

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado dos cursos de Pós-Graduação**

**EFEITOS *IN VIVO* E *IN VITRO* DA CAFEÍNA SOBRE A DIFERENCIAÇÃO  
OSTEOGÊNICA DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS E ATIVIDADE  
DE SÍNTESE DE OSTEOBLASTOS E CONDRÓCITOS DE RATOS**

**Amanda Maria Sena Reis**

**Belo Horizonte  
2017**

**Amanda Maria Sena Reis**

**Efeitos *in vivo* e *in vitro* da cafeína sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais e atividade de síntese de osteoblastos e condrócitos de ratos**

Defesa de tese apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.  
Área: Patologia Animal  
Orientadora: Profa. Dra. Rogéria Serakides  
Coorientadoras: Profa. Dra. Natália Melo Ocarino e Profa. Dra. Jankerle Neves Boeloni

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária - UFMG  
2017**

R375e  
tronco  
Maria

Reis, Amanda Maria Sena, 1986-  
Efeitos *in vivo* e *in vitro* da cafeína sobre a diferenciação osteogênica das células  
mesenquimais e atividade de síntese de osteoblastos e condrócitos de ratos / Amanda  
Sena Reis. – 2017.  
177 p. : il.

Orientadora: Rogéria Serakides  
Coorientadoras: Natália Melo Ocarino, Jankerle Neves Boeloni  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária  
Inclui bibliografia

Teses.  
1. Rato como animal de laboratório – Teses. 2. Células-tronco – Teses. 3. Cafeína –  
4. Patologia veterinária – Teses. I. Serakides, Rogéria. II. Ocarino, Natália Melo. III. Boeloni,  
Jankerle Neves. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

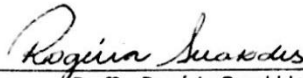
CDD – 636.088 5

## FOLHA DE APROVAÇÃO

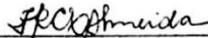
**AMANDA MARIA SENA REIS**

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTORA em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em PATOLOGIA ANIMAL.

Aprovada em 13 de Janeiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:



Prof<sup>a</sup>. Rogéria Serakides  
Presidente - Orientadora



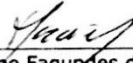
Prof<sup>a</sup>. Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida  
Universidade Federal Minas Gerais - UFMG



Prof. Arriando de Mattos Carvalho  
Universidade Federal Minas Gerais - UFMG



Prof. Juneo Freitas Silva Escola de Veterinária - UFMG  
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Prof. Ernane Fagundes do Nascimento  
Escola de Veterinária - UFMG

---

## *AGRADECIMENTOS*

---

A Deus, meu pai do céu, por sempre me guiar e pintar meu caminho, me permitindo vivenciar momentos incríveis de grande aprendizado. Agradeço a ele todos os dias por me presentear com um novo amanhecer e por fazer parte de sua criação. Agradeço também pelo anjo da guarda que me acompanha, me rege e me guarda.

À Mãe Rainha e Vencedora Três Vezes Admirável de *Schoenstatt*, minha grande confidente durante este trabalho, pelo auxílio imediato, e por estar sempre ao meu lado nos momentos em que mais necessitei. Agradeço imensamente por ter sido tão abençoada por ela e por presenciar tantos milagres.

Aos meus amados pais José Roberto e Maria do Carmo, por simplesmente existirem, e por me ensinarem todos os dias que a vida é linda e que “O mundo pode até fazer você chorar, mas Deus te quer sorrindo”. Por serem meus grandes professores doutores, aqueles que me ensinam a disciplina “A arte do amor sem medidas”. A vocês dedico este árduo trabalho com muito carinho e amor.

À minha irmã Roberta, por todo apoio e amizade, auxiliando mesmo na distância e por ser sempre o meu outro eu. Obrigada por fazer parte da minha vida e por ser um dos presentes mais lindos que Deus me deu.

Ao Daniel, meu grande companheiro, amigo e parceiro, obrigada por não medir esforços para me ajudar, pela paciência e por me apoiar incondicionalmente todos os dias dessa caminhada. Por me dar forças e tornar as minhas miragens realidade. A você também dedico este trabalho com muito carinho.

Aos meus queridos avós, Sena e Amanda, por me proporcionarem com a sua presença o alcance de um pedacinho do paraíso na terra. Aos meus tios e primos pelo apoio incondicional, por estarem sempre dispostos a ajudar e na torcida.

À Denise, que me acolheu como uma filha e por me receber sempre de braços abertos. Você tem toda a minha consideração!

À Clarice, Valmara, Ana Paula e Jéssica, amigas com as quais tive o prazer de morar no decorrer do doutorado e com as quais aprendi a arte da convivência e o aprendizado individual que cada uma de vocês me proporcionou. Obrigada pela companhia, pelas risadas, pelos conselhos, e por construir comigo uma família em BH.

À minha querida orientadora professora Rogéria Serakides, por dar forma a minha vida como pesquisadora e por modelar o meu trabalho, criando a partir da argila uma peça única e inigualável. Agradeço por esses seis anos de convívio e por me adentrar a essa fonte inesgotável do saber. A academia me trouxe ensinamentos que vou levar para a vida toda, além de uma grande evolução científica, psíquica e espiritual. Sinto imensa admiração por essa grande profissional, professora pesquisadora e também pessoa de grande coração. Você me ensinou que não adianta correr atrás das borboletas, mas que é necessário cuidar do jardim para que elas venham até nós. Obrigada por me ensinar a cuidar do meu jardim!

A minha querida co-orientadora professora Natália de Melo Ocarino, pela sua participação constante e imprescindível. Obrigada por estar sempre atenta aos detalhes, e contribuir minuciosamente com a construção deste trabalho, assim como na construção de um lindo origami. Obrigada por incluir borboletas e tsurus no meu jardim. Nunca vou me esquecer de tudo que fez e faz por mim. Não tenho palavras para agradecer a sua contribuição tanto profissional como pessoal. Admiro a sua seriedade, ética, e grande sabedoria na academia, mesmo tão jovem! Muito obrigada pela co-orientação, sempre muito perspicaz e de tamanha competência!!

Aos professores do setor de patologia, agradeço imensamente pelos conhecimentos adquiridos durante o doutorado.

Ao Juneo, Cintia e Loris meus companheiros irmãos de doutorado, por dividirem ensinamentos, momentos de descontração e amizade. Como é bom trabalhar com colegas que se tornam grandes amigos. A vocês só tenho a agradecer, pois tornaram os meus dias muito mais felizes.

À mestrande e minha grande amiga Karina, por todos os momentos e sentimentos compartilhados. Obrigada pela ajuda experimental, mas, principalmente por estar comigo tanto nos momentos alegres como nos de dificuldade e apreensão. Você espalhou pétalas de rosas pelo meu caminho, tornando o fim dessa trajetória mais belo, suave e perfumado.

À profa Jankerle Neves Boeloni, que me treinou no cultivo celular, pela paciência e por ser sempre muito solícita.

Aos amigos e colegas da Patologia, Juneo, Cintia, Lorena, Karina, José Sato, Tati Carvalho, Cláudia, Maria, Letícia, Ana Flávia, Daniel, Carlos, Javier, Mateus, Talita, Amanda, Luísa, Camila, Tayse, Pamela, Bia, Ana Patrícia, Auricélio e todos os demais que me falham a memória. Obrigada pela amizade e por estarem sempre dispostos a ajudar.

Aos técnicos de laboratório Leimar, Natália, Mariana e Luís obrigada por toda a ajuda na realização deste trabalho. Obrigada por serem sempre tão amáveis.

Aos funcionários da limpeza, da esterilização, e aos porteiros, em especial ao Jeferson, João, Dona Beth e Vitalina obrigada pela convivência agradável.

Aos componentes titulares da banca Ernane Fagundes do Nascimento, Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Juneo Freitas Silva e Armando de Mattos Carvalho, e aos suplentes José Carlos Nogueira e Eliane Gonçalves de Melo pela prontidão em compor a banca para avaliação desta tese.

Aos animais, Kassy, Meg, Yuri, Luna, Maia, Gaia, Baio, Boneca, Bonequinha, Lindinha, Bina, Safira, Betinha, Belinha e Catarina seres especiais com os quais tive/tenho o prazer de conviver.

Aos ratinhos do laboratório, pois foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. A Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), a Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro destinado a realização deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

---

<b>Lista de abreviaturas</b> .....	8
<b>Lista de figuras</b> .....	9
<b>Lista de tabelas</b> .....	14
<b>Resumo</b> .....	15
<b>Abstract</b> .....	17
<b>Introdução</b> .....	18
<b>Objetivos</b> .....	20
<b>Capítulo 1</b> .....	21
<b>Revisão de literatura</b> .....	21
<b>1. Condrogênese</b> .....	21
1.1. Condroblastos/Condrócitos.....	26
1.2. Síntese de matriz condrogênica.....	27
<b>2. Osteogênese</b> .....	29
2.1. Células tronco mesenquimais.....	31
2.1.1. Diferenciação osteogênica.....	33
2.2. Osteoblastos.....	35
2.2.1. Síntese de matriz óssea.....	37
<b>3. Cafeína</b> .....	40
3.1. Farmacocinética da cafeína.....	41
3.1.1. Absorção e distribuição.....	41
3.1.2. Metabolismo e eliminação.....	41
3.2. Efeitos diretos e indiretos da cafeína e seus receptores sobre as células cartilaginosas, ósseas e suas precursoras.....	42
<b>Capítulo 2</b> .....	47
Inibição da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da prole de ratas tratadas com cafeína durante a gestação e lactação .....	47
Resumo .....	48
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	52
Resultados .....	60
Discussão .....	63
<b>Capítulo 3</b> .....	63
Potencial osteogênico de osteoblastos extraídos de ratos neonatos de mães tratadas com cafeína durante toda a gestação.....	63
Resumo .....	63
Introdução.....	64
Material e Métodos.....	65
Resultados .....	69
Discussão .....	76
<b>Capítulo 4</b> .....	80
Efeito não linear da cafeína sobre a viabilidade, atividade de síntese e expressão gênica de condrocitos da prole de ratas tratadas durante a gestação.....	80
Resumo .....	80
Introdução.....	81
Material e Métodos.....	82
Resultados .....	85

Discussão .....	93
<b>Capítulo 5</b> .....	97
Efeito inibidor direto da cafeína sobre a viabilidade, atividade de síntese e expressão gênica em culturas de condrócitos da cartilagem articular de ratos.....	97
Resumo .....	97
Introdução.....	98
Material e Métodos.....	99
Resultados .....	102
Discussão .....	108
<b>Considerações finais</b> .....	112
Referências Bibliográficas.....	113
<b>Anexos</b> .....	152



---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

AMPC: adenosina monofosfato cíclico  
ANOVA: análise de variância  
BMPs: proteínas morfogenéticas do osso  
Cbfa-1/Runx-2: fator ligante de núcleo A1/fator de transcrição 2 relacionado ao Runt  
Col-1: colágeno tipo I  
Col-2: colágeno tipo II  
DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*  
DNA: ácido desoxirribonucleico  
EUA: Estados Unidos da América  
FGF: fator de crescimento fibroblástico  
FGFR: receptor do fator de crescimento fibroblástico  
GAG: glicosaminoglicano  
GH: hormônio do crescimento  
HE: Hematoxilina-Eosina  
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina  
Ihh: *Indian hedgehog*  
IL: interleucina  
MAPK: proteína quinase mitógeno-ativada  
MEC: matriz extracelular  
MMPs: metaloproteinases de matriz  
MTT: {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]*}  
N-caderina: caderina neural  
N-CAM: molécula de adesão celular neural  
OPG: osteoprotegerina  
PAS: ácido periódico de *Schiff*  
PBS: solução tampão de fosfato padrão  
RT-PCR: reação em cadeia da polimerase em tempo real  
PTH: paratormônio  
PTHrP: peptídeo relacionado ao paratormônio  
RANKL: receptor ativador NF-kapa beta ligante RNA: ácido ribonucleico  
SFB: soro fetal bovino  
Shh: sonic hedgehog  
SNK: Student Newman Keuls  
SOX: SRY-box  
Sox-5: gene que codifica a proteína ligante do DNA (Sox-9-SRY (sex determining region Y)-box 5)  
Sox-6: gene que codifica a proteína ligante do DNA (Sox-9-SRY (sex determining region Y)-box 6)  
Sox-9: gene que codifica a proteína ligante do DNA (Sox-9-SRY (sex determining region Y)-box 9)  
TGF- $\beta$ : fator de crescimento transformador beta  
TIMPs: inibidores de metaloproteinases específicas de tecidos  
VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular  
WNT: via de sinalização Wingless

