dos 20 aos 45 anos, o conteúdo mineral ósseo se estabiliza para declinar progressivamente. O declínio da massa óssea pode culminar em osteoporose: uma doença crônico-degenerativa com repercussão direta sobre a morbidade e a mortalidade (SEEMAN e DELMAS, 2006).

A compreensão do metabolismo ósseo tem propiciado o surgimento de novos alvos terapêuticos em osteoporose. Iniciada na década de 1980, a pesquisa com células-tronco demonstrou ser uma ferramenta útil pela criação de modelos que reproduziam com fidelidade a fisiologia humana (EVANS e KAUFMAN, 1981; MARTIN, 1981; THOMSON, 1998).

Identificados desde 1965, diversos subtipos da proteína morfogenética óssea (BMP) já foram descritos na literatura. Presentes nas gônadas e também no tecido ósseo em formação, as BMPs induzem a diferenciação óssea *in vivo* e também *in vitro* (OGAWA et al., 1992). Estudos recentes demonstraram que a BMP-2 e a BMP-4, tradicionalmente ligadas à formação óssea, também exercem função reprodutiva de células germinativas primordiais, folículos e gonadotrofinas hipofisárias (Shimasaki et al., 2004).

A Ativina A é uma proteína que também age sobre os ossos. Membro da superfamília dos fatores transformadores do crescimento tipo beta (TGF- β), foi isolada a partir de sítios de consolidação óssea em camundongos (HIROTANI et al., 1992).

Embora alguns autores demonstraram haver antagonismo entre a Ativina A e a mineralização óssea (HASHIMOTO et al., 1992), predomina a idéia de uma sinergia entre a Ativina A e outras substâncias envolvidas na osteoblastogênese (SAKAI et al., 1999; GADDY-KURTEN et al., 2002). Esta evidência sugere uma potencial opção terapêutica da Ativina, como agente anabolizante, em osteoporose (EIJKEN et al., 2007).

A tese adaptou um protocolo de diferenciação celular osteoblástica de CTE de camundongos para avaliar a expressão gênica da Ativina A na osteoblastogênese. Realizaram-se estudos com PCR de tempo real para marcadores da formação óssea e Ativina paralelamente à avaliação imunohistoquímica da Ativina A no material de cultivo.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Componentes da Matriz Óssea

O osso é um material composto por uma fração mineral e outra orgânica. A fração mineral possui íons cálcio, fósforo e cristais de hidroxiapatita. A fração orgânica é composta por células ósseas, proteínas colágenas e proteínas não-colágenas.

1.1.2. Células Ósseas

Há quatro tipos de células ósseas: osteoblastos, osteoclastos, *lining cells* e osteócitos. Os osteoblastos promovem a formação óssea. Os osteoclastos agem sobre a reabsorção óssea. *Lining cells* são precursoras de osteoblastos. E osteócitos intermediam as ações de osteoclastos e osteoblastos.

Osteoblastos são células ósseas de origem mesenquimal. Estas células derivam-se de outras células denominadas *lining cells* ou células de revestimento, presentes na matriz osteóide. Os osteoblastos são as responsáveis pela formação óssea (EVERTS V et al., 2002; GEOFFROY V et al., 2004).

Osteoclastos são células multinucleadas, originadas a partir da diferenciação de precursors hematopoiéticos. Elas são responsáveis por acidificar e dissolver a matriz óssea (HOU et al., 2004). Um único osteoclasto é capaz de reabsorver o volume ósseo formado por 1.000 osteoblastos e constituir, dessa forma, a lacuna de reabsorção também conhecida como lacuna de Howship (HEATH et al., 1984). Os osteoclastos entram em contato direto com o tecido ósseo através da sua borda ondulada.

Quando um osteoblasto alcança a diferenciação terminal inserido na matriz óssea, ele é chamado de osteócito. Osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo. Mergulhados na matriz óssea, os osteócitos se conectam por canalículos e formam uma rede de comunicação celular tal e qual o fazem os neurônios.

1.1.3. Proteínas Ósseas

1.1.3.1 Proteínas Ósseas Colágenas

Diferentes tipos celulares podem sintetizar colágeno, dependendo de cada tecido. No tecido ósseo, há predomínio o colágeno tipo I, o principal produto secretado pelo osteoblasto. Cerca de 90% da matriz óssea extracelular é constituída por colágeno tipo I (COL 1). Os 10% restantes, são representados por proteínas não-colágenas (TRIFFIT, 1987).

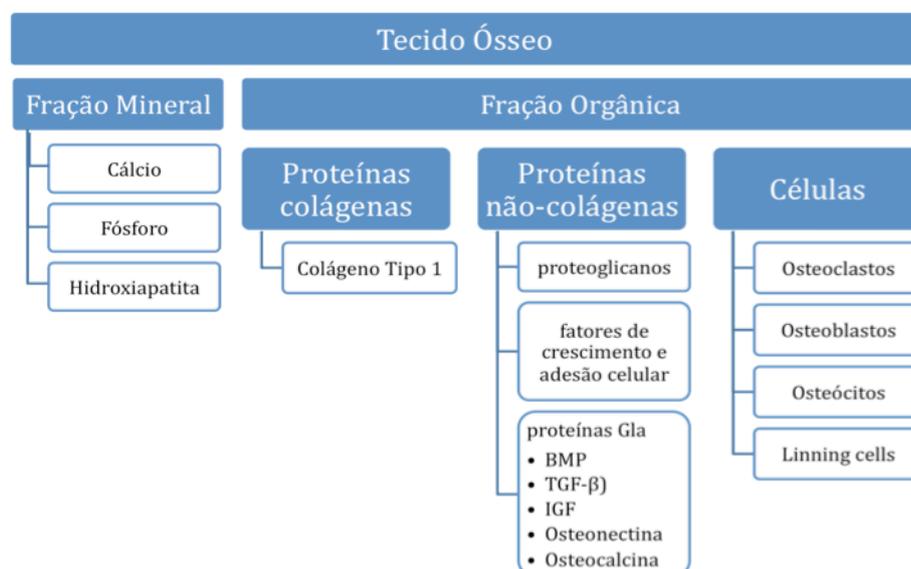
1.1.3.2 Proteínas Ósseas Não-Colágenas

Proteínas ósseas não-colágenas, representadas por proteoglicanos, proteínas de crescimento e adesão celular e proteínas Gla são assim chamadas por possuírem radicais gama-carboxiglutamatos (Gla) em sua estrutura. Os radicais Gla localizam-se dentro de domínios protéicos que são ligados ao metabolismo do cálcio (Furie B et al., 1999). A figura 01 ilustra os componentes orgânicos e inorgânicos da matriz óssea.

Há diversos exemplos de proteínas Gla com ação direta no metabolismo ósseo: proteína morfogenética óssea ou *bone morphogenetic protein* (BMP), fatores transformadores do crescimento celular (TGF- β), fatores insulínicos de crescimento (IGF), osteonectina (ON) e osteocalcina (OC). Todas elas envolvidas na regulação autócrina e/ou parácrina do tecido ósseo (MANN, 1999; SOWERS et al., 2006). A osteocalcina é uma proteína Gla produzida exclusivamente pelos osteoblastos e, por esta razão, constitui um marcador específico para diferenciação neste tipo celular.

A BMP foi isolada pela primeira vez a partir de ossos neoformados (URIST et al., 1973). Posteriormente, a clonagem molecular permitiu a identificação de diferentes proteínas morfogenéticas ósseas e a atribuição de funções básicas para cada uma delas (Wozney et al., 1988). Há mais de 20 subtipos de BMP com funções variadas durante o processo da embriogênese: formação óssea, hematopoiese e neurogênese. As BMP fazem parte da superfamília TGF- β juntamente com ativinas, inibinas, miostatinas e nodal. (BRAGDON et al., 2011). Materiais sintéticos com BMP têm sido desenvolvidos e empregados na implantologia. BMP-2 e BMP-4 são as principais BMP em uso clínico (CHENARD, et al., 2012).

Figura 01 - Diagrama ilustrativo das substâncias envolvidas na composição da matriz óssea.

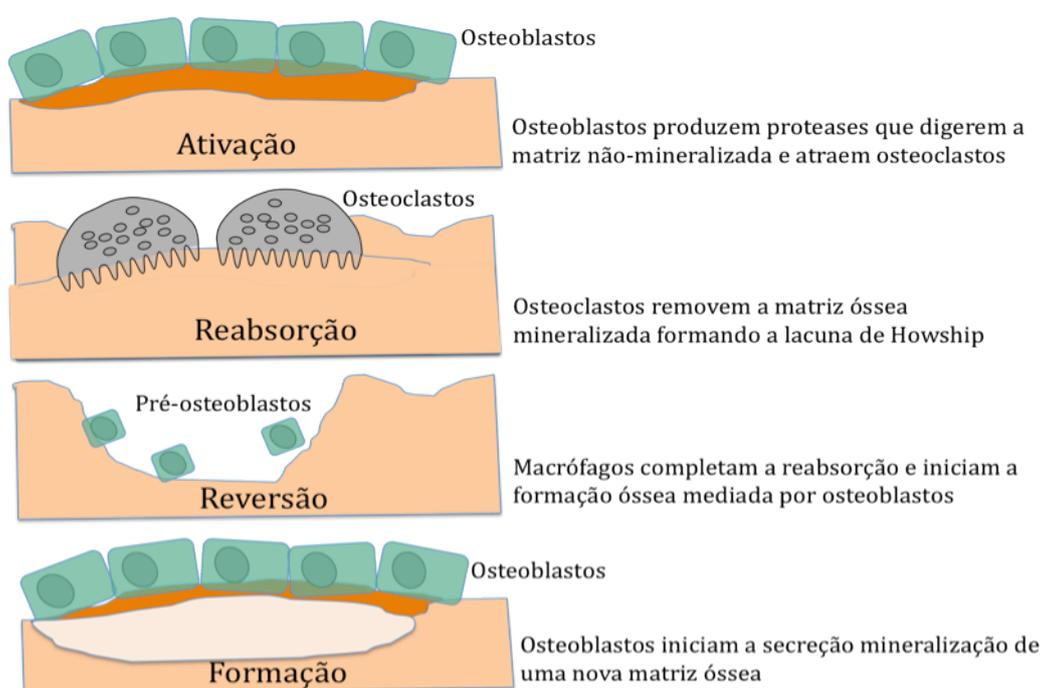


1.2 Remodelação Óssea

A remodelação óssea existe para reparar e manter o sistema esquelético. Por ser um tecido dinâmico, o osso é continuamente removido e reformado por células ósseas. O ciclo de remodelação é coordenado por uma série de eventos nos quais osteoblastos e osteoclastos se interagem para preservar o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea. O equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos é regulado localmente por citocinas e fatores de crescimento e sistemicamente através de hormônios como o paratormônio (PTH), a vitamina D3 e o estrogênio. O *stress* mecânico também estimula o tecido ósseo direta e indiretamente, por intermediação de tais substâncias.

O ciclo de remodelação óssea pode ser dividido em quatro fases: ativação, reabsorção, reversão e formação. O termo ativação descreve o evento inicial que converte uma superfície óssea quiescente numa área de remodelação. A ativação depende de fatores locais e sistêmicos que agem sobre a linhagem celular osteoblástica. Findo o processo de ativação, ocorre uma interação entre osteoblastos e precursores hematopoiéticos que favorece a formação de osteoclastos. Na fase de reabsorção, os osteoclastos removem componentes da matriz óssea e formam erosões denominadas lacunas de Howship. A fase reversa é o momento no qual ocorre o acoplamento da reabsorção à formação óssea. Este é o ponto de transição entre destruição e reparo ósseo. A partir daí, inicia-se a formação de uma nova matriz óssea que se arranjará sob form do sistema harversiano.

Figura 02 - Ilustração das quatro etapas que compõem o ciclo de remodelação óssea.



1.3. Células-Tronco Embrionárias

Células-tronco (CT) são células indiferenciadas com capacidade de auto-renovação e de transformação em outros tipos celulares. São classificadas pela capacidade de diferenciação em: unipotentes, multipotentes, pluripotentes e totipotentes. Células unipotentes originam apenas um tipo celular. Multipotentes são células que originam um número limitado de tipos celulares. Células pluripotentes podem se diferenciar em quase todos os tipos de células, exceto em tecidos extraembrionários. Células totipotentes possuem a capacidade de se diferenciar em todos os tipos celulares (THE BRITISH STANDARDS INSTITUTION, 2012). Uma CT adulta é obtida após a embriogênese, a partir de um tecido já diferenciado (ex: medula óssea, tecido adiposo ou cordão umbilical). Por definição, células-tronco adultas (CTA) são multipotentes, conservando a capacidade de se renovarem por períodos longos e, com certa limitação, podem diferenciar-se para produzir um tipo de célula ou linhagem tecidual com funções especializadas (CONRAD e HUSS, 2005).

Células-tronco embrionárias (CTE) são células primitivas, indiferenciadas, pluripotentes, originadas do blastocisto e com potencial para gerar tipos celulares especializados de qualquer órgão ou tecido do organismo (DOETSCHMAN et al., 1985). As CTE têm sido consideradas uma fonte promissora para a terapia celular, pois são capazes de proliferar sem limites, respondem a diversos sinais moleculares e também permitem a manipulação genética (LEE et al., 2000).

1.4. Osteoporose

A revisão que segue não pretende esgotar todos os aspectos da doença e sim contextualizar informações relevantes ao tratamento atualmente disponível para pacientes portadores de osteoporose.

1.4.1. Conceito

A primeira definição de osteoporose foi dada pelo endocrinologista norte-americano Fuller Albright em 1947. O pesquisador, interessado na relação entre a ginecologia e a ortopedia, descreveu a displasia poliostótica fibrosa conhecida como síndrome McCune-Albright (ALBRIGHT et al., 1947).

O conceito atual da osteoporose foi estabelecido em consenso internacional (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993) e a define como uma doença do esqueleto caracterizada por deterioração da microarquitetura das trabéculas ósseas. Aliada à deterioração da estrutura trabecular, ocorre o aumento do risco de fraturas por baixo impacto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

1.4.2. Apresentação Clínica

A osteoporose cursa de forma assintomática em suas fases iniciais e, com sua progressão, pode acarretar fraturas espontâneas. Na doença, as fraturas acontecem devido à excessiva fragilidade do tecido ósseo que torna-se suscetível à ruptura mesmo quando na presença de traumas mecânicos de baixa energia.

As fraturas constituem a principal causa de morbidade e mortalidade na osteoporose. Embora possam ocorrer em qualquer local do esqueleto, os sítios mais comuns de fraturas por fragilidade são: vértebras, arcos costais, fêmur proximal, rádio distal, úmero e ulna (JOHNELL e KANIS, 2004).

1.4.3. Epidemiologia

Metade das mulheres com idade acima dos cinquenta anos experimentará uma fratura no seu tempo remanescente de vida. Neste grupo, a osteoporose é responsável por mais dias de internação hospitalar do que os dias de hospitalização decorrentes de diabetes, infarto do miocárdio e câncer de mama somados (KANIS et al., 1997).

A estatística impressiona: a cada três segundos, uma fratura osteoporótica ocorre em todo o mundo. Porém, apenas uma em cada três fraturas vertebrais é diagnosticada durante o atendimento médico (INTERNATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION, 2012).

A forma insidiosa de apresentação da doença, aliada à sua grande prevalência, agravam a morbimortalidade da osteoporose, especialmente para os indivíduos adultos em idade avançada (COOPER et al., 1992). Por esta razão, a Organização Mundial da Saúde incluiu a densitometria óssea no rastreamento de pacientes em risco de desenvolver a doença (CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE, 1993).

Apesar de mais prevalente em países nórdicos e de clima frio, a osteoporose também atinge países tropicais como o Brasil. Estima-se que, em poucos anos, o crescimento da população de idosos na América Latina elevará a incidência de fraturas de quadril em nossa região para valores próximos daqueles verificados hoje nos Estados Unidos e Europa (RIERA-ESPINOZA, 2009).

De acordo com os critérios diagnósticos preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 33% das mulheres pós-menopáusicas da cidade de São Paulo apresentam osteoporose na coluna lombar ou no fêmur à densitometria (PINHEIRO et al., 2010). A incidência brasileira de fraturas de quadril, atualmente em torno de 121.700 fraturas por ano, deve chegar a 140.000 fraturas por ano em 2020 e à 160.000 até 2050 (CLARK et al., 2009).

1.4.4. Tratamento

O tratamento da osteoporose deve ir além do simples ganho de massa óssea. Ele almeja reduzir o risco de fraturas osteoporóticas vertebrais e não-vertebrais, em diferentes populações de risco (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2001; THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2010).

Fuller Albright foi pioneiro ao descrever a osteoporose e demonstrar a eficácia do estrogênio na redução da incidência de fraturas. Ele verificou que o estrogênio era capaz de promover uma redução na incidência de fraturas vertebrais e não-vertebrais em mulheres após a menopausa (ALBRIGHT et al., 1947). O pesquisador também teve que lidar com os efeitos indesejáveis da estrogênio-terapia. Albright também foi o primeiro a preconizar o uso da progesterona, em oposição ao estrogênio, na prevenção da hiperplasia endometrial em mulheres com útero presente (FORBES, 1991).

Posteriormente, diversas outras vias osteometabólicas estrogênio-dependentes foram descritas e a terapia de reposição hormonal estabeleceu-se como um recurso capaz de prevenir a ocorrência de fraturas em mulheres após a menopausa (RACHNER et al., 2011).

De acordo com o efeito predominante que exercem sobre o metabolismo ósseo, os agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento da osteoporose são classificados em dois grupos: anabolizantes e antirreabsortivos (LESLIE, 2009). Os agentes anabolizantes atuam nos osteoblastos estimulando a formação e os agentes antirreabsortivos atuam via osteoclastos reduzindo a reabsorção óssea.

1.4.4.1 Agentes Anabolizantes

Os agentes anabolizantes aprovados para o tratamento da osteoporose são a Teriparatida 1-34 e o PTH 1-84. Ambos são análogos sintéticos do paratormônio (PTH) humano e diferem entre si pelo número de aminoácidos idênticos ao PTH humano que possuem em suas moléculas: 34 e 84, respectivamente. Devido ao alto custo, necessidade de administração subcutânea diária e conservação em ambiente refrigerado, eles possuem indicação restrita aos casos de osteoporose grave para os quais outras opções terapêuticas já tenham sido utilizadas. Devido a considerações sobre a segurança do tratamento prolongado, seu uso foi limitado a dois anos de tratamento (VAHLE et al. 2002).

O uso da Teriparatida 1-34 em altas doses foi associado ao desenvolvimento de osteossarcomas em animais de laboratório e alguns casos foram relatados em humanos. Este achado motivou a recomendação de que agentes dessa natureza não fossem utilizados em pacientes com histórico de neoplasias ósseas ou tumores do tecido conjuntivo (HARPER et al., 2007; LUBITZ e PRASAD, 2009; SUBBIAH et al., 2010).

Numa revisão de dez anos de experiência clínica com a Teriparatida 1-34 verificou-se ausência de risco adicional significativo para o surgimento de neoplasias em pacientes usuários desse anabolizante. Entretanto, mesmo com o respaldo de dez anos de acompanhamento, a recomendação de se restringir o tratamento para 24 meses e contraindicar o uso em pacientes com risco oncológico ainda gera um certo desconforto na comunidade médica (CAPRIANI et al., 2012).

1.4.4.2. Agentes Antirreabsortivos

Os agentes antirreabsortivos aprovados para uso em osteoporose são: calcitonina, terapia hormonal (TH), moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMS), ranelato de estrôncio, bisfosfonatos e denosumabe. Dentre eles, aqueles mais empregados para o tratamento da osteoporose são os bisfosfonatos (RACHNER et al., 2011).

Embora a eficácia anti-fratura do tratamento com bisfosfonatos seja incontestável, seu potencial terapêutico é limitado. O uso do bisfosfonato alendronato foi avaliado em pacientes submetidos a tratamento de osteoporose por longos períodos. Concluiu-se que a ocorrência de fraturas femorais atípicas estaria ligada à supressão exagerada do turnover ósseo, induzida pelo uso prolongado de bisfosfonatos (ODVINA et al., 2005).

1.4.4.3. Terapia Hormonal

A eficácia anti-fratura do estrogênio em mulheres após a menopausa foi demonstrada no estudo Women's Health Initiative. Pacientes usuárias de terapia hormonal (TH) experimentaram maior densidade óssea e menor risco de fratura vertebral e não-vertebral se comparadas às não-usuárias, tanto com a estrogenerioterapia isolada quanto com a administração combinada de estrogênio e progesterona (CAULEY et al., 2003). A TH também foi capaz elevar densidade mineral óssea mesmo quando empregada em doses mais baixas (ETTINGER et al., 2004).

Atualmente, nenhum produto utilizado para TH está aprovado para o tratamento da osteoporose. Todos eles estão indicados exclusivamente para a prevenção da osteoporose pós-menopáusia (THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY, 2012).

1.4.5. Fraturas Subtrocanterianas Atípicas

A remodelação óssea é um processo dinâmico de renovação. Ela é necessária para que microdanos, sempre presentes, sejam reparados e não evoluam para fraturas macroscópicas.

A supressão da remodelação óssea por períodos prolongados pode levar à paralisação da renovação óssea e ao surgimento de fraturas atípicas. Este processo tem sido denominado estado de hipersupressão óssea.

Fraturas atípicas apresentam um padrão diferente das fraturas osteoporóticas clássicas. Este padrão atípico é dado por sinais dolorosos prodrômicos comuns à região subtrocanteriana do fêmur. Outra peculiaridade das fraturas subtrocanterianas atípicas é a sua frequente incidência bilateral (WATTS e DIAB, 2010).

Estudos de longa duração revelaram que o uso prolongado de antirreabsortivos pode levar à ocorrência das fraturas atípicas. Sua repercussão motivou a adoção de cuidados no uso crônico de bisfosfonatos em todo o mundo e estimulou a pesquisa de novos agentes com mecanismo de ação anabolizante que sejam menos propensos à supressão (SHANE et al., 2010; RIZZOLI et al., 2011).

1.5. Ativinas e Metabolismo Ósseo

Com o objetivo de aproveitar o efeito benéfico do estrogênio sem incorrer no risco de complicações indesejáveis como neoplasias ou tromboembolismo, novas substâncias intermediadoras do estrogênio no osso têm sido investigadas (CHANTRY et al., 2010). Dentre elas, destacam-se as Ativinas, as Inibinas e as Proteínas Morfogênicas Ósseas (do inglês, *Bone Morphogenetic Protein* = BMP) (SOWERS et al., 2006).

Isoladas a partir das gônadas, as ativinas e inibinas foram associadas à produção do FSH. Sua expressão foi descrita para diversos tipos celulares (CHEN et al., 2012), indicando eventuais funções dessas proteínas na regulação parácrina da função reprodutiva, da função ovariana e da tumorigênese gonadal (WIATER e VALE, 2008).

A ativina estimula a secreção de FSH via hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). A inibina atua basicamente de forma antagônica à ativina em seus diferentes sítios de ação. Ela se opõe à ativina através da formação de complexos com duas substâncias moduladoras principais: Nodal e Cripto (FERREIRA et al., 2008; WU et al., 2008; KELBER et al., 2008; SHANI et al., 2008; PAPAGEORGIOU et al., 2009).

Ativinas e inibinas são moléculas compostas por dímeros de glicoproteínas denominados subunidades alfa (α) e beta (β). Foram codificados três genes determinantes para a produção de ativinas e inibinas: os genes α , βA e βB . Os produtos desses três genes podem ser homodímeros e heterodímeros. Os homodímeros são moléculas compostas por subunidades de uma mesma estrutura molecular. Os heterodímeros se formam a partir da combinação de subunidades que diferem na sua estrutura molecular (VALE et al., 1990).

O heterodímero formado entre as subunidades α e βA ($\alpha + \beta A$) constitui a Inibina A. A Inibina B é formada pelo heterodímero α e βB ($\alpha + \beta B$). Os homodímeros βA e βB ($\beta A + \beta A$) se unem formando a Ativina A. A Ativina B é composta pelos homodímeros βB e βB ($\beta B + \beta B$). E, finalmente, a união de homodímeros βA e βB ($\beta A + \beta B$) forma a Ativina AB (XIAL e SCHNEYER, 2009).

Devido ao antagonismo que a inibina exerce sobre a ativina em seus tecidos-alvo, o efeito endócrino da inibina sobre o metabolismo ósseo deve ser considerado no contexto da expressão da ativina (FARNWORTH et al., 2006; NICKS et al., 2010). Somente a Ativina A (homodímero $\beta A + \beta A$) está presente no tecido ósseo e nas cartilagens. Sua expressão estimula a ação da Proteína Morfogênica Óssea Tipo-2 (BMP-2) e culmina na formação de tecido ósseo ectópico. Essa relação direta reforça a teoria de que a Ativina A seja um potente indutor da formação óssea (OGAWA et al., 1992; SUN et al., 2006).

Alguns autores demonstraram que a administração de Ativina A em culturas de osteoblastos humanos e a injeção subperiosteal dessa substância em ossos de camundongos *in vivo* estimulam a proliferação de osteoblastos e proteínas da matriz óssea (CENTRELLA et al., 1991). Porém, demonstrou-se uma relação de antagonismo entre a Ativina A e a mineralização óssea (HASHIMOTO et al., 1992; OUE et al., 1994). Este antagonismo foi questionado por experimentos que sugeriram haver sinergia entre a Ativina A e a osteoblastogênese (SAKAI et al., 1999; GADDY-KURTEN et al., 2002).

Posteriormente, demonstrou-se que a Ativina A, na verdade, estimulava a formação de osteoclastos (SUGATANI et al., 2003) e inibia a diferenciação de osteoblastos (EIJKEN et al., 2007). A abundante quantidade de Ativina A na matriz óssea sustenta a hipótese de haver uma associação entre reabsorção óssea e produção local de ativina (NICKS et al., 2009; PERRIEN et al., 2012). Sendo assim, um agente capaz de bloquear os efeitos endógenos da ativina poderia ser estudado com finalidade terapêutica anabolizante.