---

---

## LISTA DE FIGURAS

---

---

---

### CAPÍTULO 1

---

Figura 1	Desenho esquemático da condrogênese na formação e crescimento ósseo endocondral demonstrando a migração de células tronco mesenquimais para o molde cartilaginoso e posterior diferenciação em condrócitos e as principais alterações na composição da matriz extracelular.....	24
Figura 2	Esquema demonstrativo da regulação da condrogênese pelos transcritos gênicos Sox-9 e Runx-2.....	25
Figura 3	Esquema demonstrativo da ação direta e indireta da cafeína sobre importantes receptores durante a diferenciação das células ósseas e cartilaginosas.....	44
Figura 4	Esquema demonstrativo demonstrando a ação da cafeína sobre os níveis de AMPc através do antagonismo a receptores de adenosina e inibição de fosfodiesterase, que por sua vez modula a expressão dos transcritps gênicos Sox-9 e Runx-2.....	45

---

### CAPÍTULO 2

---

Figura 1	Caracterização fenotípica pela expressão de CD90, CD73, CD54, RT1A, CD34 e CD11 por citometria de fluxo em CTMs indiferenciadas da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio DMEM. * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ .....	53
Figura 2	Redução do MTT em cristais de formazan (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ .....	54
Figura 3	Atividade da fosfatase alcalina (média $\pm$ desvio padrão) de culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ .....	55
Figura 4	Fotomicroscopia da atividade da fosfatase alcalina (média $\pm$ desvio padrão) em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle e tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,B,C,D), 14 (E,F,G,H) e 21 (I,J,K,L) dias. Bar: 58,5 $\mu$ m.....	56
Figura 5	Porcentagem de área coberta por CTMs/campo (média $\pm$ desvio padrão) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias. Bar: 58,5 $\mu$ m. *** $p < 0,001$ .....	57
Figura 6	Número de nódulos mineralizados/campo (média $\pm$ desvio padrão) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle e tratadas com cafeína nas doses de 25, 50	

	e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias. Bar: 58,5 µm. *p<0,05, *** p <0,001.....	57
Figura 7	Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, Runx-2, colágeno I e fosfatase alcalina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle e tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.....	58

---

### CAPÍTULO 3

---

Figura 1	Redução do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em cultura de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. ** p <0,01, *** p <0,001.....	69
Figura 2	Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. ** p <0,01, *** p <0,001.....	70
Figura 3	Síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.....	70
Figura 4	Porcentagem de nódulos mineralizados/campo (média ± desvio padrão) e fotomicroscopia do ensaio Von kossa em culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) (A) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (B), 50 (C) e 100 (D) mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. Bar=58,5. *** p <0,001.....	71
Figura 5	Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteocalcina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001.....	72
Figura 6	Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para osteopontina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. * p <0,05, ** p <0,01.....	73
Figura 7	Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito	

gênico para sialoproteína óssea pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001..... 73

Figura 8 Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para colágeno tipo I pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \* p <0,05, \*\*\* p <0,001..... 74

Figura 9 Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para fosfatase alcalina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária da prole de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\*\* p <0,001..... 74

Figura10 Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) do transcrito gênico para Runx-2 pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\* p <0,01..... 75

---

## CAPÍTULO 4

---

Figura 1 Redução do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001..... 86

Figura 2 Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão), em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001..... 86

Figura 3 Síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*p<0,05..... 87

Figura 4 Porcentagem de área ocupada por condrócitos/campo (média ± desvio padrão) e fotomicroscopia em Hematoxilina e eosina (HE) de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico aos 21 dias. Bar= 58,8 µm.\*\*\*p<0,05..... 88

Figura 5 Porcentagem de matriz condrogênica PAS+/campo (média ± desvio padrão), e

	fotomicroscopia em Ácido periódico-Schiff (PAS) de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico, aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. ***p<0,001.....	89
Figura 6	Porcentagem de matriz condrogênica Alcian Blue+/campo (média ± desvio padrão), e fotomicroscopia em Alcian blue de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. ***p<0,001.....	89
Figura 7	Porcentagem de matriz condrogênica Safranina O+/campo (média ± desvio padrão) e fotomicroscopia em Safranina O de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos, de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivados em meio condrogênico aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. *p<0,05.....	90
Figura 8	Comparação da quantificação relativa de transcritos gênicos (média ± desvio padrão) para Sox-9 (A), fosfatase alcalina (B), colágeno tipo II (C), agregano (D) e Runx-2 (E) pelo qRT-PCR em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação, e cultivadas por 21 dias. *p<0,05, **p<0,01.....	91

---

## CAPÍTULO 5

---

Figura 1	Redução do MTT em cristais de formazan (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos sete, 14 e 21 dias. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....	102
Figura 2	Atividade da fosfatase alcalina (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos sete, 14 e 21 dias. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....	103
Figura 3	Síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos sete, 14 e 21 dias. **p<0,01, ***p<0,001.....	104
Figura 4	Porcentagem de área ocupada por condrócitos/campo (média ± desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Hematoxilina e eosina (HE) de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....	104
Figura 5	Porcentagem de matriz condrogênica/campo PAS+ (média ± desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Ácido Periódico-Schiff (PAS) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio de diferenciação condrogênica sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína	

	(CAF) em diferentes concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. **p<0,01.....	105
Figura 6	Figura 6. Porcentagem de matriz condrogênica/campo Alcian Blue+ (média ± desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Alcian blue de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.....	105
Figura 7	Porcentagem de matriz condrogênica/campo Safranina O+ (média ± desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Safranina-O de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias. Bar: 58,5 µm. *p<0,05.....	106
Figura 8	Comparação da quantificação relativa de transcritos gênicos (média ± desvio padrão) para agregano (A), colágeno tipo II (B), Sox-9 (C), Runx-2 (D), fosfatase alcalina (E) pelo qRT-PCR em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos 21 dias. *p<0,05, **p<0,01.....	107

---

## **LISTA DE TABELAS**

---

---

### **CAPÍTULO 2**

---

Tabela 1	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR.....	52
Tabela 2	Resumo dos efeitos da cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina (ALP), porcentagem de área ocupada por CTMs/campo, porcentagem de nódulos/campo e na expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 em comparação com o grupo controle.....	59

---

### **CAPÍTULO 3**

---

Tabela 1	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR..	68
Tabela 2	Resumo dos efeitos da cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina (ALP), síntese de colágeno (COL), porcentagem de nódulos/campo, e na expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 em comparação com o grupo controle.....	76

---

### **CAPÍTULO 4**

---

Tabela 1	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR.....	85
Tabela 2	Resumo dos efeitos da cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno (COL), porcentagem de condrócitos e matriz condrogênica PAS+, Alcian Blue +, Safranina O+/campo, e na expressão gênica de Sox-9, fosfatase alcalina (ALP), agrecano, colágeno tipo II e Runx-2 em comparação com o grupo controle.....	92

---

### **CAPÍTULO 5**

---

Tabela 1	Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR.....	101
Tabela 2	Resumo dos efeitos da cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno (COL), porcentagem de condrócitos e matriz condrogênica PAS+, Alcian Blue +, Safranina O+/campo, e na expressão gênica de Sox-9, fosfatase alcalina (ALP), agrecano, colágeno tipo II e Runx-2 em comparação com o grupo controle.....	108

## RESUMO

A cafeína é um alcaloide ativo que pode causar danos aos tecidos ósseo e cartilaginoso desde a formação do esqueleto na vida pré-natal até a vida adulta. Esse composto passa para a prole através da placenta e do leite, causando redução da formação e do crescimento ósseo. A hipótese deste estudo é que as células tronco mesenquimais (CTMs), os osteoblastos e os condrócitos, responsáveis por originar o esqueleto, possam ser alvos da cafeína. Para tentar elucidar os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a cafeína atua sobre essas células, foram realizados quatro experimentos distintos. O objetivo foi avaliar o efeito da cafeína sobre a diferenciação osteogênica das CTMs da medula óssea (experimento 1), atividade de síntese de osteoblastos da calvária (experimento 2) e a atividade de síntese de condrócitos (experimento 3), extraídos da prole de ratas mães que receberam 25, 50 e 100mg/Kg de cafeína durante a gestação (experimento 2 e 3) ou durante a gestação e lactação (experimento 1). No quarto experimento, o objetivo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações de cafeína, adicionadas ao meio de cultura, sobre a atividade de síntese de condrócitos extraídos de ratos neonatos. No primeiro e segundo experimentos, foram avaliados a viabilidade celular, a atividade da fosfatase alcalina, a síntese de colágeno e de nódulos mineralizados e a expressão dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e Runx-2 por qRT-PCR. No terceiro e quarto experimentos, foram avaliados a viabilidade celular e a atividade de síntese por meio de análises citoquímicas, morfométricas e da quantificação dos transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agrecano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina por qRT-PCR. Os dados dos quatro experimentos foram submetidos a ANOVA com comparação das médias pelo teste SNK. Diferenças foram consideradas significativas se  $p \leq 0,05$ . Nas CTMs, as doses de 50 e 100mg/Kg de cafeína reduziram a atividade da fosfatase alcalina em todos os períodos estudados e a expressão de colágeno tipo I aos 21 dias. A expressão dos transcritos gênicos para fosfatase alcalina, Runx-2 e sialoproteína óssea e a síntese dos nódulos mineralizados reduziu em todas as doses de cafeína (experimento 1). Os osteoblastos extraídos de filhotes de ratas que receberam cafeína na dose de 50mg/Kg durante a gestação apresentaram aumento da síntese de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina e colágeno tipo I, resultando em aumento da síntese de nódulos mineralizados (experimento 2). Nas culturas de condrócitos de todos os grupos tratados com cafeína os efeitos não foram lineares ou dose-dependentes. As culturas de condrócitos extraídos dos grupos tratados com a dose de 25 mg/Kg foram as que apresentaram os menores valores, com redução da viabilidade e da porcentagem de células, da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e de matriz condrogênica, bem como da expressão de Sox-9, fosfatase alcalina e colágeno tipo I. Culturas de condrócitos do grupo tratado com 50 mg/Kg de cafeína apresentaram redução da síntese de colágeno e da expressão de Sox-9. A dose de 100 mg/Kg reduziu a síntese de colágeno, bem como a expressão de Sox-9 e de fosfatase alcalina (experimento 3). *In vitro*, a cafeína reduziu significativamente e de forma dose-dependente a redução do MTT em cristais de formazan, a porcentagem de células/campo, a síntese de colágeno, a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de matriz condrogênica PAS+, safranina O+, alcian blue+, bem como a expressão dos transcritos gênicos para agrecano, Sox-9 e colágeno tipo II (experimento 4). Conclui-se que os efeitos da cafeína são variáveis de acordo com sua ação *in vivo* ou *in vitro*, com sua concentração ou dose e com o tipo de célula sob a qual ela esteja atuando. De forma geral, os efeitos *in vivo* da cafeína sobre as células tronco e os condrócitos e o efeito *in vitro* sobre os condrócitos é negativo e danoso, enquanto que seus



efeitos *in vivo* sobre os osteoblastos, nas mesmas doses testadas sobre as CTMs e os condrócitos, são contrários, aumentando a viabilidade e a atividade de síntese dessas células.