A molécula ACE-011 é uma forma solúvel do domínio ActRIIA fundida ao domínio Fc da IgG murina (ActRIIA-IgG1-Fc) e age como um decodificador da ativina causando efeitos anabólicos em camundongos saudáveis ovariectomizados (PEARSALL et al., 2008) e estimulando a diferenciação celular (DJOUAD et al., 2010).

Tais observações demonstram como evoluiu o conhecimento da relação ativina-osso (BARON e HESSE, 2012). A inibição dos efeitos da ativina promove anti-reabsorção e anabolismo ósseos, com repercussão no osso esponjoso em primatas e constitui um potencial agente terapêutico em osteoporose (LOTINUM et al., 2010; LOTINUM et al., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a expressão gênica de ativina A em culturas de células-tronco embrionárias de camundongo durante protocolo de cultivo para diferenciação celular osteoblástica.

2.2. Objetivos Específicos

- Introduzir o cultivo celular em suspensão como proposta alternativa de adaptação à técnica de cultivo em gotas invertidas descrita no protocolo de diferenciação osteoblástica.
- Analisar a expressão gênica de marcadores de indiferenciação e de diferenciação celular em diferentes estágios do protocolo de diferenciação osteoblástica de CTE de camundongos.
- Relacionar a expressão gênica da Ativina A e dos marcadores de diferenciação óssea em diferentes estágios do protocolo de diferenciação osteoblástica de CTE de camundongos.
- Relacionar os resultados da análise imunohistoquímica à expressão protéica da Ativina A em diferentes estágios do protocolo de diferenciação osteoblástica de CTE de camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Dois estudos descrevendo um protocolo de diferenciação de células-tronco embrionárias de camundongo em osteoblastos já publicados foram utilizados como referência para obtenção do material de cultivo (KAWAGUCHI et al. 2005, KAWAGUCHI 2006).

Embora outros trabalhos sobre a diferenciação osteoblástica tenham sido realizados, a qualidade do detalhamento técnico e a reprodutibilidade das condições originais de cultivo sustentaram a escolha do modelo de diferenciação empregado no experimento.

A técnica descrita por Kawaguchi preconiza a utilização de CTE de camundongo. O Laboratório de Reprodução Humana Aroldo Fernando Camargos possui uma linhagem de CTE imortalizada a partir de blastocistos obtidos em camundongos da linhagem 129/Sv, segundo metodologia já descrita anteriormente por Tavares (TAVARES et al., 2007).

Uma modificação à técnica original descrita no protocolo de Kawaguchi foi implementada e consistiu na substituição do cultivo de corpos embrionários em gotas invertidas (ou *hanging drop*) pelo cultivo celular em suspensão. Este mesmo procedimento foi empregado com sucesso na diferenciação neuronal de CTE, já desenvolvido no mesmo serviço (NAGY et al., 2003; TAVARES et al., 2012).

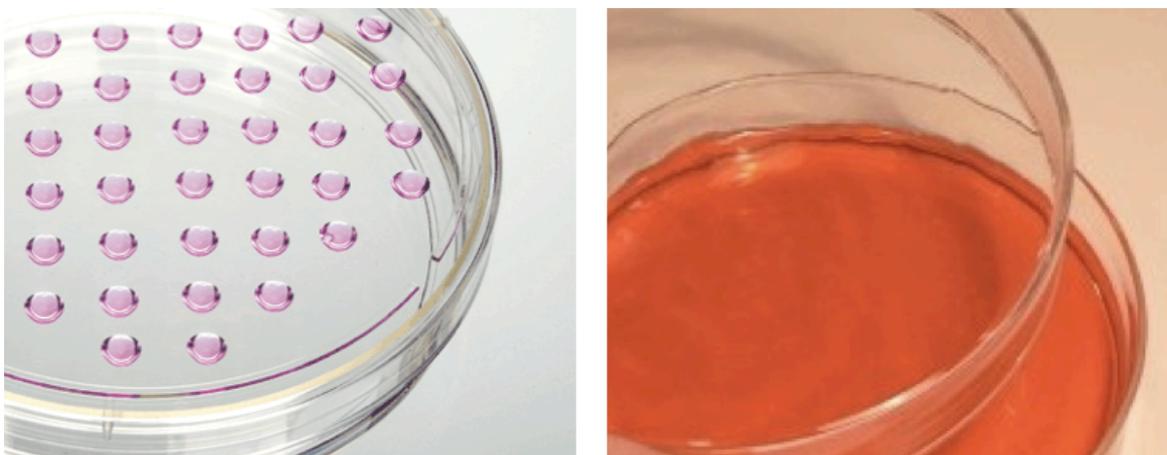


Figura 03 - Cultivo celular em gotas invertidas (Esq.) e em suspensão tradicional (Dir.).

Fonte: www.nature.com/nprot/journal/v6/n7/covers/index.html http://en.wikipedia.org/wiki/File:Cell_Culture_in_a_tiny_Petri_dish.jpg

A diferenciação osteoblástica seguiu uma metodologia similar à descrita por Kawaguchi (2006) e pode ser dividida em quatro estágios:

Estágio 01 - Cultivo de Células Indiferenciadas

Estágio 02 - Formação de Corpos Embrionários

Estágio 03 - Tratamento de Corpos Embrionários com AR

Estágio 04 - Diferenciação Terminal com BMP

3.1. Grupos Amostrais

Dentro do protocolo de estudo, três momentos distintos foram selecionados para análise bioquímica e imunocitoquímica. Cada momento representa um dos estímulos de diferenciação empregados. Os estímulos, aplicados em diferentes estágios do protocolo, deram origem a três grupos de amostras celulares que foram avaliadas em paralelo por PCR em tempo real e imunohistoquímica. Os grupos foram:

- **Grupo CT** - composto por células-tronco indiferenciadas tratadas apenas com meio KW enriquecido com LIF. Representa o controle negativo para estímulos de diferenciação óssea.

- **Grupo Sem BMP** - composto por células submetidas ao tratamento com AR mas não à ação da BMP-4. Estas células completaram apenas parte do protocolo de diferenciação osteoblástica. Após permanecerem 02 dias em AR, as células foram transferidas para placas contendo meio KW padrão sem LIF e BMP-4. As trocas desse meio respeitaram a cronologia de trocas prevista para o grupo de diferenciação terminal, perdurando até o dia 26.

- **Grupo BMP** - composto por células submetidas a todas as etapas e agentes transformadores do protocolo de diferenciação. Foi assim denominado por compreender a adição do meio osteogênico, cujo o principal agente indutor da diferenciação é representado pela BMP-4.

A separação das culturas entre grupos com estímulos distintos objetivou analisar, de forma independente, a interferência dos diferentes graus de estímulo à diferenciação osteoblástica sobre os resultados da imunocitoquímica. Avaliou-se a expressão de marcadores de indiferenciação celular, marcadores de diferenciação óssea e expressão da Ativina A.

Cultivo e amostragem foram realizados em triplicata para cada um de três experimentos independentes realizados. O material obtido foi avaliado por PCR de tempo real e imunocitoquímica.

FLUXOGRAMA DO ESTUDO

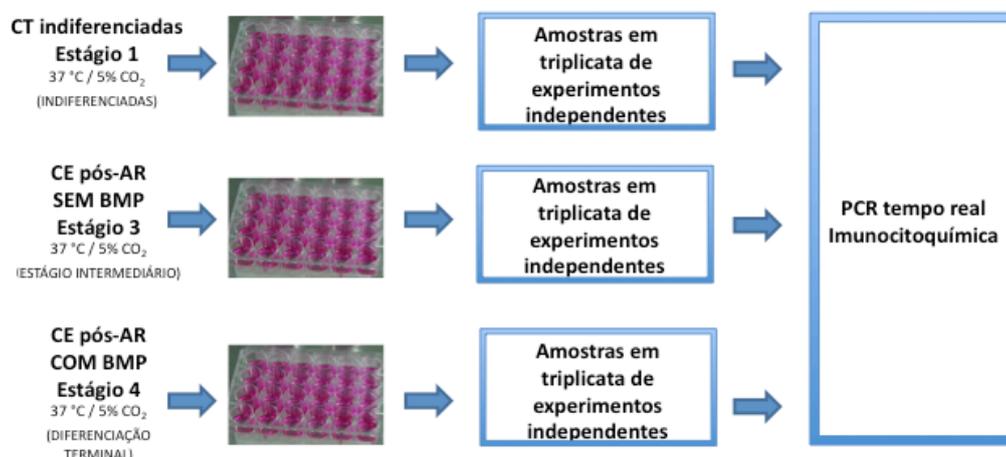


Figura 04 - Fluxograma do estudo. Grupos CT, SEM BMP e COM BMP.

3.2. Obtenção e Diferenciação das Células-Tronco Embrionárias

Utilizou-se uma linhagem de CTE isolada de blastocistos obtidos de camundongos da linhagem 129/Sv, segundo metodologia descrita anteriormente (NAGY et al., 2003; TAVARES et al., 2007; TAVARES et al., 2012).

As aprovações éticas necessárias foram obtidas junto ao Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG. Cópias dos certificados de autorização 04/2006 e 133/09 encontram-se na seção Anexos, da presente tese.

Para cada grupo (CT, Sem BMP e BMP), três amostras foram processadas e os resultados comparados entre si. Todas as amostras foram avaliadas quanto à expressão gênica de marcadores de indiferenciação celular, marcadores de diferenciação óssea e Ativina A. Os resultados foram analisados estatisticamente e plotados em gráficos para visualização.

3.3. Detalhamento Técnico do Cultivo Celular

Estágio 01 - Cultivo de Células Indiferenciadas.

O cultivo das CTE foi realizado após descongelamento da colônia CT-4 em banho-maria a 37°C. No ambiente estéril da capela de fluxo laminar, o fundo de uma placa de 60 mm foi coberto com 1,5 mL de uma solução estéril contendo gelatina a 0,1%. As placas foram cobertas e mantidas na capela de fluxo laminar durante 10 minutos para garantir a adesão da solução à placa. A seguir, o volume excedente da solução de gelatina foi removido por aspiração com pipeta tipo Pasteur. O meio de cultura padrão (KW) contendo Fator Inibidor da Leucemia (LIF) foi adicionado e 1×10^5 de CTE por placa foram semeadas e

cultivadas (Tabela 01). A análise diária da confluência das colônias foi realizada através do microscópio e, verificada uma confluência de 70%, procedia-se a uma nova passagem. Tal medida visa a evitar a diferenciação celular, comum em cultivos com confluência igual ou superior a 90%. Três amostras de experimentos independentes foram recolhidas nesse estágio e processadas para análise, representando as células indiferenciadas. Os meios de cultura foram armazenados a 4°C e ao abrigo da luz para evitar a deterioração. No protocolo foram empregados meios de cultivo suplementados com L-glutamina e armazenados por um período máximo de 14 dias.

Estágio 02 - Formação de Corpos Embrionários

Corpos Embrionários (CE) são colônias esferóides encontradas no cultivo em suspensão de células-tronco embrionárias. Tais estruturas não são parte do desenvolvimento normal e ocorrem apenas em condições *in vitro*. Os CE possuem tipos celulares mistos correspondentes às três camadas germinais: endoderma, mesoderma e ectoderma. Em contraste com as culturas de monocamada, as estruturas esferóides possuem grande rendimento e alto potencial de aplicações clínicas (RUDNICKI e MCBURNEY, 1987).

O presente estágio visa à diferenciação celular dos três folhetos embrionários mencionados no parágrafo anterior. Para este fim, manteve-se o meio KW original exceto pela ausência do Fator Inibidor da Leucemia (LIF). Conforme descrito na Tabela 01, identificamos este meio KW sem LIF como KW2. O protocolo original preconizado por Kawaguchi (2006), preconiza a semeadura da suspensão celular pelo método das gotas dependuradas ou invertidas. Optamos pela forma de cultivo em suspensão tradicional mantendo o mesmo KW2 do protocolo original. Para induzir a formação de CE, utilizou-se o cultivo celular em suspensão contendo 3×10^5 células tronco indiferenciadas (CTE) por cada mL de meio de cultura padrão sem LIF (KW2) em placa de cultivo estéril de 60mm não-aderente e sem tratamento com solução de gelatina. Estas placas foram encubadas pelo período de dois dias.

Estágio 03 - Tratamento de Corpos Embrionários com Ácido Retinóico

Neste estágio, realizou-se o tratamento precoce e transitório com ácido retinóico (AR) visando à manutenção do potencial de diferenciação osteoblástico (JONES-VILLENEUVE et al., 1982). Os CE obtidos após 02 dias do cultivo em suspensão foram mantidos por 03 dias em placas contendo o meio KW2 acrescido de ácido retinóico (AR) na concentração final de 10^{-7} M. Após 03 dias em AR, o meio contendo AR em baixas concentrações foi removido e

os CE foram transferidos para uma placa contendo meio KW2 (KW sem LIF e sem AR) onde permaneceram por mais 02 dias em cultivo. Nesse estágio, concretizou-se a natureza transitória da interferência do AR sobre os CE. Uma vez terminado este estágio, os CE ficaram prontos para a etapa final de diferenciação celular osteoblástica. Parte do material foi encaminhada à etapa seguinte e parte foi mantida em meio de cultivo sem LIF, sem AR e sem BMP-4 até completarem 26 dias, período equivalente ao término do protocolo de diferenciação.