Palavras-chave: Cafeína, osteoblastos, condrócitos, células tronco mesenquimais, ratos

## ABSTRACT

Caffeine is an active alkaloid that can cause damage to bone tissue and cartilage in formation during prenatal life and into adulthood. This compound is transferred to offspring through the placenta and milk, causing a reduction in the bone formation and growth. The hypothesis of present study is that mesenchymal stem cells (MSCs), osteoblasts and chondrocytes, responsible for originating the skeleton, can be targets of caffeine. To try to elucidate the cellular and molecular mechanisms by which caffeine acts on these cells, four separate experiments were performed. The objective was to evaluate the effect of caffeine on the osteogenic differentiation of MSCs from bone marrow (experiment 1), osteoblast synthesis activity of the calvaria (experiment 2), and chondrocyte synthesis activity (experiment 3), obtained from rat offspring of dams who received 25, 50 and 100mg/Kg of caffeine during pregnancy (experiment 2 and 3) or during pregnancy and lactation (experiment 1). In the fourth experiment, the objective was to evaluate the effect of different concentrations of caffeine, added to the culture medium on chondrocyte synthesis activity extracted from newborn rats. In the first and second experiments, we assessed cell viability, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis and mineralized nodules and expression of gene transcripts for osteocalcin, osteopontin, sialoprotein, alkaline phosphatase, collagen I and Runx-2 by qRT-PCR. In the third and fourth experiments, we assessed cell viability and activity of synthesis by cytochemical analysis, morphometric and quantification of gene transcripts for Sox-9, Runx-2, aggrecan, collagen II and alkaline phosphatase by qRT-PCR. The data from the four experiments were analyzed by ANOVA to compare the means by SNK test. Differences were considered significant if  $p \leq 0.05$ . In MSCs, doses of 50 and 100 mg/Kg of caffeine reduced the activity of alkaline phosphatase in all periods studied and the expression of collagen I at 21 days. The expression of gene transcripts for alkaline phosphatase, Runx-2 and bone sialoprotein and synthesis of mineralized nodules reduced in all doses of caffeine (experiment 1). Osteoblasts obtained from offspring of rats that received caffeine at a dose of 50mg/Kg during pregnancy showed an increase in gene transcripts synthesis for osteocalcin, osteopontin, sialoprotein, alkaline phosphatase and collagen type 1, resulting in increased synthesis of mineralized nodules (experiment 2). In chondrocyte cultures from all groups treated with caffeine, effects were non-linear or dose-dependent. The chondrocyte cultures obtained from groups treated with the dose of 25 mg/Kg showed the lower values, reducing viability and percentage of cells, alkaline phosphatase activity, collagen synthesis and chondrogenic matrix, as well as the expression of Sox-9, alkaline phosphatase and collagen I. Chondrocyte cultures of group treated with 50 mg/Kg of caffeine decreased collagen synthesis and expression of Sox-9. The dose of 100 mg/Kg reduced the collagen synthesis, as well as the expression of Sox-9 and alkaline phosphatase (experiment 3). *In vitro*, caffeine reduced significantly and dose-dependent manner the conversion of MTT into formazan, the percentage of cells/field, collagen synthesis, alkaline phosphatase activity and synthesis of chondrogenic matrix PAS +, safranin O +, alcian blue + as well as the expression of gene transcripts for aggrecan, Sox-9 and II collagen (experiment 4). It is concluded that the effects of caffeine vary according to their action *in vivo* or *in vitro*, with their concentration or dose and the type of cell in which it is acting. Overall, the *in vivo* effects of caffeine on stem cells and chondrocytes and the *in vitro* effect on chondrocytes is negative and harmful, while their *in vivo* effects on osteoblasts, the same doses tested on MSCs and chondrocytes, are contrary, increasing the viability and synthesis activity of these cells.

Key words: Caffeine, osteoblasts, chondrocytes, mesenchymal stem cells, rats.

## **INTRODUÇÃO**

A esquelotogênese é um fenômeno complexo, que ocorre a partir de dois mecanismos independentes, a ossificação ou formação óssea intramembranosa e a endocondral (Karaplis, 2008). A maior parte dos ossos deriva da formação óssea endocondral, na qual as células tronco mesenquimais (CTMs) diferenciam-se em condroblastos, formando um modelo cartilaginoso que será posteriormente substituído por osso (Adams et al., 2007). Já durante o período pós-natal, ocorre proliferação, diferenciação e maturação dos condroblastos da placa epifisária e da cartilagem articular, o que determina o comprimento final do osso adulto (Mackie et al., 2008).

A placa epifisária é composta por matriz extracelular, condroblastos e condrócitos, os quais estão organizados, com base em sua morfologia e padrão de expressão gênica, em zonas distintas, ou seja, na zona de repouso, zona proliferativa, zona pré-hipertrófica e zona hipertrófica (Ballock e O'Keefe, 2003; Beier, 2005; Nilsson et al., 2005; Adams et al., 2007; Belluoccio et al., 2008; Degnin et al., 2010; Mackie et al., 2011; Staines et al., 2013). No entanto, se as etapas que determinam a formação e o crescimento ósseo endocondral não estiverem devidamente reguladas, diversas patologias ósseas podem surgir como consequência deste descontrole (Yan et al., 2012).

Dentre as substâncias que são capazes de interferir com a formação e o crescimento ósseo endocondral, destaca-se a cafeína, que é um alcaloide natural (1,3,7-trimetilxantina) importante que está presente no café, chá e em outras bebidas cafeínadas amplamente consumidas, assim como no chocolate e em alguns medicamentos (Dews, 1982; Reissig et al., 2009; Reis et al., 2014). Mas, ela também está presente nos sub-produtos do café (polpa e palha) fornecidos na alimentação de bovinos e suínos (Cabezas et al., 1987; Mazzafera, 2002). Esse composto passa através da placenta e é excretado pelo leite em humanos e ratos, passando para a prole (Tyralla e Dodson, 1979) e sendo encontrado na urina e no plasma dos neonatos. Por isso, os efeitos farmacológicos e fisiológicos da cafeína têm sido extensivamente estudados.

No entanto, a gênese das alterações esqueléticas induzidas pelo consumo de cafeína não foi totalmente elucidada. O que se pretendeu a partir da execução deste projeto foi elucidar a participação dos osteoblastos e condrócitos, bem como das CTMs da medula óssea na gênese das alterações ósseas induzidas na prole de ratas que receberam cafeína durante a gestação e a lactação. Por serem os osteoblastos e os condrócitos as células que derivam das células tronco, e por serem estas responsáveis por originar o esqueleto, nossa hipótese era que essas células poderiam ser alvo da cafeína.

Em humanos, a cafeína apresenta alteração da sua depuração durante a gravidez, com aumento da meia-vida em até cinco vezes quando comparada com mulheres não gestantes, particularmente, no segundo e terceiro trimestres da gestação, que coincide com o período em que o desenvolvimento do feto é exponencial (Vik et al., 2003). Desta forma, o acúmulo desta substância pode representar um risco potencial para o feto (Souza e Sichieri, 2005).

Em estudos epidemiológicos, diversas alterações como aborto espontâneo, redução do crescimento fetal, prematuridade e baixo peso ao nascer já foram associados ao consumo materno de cafeína (Pacheco et al., 2007; Bakker et al., 2010). Porém a maioria desses estudos relata que não há evidências de que esta substância cause malformações congênitas em seres

humanos (Larroque et al., 1993). Além das alterações na formação e no crescimento ósseo endocondral, a cafeína também tem sido considerada um fator de risco para a osteoporose humana (Zhou et al., 2010), o que tem estimulado alguns pesquisadores a estudar o efeito deste agente na osteogênese em modelos animais (Rapuri et al., 2007; Reis et al., 2014).

Estudos prévios têm demonstrado que a cafeína causa alterações nos ossos e articulações de fetos e de ratos jovens. Nos fetos de ratas que receberam cafeína, têm sido observadas alterações teratogênicas como a fenda palatina, ectrodactilia e braquidactilia (Scott, 1983; Reis, 2012), bem como redução da massa (Reis, 2012) e do conteúdo mineral ósseo (Nakamoto et al., 1989). Além disso, o consumo de cafeína pela mãe durante a gestação também pode causar morte de condrócitos no feto evidenciada logo após o nascimento (Reis et al., 2014).

Em ratos jovens, altas doses de cafeína inibem o crescimento ósseo endocondral (Huang et al., 2002), uma vez que fragmentos de osso desmineralizado implantado no subcutâneo, apresentaram redução da expressão de colágeno tipo II, histona e TGF beta, supostamente por reduzir a diferenciação das CTMs em células cartilaginosas, resultando em alterações permanentes na arquitetura do esqueleto (Barone et al., 1993). Além disso, o consumo de cafeína pela mãe durante a gestação e a lactação também afeta o crescimento ósseo pós-natal causando menor diferenciação das células das placas de crescimento com indistinção das zonas da placa epifisária dos ossos longos e vértebras, bem como deficiência de proteoglicanos (Reis et al., 2014).

No entanto, apesar dos evidentes efeitos da cafeína sobre o tecido ósseo e cartilaginoso, os mecanismos celulares e moleculares pelo qual a cafeína atua ainda não estão claros. Postula-se que esse alcaloide possa afetar indiretamente o osso por aumentar a excreção urinária de cálcio e reduzir a absorção intestinal desse mineral (Bergman et al., 1990). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que a adição de cafeína em culturas de osteoblastos pode reduzir a viabilidade celular por aumentar a apoptose (Tsuang et al., 2006) e inibir a atividade de síntese dessas células (Tassinari et al., 1991; Kamagata-Kiyoura et al., 1999). Também foi comprovado que a cafeína reduz a expressão de receptores para vitamina D e a atividade da fosfatase alcalina em culturas de osteoblastos (Rapuri et al., 2007), assim como a expressão de histona, osteocalcina e de osteopontina, atrasando ou até mesmo inibindo a mineralização do esqueleto fetal (Tassinari et al., 1991).

Porém, embora haja estudos sobre o efeito da adição de cafeína em culturas de osteoblastos, não há pesquisas sobre a viabilidade e a atividade de síntese de osteoblastos ou condrócitos extraídos da prole de ratas que receberam cafeína. E, embora pesquisas tenham demonstrado que a adição de cafeína em culturas de CTMs inibe a diferenciação osteogênica (Tassinari et al., 1991; Zhou et al., 2010), não há estudos sobre a diferenciação osteogênica de CTMs oriundas da prole de indivíduos que receberam a cafeína *in vivo*. A adição de cafeína em cultura de células pode dar algum indício da ação *in vivo* desse alcaloide. Mas nem sempre os resultados extraídos dos estudos *in vitro* correspondem seguramente aos efeitos observados *in vivo*.

## **OBJETIVOS**

### **Capítulo 2 (experimento 1)**

Avaliar a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da medula óssea da prole ao desmame de ratas que receberam diferentes doses de cafeína durante toda a gestação e a lactação, a partir da avaliação da viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, e avaliação dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e Runx-2.

### **Capítulo 3 (experimento 2)**

Avaliar a viabilidade e a atividade de síntese de osteoblastos extraídos da calvária de ratos neonatos, cujas mães receberam diferentes doses de cafeína durante toda a gestação, a partir da avaliação da viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, e avaliação dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e Runx-2.

### **Capítulo 4 (experimento 3)**

Estudar a atividade de síntese de condrócitos extraídos das cartilagens de crescimento de ratos neonatos cujas mães receberam diferentes doses de cafeína durante toda a gestação, a partir da avaliação da viabilidade e da atividade de síntese por meio de análises citoquímicas, morfométricas e da quantificação dos transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agrecano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina.

### **Capítulo 5 (experimento 4)**

Estudar o efeito da cafeína adicionada ao meio de cultura sobre a atividade de síntese de condrócitos extraídos das cartilagens de crescimento de ratos neonatos provenientes de mães que não receberam cafeína, a partir da avaliação da viabilidade e da atividade de síntese por meio de análises citoquímicas, morfométricas e da quantificação dos transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agrecano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina.