Estágio 04 - Diferenciação Terminal

Realizou-se o plaqueamento dos CE coletados advindos dos estágios anteriores. Para tanto, a placa de 60 mm foi tratada com a solução de gelatina a 0,1% por 10 minutos, em ambiente estéril de capela de fluxo laminar. Após este período, o excesso da solução de gelatina foi retirado, e foram 2,5 mL de meio de cultivo osteogênico cuja composição é detalhada na Tabela 01. Para a coleta dos CE, utilizaram-se pipetas de Pasteur estéreis, sendo o meio deixado em tubo cônico de 15 mL por cerca de 10 minutos na incubadora de CO₂ à 5%. Após este período, removeu-se o sobrenadante antes de ressuspender os CE em 2,5 mL de meio específico para osteogênese. Nessas condições de cultivo, o meio foi trocado pela primeira vez aos seis dias de cultivo e sucessivamente a cada 03 dias até alcançar dezenove dias de cultivo em meio osteogênico. O tempo total de cultivo totalizou vinte e seis dias contados desde a fase celular indiferenciada até o término do protocolo final de diferenciação em osteoblastos (KAWAGUCHI, 2006).

3.4. Meios de Cultura Utilizados

Os meios de cultura empregados diferem entre si por conterem agentes específicos para cada estágio. A Tabela 01 descreve a composição de cada um dos meios empregados no cultivo celular.

O meio padrão (KW1) é enriquecido com LIF para que as células sejam mantidas em estado de indiferenciação. O meio KW2 é quase idêntico ao primeiro. Na sua composição, suprimiu-se exclusivamente a adição de LIF. Células mantidas nesse meio avançam no processo de diferenciação. O meio AR é o mesmo meio KW2, enriquecido com AR em baixas concentrações. A adição do ácido retinóico (AR) O meio Osteogênico é aquele responsável pela diferenciação terminal. Além da adição de dexametasona e ácido ascórbico, ele é enriquecido com BMP-4, uma proteína sabidamente ósteo-indutora.

| Nome de Referência | Composição | Utilização |
|--|--|--------------|
| Meio de cultura Padrão (KW1) | <p>Para cada 500mL de meio filtrado: 5,0 mL MEM AA 100X (0,1mM), Invitrogen, 11140-050; 5,0 mL Glutamina (2,0mM), Invitrogen, 25030-123; 5,0 mL Piruvato Na⁺⁺ (1,0 mM), Invitrogen, 11360-88; 5,0 mL 2-BME - 100X (0,1 mM), Sigma-Aldrich, M 7522; 50,0 mL Soro Fetal Bovino (10%), Gibco, 12657-029; 430,0 mL Meio de cultura GMEM, Sigma-Aldrich, G5154; 0,500 mL LIF - Fator Inibidor da Leucemia (10⁶ UI/mL), Sigma-Aldrich, L5158-5UG;</p> | Estágio 1 |
| Meio de cultura padrão sem LIF (KW2) | <p>Para cada 500mL de meio filtrado: 5,0 mL MEM AA 100X (0,1mM), Invitrogen, 11140-050; 5,0 mL Glutamina (2,0mM), Invitrogen, 25030-123; 5,0 mL Piruvato Na⁺⁺ (1,0 mM), Invitrogen, 11360-88; 5,0 mL 2-BME - 100X (0,1 mM), Sigma-Aldrich, M 7522; 50,0 mL Soro Fetal Bovino (10%), Gibco, 12657-029; 430,0 mL Meio de cultura GMEM, Sigma-Aldrich, G5154;</p> | Estágio 2 |
| Meio de cultura padrão com Ácido Retinóico (AR) | <p>Dissolver 50 mg de 100X Ácido Retinóico (AR), Sigma-Aldrich, R 2625 em 16 mL de DMSO para obter a solução de AR 10⁻² M (solução de estoque mantida em alíquotas a -80° C. Diluir esta solução 20 vezes para obter a concentração final 5 X 10⁻⁴ M. Adicionar 2 µL da última solução em 10,0 mL de meio KW2 para preparar a solução final de concentração igual a 10⁻⁷ M. Obs: a manipulação de AR deve ser feita em local escuro.</p> | Estágio 3 |
| Meio de cultura padrão sem LIF (KW2) | <p>Para cada 500mL de meio filtrado: 5,0 mL MEM AA 100X (0,1mM), Invitrogen, 11140-050; 5,0 mL Glutamina (2,0mM), Invitrogen, 25030-123; 5,0 mL Piruvato Na⁺⁺ (1,0 mM), Invitrogen, 11360-88; 5,0 mL 2-BME - 100X (0,1 mM), Sigma-Aldrich, M 7522; 50,0 mL Soro Fetal Bovino (10%), Gibco, 12657-029; 430,0 mL Meio de cultura GMEM, Sigma-Aldrich, G5154;</p> | Estágio 3 |
| Meio Osteogênico (BMP) | <p>Para cada 20 mL de meio KW2, adicionar: 200 µL de 100X β-Glicerol Fosfato (β-GP, 10 mM), Sigma-Aldrich, G9891 / Ácido ascórbico (AA, 170 µM), Sigma-Aldrich, A8960 40 µL de 500X Dexametasona (100 nM), Sigma-Aldrich, D8893; 200 µL de 100X BMP-4 (100 ng / mL), R&D Systems 314-BP (validade: 2 semanas)</p> | Estágio 4 |

Tabela 01 - Nomenclatura, Composição e utilização dos meios de cultura utilizados

3.5. Preparo do Material para Análise

O processamento do material consistiu em tripsinização, ressuspensão e contagem empregando-se um hematócômetro de Neubauer. A seguir, o material foi centrifugado em tubos de Eppendorf formando *pellets* com cerca de 400 mil células em cada. Os tubos foram armazenados a -80 °C para a análise de PCR em tempo real. O mesmo procedimento foi realizado nos três grupos celulares obtidos: CT, Sem BMP e BMP.

3.6. Extração de RNA e PCR em Tempo Real

3.6.1. Extração de RNA total

O *pellet* de células coletadas foi ressuspendido por agitação mecânica (*vortex*) em 1 ml de Trizol® (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), utilizando-se o protocolo para o reagente Trizol®, sem modificações. Ao término do protocolo, o RNA total foi quantificado no NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA), utilizando-se uma alíquota de 1 µl. Com o objetivo de eliminar uma possível contaminação por DNA genômico, as amostras de RNA foram tratadas com TURBO DNA-free kit (Ambion Inc., Foster, California, USA), e em seguida requantificadas no NanoDrop.

3.6.2. Síntese do DNA complementar (cDNA) pela transcrição reversa (RT)

A síntese do cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA total em 50 µl de volume da reação final (20 ng RNA/µL), utilizando oligonucleotídeos complementares reversos (anti-senso) ao RNAm dos genes-alvo (Tabela 02). O RNA foi inicialmente incubado a 70°C por 10 minutos juntamente com os iniciadores reversos (25 picomols de cada), para o anelamento inicial dos *primers* descritos na Tabela 02. Em seguida, foi incubado com a transcriptase reversa na presença do tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), 4 µl de dNTP mix (250 mM de cada), 40 U de inibidor de RNase e água livre de RNase para completar o volume final. A reação foi então incubada a 43°C por 1 hora, finalizada a 4°C e armazenada a -80°C até o uso. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen® (SuperScript® First-Strand Synthesis System for RT-PCR).

3.6.3. Oligonucleotídeos Específicos

3.6.3.1. Escolha dos marcadores moleculares

Para avaliação da indiferenciação celular, da diferenciação osteoblástica e da expressão da Ativina A, marcadores moleculares foram escolhidos. Cad um deles possui propriedades específicas que os tornam representativos de indiferenciação, diferenciação ou simplesmente da expressão da ativina.

- **Oct-4** (octamer-binding transcription factor 4) e **Nanog** são os fatores de transcrição mais precocemente expressos no embrião. Por serem proteínas criticamente envolvidas na auto-renovação de células embrionárias indiferenciadas, ambas têm sido frequentemente usadas como marcadores de indiferenciação celular (NIWA et al., 2000; LOH et al., 2006; ZHAO et al., 2012).

- **Fosfatase alcalina óssea** é uma glicoproteína encontrada na superfície de osteoblastos. Sua expressão tem sido utilizada como um indicador da diferenciação celular osteoblástica. Porém, por ser uma isoforma da fosfatase alcalina, sua produção não indica uma atividade exclusiva dos osteoblastos. Ela pode ser expressa também em pré-osteoblastos e, apesar de amplamente empregada na prática clínica, não constitui a opção mais específica para se estimar a expressão da linhagem osteoblástica (CALVO et al., 1996).

- **RUNX-2** ou Fator 2 de Transcrição Relacionado ao Runt. É um fator que se liga à CBF-alpha-1 constituindo uma etapa fundamental na diferenciação osteoblástica. A expressão do marcador RUNX-2 indica um comprometimento precoce da linhagem celular com o processo de formação óssea (DUCY et al., 1997; HASSAN et al., 2006; ZHANG et al., 2009).

- **Osteocalcina** é uma proteína produzida exclusivamente por osteoblastos maduros. Para confirmar a diferenciação de CTE em osteoblastos, a expressão gênica da Osteocalcina tem sido amplamente empregada (OWEN et al., 1990; CARPENTER et al., 1998).

Os *primers* (oligonucleotídeos) iniciadores da transcrição reversa e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foram selecionados a partir do GeneBank, por meio da ferramenta Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>). As sequências foram analisadas no site da Integrated DNA Technologies (IDT) (<http://www.idtdna.com>), que permitiu a elaboração dos *primers* para as regiões-alvo de cada gene, de acordo com as nossas especificações para as condições de cada *primer*. O gene que codifica a proteína β -actina foi utilizado como referência para correção da expressão dos genes-alvo na PCR, a saber: Oct-4, Nanog, Runx-2, Fosfatase Alcalina Óssea, Osteocalcina e Ativina A. Os *primers* foram sintetizados pela Invitrogen, recebidos liofilizados e, em seguida, ressuspensos em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), para concentração final de 100 pmol/ μ l (concentração

para estoque). Foram preparadas alíquotas de 1 pmol/μl (concentração de uso para a PCR), no dia da PCR em tempo real. A localização e sequência dos oligonucleotídeos sintetizados estão apresentados na Tabela 02.

| Iniciadores | Sequência de nucleotídeos (nt) | nt | Fragmento amplificado | Código GenBank |
|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------|------------------------------|-----------------------|
| B-Actina-F (senso) | 5'- TCTTGGGTATGGAATCCTGTGGCA -3' | 24 nt | 75 pb | NM_007393.3 |
| B-Actina-R (anti-senso) | 5'- ACAGCACTGTGTTGGCATAGAGGT -3' | 23 nt | | |
| Oct-4-F (senso) | 5'- ATTGAGAACCGTGTGAGGTGGAGT - 3' | 24 nt | 85 pb | NM_013633.2 |
| Oct-4-R (anti-senso) | 5'- TGGCGATGTGAGTGATCTGCTGTA - 3' | 24 nt | | |
| Nanog-F1 (senso) | 5'- AGCAGATGCAAGAACTCTCCTCCA -3' | 24 nt | 89 pb | NM_028016.2 |
| Nanog-R2 (anti-senso) | 5'- CCGCTTGCACTTCATCCTTTGGTT -3' | 24 nt | | |
| Osteo-F1 (senso) | 5'- TGAGCTTAACCTGCTTGTGACGA - 3' | 24 nt | 100 pb | NM_001032298.2 |
| Osteo-R (anti-senso) | 5'- AGGGCAGCACAGGTCCTAAATAGT - 3' | 24 nt | | |
| ALBP-F (senso) | 5'- ATGAAATCACCGCAGACGACAGGA -3' | 24 nt | 98 pb | NM_024406.1 |
| ALBP-R (anti-senso) | 5'- TGTGGTCGACTTTCCATCCCACTT -3' | 24 nt | | |
| Runx-2-F (senso) | 5'- GCTTTCATTAGGCAGGGCCAACAA -3' | 24 nt | 87 pb | NM_009820.2 |
| Runx-2-R (anti-senso) | 5'- AGGGCTGGATCTCAAACCTCACACA -3' | 24 nt | | |
| Ativina-F (senso) | 5'- TGGAGTGTGATGGCAAGGTCAACA -3' | 24 nt | 84 pb | M13436.1 |
| Ativina-R (anti-senso) | 5'- TGATCCAGTCATTCCAGCCGATGT -3' | 24 nt | | |

Tabela 02 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação de PCR para a amplificação específica do cDNA da B-Actina e dos genes-alvo.

3.6.4. RT-PCR em Tempo Real

As amostras de cDNA resultantes da RT foram submetidas à PCR em tempo real no equipamento ABI PRISM® 7500 Sequence Detection System, utilizando-se o Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As amostras foram aplicadas em placas de 96 poços (ABI PRISM® 96-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em triplicata, no volume final de reação de 20 µl. Em cada poço foram pipetados 2 µl (75 ng de cDNA total) de amostra e adicionados posteriormente 18 µl do seguinte *mix*: 10 µl do Power SYBR Green® PCR Master Mix Kit + 0,5 µl de cada primer (senso e antissenso) + H₂O livre de RNase e DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) e recebeu um *spin* para trazer o volume para o fundo do poço. Em seguida, a placa foi encaixada no equipamento de PCR em tempo real para leitura. As reações de PCR em tempo real ocorreram no seguinte ciclo termal: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/0,15 min. e 60°C/1 min. Ao término da ciclagem, foi realizada a curva de melting a 60°C por um minuto, para a construção da curva de dissociação dos fragmentos amplificados.

O grau de pureza de um material pode ser avaliado por este perfil de desnaturação. A presença de múltiplos picos de desnaturação indica que diferentes sequências foram amplificadas e que não há boa especificidade no material amplificado. As curvas de desnaturação obtidas neste estudo demonstraram alta especificidade, permitindo-nos afirmar que não houve amplificação de sequências de aminoácidos indesejáveis no material estudado. Este achado indica uma alta especificidade na amplificação das sequências de aminoácidos que foram submetidas à análise quantitativa dos marcadores avaliados (WIENKEN et al., 2011).

3.6.5. Análise Estatística

Para controle interno, os resultados foram expressos como ΔCT , resultado da subtração do CT dos genes-alvo pelo CT do gene de referência (vide item 3.5.3). A expressão gênica relativa foi calculada como *fold change*, definido pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$, onde $\Delta\Delta Ct = \Delta CT$ dos grupos experimentais subtraído do ΔCT médio do grupo das células do corpo embrionário. As análises foram realizadas tendo por base o ΔCT , que é a fonte primária da variação (YUAN et al., 2006). Os cálculos estatísticos da PCR em tempo real foram realizados no programa GraphPad Prism 5. Para avaliar a curva de distribuição dos dados foi

aplicado o teste de Kolmogorov-Smirnov, que demonstrou distribuição paramétrica para o Δ CT e não-paramétrica para *fold change*. Para efeito descritivo, foram calculadas e representadas graficamente as medianas e quartis do *fold change* nos três grupos. O teste t de Student não-pareado monocaudal foi utilizado para comparar a expressão dos marcadores de indiferenciação Oct-4 e Nanog nos grupos CT e SEM BMP. A análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls foram empregados para comparar a expressão dos marcadores de diferenciação e da ativina A entre os três grupos, tendo como base o *fold change* (YUAN et al., 2006). Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

3.7. Imunocitoquímica

3.7.1. Preparo das Lamínulas

Células embrionárias foram cultivadas placas de 24 poços (TPP[®], Trasadingen, Switzerland) e lamínulas de vidro circular de 13 mm (Glasscyto, São Paulo, SP). As lamínulas foram tratadas com uma solução de álcool/éter (1:1) por 24 horas para a remoção de gordura e, a seguir, autoclavadas. Em capela de fluxo laminar, as lamínulas foram colocadas em cada um dos poços da placa de 24 poços e receberam um *pool* celular na densidade de 1×10^5 células/cm²/poço para subseqüente plaqueamento.

Três experimentos independentes em triplicada foram realizados de acordo com a figura abaixo. Todas as células plaqueadas dessa forma, foram lavadas 02 vezes com PBS +/+, fixadas em 400µL de paraformaldeído 4% para cada poço e armazenadas a 4°C.

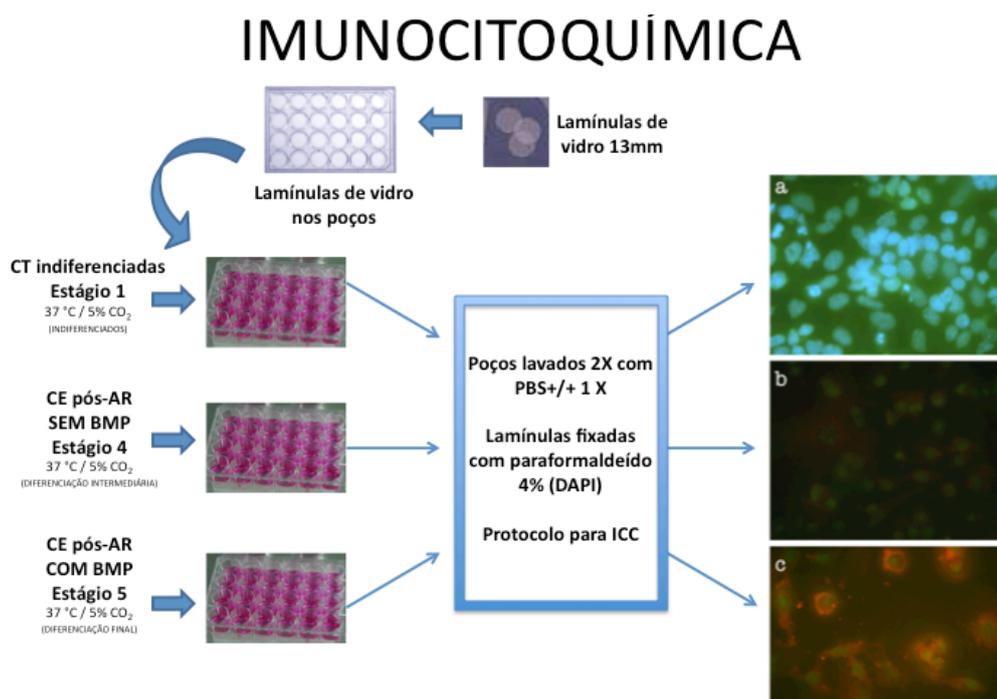


Figura 05 - Diagrama ilustrativo das etapas envolvidas na imunocitoquímica.

3.7.2. Imunocoloração para ativina A

O paraformaldeído foi descartado e cada poço lavado 03 vezes com 500 μ L de PBS+/+ 1X estéril. As células fixadas foram permeabilizadas com TBS+BSA 2%+Triton 0.1% por 10 minutos. A primeira etapa foi de inibição da peroxidase endógena a fim de evitar sua reação com o substrato fora de sítios antigênicos específicos. Para isso, as lamínulas foram incubadas por 5 minutos com Peroxidase Block (Novocastra™ Peroxidase Detection System – RE7101) e, em seguida, lavadas 2 vezes com TBS. A segunda etapa foi a incubação com um bloqueador de proteína (Novocastra™ Peroxidase Detection System - Protein Block – RE7102) por 5 minutos, para suprimir ligações não específicas dos reagentes subsequentes. Posteriormente, as células foram lavadas 2 vezes por 5 minutos com TBS.

A etapa seguinte foi a incubação das lamínulas com o anticorpo primário para a subunidade β A da ativina (Human/Mouse/Rat Activin A β A subunit Antibody – R&D Systems). O anticorpo foi diluído em TBS nas proporções sugeridas nas instruções de uso do anticorpo (R&D System). O controle negativo consistiu em lamínulas incubados com TBS+BSA 2% (anexo). Nesta etapa as lamínulas foram viradas sobre 25 μ L da solução do anticorpo, sobre um plástico *insufilm* e incubadas por 1 hora. Para evitar evaporação e ressecamento a incubação foi feita numa câmara úmida. A câmara que utilizamos consistiu em uma caixa plástica retangular rasa, forrada com papel umedecido em água destilada.

Findo o tempo de incubação com o anticorpo primário, as lâminulas foram lavadas 2 vezes por 5 minutos com TBS, e passou-se para a incubação com o anticorpo policlonal secundário Donkey anti-Goat IgG – FITC (Abcam), aplicando-se 25 μ L sobre um plástico *insufilm* esticado sobre a tampa de uma placa, as lamínulas foram viradas sobre a gota por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada a incubação e lavado o excedente de anticorpo secundário 2 vezes por 5 minutos com TBS, passamos à próxima etapa que foi a marcação nuclear com DAPI.

Sobre Parafilm, foram pipetados 20 μ L de DAPI para cada lamínula, diluído 1000 vezes em PBS+/+ 1X, em uma concentração final de 0,03 mM/mL. As lamínulas foram transferidas para o *parafilm* de maneira que o lado em que as células aderiram estivesse em contato com a gota de DAPI e, a seguir, foram incubadas no escuro por 1 minuto no DAPI e transferidas novamente para a placa de cultura com a superfície de crescimento voltada para cima. A seguir, lavadas 4 vezes com PBS+/+ 1X. As lamínulas foram secas encostando-se a borda das mesmas em papel absorvente e, em seguida, montadas em lâminas de microscopia,

com óleo de montagem antifade (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e as bordas seladas com esmalte. As lâminas foram guardadas em caixa escura e resfriada (-20°C).

3.7.3. Leitura das lâminas

As células foram examinadas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axio-plan 2, Alemanha), utilizando filtro de excitação e emissão de 380 e 430 nm, no Laboratório Professora Conceição Machado, no Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, utilizando-se objetiva de 40 X 0,75 e 60 X 1,23 . As imagens foram capturadas utilizando-se o programa Axion Vision Release 4.7.2, através da câmera digital acoplada ao sistema MC 200 chip com ampliação de imagens em até 400X.

4. RESULTADOS

4.1. Indicadores de Qualidade das reações de PCR em Tempo Real

Foram utilizadas amostras em triplicata de três experimentos independentes em diferentes estágios de diferenciação: indiferenciado (CT), intermediário (sem BMP) e diferenciado (BMP). Os resultados de amplificação da Beta-Actina demonstraram-se homogêneos em todos os alvos para as sequências de aminoácidos avaliadas e sua amplificação seguiu o padrão exponencial esperado (Gráfico 01). As curvas de desnaturação comprovaram a alta especificidade das reações de PCR, com amplificação exclusiva das sequências-alvo (Gráfico 02).

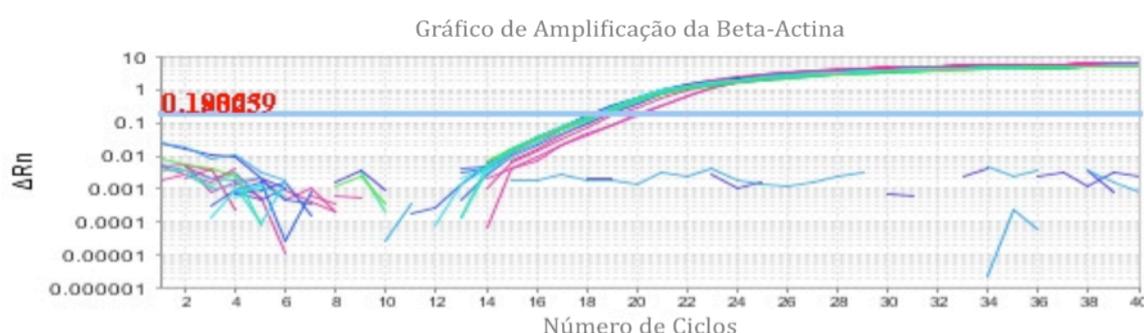


Gráfico 01 - Amplificação da Beta-Actina. *Cycle Threshold* (Ct) representado na barra horizontal.

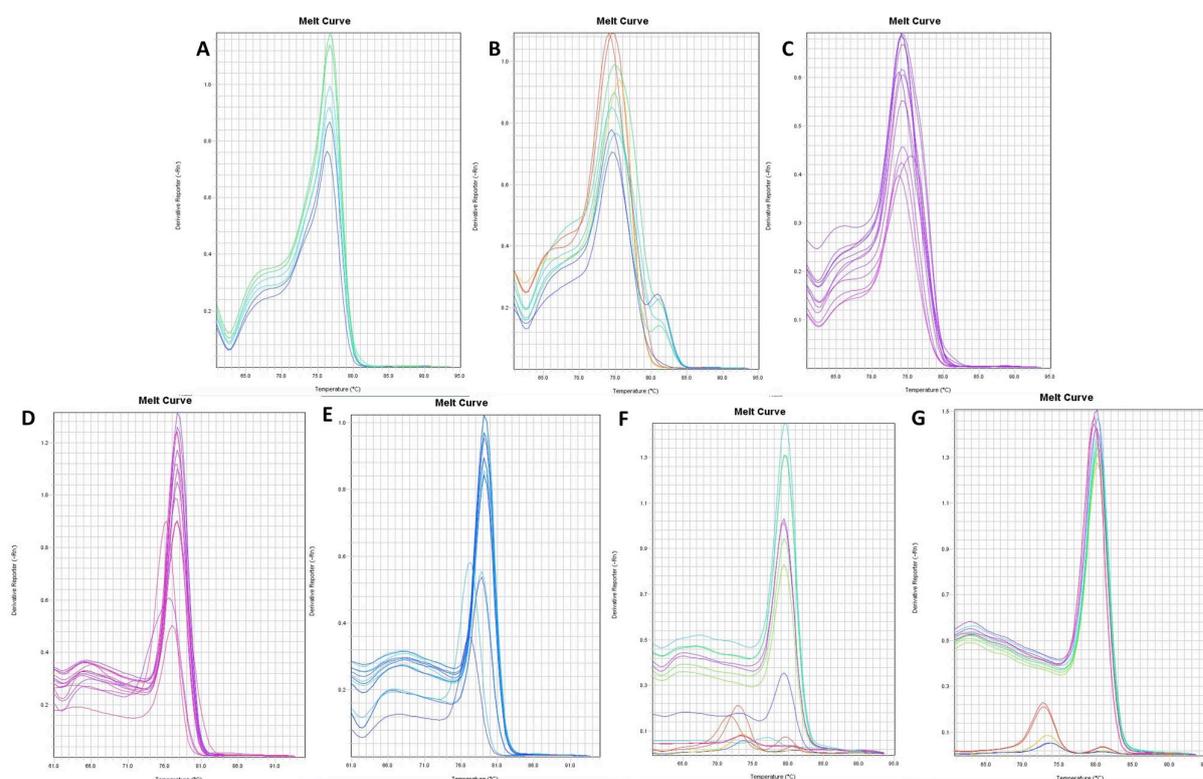


Gráfico 02 - Curvas de desnaturação (*Melting*). (A) β -Actina, (B) fosfatase alcalina óssea, (C) osteocalcina, (D) ativina β A, (E) Oct-4, (F) Nanog, (G) Runx-2.