## ***CAPÍTULO 1***

### ***REVISÃO DE LITERATURA***

#### **1. Condrogênese**

A condrogênese é um dos eventos iniciais que ocorre durante o desenvolvimento do esqueleto embrionário, e que abrange desde a proliferação e diferenciação das células condroprogenitoras até a síntese de matriz condrogênica, com formação do molde de cartilagem, que será posteriormente substituído por osso, como parte do processo de formação óssea endocondral (Goldring et al., 2006; Adams et al., 2007). Contudo, a condrogênese também pode ser observada na vida pós-natal, durante a formação do calo ósseo para reparo de fraturas, por exemplo (Mindell et al., 1971; Hinton et al., 2016).

Durante a condrogênese, formam-se três tipos de cartilagem: a hialina, a elástica e a fibrosa. No entanto, a cartilagem hialina que compõe o molde no processo de formação óssea endocondral é o tipo mais estudado, além de ser responsável pela formação da maioria dos ossos do esqueleto, dentre eles os ossos dos membros, costelas, vértebras, mandíbula, maxila e da base do crânio (Schipani e Provot, 2003; Roughley, 2006; Yu e Ornitz, 2007; Horton e Degnin, 2009).

A formação do molde cartilaginoso inicia-se com o recrutamento de células tronco do mesênquima oriundas da crista neural do ectoderma neural que dá origem ao esqueleto craniofacial, do esclerótomo do mesoderma paraxial ou compartimento somítico, que dá origem ao esqueleto axial, e da somatopleura do mesoderma lateral, que origina o esqueleto apendicular (Olsen et al., 2000). As células mesenquimais indiferenciadas, ao migrarem para o local onde será formado o molde cartilaginoso, produzem inicialmente matriz extracelular rica em colágeno tipo I, ácido hialurônico e fibronectina. Posteriormente, essas células agrupam-se e sofrem um processo de condensação pré-cartilaginosa, que é regulado por interações célula-célula, célula-matriz, associada com aumento da adesão celular, formação de junções *gap*, bem como alterações na arquitetura do citoesqueleto (Goldring et al., 2006; Barna et al., 2007; Singh and Schwarzbauer, 2012). A condensação é um pré-requisito para a diferenciação condrogênica, sendo seu início associado ao aumento da atividade da hialuronidase que exerce papel importante nessa etapa, uma vez que ela reduz o ácido hialurônico, diminuindo o espaço e a movimentação intercelular, aumentando dessa forma a interação e a coesão entre as células (DeLise et al., 2000; Bobick et al., 2009).

Além disso, a ativação de vias de sinalização representadas pela quinase de adesão focal (FAK) e paxillin induzem o aparecimento de moléculas de adesão celular como as caderinas neurais (N-caderinas) e as moléculas de adesão celular neural (N-CAM) (DeLise et al., 2000; Goldring et al., 2006). Essas proteínas de adesão aumentam não somente a interação célula-célula, mas também a interação célula-matriz, promovendo ligações com o colágeno e o ácido hialurônico (Barna et al., 2007). Outras proteínas, como versicam e sindecam, sob estímulo do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ), regulam negativamente as moléculas de adesão, sendo importantes para definir os limites da condensação (Kulyk et al., 1989; DeLise et al., 2000; Goldring et al., 2006; Singh and Schwarzbauer, 2012). À medida que as células vão se diferenciando, a expressão das moléculas de adesão N-caderina e N-CAM vão reduzindo, e a

função de manter a proximidade entre essas células, passa a ser exercida pela fibronectina, crucial nas etapas subsequentes (Singh and Schwarzbauer, 2012). Simultaneamente, na periferia da condensação, as células achatadas e alongadas formam o pericôndrio (Goldring et al., 2006; Yu e Ornitz, 2007).

Após a condensação mesenquimal, várias vias de sinalização intracelulares, como MAPK, SMADS, PKC, WNTs são ativadas, induzindo a atuação de fatores de transcrição como o Sox-9, o Sox-5 e o Sox-6 sobre a diferenciação das células condroprogenitoras em condroblastos, o que promove alterações na composição da matriz extracelular. O Sox-9, via ativação ou repressão transcricional, regula não somente os genes de proteínas da matriz, mas também os fatores de crescimento como os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), peptídeo relacionado ao paratormônio (PTHrP) e seus receptores, bem como moléculas sinalizadoras (membros da família hedgehog - Ihh), sendo por isso, considerado o regulador mais importante da diferenciação condrogênica (Ng et al., 1997; Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005; Oh et al., 2010). Sob a influência desses fatores, as células comprometidas com a linhagem condrogênica passam a expressar colágeno tipo II, IX, XI, agregano, proteína gla (osteocalcina) e ácido hialurônico, requeridos para a formação da cartilagem (Mackay et al., 1998; DeLise et al., 2000; Barry et al., 2001; Goldring et al., 2006; Bobick et al., 2009; Bydlowski et al., 2009; Sundelacruz and Kaplan, 2009; Giuliani et al., 2013).

Estudos com a inativação do gene Sox-9 demonstram ausência da expressão de marcadores condrogênicos específicos como colágeno tipo II, colágeno tipo XI e agregano, impedindo a formação da cartilagem. Assim, o Sox-9 também é essencial para estabelecer a diferenciação das células condroprogenitoras em condroblastos, bem como para a proliferação e estabelecimento de colunas celulares paralelas na placa de crescimento (Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005).

À medida que os condroblastos sintetizam matriz extracelular, estes se diferenciam em condrócitos que se tornam aprisionados pela matriz produzida. A íntima interação entre os componentes da matriz e os receptores de superfície presentes nessas células fornecem sinalizações importantes no decorrer das diferentes etapas da diferenciação celular (Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005). Como o Sox-9 é expresso não somente por células condroprogenitoras e condroblastos, mas por todos os condrócitos, exceto aqueles pré-hipertróficos e hipertróficos, esse fator de transcrição associado a PTHrP também controla a maturação dos condrócitos e a ossificação endocondral subsequente (Zhao et al., 1997; Huang et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Leung et al., 2011). Em contrapartida, os hormônios tireoidianos inibem a ação do Sox-9, a fim de promover a hipertrofia dos condrócitos (Okubo e Reddi, 2003).

Os condrócitos durante o processo de diferenciação sofrem uma série de alterações na sua morfologia, entre elas, tornam-se hipertróficos, repletos de retículo endoplasmático rugoso, complexos de golgi e de vesículas secretoras (Gerstenfeld e Landis, 1991; Kergosien et al., 1998). Os condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos expressam o fator de transcrição Runx-2, que age como um regulador da hipertrofia dessas células, induzindo a expressão de colágeno tipo X, fosfatase alcalina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinases (MMPs) e inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (Gerstenfeld e Landis, 1991; Kergosien et al., 1998; Crombrughe et al., 2001; Zheng et al., 2003; Vaes et al., 2006; Nishimura et al., 2012). Esses fatores facilitam a invasão da cartilagem por vasos sanguíneos, resultando na

formação dos centros de ossificação na cartilagem (Vortkamp et al., 1998; Crombrughe et al., 2001; Komori, 2003; Horton e Degenin, 2009; Ding et al., 2012).

O Runx-2 é um fator de transcrição chave na diferenciação terminal dos condrócitos, pois estudos com deleção gênica têm demonstrado que fetos Runx-2 (-/-) apresentam inibição da hipertrofia de condrócitos (Kim et al., 1999; Inada et al., 1999). Enquanto que a super expressão desse gene em camundongos transgênicos causa maturação prematura de condrócitos, nanismo e malformações esqueléticas (Ueta et al., 2001; Takeda et al., 2001). Mas, apesar do Runx-2 ser essencial na via condrogênica, sua ação isolada não é suficiente para desencadear este processo, sendo crucial sua interação com outros fatores locais, tais como as BMPs e o Ihh-PTHrP (Yamaguchi et al., 2000; Yoshida et al., 2004).

Durante o período pós-natal, resquílios do molde cartilaginoso formam a cartilagem articular e a placa epifisária que é composta por matriz extracelular e condrócitos os quais estão organizados, com base em sua morfologia e padrão de expressão gênica, em zonas distintas, ou seja, na zona de repouso, zona proliferativa, zona pré-hipertrófica e zona hipertrófica (Ballock e O'Keefe, 2003; Beier, 2005; Nilsson et al., 2005; Adams et al., 2007; Belluoccio et al., 2008; Degenin et al., 2010; Mackie et al., 2011; Staines et al., 2013). Nessas diferentes zonas, os condrócitos sofrem proliferação, diferenciação e maturação o que determina o crescimento ósseo, e conseqüentemente o comprimento final do osso adulto de forma muito semelhante ao que ocorre durante a formação óssea endocondral e que será descrito à frente (Mackie et al., 2008).



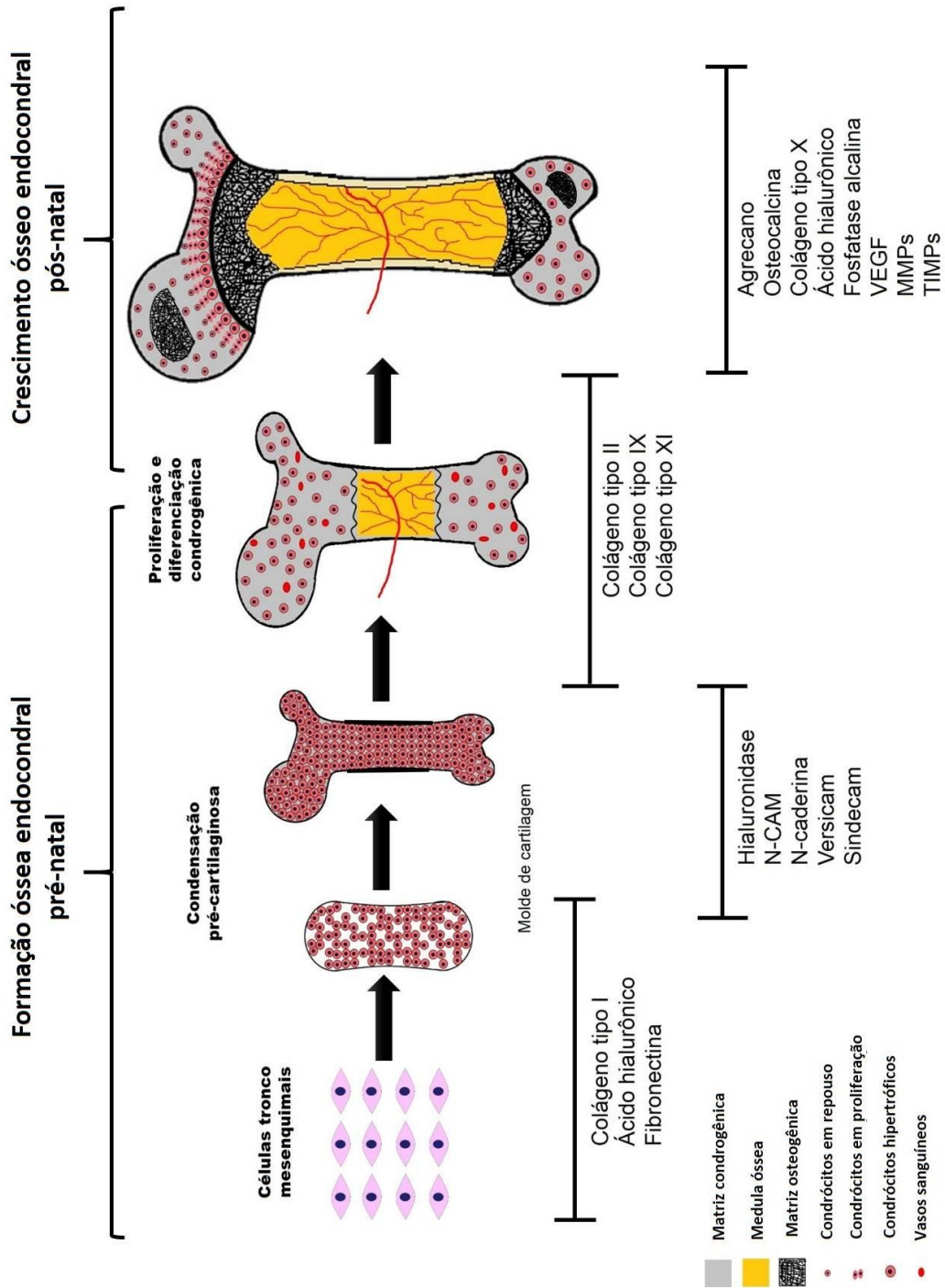


Figura 1: Desenho esquemático da formação e crescimento ósseo endocondral demonstrando a migração de células tronco mesenquimais para formação do molde cartilaginoso e posterior formação óssea.

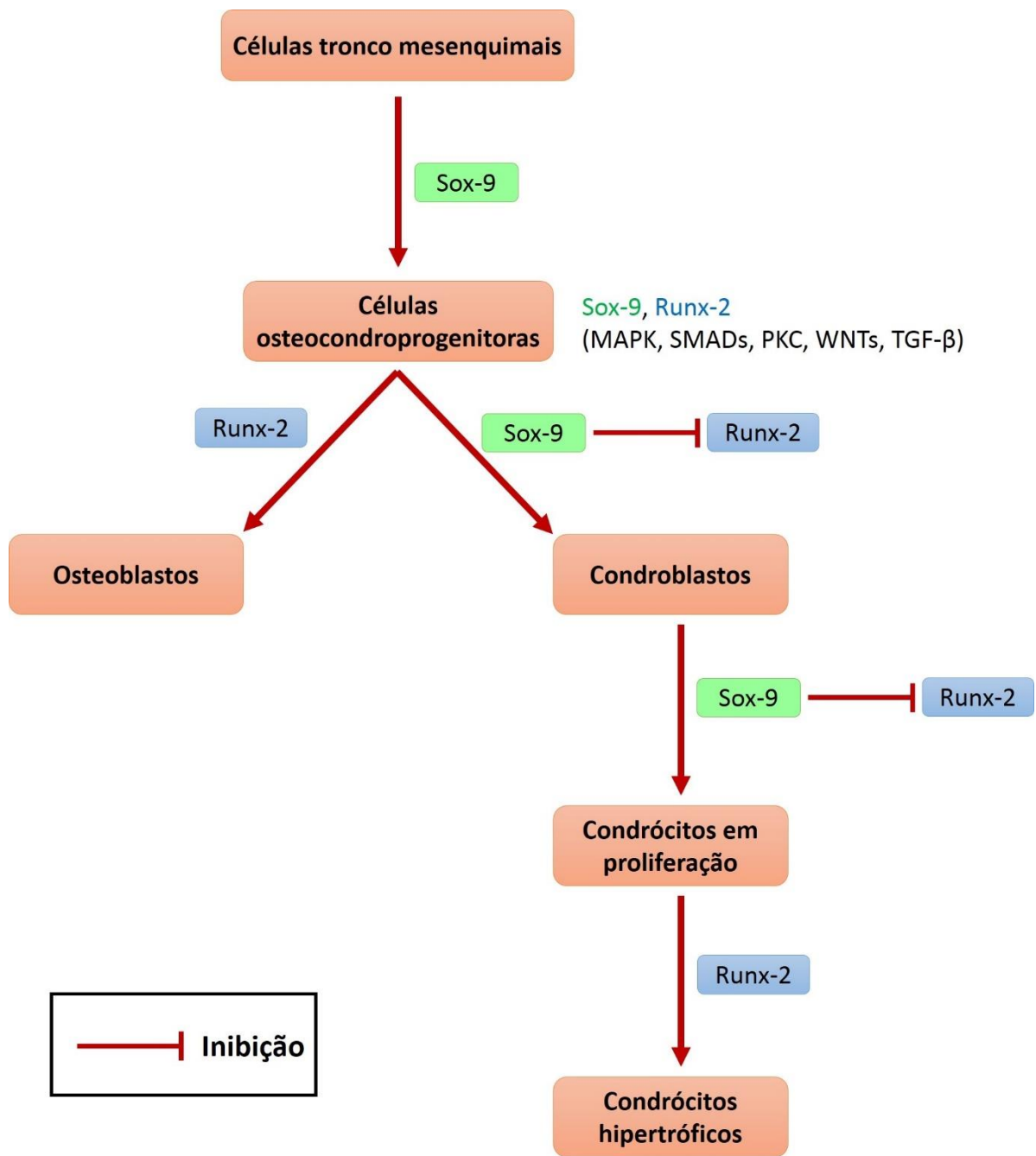


Figura 2. Esquema demonstrativo da regulação da condrogênese pelos transcritos gênicos Sox-9 e Runx-2.

## 1.1. Condroblastos/Condrócitos

O tecido cartilaginoso é constituído de condroblastos (células jovens, recém diferenciadas, com elevada atividade metabólica) e condrócitos (células maduras, com baixa atividade metabólica), que são células altamente especializadas de origem mesenquimal e responsáveis pela síntese, manutenção e degradação da matriz condrogênica extracelular. Portanto, os condroblastos e os condrócitos são as células responsáveis pelo equilíbrio sincronizado entre o anabolismo e o catabolismo do tecido cartilaginoso (Gosset et al., 2008; Studer et al., 2012).

À medida que os condroblastos sintetizam matriz condrogênica, essas células vão sendo circundadas pela própria matriz e se tornam aprisionadas no interior de lacunas ou condroplastos, diferenciando-se em condrócitos. No decorrer dessa diferenciação, ocorrem alterações na morfologia celular e na composição dos componentes citoplasmáticos. No entanto, deve ser enfatizado que a distinção entre condroblastos e condrócitos é bastante arbitrária e baseada na maturidade celular (Kosher, 1983). Os condroblastos são células mais alongadas, com núcleo central, apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, ambos associados com a síntese de colágeno e proteoglicanos. Além disso, devido à alta atividade metabólica, essas células também possuem numerosas mitocôndrias (Revel e Hay, 1963; Ross, 1975).

Já os condrócitos, apresentam morfologia ovóide a poliédrica e redução do número de mitocôndrias, que além de escassas, são menores e com poucas cristas. Os condrócitos trabalham mais lentamente, com baixo metabolismo celular interno e externo (Revel e Hay, 1963; Ross, 1975). No entanto, estudos ultraestruturais demonstram uma certa heterogeneidade entre os condrócitos, classificando-os em claros e escuros (Hwang, 1978, Wilsman et al, 1981). A população de condrócitos claros apresenta cisternas de retículo endoplasmático rugoso mais esparsadas e complexo de golgi pouco desenvolvido, enquanto que os condrócitos escuros, ao contrário, apresentam retículo endoplasmático rugoso e complexo de golgi bem desenvolvidos, além de numerosas vesículas citoplasmáticas. No entanto, apesar das diferenças encontradas na ultraestrutura dessas células, pouco se sabe sobre suas diferenças funcionais no tecido (Ahmed et al., 2007).

O citoesqueleto dos condrócitos é composto por uma rede de microtúbulos, filamentos de actina e filamentos intermediários de vimentina, sendo essencial para a manutenção da forma e seu fenótipo, bem como para a organização das organelas e para o transporte intracelular (Benjamin et al., 1994). O citoesqueleto desempenha papel crítico na hipertrofia dos condrócitos. Além disso, os condrócitos à medida que se diferenciam, acumulam glicogênio e inclusões lipídicas no citoplasma, que, provavelmente, se constitui em um mecanismo de reserva energética para fornecimento de matéria-prima para a síntese da matriz, uma vez que essas células encontram-se em condições de hipóxia por estarem afastadas de vasos sanguíneos. Além disso, o glicogênio pode ser uma das fontes de fosfato orgânico usada na mineralização posterior (Stockwell, 1978).

Uma das ferramentas mais importantes para explorar as características fenotípicas e moleculares dos condrócitos, bem como sua diferenciação e atividade de síntese é por meio do cultivo dessas células (Gosset et al., 2008). Pesquisadores têm estudado o modelo de cultivo de condrócitos de várias espécies, entre elas, ratos, camundongos, bovinos, coelhos, aves e humanos, sendo os sítios de coleta mais descritos as cartilagens articulares e da região costochondral e nasal (Kergosien et al., 1998; Gartland et al., 2005; Giannoni et al., 2006). In vitro, os condrócitos mantêm a capacidade de expressar os diferentes fenótipos e genótipos característicos do

desenvolvimento *in vivo*, mas sofrem influência do sítio de coleta, da idade, de fatores ambientais, condições de cultura (tridimensional ou não), bem como da presença de complementos no meio de cultivo para a proliferação e diferenciação celular (Gerstenfeld e Landis, 1991).

O isolamento de células da linhagem condrogênica é realizado por meio de secções do tecido cartilaginoso com posterior digestão enzimática por colagenase II ou tripsina. Após sua dissociação do tecido de origem, as células extraídas (condroprogenitoras, condroblastos e condrocitos) são cultivadas em meio condrogênico para estimular sua total diferenciação e obtenção de uma cultura homogênea (Thirion e Berenbaum, 2004; Tallheden et al., 2006; Gosset et al., 2008). Para reproduzir as características fenotípicas, genotípicas e a síntese de matriz condrogênica que ocorrem *in vivo*, são adicionadas ao meio de cultura, substâncias condroindutoras como fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$  1-3), fator de crescimento 1 semelhante a insulina (IGF-1), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), insulina, transferrina, ácido ascórbico, glicerofosfato, dexametasona e piruvato de sódio (Hashimoto et al., 2006; Solchaga et al., 2011). Na presença do meio condrogênico, as células extraídas adquirem a morfologia poligonal e passam a expressar marcadores característicos em diferentes momentos ao longo da cultura. O IGF-1 e o bFGF possuem ação mitogênica sobre os condroblastos *in vitro*, enquanto que o TGF- $\beta$  1-3 atua mediando a diferenciação condrogênica (Böhme et al., 1992; Van der Kraan et al., 2009). A insulina, o IGF-1 e a dexametasona estimulam a síntese de proteoglicanos pelos condrocitos (Chen et al., 2005; Kisiday et al., 2005). Já o ácido ascórbico promove a expressão do fenótipo hipertrófico, bem como a elevação dos níveis de fosfatase alcalina e de colágeno tipo X (Gerstenfeld e Landis, 1991). O glicerofosfato, assim como no cultivo de osteoblastos, age como fosfato orgânico promotor da mineralização, atuando nas fases mais tardias da diferenciação dos condrocitos, após a hipertrofia celular, quando estes formam nódulos cartilagosos que posteriormente se mineralizam (Gerstenfeld e Landis, 1991).

Dessa forma, pesquisadores dividem a condrogênese *in vitro* em quatro etapas. Na primeira etapa, até o quinto dia, os condroblastos se proliferam e formam uma monocamada confluenta, onde caracterizam-se pela morfologia fusiforme. Até o terceiro dia desta etapa, ocorre expressão de colágeno tipo I, que diminui drasticamente após esse período. Na segunda etapa, após o sexto dia, pode ser observada a formação de agregados celulares em meio à monocamada celular, simultaneamente à expressão de colágeno tipo II, IX, XI e proteoglicanos que permanece até o final de 2 semanas. Na terceira etapa, as células se tornam hipertróficas e passam a expressar colágeno tipo X, fosfatase alcalina, metaloproteinases, TIMPs, e inicia-se a formação de nódulos cartilagosos, que na quarta etapa, ao final de três semanas, se mineralizam (Gerstenfeld e Landis, 1991; Kergosien et al., 1998).