4.2. Expressão de Marcadores de Indiferenciação Celular

Observou-se significativa redução na expressão gênica do marcador de indiferenciação celular Oct-4 nas células submetidas ao estímulo parcial de diferenciação óssea (Sem BMP) se comparadas ao grupo de células-tronco indiferenciadas (CT).

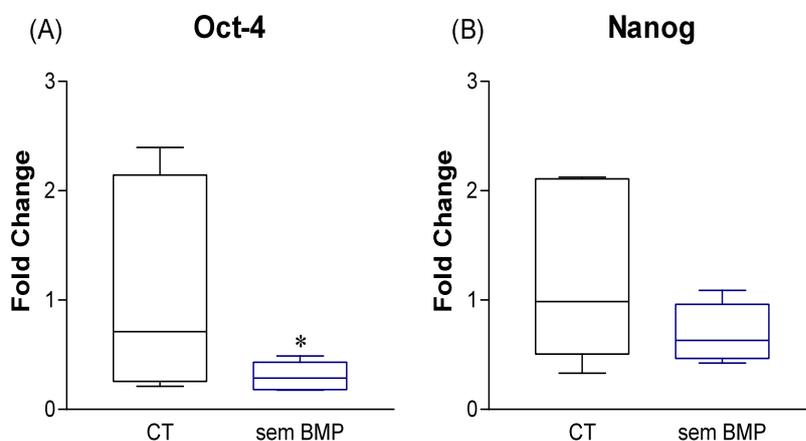


Gráfico 03 - Expressão gênica dos marcadores de indiferenciação celular Oct-4 (A) e Nanog (B) em células-tronco indiferenciadas (CT) e corpos embrionários que receberam estímulo intermediário de diferenciação (sem BMP). Os gráficos representam a mediana (linha horizontal), o intervalo inter-quartil (extremidades dos retângulos) e os percentis 10 e 90 (barras de erro). * $p < 0,05$ (teste t de Student).

4.3. Expressão de Marcadores de Diferenciação Óssea

Substâncias produzidas pelos osteoblastos foram utilizadas como marcadores específicos da diferenciação óssea (ex: osteocalcina, fosfatase alcalina óssea e RUNX-2. Sua expressão gênica foi quantificada em momentos distintos do protocolo de diferenciação celular.

O Gráfico 04 representa a expressão gênica dos marcadores de formação óssea nas células indiferenciadas (CT); nas células que sofreram a diferenciação intermediária (SEM BMP) e nas células que completaram todo o processo de diferenciação óssea (BMP).

Verificou-se maior expressão gênica de osteocalcina (aumento mediano de 5,8 vezes, $p < 0,05$) e de RUNX-2 (aumento mediano de 3,3 vezes, $p = 0,08$) no material submetido ao estímulo para diferenciação final em relação ao referencial CT. A expressão gênica da fosfatase alcalina óssea foi semelhante entre os grupos de diferenciação intermediária (sem BMP) e na fase de diferenciação terminal (BMP).

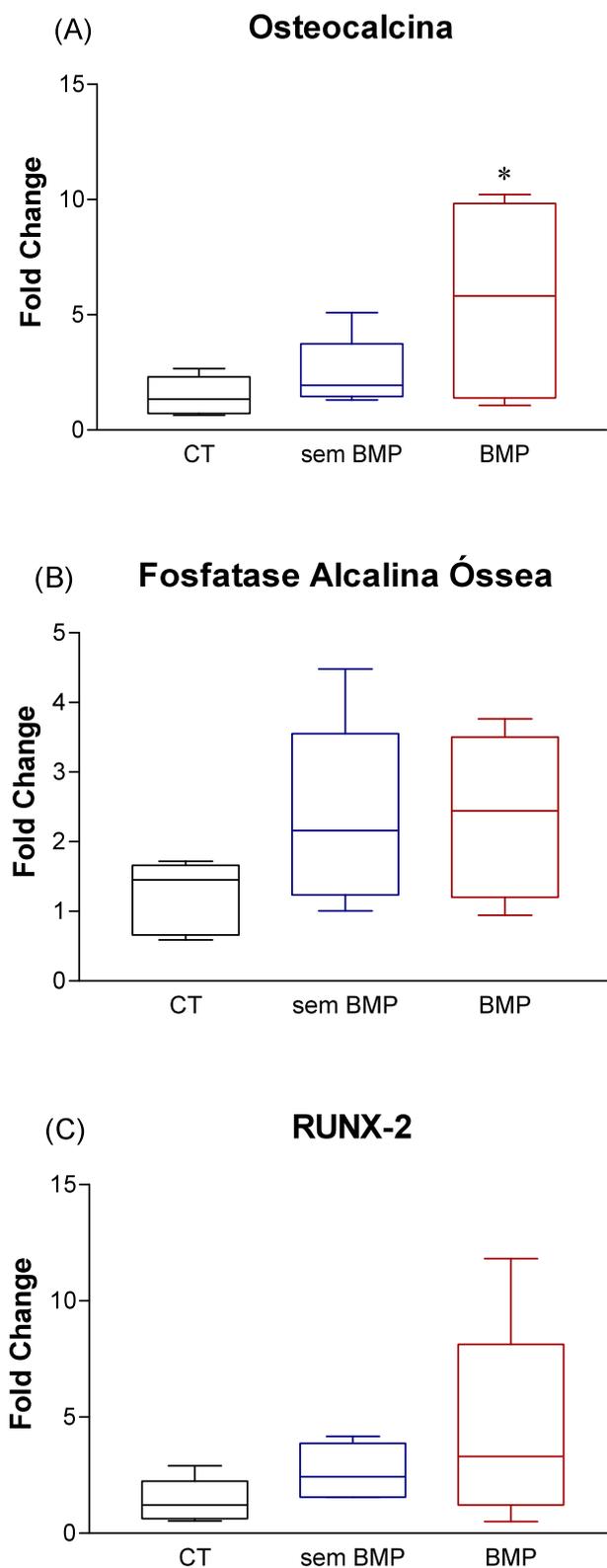


Gráfico 04 - Expressão gênica dos marcadores de diferenciação osteobástica: osteocalcina (A), fosfatase alcalina óssea (B), RUNX-2 (C) no processo de diferenciação celular. * $p < 0,05$ (análise de variância e teste de Newman-Keuls) vs. células indiferenciadas (CT).

4.4. Expressão gênica da Ativina A

A expressão gênica da Ativina A é representada na Figura 7. Observa-se o aumento progressivo da expressão de ativina A durante o processo de diferenciação celular. Nas células que completaram o processo de diferenciação com estímulo por BMP, a expressão mediana de ativina A de 4,1 vezes superior ($p < 0,05$) à do grupo de células-tronco indiferenciadas (Gráfico 05).

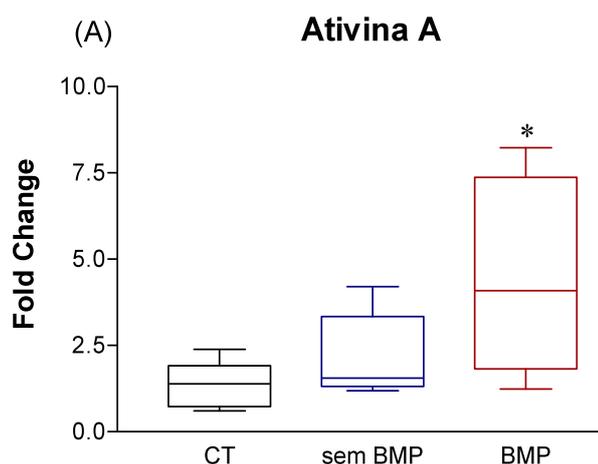


Gráfico 05 – Expressão gênica da ativina A (subunidade beta-A) durante processo de diferenciação celular. * $p < 0,05$ (análise de variância e teste de Newman-Keuls) células diferenciadas vs. células indiferenciadas (CT).

4.5. Imunocoloração para Ativina A

A Figura 06 exibe os resultados da imunocoloração para Ativina A. Não houve imunocoloração para ativina A em células indiferenciadas. As células tratadas com AR e sem o estímulo da BMP-4 apresentaram marcação discreta, enquanto as células cultivadas com BMP até a diferenciação completa apresentaram marcação mais intensa para Ativina A.

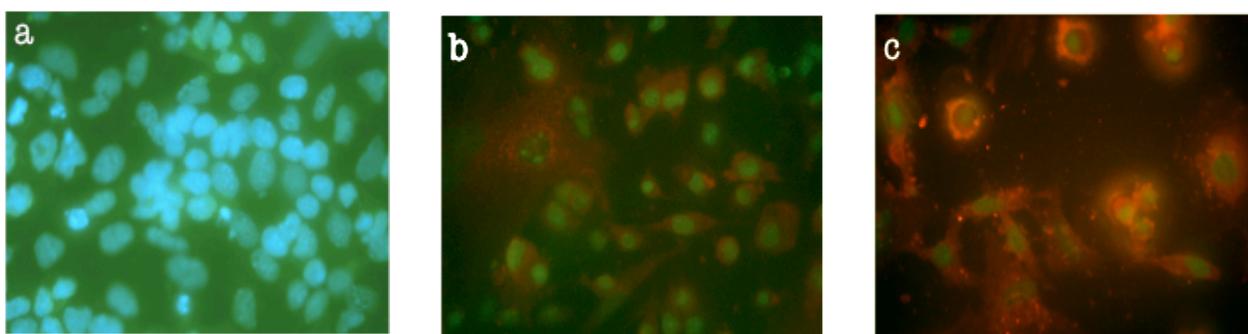


Figura 06 - Fotomicrografias representativas do resultado da imunocitoquímica para ativina A em células-tronco indiferenciadas (A), células sob estímulo intermediário sem BMP (B) e nas células que completaram todo o protocolo de diferenciação óssea com BMP (C). A imunomarcação corresponde à coloração avermelhada, extranuclear. Os núcleos são marcados em verde.

5. DISCUSSÃO

5.1. Cultivo e Diferenciação Celular

No presente trabalho, todas as amostras de células de cultivo foram geradas a partir de uma única linhagem de células-tronco indiferenciadas descongelada na décima passagem celular. Portanto, presumidamente portadoras do mesmo potencial genético. A diferença entre elas foi apenas o grau de estímulo para diferenciação óssea aplicado.

A adaptação técnica proposta foi a substituição do cultivo em gotas invertidas pelo cultivo em suspensão tradicional. O cultivo em suspensão convencional obteve um rendimento satisfatório por meio da cultura em suspensão, reduzindo o gasto de tempo e material em relação ao cultivo em suspensão. É importante o uso de placa de cultivo anti-aderente a fim de evitar o plaqueamento excessivo do material em suspensão.

5.2. PCR em Tempo Real

Todos os genes-alvo descritos acima, foram normalizados pela β -Actina quando avaliados por PCR em tempo real em cada uma das amostras dos três experimentos completos e independentes realizados.

5.2.2. Homogeneidade

A expressão da β -Actina deve ser homogênea entre as diferentes amostras testadas para garantir a comparabilidade entre todo o material coletado. Os resultados obtidos demonstraram haver homogeneidade na expressão de β -Actina em todas as amostras (Gráfico 01) atestando a comparabilidade do material e a reprodutibilidade dos três experimentos independentes realizados (HUGGETT et al., 2005).

5.2.3. Especificidade

A análise da curva de desnaturação (*Melting Curve*) é uma abordagem que avalia as características de dissociação do DNA durante o aquecimento através do perfil de desintegração pelo calor. A desnaturação de ácidos nucleicos do DNA ou RNA produz um efeito denominado termoforese, documentado pelas alterações na fluorescência, específicas para cada sequência de aminoácidos. Dessa forma, cada substância possui um perfil de desnaturação específico que gera uma curva própria de desnaturação.

5.2.4. Quantificação da Expressão Gênica

Existem dois métodos, igualmente válidos, para análise de dados obtidos a partir de PCR em tempo real: método da Curva Padrão Relativa e método CT Comparativo. O método da Curva Padrão Relativa requer uma curva padrão para cada reação e, por isso, exige mais reagentes e mais espaço na placa de reação. O Método CT Comparativo, também conhecido como método $\Delta\Delta CT$, é semelhante ao método da Curva Padrão Relativo e utiliza fórmulas matemáticas para a quantificação relativa. Conforme demonstrado no Gráfico 01, a amplificação da Beta-Actina foi homogênea entre as amostras testadas. A homogeneidade é respalda a utilização do método CT Comparativo.