## **1.2. Síntese de matriz condrogênica**

A matriz condrogênica é uma estrutura dinâmica que possui íntima interação com os condroblastos e condrocitos, células responsáveis pela sua síntese, conferindo não somente resistência ao tecido cartilaginoso, como também regulando a proliferação, diferenciação e a homeostasia dessas células (Goessler et al., 2004). Esta matriz é composta principalmente por fibrilas de colágeno em associação a um complexo viscoso e altamente hidrofílico de

macromoléculas aniônicas de proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas adesivas (Plaas et al., 1983; Gosset et al., 2008; Studer et al., 2012).

A interação entre as células e a matriz cartilaginosa é mediada em parte por uma família de receptores denominada integrinas e anexinas. Esses receptores transmembranas são expressos em condroblastos e condrócitos e ligam-se a várias proteínas da matriz, entre elas colágenos tipo II e VI, vitronectina, osteopontina, laminina, e fibronectina, desempenhando papel importante no metabolismo e na sobrevivência celular, bem como na organização estrutural e no remodelamento da matriz condrogênica (Van der Kraan et al., 2002; Gao et al., 2014). Outro receptor de membrana bem estudado é o CD44, que se liga ao ácido hialurônico. O bloqueio desse receptor está vinculado a degradação da matriz, bem como ao atraso na síntese de colágeno tipo II e agregano (Maleski e Knudson 1996; Van der Kraan et al., 2002; Gao et al., 2014).

Dentre os constituintes da matriz condrogênica, o colágeno é o mais abundante. Durante a condrogênese *in vivo* e *in vitro*, a expressão dos diferentes tipos de colágeno ocorre de forma temporal de acordo com o nível de diferenciação celular, com expressão inicial de colágeno tipo I pelas células indiferenciadas, seguido do tipo II pelas células em diferenciação e, finalmente, de colágeno tipo X pelas células maduras (Combrugghe et al., 2001; Barry et al., 2001; Shum et al., 2003; Singh e Schwarzbauer, 2012). Outros colágenos como os tipos III, VI, IX, XI, XII e XIV também contribuem para a síntese da matriz madura (Goessler et al., 2004). Na cartilagem articular, o colágeno predominante é o tipo II, cuja função é formar redes tridimensionais, conferindo rigidez à tração, resistência e elasticidade ao tecido (Responde et al., 2007).

A síntese de colágeno ocorre por meio de várias e complexas etapas intra e extracelulares. No compartimento intracelular, o retículo endoplasmático rugoso e o complexo de golgi são organelas importantes envolvidas na síntese e no processamento dessa proteína, que envolve a formação das cadeias alfas do pró-colágeno, hidroxiprolina e hidroxilisina, dependentes de vitamina C e a adição de galactosil e glicosil, formando a tripla hélice. Enquanto que no compartimento extracelular o pró-colágeno solúvel se converte em tropocolágeno insolúvel que se agrega para formar fibrilas. Alguns proteoglicanos como decorin e fibromodulin, bem como glicoproteínas estruturais desempenham papel importante na agregação do tropocolágeno, determinando a espessura e o padrão de agregação das fibrilas. Portanto qualquer interferência na síntese do colágeno pode acarretar em alterações na matriz condrogênica (Prockop et al., 1979; Murad et al., 1981).

Além das proteínas colagênicas, o tecido cartilaginoso também é constituído por importantes proteínas não colagênicas, como os proteoglicanos. As moléculas de proteoglicanos são formadas por uma parte central protéica, a qual ligam-se covalentemente numerosas moléculas de glicosaminoglicanos sulfatados (Sweet et al., 1997). Nos condroblastos e condrócitos, o esqueleto protéico dos proteoglicanos é sintetizado nos ribossomos e transferido para o retículo endoplasmático rugoso. Já a ligação com as cadeias de glicosaminoglicanos e a sulfatação é efetuada no complexo de golgi em etapas que envolvem a atividade de várias enzimas, entre elas a sulfotransferase, que catalisa a incorporação dos grupos sulfatos na molécula recém formada e a sulfatase, responsável por removê-los (Iozzo e Pacifici, 1986; Diez-Roux e Ballabio, 2005, Bulow e Hobert, 2006; Souza e Pinhal, 2011; Mertz et al., 2012). A síntese de proteoglicanos também depende de um equilíbrio hormonal adequado, sendo a síntese acelerada pela tiroxina e testosterona e diminuída pela cortisona, hidrocortisona e estradiol. Outros fatores, como a vitamina C também atuam na síntese dos proteoglicanos, uma vez que sua

deficiência reduz de 70-80% a incorporação de sulfato em proteoglicanos, mas não devido a defeitos da sulfatação, mas devido à redução na incorporação das cadeias de glicosamina (Bird et al., 1986).

Após sua síntese, os proteoglicanos são armazenados em grânulos citoplasmáticos inseridos na membrana plasmática ou secretados na matriz extracelular (Nader et al., 1991). As moléculas de glicosaminoglicanos, devido a incorporação de sulfatos em diferentes posições (dermatam sulfatado, condroitim sulfatado, heparan sulfatado e queratan sulfatado), apresentam alta carga negativa e conseqüentemente grande conteúdo de água de solvatação atuando como um sistema de absorção de choques mecânicos e de difusão de nutrientes provenientes de vasos sanguíneos do pericôndrio em direção aos condrócitos. Em adição, para que ocorra a degradação dos proteoglicanos pelos condrócitos é necessário que ocorra a desulfatação, sendo este processo considerado um regulador crítico da condrogênese (Settembre et al., 2008; Cortes et al., 2009; Mertz et al., 2012).

Os proteoglicanos estabelecem ligações não covalentes com o ácido hialurônico, que consiste em uma glicosamina não sulfatada e de alto peso molecular, formando um grande agregado molecular, essencial para manter a rigidez da matriz condrogênica (Kimura et al., 1980). Além disso, os proteoglicanos por meio da especificidade das cadeias laterais dos glicosaminoglicanos (padrão de sulfatação), estabelecem ligações com fatores de crescimento, moléculas de adesão, enzimas e inibidores de enzimas presentes na matriz, exercendo funções como o controle do transporte de células e moléculas e da atividade de vias e moléculas sinalizadoras como Wnt, proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e Indian hedgehog (Ihh) (Souza e Pinhal, 2011). Portanto, é fundamental que todas essas etapas estejam funcionando harmonicamente para que não ocorram alterações na diferenciação celular (Delise et al., 2000; Settembre et al., 2008; Cortes et al., 2009; Mertz et al., 2012).

O principal proteoglicano presente no tecido cartilaginoso é o sulfato de condroitina, também denominado agrecano, cuja função principal é a de se ligar a outros proteoglicanos como o ácido hialurônico, sindecan, glipican, biglican, decorin, epipican e perlecan, promovendo resistência às forças de compressão. É também crucial na morfogênese do condroesqueleto durante o desenvolvimento. O agrecano desempenha papel importante durante a formação das condensações, sob estímulo do fator de transcrição Sox-9 e coordena interações entre as células e a matriz extracelular, principalmente devido à sua capacidade de se ligar ao ácido hialurônico (Knudson e Knudson, 2001; Kiani et al., 2002).

Posteriormente quando os condrócitos vão se tornando hipertróficos e passam a expressar o fator de transcrição Runx-2, tornam-se positivos para fosfatase alcalina, que se distribui para a matriz na zona de pré-mineralização, em um padrão consistente com a localização das vesículas da matriz. Dessa forma, essa enzima exerce importante função nessa etapa, sendo expressa tanto por condrócitos terminais, quanto por osteoblastos, atuando na substituição da cartilagem por tecido ósseo (Roach, 1999; Miao et al., 2002).

## **2. Osteogênese**

A osteogênese é um fenômeno complexo, que envolve vários eventos e que pode ocorrer na vida pré-natal durante a formação do esqueleto e na vida pós-natal, durante o crescimento ósseo e o reparo de lesões ósseas. Esse processo engloba desde a diferenciação de células

osteoprogenitoras até a síntese de matriz óssea (Chen et al., 2009). A formação do tecido ósseo, inicia-se com a condensação mesenquimal das células precursoras esqueléticas também conhecidas como células progenitoras osteocondrais que dão origem a condrócitos para formar o molde cartilaginoso no processo de ossificação endocondral que posteriormente será substituído por osso ou originam osteoblastos formando osso durante o processo de ossificação intramembranosa (Vaes et al., 2006; Adams et al., 2007; Yang, 2009).

O processo de ossificação intramembranosa ocorre na maioria dos ossos do esqueleto, dentre eles, alguns ossos craniofaciais, bem como na formação do colar ósseo que envolve o molde cartilaginoso na formação óssea endocondral (Langille et al., 1994; Horton e Degnin, 2009).

Por isso, no decorrer do desenvolvimento dos ossos longos, simultaneamente à formação óssea endocondral, também ocorre formação óssea intramembranosa. Ou seja, enquanto os condrócitos se diferenciam e tornam-se hipertróficos, vias de sinalização como o Wnt, Ihh e Osterix induzem a diferenciação de células mesenquimais do pericôndrio em osteoblastos, que por sua vez, expressam Runx-2, que regula a síntese de matriz óssea para formar um colar ósseo que envolve a cartilagem hipertrófica (Ducy et al., 1997; Vortkamp et al., 1998; Goldring, 2006; Vaes et al., 2006; Yang et al., 2009). Posteriormente, esse colar ósseo dá origem a cortical da diáfise dos ossos longos, além de ser fonte de células osteoprogenitoras na vida pós-natal (Yu e Ornitiz, 2007; Percival e Richtsmeier, 2013).

Sabe-se que o Runx-2 é necessário para a diferenciação osteogênica das células osteoprogenitoras, uma vez que ratos homocigóticos para a mutação desse gene morrem após o nascimento apresentando nanismo, membros curtos e ausência de formações ósseas endocondral e intramembranosa (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997). Já os ratos heterocigóticos para a mutação do gene Runx-2 são viáveis, mas apresentam uma série de alterações ósseas como hipoplasia dos ossos nasal, frontal, parietal, interparietal e supraoccipital que são alterações semelhantes às observadas na displasia cleidocraniana (CCD) que ocorre em humanos (Otto et al., 1997; Komori et al., 1997).

Em adição, o osterix age em etapas posteriores da diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos. Esse gene é expresso por condrócitos diferenciados e em altos níveis no pericôndrio. Pesquisadores constataram que ratos com células Osx-nulas adquirem o fenótipo de condrócitos. Além disso, esses animais apresentam redução da expressão de colágeno tipo I e ausência da expressão de osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea (Nakashima e Crombrughe, 2003).

Na sequência, os condrócitos hipertróficos, que também expressam Runx-2 em altos níveis, VEGF e metaloproteinases, induzindo angiogênese a partir do pericôndrio (Kim et al., 1999; Takeda et al., 2001; Vaes et al., 2006; Percival e Richtsmeier, 2013). Durante o desenvolvimento do esqueleto, o Runx-2 age também como um regulador da hipertrofia de condrócitos, induzindo a expressão de colágeno tipo X (Zheng et al., 2003) e MMP-13 (Nishimura et al., 2012) em condrócitos diferenciados terminalmente (Vaes et al., 2006). Portanto, o Runx-2 tem duas funções distintas, sendo uma delas essencial para a diferenciação das células progenitoras mesenquimais em osteoblastos e a outra estimulando a diferenciação de condrócitos hipertróficos (Crombrughe et al., 2001), sendo por isso considerado um regulador chave da osteogênese (Bruderer et al., 2014).

Durante a ossificação endocondral pré-natal, a invasão vascular da cartilagem carrega células tronco mesenquimais que originam osteoblastos, bem como osteoclastos e células hematopoiéticas. Simultaneamente, ocorre a degeneração e morte dos condrócitos terminalmente diferenciados, levando a substituição da cartilagem por tecido ósseo (Vortkamp et al., 1998; Cancedda et al., 2000; Crombrughe et al., 2001; Yu e Ornitiz, 2007; Horton e Degnin, 2009; Percival e Richtsmeier, 2013). Os osteoblastos à medida que produzem matriz óssea se diferenciam em osteócitos e se tornam aprisionados no interior de lacunas (Horton e Degnin, 2009). Outro mecanismo alternativo proposto por pesquisadores para a formação óssea, é a transdiferenciação de condrócitos hipertróficos em osteoblastos, mas esse mecanismo ainda não está claro (Cancedda et al., 1995; Yang et al., 2014).

## 2.1. Células tronco mesenquimais

As células tronco mesenquimais (CTMs) também nomeadas de células estromais mesenquimais multipotentes, células tronco estromais da medula (Bydlowski et al., 2009; Bianco et al., 2011) e células progenitoras mesenquimais (Sun et al., 2013) são uma linhagem de células tronco adultas encontradas na medula óssea (Minguell et al., 2000; Abdallah et al., 2008; Hass et al., 2011) e regiões perivasculares de vários tecidos adultos, como sistema nervoso central e periférico, pulmão, coração, pâncreas, fígado, baço, rim, timo, vasos sanguíneos, trato gastrointestinal, músculo esquelético, periósteo, tendão, membrana sinovial, tecido adiposo, pele, córnea, retina, polpa dentária e ligamento periodontal (Jankowski et al., 2002; Jiang et al., 2002; Presnell et al., 2002; Cancedda et al., 2003; Gurevitch et al., 2003; Murphy et al., 2003; Luyten, 2004; Mayhall et al., 2004; Grove et al., 2004; Meirelles et al., 2006; Hass et al., 2011; Foronjy e Majka, 2012; Ledesma-Martínez et al., 2015), bem como no sangue, fígado e medula óssea do feto (Campagnoli et al., 2001).

Dentre os principais locais para extração das CTMs, a medula óssea tem sido a mais utilizada, principalmente devido à facilidade de obtenção dessas células (Tuli et al., 2002; Payushina et al., 2006). No entanto, 0,01% a 0,0001% das células nucleadas do estroma da medula óssea pode ser realmente considerada CTMs, sendo essa quantidade maior em indivíduos jovens (Pittenger et al., 1999; Heng et al., 2004). Além de serem encontradas em pequena quantidade, as células estromais da medula óssea são heterogêneas, sendo uma mistura de progenitoras em diferentes estágios de comprometimento com a linhagem mesodérmica e somente uma pequena quantidade com capacidade multipotencial e de autorrenovação (Bydlowski et al., 2009).

As CTMs são células multipotentes e capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares de origem mesodérmica como condrócitos, adipócitos, osteoblastos, fibroblastos e mioblastos (Friedenstein et al., 1974; Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2000; Tuan et al., 2003), bem como em linhagens não mesodérmicas como células neurais, epiteliais ou hepatócitos, processo conhecido como plasticidade ou transdiferenciação (Minguell et al., 2001; Wagers e Weissman, 2004; Tae et al., 2006). Além disso, devido à sua capacidade de auto-renovação e reparo dos tecidos nos quais residem (Shenfield et al., 2002), estas células têm sido muito estudadas, com ênfase no potencial de regeneração de tecidos e órgãos lesados e na sua capacidade de modular a resposta imunológica (Pittenger et al., 1999; Minguell et al., 2000; Shenfield et al., 2002; Abdi et al., 2008).



Fridenstein e colaboradores (1966) foram os primeiros pesquisadores a descrever as características fenotípicas e genotípicas das CTMs e desde então até os dias atuais, muitos avanços têm sido alcançados com enfoque na sua identificação, isolamento e caracterização (Tuan et al., 2003; Tae et al., 2006; Liu et al., 2009). O potencial de proliferação e de diferenciação dessas células tem sido estudado em várias espécies, incluindo camundongos, ratos, gatos, cães, coelhos, suínos, ovelhas, cavalos, babuínos, primatas e seres humanos (Devine et al., 2003; Chamberlain et al., 2007; Bourzac et al., 2010). Nosso grupo de pesquisa tem investigado o papel dessas células na gênese das alterações ósseas decorrentes do consumo de cafeína, das disfunções tireoidianas, bem como no tratamento da osteoporose (Ocarino et al., 2007; Boeloni et al., 2009; Reis et al., 2016).

Para viabilizar a utilização dessas células em pesquisas e na terapia regenerativa de tecidos, muitos protocolos de cultura celular vêm sendo estabelecidos (Pittenger et al., 1999; Kraus e Kirker-Head, 2006). De uma forma geral, estes protocolos constam de uma fase inicial de separação das células mononucleares da medula óssea, adição de um meio de crescimento básico representado por Dulbecco's modified Eagles's medium (DMEM) acrescido de antibióticos e antifúngicos, seguido de contagem celular e plaqueamento na concentração variável de  $1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^5$  células/cm<sup>2</sup> (Kraus e Kirker-Head, 2006). O meio de crescimento deve ser suplementado com 10 a 20% de soro fetal bovino (SFB) (Pittenger et al., 1999; Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009), uma vez que na ausência desse composto, as células apresentam pouca adesividade, baixa atividade metabólica, além de elevada morte celular (Heng et al., 2004; Zhu et al., 2006). Além disso, o crescimento celular deve ser acompanhado por visualização das garrafas de cultura duas a três vezes por semana, sendo os meios trocados de acordo com a necessidade da cultura, como por exemplo turbidez do meio e consequente alteração do pH (Fontes et al., 2006).

Ao atingirem a confluência de 70 a 80%, as células devem ser tripsinizadas e cultivadas, para que não ocorra a inibição do seu crescimento, além de serem necessárias passagens sucessivas para se obter grandes quantidades de CTMs, com ausência de outros tipos celulares (Bydlowski et al., 2009). No entanto, essas células apresentam vida útil limitada *in vitro*. Após a 7-12<sup>a</sup> passagem ocorrem alterações no fenótipo celular, na proliferação, no potencial de diferenciação, na expressão gênica, bem como nos marcadores de superfície específicos, demonstrando sinais de senescência. Pesquisadores não sabem ao certo os mecanismos pelos quais a senescência ocorre, mas há evidências de que esse processo envolve, encurtamento progressivo dos telômeros, bem como danos ao DNA, estresse oxidativo e ativação da via apoptótica. Dessa forma, a senescência das CTMs pode limitar as suas aplicações terapêuticas, sendo crucial o seu controle para garantir a qualidade na terapia celular (Stenderup et al., 2003; Bydlowski et al., 2009; Sepúlveda et al., 2014; Turinetto et al., 2016).

Fridenstein e colaboradores (1974) observaram que as CTMs são células formadoras de colônias morfológicamente semelhantes a fibroblastos (CFU-F), que caracterizam-se pela facilidade de crescimento em monocamadas, manutenção de sua multipotencialidade por várias passagens, além da capacidade de emitir prolongamentos e secretar matriz extracelular que permitem a sua adesão à superfície, sobretudo ao plástico das garrafas de cultura (Caplan et al., 1991; Pittenger et al., 1999; Kraus e Kirker-Head, 2006).

Outras células presentes na medula óssea também apresentam certa capacidade de aderência a substratos plásticos, com maior ou menor intensidade, como por exemplo os macrófagos e fibroblastos, mas com as várias trocas do meio de cultura, estas células são removidas. Portanto,

este procedimento elimina a heterogeneidade da cultura e, após determinado número de passagens, a cultura torna-se enriquecida pela fração que se autorrenova, as CTMs. Em adição, só poderá ser denominada CMTs, as células que apresentarem a capacidade de se diferenciar *in vitro* em múltiplas linhagens celulares, entre elas adipócitos, osteócitos e condrócitos (Nardi e Meirelles, 2006; Chamberlain et al., 2007; Bydlowski et al., 2009). Além disso, as CTMs expandidas em culturas podem ser identificadas pela expressão de determinados marcadores de superfície, que entretanto, não são específicos ou exclusivos, ocorrendo em outros tipos celulares. Mas por meio da análise da expressão ou ausência de expressão de um conjunto de anticorpos, é que se determina seu perfil imunofenotípico (Payushina et al., 2006; Meirelles et al., 2006). Pesquisadores tem demonstrado que as CTMs possuem expressão de CD105, CD73, CD90 (Thy-1), CD44, CD71, CD106, CD124, CD54, CD144, CD166, CD115, CD29, HLA-ABC, Sca-1, RT1A (MHC-I) (Mafi et al., 2011; Ranera et al., 2011; Lin et al., 2013; Yang et al., 2014; Ramos et al., 2016) e Stro-1 (Haynesworth et al., 1992; Panetta et al., 2009; Lin et al., 2011). O anti-Stro 1 foi o primeiro anticorpo monoclonal a reagir especificamente com as células progenitoras não hematopoiéticas do estroma da medula óssea. Além disso, populações de células negativas para Stro-1 não são capazes de formar colônias. Entretanto, vale ressaltar que Stro-1 não é um marcador exclusivo de CTMs e sua expressão é gradativamente reduzida durante a expansão da cultura, limitando o seu uso para identificação de CTMs nos repiques iniciais (Bydlowski et al., 2009; Lin et al., 2011). Outros marcadores de superfície celular também têm sido expressos positivamente pelas CTMs, como SH2, SH3, SH4, HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-I, DP, EMA, DQ (MHC Classe II), CD105, Oct 4, Oct 4A, Nanog, Sox-2, TERT, Stat-3, vimentinas, integrinas e ICAM-1 (Minguell et al., 2001; Mafi et al., 2011).

Em contrapartida, essas células não expressam marcadores de células tronco hematopoiéticas/endoteliais como: CD45, CD34 (Pittenger et al., 1999; Conget e Minguell, 1999; Panetta et al., 2009), CD11b (marcador de célula imune), glicoforina-A (marcador de linhagem eritróide), CD14, CD31, CD33 e CD133 (Mafi et al., 2011; Ranera et al., 2011), CD 19 (ou CD 79-alfa), CD117 (marcador de célula-tronco progenitora hematopoiética) e o antígeno leucocitário humano classe II (HLA-II) (La Rocca et al., 2009). Também não expressam moléculas coestimulatórias como CD80, CD86, CD40 ou moléculas de adesão CD31 (PECAM-1) expressas em células hematopoiéticas e CD56 (NCAM-1) (Bydlowski et al., 2009).

Existe grande variação na expressão desses marcadores de acordo com a fonte de células, o método de isolamento e cultura, da espécie de origem ou do estágio de diferenciação celular (Chamberlain et al., 2007; Bydlowski et al., 2009; Park et al., 2013; Maleki et al., 2014). Dessa forma, o *International Society for Cellular Therapy* definiu que um dos critérios para caracterizar fenotipicamente CTMs é que estas devem expressar CD105, CD73 e CD90, e devem ser negativas para CD34, CD45 e CD14 ou CD11b, sendo este critério de caracterização aceito e utilizado por pesquisadores de todo o mundo (Horwitz et al., 2005; Schäffler e Büchler, 2007; Lin et al., 2013; Ramos et al., 2016).

### **2.1.2. Diferenciação osteogênica**

As CTMs apresentam capacidade de se diferenciar por meio de uma série de processos que envolvem interação célula-célula e célula-matriz, divisão celular, regulação gênica, fatores de crescimento, citocinas, fatores hormonais e humorais, bem como estímulos físicos e mecânicos (Bobis et al., 2006, Payushina et al., 2006; Ocarino et al., 2007; Bydlowski et al., 2009). Esses

processos ocorrem no microambiente onde essas células se encontram, sendo cruciais para determinar o comprometimento dessas células com uma linhagem específica (Birmingham et al., 2012).