Quanto menor é o número de ciclos de PCR necessários para se expressar um gene, maior será a expressão gênica desse alvo. Essa relação inversa é utilizada para compor uma equação que considera a amplificação do gene de referência e a média das curvas de amplificação dos demais genes testados. O parâmetro derivado dessa equação é conhecido como $\Delta\Delta CT$. Portanto, quanto menor o $\Delta\Delta CT$, maior a expressão gênica de um determinado alvo no material estudado.

5.2.4.1. Marcadores de Indiferenciação Celular

Conforme esperado, os marcadores de indiferenciação celular (Nanog e Oct-4) foram mais expressos nas amostras de células-tronco indiferenciadas, conforme previsto. Mesmo em estágios avançados do protocolo de diferenciação houve expressão desses marcadores

Oct-4

O nível de significância estatística foi alcançado demonstrando que a expressão gênica do Oct-4 foi significativamente menor à medida em que o protocolo avançou para estágios de maior estímulo à diferenciação óssea (Gráfico 03 A).

Nanog

O Gráfico 03 B sugere haver menor expressão do Nanog nas amostras submetidas à uma parte do processo de diferenciação (Grupo Sem BMP) do que nas amostras de células-tronco indiferenciadas (Grupo CT). Contudo, a significância estatística não foi alcançada. É possível que o reduzido tamanho amostral tenha comprometido a significância estatística esperada para a redução da expressão gênica do marcador Nanog no experimento.

5.2.4.2. Marcadores de Diferenciação Osteoblástica

Fosfatase Alcalina Óssea

Os resultados do experimento realizado confirma os dados da Literatura relativos à FAO. Foi demonstrado que a expressão de FAO pode ser decorrente de osteoblastos maduros mas também de pré-osteoblastos (CALVO et al., 1996). O Gráfico 04 B evidencia uma expressão semelhante da fosfatase alcalina óssea entre células submetidas ao estímulo intermediário (Grupo Sem BMP) e células que receberam o estímulo completo de diferenciação óssea (Grupo BMP).

RUNX-2

Este marcador de diferenciação óssea comportou-se dentro do esperado. À medida em que as células recebiam mais estímulo para a diferenciação, maiores quantidades de RUNX-2 eram expressas. Inobstante a tendência gradual verificada, a significância estatística não foi alcançada. Vale lembrar que o RUNX-2 indica um comprometimento precoce da linhagem celular com a diferenciação óssea e pode ser expressa também em pré-osteoblastos.

Osteocalcina

Este marcador, expresso exclusivamente em osteoblastos maduros, reflete com fidelidade a maior expressão gênica dos marcadores ósseos em células submetidas ao protocolo completo de diferenciação osteoblástica. A maior expressão da Osteocalcina alcançou o nível de significância estatística quando comparado às células indiferenciadas. A magnitude dessa resposta parece reproduzir os diferentes graus de estímulo e sugere que o estímulo osteogênico do Estágio 04 seja fundamental para garantir uma completa diferenciação óssea.

5.2.4.3. Ativina A

A expressão gênica da ativina A acompanhou o padrão de resposta dos marcadores de diferenciação óssea RUNX-2 e Osteocalcina, corroborando a hipótese de que a Ativina A seja um importante fator envolvido na diferenciação óssea terminal, mais presente nos osteoblastos. A Ativina A foi detectável também em células submetidas a estímulo parcial para a diferenciação.

O nível de significância estatística para a crescente expressão da Ativina A foi alcançado somente nas amostras celulares que receberam o estímulo terminal de diferenciação, sugerindo que a BMP - no caso o subtipo 4 - seja um agente fundamental e atue em sinergia com a Ativina A no processo de mineralização óssea.

A ativina A foi expressa de forma independente das ativinas gonadais pois, pelo método de cultivo celular *in vitro*, é possível constituir um ambiente isento da interferência de ativinas gonadais. Dessa forma, demonstrou-se que a ativina A é produzida a partir de células osteoblásticas diferenciadas a partir de CTE de camundongo.

Embora detalhes da relação entre ativinas e BMPs não tenham sido elucidados, é possível considerar que a Ativina A atue em sinergia à BMP e, portanto, favorecendo a mineralização óssea. Por ser secretada em Osteoblastos, a Ativina A pode ser considerada uma substância anabolizante. Sua ação óssea deve ser alvo de mais estudos com objetivo de se constituir um potencial alvo terapêutico a ser explorado.

5.3. Imunocitoquímica

A quantificação da marcação por imunocitoquímica não pôde ser realizada devido à espessura do material depositado sobre as lamínulas. As amostras avaliadas demonstraram intenso efeito *efeito background*, o que compromete a quantificação da resposta luminescente.

Contudo, uma análise qualitativa pode ser obtida. Através do microscópio, foi possível perceber que a intensidade da marcação de Ativina foi tanto maior quanto mais estímulo osteogênico era aplicado às culturas celulares.

6. CONCLUSÕES

- A adaptação ao protocolo de diferenciação osteoblástica possibilitou uma qualidade de cultivo suficiente para avaliar a expressão de marcadores específicos em colônias celulares submetidas a um protocolo de diferenciação celular osteoblástica.
- A expressão gênica dos marcadores de diferenciação óssea (Osteocalcina, RUNX-2 e Fosfatase Alcalina Óssea), avaliada por PCR de tempo real, aumentou gradualmente em relação direta com o estímulo de diferenciação osteoblástica.
- A expressão gênica da ativina A, avaliada por PCR de tempo real, foi detectada em células-tronco embrionárias de camundongo desde o estágio indiferenciado, aumentando gradualmente com o tempo de cultivo celular de forma diretamente proporcional à expressão de marcadores de formação óssea avaliados.
- A expressão protéica da Ativina A foi comprovada pela marcação imunocitoquímica, que demonstrou, de forma qualitativa, haver maior expressão de ativina quanto mais se avançou rumo à diferenciação osteoblástica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbondanzo SJ, Gadi I e Stewart CL. Derivation of embryonic stem cell lines. *Methods in Enzymology* 1993; 225:803-23.

Albright F, Butler AM, Hampton AO, Smith P. Syndrome characterized by osteitis fibrosa disseminata, areas of pigmentation, and endocrine dysfunction, with precocious puberty in females. *N Engl J Med* 1937; 216:727-41.

Albright, F., Bloomberg, E., and Smith, P. H., Post-menopausal osteoporosis. *Tr. Assoc. Am. Physicians*, 1940, 55, 298.

Baron R, Hesse E. Update on Bone Anabolics in Osteoporosis Treatment: Rationale, Current Status, and Perspectives. *J Clin Endocrinol Metab* 2012; 97(2):311–325.

Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner JE, Gottlieb DI. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995;168: 342 – 57.

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A. Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cell Signal* 2011;4:609-20.

Calvo MS, Eyre Dr, gundberg CM. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocrine rev*, 1996; 17: 333-68.

Capriani C, Irani D, Bilezikian JP. Safety of osteoanabolic therapy: a decade of experience. *J Bone Min Res* 2012; 27(12): 2419–28.

Carpenter TO, Moltz KC, Ellis B, Andreoli M, Mccarthy YL, Centrella M et al.. Osteocalcin production in primary osteoblast cultures derived from normal and *hyp* mice. *Endocrinology* 1998; 139: 35– 43.

Cauley JA, Robbins J, Chen Z et al. for the Women’s Health Investigators. Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women’s Health Initiative Randomized Trial. *JAMA* 2003; 290:1729-38.

Centrella M, McCarthy TL, Canalis E. Activin-A binding and biochemical effects in osteoblast-enriched cultures from fetal-parietal bone. *Mol Cell Biol* 1991;11:250–58.

Chantry AD, Heath D, Mulivor AW, Pearsall S, Baudhuin M, Coulton L et al. Inhibiting Activin-A signaling stimulates bone formation and prevents cancer-induced bone destruction *in vivo*. *J Bone Miner Res* 2010; 25(12):2633-46.

Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci* 2012; 8(2):272-288

Chenard KE, Teven CM, He T-C, Reid RR. Bone morphogenetic proteins in craniofacial surgery: current techniques, clinical experiences, and the future of personalized stem cell therapy. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012; 1-14.

Clark P, Cons-Molina F, Delezé M, Ragi-Eis S, Haddock L, Zanchetta JRet al.. The prevalence of vertebral fractures in Latin American countries: The Latin-American Vertebral Osteoporosis Study (LAVOS). *Osteoporos Int* 2009; 20:275-82.

Conrad C, Huss R. Adult stem cell lines in regenerative medicine and reconstructive surgery *Journal of Surgical Research* 2005; 124:201– 8.

Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* 1993; 94: 646-50.

Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd. Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. *J Bone Miner Res* 1992; 7(2):221-7.

Dang SM, Gerecht-Nir S, Chen J, Itskovitz-Eldor J, Zandstra PW. Controlled, Scalable Embryonic Stem Cell Differentiation Culture. *Stem Cells* 2004;22(3):275-82.

Dani C, Smith AG, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, et al. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997;110:1279 – 85.

Dani C. Embryonic stem cell-derived adipogenesis. *Cells Tissue Org* 1999;165:173 – 80

Doetschman TC, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The *in vitro* development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; 87:27-45.

Djouad F, Jackson WM, Bobick BE, Janjanin S, Song Y, Huang GTJ, Tuan RS
Activin A expression regulates multipotency of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cell Research & Therapy*; 2010: 1:11.

Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997;89: 747 – 54.

Eijken M, Swagemakers S, Koedam M, Steenbergen C, Derkx P, Uitterlinden AG, Van der Spek PJ, Visser JA, de Jong FH, Pols HA, Van Leeuwen JP. The activin A-follistatin system: potent regulator of human extracellular matrix mineralization. *FASEB J* 2007; 21(11):2949-60.

Ettinger B, Ensrud KE, Wallace R, et al. Effects of ultralow-dose trans- dermal estradiol on bone mineral density: a randomized clinical trial. *Obstet Gynecol* 2004;104:443-51

Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; 292:154-156.

Everts V, Delaisse JM, Korper W, et al. 2002. The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res* 17:77-90.

Farnworth PG, Stanton PG, Wang Y, Escalona R, Findlay JK, Ooi GT. Inhibins Differentially Antagonize Activin and Bone Morphogenetic Protein Action in a Mouse Adrenocortical Cell Line *Endocrinology* 2006; 147(7):3462–71.

Fehling HJ, Lacaud G, Kubo A, Kennedy M, Robertson S, Keller G et al. Tracking mesoderm induction and its specification to the hemangioblast during embryonic stem cell differentiation. *Development* 2003;130:4217 – 27.

Ferreira MC, Witz CA, Hammes LS, Kirma N, Petraglia F, Schenken RS, Reis FM. Activin A increases invasiveness of endometrial cells in an in vitro model of human peritoneum. *Mol Hum Reprod* 2008; 14(5) 301-7.

Forbes AP. Fuller Albright: His concept of postmenopausal osteoporosis and what came of it. *Clin Orthop Relat Res* 1991; 269:128-41.

Furie B, Bouchard BA, Furie BC. Vitamin K-dependent biosynthesis of gamma-carboxyglutamic acid". *Blood* 1999;93 (6): 1798 - 808.

Gaddy-Kurten D, Coker JK, Abe E, Jilka RL, Manolagas SC. Inhibin suppresses and activin stimulates osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in murine bone marrow cultures. *Endocrinology* 2002; 143:74-83.

Geoffroy V, Marty-Morieux C, Le Goupil N, et al. 2004. In vivo inhibition of osteoblastic metalloproteinases leads to increased trabecular bone mass. *J Bone Miner Res* 19:811-822.

Harper KD, Krege JH, Marcus R, Mitlak BH. Osteosarcoma and teriparatide?. *J Bone Miner Res* 2007; 22(2):334.

Hashimoto M, Shoda A, Inoue S, Yamada R, Kondo T, Sakurai T, Ueno N, Muramatsu M. Functional regulation of osteoblastic cells by the interaction of activin-A with follistatin. *J Biol Chem* 1992; 267:4999-5004.

Hassan MQ, Tare RS, Lee SH, Mandeville M, Morasso MI, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB. BMP-2 commitment to the osteogenic lineage involves activation of RUNX-2 by DLX3 and a homeodomain transcriptional network. *J Biol Chem* 2006;281(52):40515-26.

Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, et al. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta* (1984) 802:151-154.

Hirotsu H, Ohtsuka-Isoya M, Mori S, Sakai R, Eto Y, Echigo S, Shinoda H. (2002) Activin A increases the bone mass of grafted bone in C3H/HeJ mice. *Calcif Tissue Int* 70:330-338.

Hou P, Troen T, Ovejero MC, et al. Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. *Bone* (2004) 34:37-47.

Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR Normalisation Strategies and Considerations. *Genes and Immunity* 2005; 1–6.

International Osteoporosis Foundation. Latin American Audit [Internet]. Genève [atualizada em 2012 May 25, acesso em 2013 Jan 26]. Disponível em: <http://www.iofbonehealth.org/sites/default/files/PDFs/2012-LA_Audit.pdf>.

Johnell O, Kanis JA. An estimate of the worldwide prevalence, mortality and disability associated with hip fracture. *Osteoporos Int* 2004;15:897-902.

Jones-Villeneuve EM, McBurney MW, Rogers KA, Kalnins VI. Retinoic acid induces embryonal carcinoma cells to differentiate into neurons and glial cells. *JCB* 1982; 94 (2): 253-62.

Kanis JA, Johnell O, Oden A, De Laet C, Mellstrom D. Guidelines for diagnosis and management of osteoporosis. The European Foundation for Osteoporosis and Bone Disease. *Osteoporos Int* 1997; 7:390-406.

Kawaguchi J, Mee PJ, Smith AG. Osteogenic and chondrogenic differentiation of embryonic stem cells in response to specific growth factors. *Bone* 2005; 36: 758–69.

Kawaguchi J. Generation of Osteoblasts and Chondrocytes From Embryonic Stem Cells. In: Turksen K, editor. *Methods in Molecular Biology*, vol. 330: Embryonic Stem Cell Protocols. 2nd ed. Totowa: Humana Press Inc.; 2006. p. 135-48.

Kelber J.A., Shani G., Booker E.C., Vale W.W.; Gray P.C. Cripto is a noncompetitive activin antagonists that forms analogous signaling complexes with activin and nodal. *J Biol Chem* 2008; 283(36): 4490–500.

Lee S-H, Lumelsky N, Studer L et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat biotechnol* 2000; 18:675-9.

Leslie WD, O'Donnell S, Jean S, et al. for the Osteoporosis Surveillance. Expert Working Group. Trends in hip fracture rates in Canada. *JAMA* 2009; (26)302:883-9.

Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics* 2006; 38(4)2431-40

Lotinun S, Pearsall RS, Davies MV, Marvell TH, Monnell TE, Ucran J, Fajardo RJ, Kumar R, Underwood KW, Seehra J, Bouxsein ML, Baron R. A soluble activin receptor Type IIA fusion protein (ACE-011) increases bone mass via a dual anabolic-antiresorptive effect in Cynomolgus monkeys. *Bone* 2010; 1082–1088.

Lotinun S, Pearsall RS, Horne WC, Baron R. Activin Receptor Signaling: A Potential Therapeutic Target for Osteoporosis. *Current Molecular Pharmacology*, 2012; 5(2):195-204

Lubitz R, Prasad S. Case report: osteosarcoma and teriparatide (abstract). Poster presented at the ASBMR 31st Annual Meeting. *J Bone Miner Res* 2009; 24 (Suppl 1):SU0354.

Mann KG. Biochemistry and physiology of blood coagulation. *Thromb. Haemost.* 1999; 82 (2): 165 - 74.

Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7634-8.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. Isolation and culture of blastocyst-derived stem cell lines. In: Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R, editors.

Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press 2003; pp. 359–98.

National Institutes of Health - NIH. Consensus Development Panel on Osteoporosis Prevention, Diagnosis and Therapy. *JAMA* 2001; 85:785-95.

Nicks KM, Fowler TW, Akel NS, Perrien DS, Suva LJ, Gaddy D. Bone turnover across the menopause transition: the role of gonadal inhibins. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1192:153-60.

Nicks KM, Perrien DS, Akel NS, Suva LJ, Gaddy D. Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 310:11-20.

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000 (4):372-6.

Odvina CV, Zerwekh JE, Rao DS, Maalouf N, Gottschalk FA, Pak CY Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(3):1294-301.

Ogawa Y, Schmidt DK, Nathan RM, Armstrong RM, Miller KL, Sawamura SJ et al. Bovine bone activin enhances bone morphogenetic protein-induced ectopic bone formation. *J Biol Chem* 1992; 267:14233–7.

Oue Y, Kanatani H, Kiyoki M, Eto Y, Ogata E, Matsumoto T. Effect of local injection of activin A on bone formation in newborn rats. *Bone* 1994; 15:361–6.

Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, Barone LM, Wilming L, Tassinari MS, Kennedy MB, Pockwinse S, Lian JB, Stein GS. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 1990; 143:420–430.

Papageorgiou I, Nicholls PK, Wang F, Lackmann M, Mankanji Y, Salamonsen LA et al. Expression of nodal signalling components in cycling human endometrium and in endometrial cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2009; 7:122.

Pearsall RS, Canalis E, Cornwall-Brady M, Underwood KW, Haigis B, Ucran J, Kumar R, Pobre E, Grinberg A, Werner ED, Glatt V, Stadmeier L, Smith D, Seehra J, Bouxsein ML. A soluble activin type IIA receptor induces bone formation and improves skeletal integrity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105:7082–7087.

Perrien DS, Achenbach SJ, Bledsoe SE, Walser B, Suva LJ, Khosla S, Gaddy D. Bone turnover across the menopause transition: correlations with inhibins and follicle-stimulating hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1848–54.

Perrien DS, Nicks KM, Liu L, Akel NS, Bacon AW, Skinner RA, Swain FL, Aronson J, Suva LJ, Gaddy D. Inhibin A enhances bone formation during distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 2012; 30:288-95.

Pinheiro MM, dos Reis Neto ET, Machado FS, Omura F, Yang JHK, Szejnfeld J, Szejnfeld VL. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. *Rev Saúde Pública* 2010; 44:479-85.

Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC. Osteoporosis: now and the future. *Lancet* 2011; 377:1276–87.

Riera-Espinoza G. Epidemiology of osteoporosis in Latin America 2008. *Salud Publica Mex* 2009; 51 (Supl): S52-S55.

Rizzoli R, Akesson K, Bouxsein M, Kanis JA, Napoli N, Papapoulos S et al. Subtrochanteric fractures after long-term treatment with bisphosphonates: An European Society on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis and International Osteoporosis Foundation Working Group Report. *Osteoporosis Int* 2011; 22:373–90.

Rudnicki MA, McBurney MW. Cell culture methods and induction of differentiation of embryonal carcinoma cell lines. In: *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells a Practical Approach*. Robertson EJ, editors. Oxford: IRL Press 1987; pp. 19-49.

Sandhu HS, Khan SN. Animal Models for Preclinical Assessment of Bone Morphogenetic Proteins in the Spine *Spine* 2002; 27(16S):S32-S38.

Sakai, R, Miwa, K, Eto Y. Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. *Bone* 1999; 25:191-6,

Seeman E, Delmas PD. Bone quality - the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med* 2006; 354:2250-61.

Shane E, Burr D, Ebeling PR, Abrahamsen B, Adler RA, Brown TD et al. Atypical subtrochanteric and diaphyseal femoral fractures: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res* 2010; 25: 2267–94.

Shani G, Fischer WH, Justice NJ, Kelber JA, Vale W, Gray PC. GRP78 and cripto form a complex at the cell surface and collaborate to inhibit transforming growth factor beta signaling and enhance cell growth. *Mol Cell Biol* 2008; 28: 666–77.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev* (2004); 25:72-101.

Shuto O, Sarkar G, Bronk JT, Matsui N, Bolander ME. Osteoblasts Express Types I and II Activin Receptors During Early Intramembranous and Endochondral Bone Formation. *J Bone Min Res* 1997; 12(3): 403-11.

Sowers MR, Jannausch M, McConnell D, Little R, Greendale GA, Finkelstein JS et al. Hormone predictors of bone mineral density changes during the menopausal transition. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91:1261–67.

Subbiah V, Madsen VSS, Raymond AK, Benjamin RS, Ludwig JA. Of mice and men: divergent risks of teriparatide-induced osteosarcoma. *Osteoporos Int* 2010; 21(6):1041–5.

Sun L, Peng Y, Sharrow AC, Iqbal J, Zhang Z, Papachristou DJ et al. FSH Directly Regulates Bone Mass. *Cell* 2006; 125:247–60.

Sugatani T, Alvarez UM, Hruska KA. Activin A stimulates I B- /NF B and RANK expression for osteoclast differentiation, but not AKT survival pathway in osteoclast precursors. *J Cell Biochem* 2003; 90: 59 – 67.

Tavares RLC, Xu K, Zhang C, de Freitas V. A specific and quick gene expression study in mouse ES cells *J Assist Reprod Genet* 2007; 24:366- 72.

Tavares RLC, Cortes PA, de Azevedo CI, Cangussú SD, Camargos AF, Arantes RME. Variation in neuronal differentiation of a newly isolated mouse embryonic stem cell line: a detailed immunocytochemistry study. *Cell Biol Int Rep* 2012; 19(1): e00018.

The British Standards Institution - BSI. Cell therapy and regenerative medicine glossary. *Regen. Med.* 2012; 7(Supl. 3), S1–S124.

The North American Menopause Society - NAMS. Hormone Therapy Position Statement. *Menopause* 2012; 19(3): 257-71.

The North American Menopause Society - NAMS. Management of Osteoporosis in Postmenopausal Women Position Statement. *Menopause* 2010; 17(1):25-54.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282:1145–7.

Triffitt JT. The special proteins of bone tissue. *Clin Sci* 1987; 72: 399408.

Tung YC, Hsiao AY, Allen SG, Torisawa YS, Ho M, Takayama S. High-throughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. *Analyst* 2011;136(3):473-8.

Urist MR, Iwata H, Ceccotti PL, et al. Bone morphogenesis in implants of insoluble bone gelatin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973;70:3511–15.

Vahle JL, Masahiko S, Long GG, Young JK, Francis PC, Englehardt JA, Westmore MS, Ma YL, Nold JB. Skeletal changes in rats given daily subcutaneous injections of recombinant human parathyroid hormone (1–34) for 2 years and relevance to human safety. *Toxicol Pathol* 2002; 30:312.

Vale W, Hsueh A, Rivier C, Yu J. The inhibin / activin family of hormones and growth factors. In: Sporn MA, Roberts AB, editors. Peptide Growth Factors and Their Receptors.

Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Germany: Springer-Verlag 1990; p. 211–248.

Watts NB, Diab DL. Long-Term Use of Bisphosphonates in Osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95: 1555–65.

Wiater E, Vale W. Activins and Inhibins. In: Derynck R e Miyazono K, ed. The TGF- β family. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2008. p. 79-107.

Wienken CJ, Baaske P, Duhr S, Braun D. Thermophoretic Melting Curves Quantify The Conformation And Stability of RNA and DNA. *Nucleic Acids Research* 2011; 39(8): e52.

World Health Organization - WHO. Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. WHO technical report series. Geneva WHO; 1994.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, et al. Novel regulators of bone formation: Molecularclones and activities. *Science* 1988;242:1528 –34.

Wu Z, Zhang W, Chen G, Cheng L, Liao J, Jia N, Gao Y, Dai H, Yuan J, Cheng L, Xiao L. Combinatorial signals of activin / nodal and bone morphogenic protein regulate the early lineage segregation of human embryonic stem cells. *J Biol Chem* 2008; 283(36): 24991–5002.

Xial Y, Schneyer AL. The Biology Of Activin: Recent Advances In Structure, Regulation And Function. *J Endocrinol* 2009; 202(1): 1–12.

Yoon BS, Yoo SJ, Lee JE, You S, Lee HT, Yoon HS. Enhanced differentiation of human embryonic stem cells into cardiomyocytes by combining hanging drop culture and 5-azacytidine treatment. *Differentiation* 2006; 74(4):149-59.

Yuan JS, Reed A, Chen F, Stewart CN Jr. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:85.

Zhang S, Xiao Z, Luo J, He N, Mahlios J, Quarles LD. Dose-Dependent Effects of Runx-2 on Bone Development *J Bone Min Res* 2009; 24(11).

Zhao W, Ji X, Zhang F, Li L, Ma L. Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules* 2012; 17: 6196-6236.

8. ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 4/2006, relativo ao projeto intitulado "Precursores neurais diferenciados a partir de células tronco embrionárias como terapias celular da doença de Parkinson criada experimentalmente em ratos", que tem como responsável Aroldo Fernando Camargos, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 5/ 04/2006.

Este certificado expira-se em 5/ 04 / 2011.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 4/2006, related to the project entitled "Neural precursors differentiated from embryonic stem cells as cell therapy for Parkinson's Disease experimentally induced in rats", under the supervision of Aroldo Fernando Camargos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG), and was approved in April 5, 2006.

This certificate expires in April 5, 2011.

Belo Horizonte, 5 de Abril de 2006.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Presidente do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Prédio da Reitoria - Campus Pampulha
Avenida Antônio Carlos, 6627 - 7 Andar, Sala 7018
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4502 - Fax: (31) 3499-4027
www.ufmg.br/orp/cetea - cetea@orp.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- CETEA -

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 133/2009, relativo ao projeto intitulado "Células tronco embrionárias como terapia celular da osteoporose induzida em camundongos fêmeas", que tem como responsável(is) Aroldo Fernando Camargos, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 9/ 09/2009.

Este certificado expira-se em 9/ 09/ 2014.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº 133/2009, related to the project entitled "Embryonic stem cells as cellular therapy in mice induced osteoporosis", under the supervisors of Aroldo Fernando Camargos, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG), and was approved in September 9, 2009.

This certificate expires in September 9, 2014.

Belo Horizonte, 14 de Setembro de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 - Campus Pampulha
Unidade Administrativa II - 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@ppq.ufmg.br

(Mod.Cert. v1.0)

Publicação:

Camargos BM, Reis FM, Tavares RLC. Activin Expression During Osteoblastic Mice Embryonic Stem Cell Differentiation Induced by Bone Morphogenetic Protein.

J Bone Miner Res 28 (Suppl 1)

Disponível em:

[<http://www.asbmr.org/education/AbstractDetail?aid=a99b7dd1-538d-4e50-bb7d-9c97c38601f3>]

Acessado em 01 de Março de 2014