Em culturas, estas células na presença de moléculas indutoras ósseas como dexametasona, ácido ascórbico e beta-glicerofosfato são induzidas à proliferação e maturação para a formação de osteoblastos. As células alteram sua morfologia fibroblástica para um formato cuboidal, e passam a expressar marcadores conhecidos das células ósseas, como osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, dentre outros (Haynesworth et al., 1992; Jaiswal et al. 1997; Bruder et al., 1998; Pittenger et al., 1999). As células ósseas originadas das CTMs comprometidas com a diferenciação osteogênica são os pré-osteoblastos, osteoblastos e osteócitos. Esses morfotipos são considerados diferentes estágios de maturação de uma única linhagem celular (Long et al., 2001; Kobayashi et al., 2005).

Os pré-osteoblastos representam um estágio de transição entre as células osteoprogenitoras e os osteoblastos, apresentando expressão reduzida de marcadores ósseos como fosfatase alcalina e proteínas não colagênicas, como osteonectina e osteopontina (Katagiri et al., 2002). Já os osteoblastos, células mais diferenciadas, exibem alta expressão de fosfatase alcalina, proteínas ósseas e cristais de hidroxiapatita. Seus produtos específicos são as proteínas colagênicas (colágeno tipo I) e as proteínas não colagênicas (osteonectina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea) (Jaiswal et al. 1997; Payushina et al., 2006; Tae et al., 2006; Huang et al., 2007). E finalmente, os osteoblastos se diferenciam em osteócitos quando são aprisionados na matriz mineralizada, tornando-se incapazes de se dividir (Franz-Odenaalm et al., 2006). Os osteócitos possuem baixa expressão de fosfatase alcalina, mas alta expressão de osteocalcina, galectin 3 e CD44 (Birmingham et al., 2012).

Diante desses diferentes morfotipos da linhagem osteogênica e suas particularidades, pesquisadores dividem a diferenciação osteogênica de CTMs *in vitro* em três etapas: proliferação, diferenciação e maturação da matriz extracelular e mineralização (Stein e Lian, 1993; Huang et al., 2007). Na primeira etapa da diferenciação osteogênica (1º ao 4º dia) são identificados genes nas células osteoprogenitoras responsáveis pela proliferação como histonas e proto-oncogenes como c-jun, c-fos e c-myc, regulados pelas ciclinas B e E (Stein e Lian, 1993; Stein et al., 1996). Além disso, o ácido ascórbico induz a formação de fibrilas de colágeno tipo I que irá constituir a base da matriz (Aronow et al., 1990; Hoemann et al., 2009). Na segunda etapa, onde ocorre a diferenciação propriamente dita, do 5º ao 14º dia, a dexametasona liga-se a receptores para glicocorticoides presentes na superfície das células osteoprogenitoras, induzindo sua diferenciação (Xiao et al., 1997; Cooper et al., 2008; Coussens et al., 2009) e estimulando a síntese de fosfatase alcalina, que é considerada um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006). Já na terceira e última etapa (14º ao 28º dia) o ácido ascórbico e o  $\beta$ -glicerofosfato atuam como fonte local de íons e fosfatos inorgânicos (Chung et al., 1992) induzindo as células a atingirem os estágios tardios da diferenciação, promovendo a síntese e a mineralização da matriz extracelular (Bellows et al., 1992; Bruder et al., 1998; Aubin, 2001; Payushina et al., 2006). Dessa forma, os osteoblastos funcionais expressam proteínas colagênicas e não colagênicas, que associadas à deposição de cálcio e fosfato, resultam na formação de nódulos mineralizados (Jaiswal et al. 1997; Payushina et al., 2006; Tae et al., 2006; Huang et al., 2007).

Importantes fatores de transcrição regulam a diferenciação osteogênica das CTMs como o Runx-2, Wnt e Osterix (Komori et al., 1997; Ducky et al., 1999; Nakashima et al., 2002). O Wnt

induz a atividade da fosfatase alcalina, enquanto que Osterix promove a ativação de Runx-2 que por sua vez regula a síntese das proteínas colagênicas e não colagênicas (Marie, 2001) que desempenham papel chave na formação da matriz óssea (Ducy et al., 1997; Nefussi et al., 1997; Kato et al., 2002; Tsuang et al., 2006; Vaes et al., 2006; Muioli et al., 2007; Fu et al., 2007). Em adição, membros da família das proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e os fatores de crescimento fibroblástico básicos (bFGFs) têm sido implicados no processo regulador osteogênico devido às suas atividades mitogênicas e de diferenciação. Dentre elas, as BMPs 2, 4, 6, 7 e 9 são consideradas osteoindutoras, promovem o aumento da formação de nódulos mineralizados e do teor de cálcio em culturas *in vitro*. Já a combinação das BMPs com os bFGFs aumenta sinergicamente o potencial osteogênico em culturas de CTMs extraídas da medula óssea de ratos (Hanada et al., 1997; Luu et al., 2007). Além desses, outros fatores também regulam a diferenciação osteogênica como hormônios, entre eles: hormônio de crescimento, paratormônio, estrógeno, calcitonina, glicocorticoides, andrógenos e hormônios tireoidianos (Raisz, 1999; Bland, 2000; Hadjidakis e Androulakis, 2006; Datta et al., 2008), bem como a vitamina D (Nakamura et al., 2007; Clarke, 2008).

## 2.2. Osteoblastos

Os osteoblastos são células especializadas do tecido ósseo que se originam a partir de células osteoprogenitoras mesenquimais presentes nas superfícies ósseas da medula óssea, do endóstio e do perióstio (Clarke, 2008). Os osteoblastos ativos são caracterizados por serem ovóides, possuírem um núcleo redondo com predomínio de eucromatina e com um a dois nucléolos. Essas células apresentam grande quantidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático rugoso proeminente e grandes unidades de complexos de golgi (Kassem et al., 1992).

A função das mitocôndrias no processo de calcificação não está clara, mas estas organelas são essenciais para o controle das concentrações de cálcio durante a formação do tecido mineralizado (Lehninger, 1970, Bonucci et al., 1973). O retículo endoplasmático rugoso e o complexo de golgi são importantes organelas envolvidas na síntese proteica que irá compor a matriz óssea ou osteóide sintetizada e posteriormente mineralizada sob o comando dos osteoblastos (Kassem et al., 1992; Nefussi et al., 1997; Mackie, 2003; Caetano-Lopes et al., 2007). O complexo de golgi contém numerosos vacúolos e vesículas repletas de estruturas fibrilares, representadas por pró-colágeno, proteoglicanos, glicoproteínas, lipídeos e enzimas como fosfatase alcalina, que posteriormente serão responsáveis por formar as vesículas de matriz, onde inicia-se a mineralização (Kassem et al., 1992; Nakamura, 2008).

À medida que os osteoblastos vão sendo circundados pela matriz produzida, passam a ser denominados osteócitos, que representam o estágio terminal da diferenciação dos osteoblastos. Os osteócitos estão localizados no interior de lacunas osteocíticas, sendo as células mais abundantes do tecido ósseo. Essas células possuem conexão com osteócitos adjacentes por meio de canaliculos formados por seus prolongamentos citoplasmáticos, que servem como importante via para carrear nutrientes e oxigênio dos vasos sanguíneos para estas células (You et al., 2004; Nakamura, 2008). Além disso, os osteócitos por meio da expressão de proteínas da matriz, auxiliam na adesão intercelular e regulam a troca de mineral na rede canalicular. A expressão de conexinas por essas células mantém as junções gap que são essenciais para a atividade e a sobrevivência dos osteócitos. Essas células são ativas durante o processo de osteólise

osteocítica, e podem funcionar como células fagocíticas pois contêm inúmeros lisossomos (Clarke, 2008).

Os osteoblastos além de serem essenciais à formação óssea, também estão envolvidos na síntese e na expressão de fatores que estimulam a diferenciação e a atividade dos osteoclastos, como a osteoprotegerina e o receptor ativador NF-kapa beta ligante (RANKL), controlando também indiretamente os níveis de reabsorção óssea e consequentemente a homeostase do cálcio (Mackie, 2003; Nakamura, 2008). Além disso, os osteoblastos sintetizam metaloproteínas (MMP-13) e colagenases importantes para a degradação da matriz óssea (Nakamura, 2008).

Durante a embriogênese, os osteoblastos participam dos dois modelos de formação óssea representados pela formação ou ossificação intramembranosa e a endocondral. Estes dois processos envolvem uma série de vias de sinalização complexas e interligadas, bem como a interação de inúmeros fatores transcricionais, endócrinos, parácrinos e autócrinos, dificultando a avaliação *in vivo* do mecanismo de ação de drogas e/ou hormônios nas várias etapas da diferenciação celular, diante disso, cada vez mais, tem sido ampliada as técnicas e estudos *in vitro* (Mackie, 2003).

Os modelos da osteogênese *in vitro* permitem o estudo da cinética de diferenciação dos osteoblastos, da regulação de citocinas e hormônios, síntese e secreção de proteínas da matriz, bem como a compreensão de mecanismos moleculares de doenças ósseas e a farmacocinética de drogas (Czekanska et al., 2012). Além disso, pesquisadores tem demonstrado que a formação de nódulos mineralizados pelos osteoblastos *in vitro* apresenta uma expressão sequencial fenotípica e genotípica consistente com a que ocorre *in vivo* (Nefussi et al., 1997; Declercq et al., 2004).

Dessa forma, protocolos vêm sendo estabelecidos para o cultivo dessas células em diferentes espécies como ratos, camundongos, humanos, bovinos, ovinos e coelhos (Czekanska et al., 2012; Taylor et al., 2014). Dentre os sítios de coleta descritos, destacam-se a calvária (Bellows et al., 1986; Ecarot Charrier et al., 1983; Ernst et al., 1988; Bellows e Aubin., 1989; Nefussi et al., 1997), o endóstio (Modrowski e Marie 1993; Lomri et al., 1988) e o estroma da medula óssea (Shen et al., 1993; Kamalia et al., 1992; McCulloch et al., 1991; Maniatopoulos et al., 1988; Declercq et al., 2004).

O isolamento dos osteoblastos é realizado principalmente por meio da digestão enzimática por colagenase II ou tripsina e menos frequentemente por meio de migração espontânea a partir de amostras de explantes (Declercq et al., 2004), sendo que o isolamento a partir de ossos adultos, necessita de desmineralização prévia à ação enzimática (Bard et al., 1972; Milss et al., 1979). As células isoladas da calvária são heterogêneas quanto ao grau de diferenciação celular, sendo a maioria composta por osteoblastos, embora haja também células osteoprogenitoras e pré-osteoblastos. Assim, estas células são cultivadas em meio osteogênico, para estimular sua total diferenciação e obtenção de uma cultura homogênea (Nefussi et al., 1997).

As características fenotípicas e genotípicas dos osteoblastos *in vitro* dependem de muitos fatores, dentre eles, do sítio de extração das células, espécie, sexo, idade, meio de cultivo, presença de complementos para a proliferação e diferenciação celular, bem como do tempo de cultura (Beloti e Rosa et al., 2005; Czekanska et al., 2012). Exemplificando, osteoblastos extraídos de fetos humanos apresentam uma maior expressão de colágeno tipo I e osteonectina quando comparados a osteoblastos de indivíduos adultos. Osteoblastos extraídos da cabeça do

fêmur apresentam maior expressão de fosfatase alcalina quando comparados a osteoblastos extraídos da tíbia (Czekanska et al., 2012).

A osteogênese pode ser caracterizada pela identificação de marcadores ósseos que também são utilizados para estimar o grau de diferenciação das células como: Runx-2, fosfatase alcalina, bem como as proteínas colagênicas representadas principalmente pelo colágeno tipo I, e pelas proteínas não colagênicas representadas pela osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea (Nefussi et al., 1997). O padrão de expressão gênica dessas proteínas da matriz *in vitro* tem sido correlacionado com a aquisição e maturação do fenótipo osteoblástico (Moursi et al., 1996; Nefussi et al., 1997). Dessa forma, os níveis de expressão variam ao longo do tempo de cultivo (Nefussi et al., 1997; Zohar et al., 1998).

A fase de proliferação é caracterizada pela formação de camadas multicelulares com expressão de colágeno tipo I, osteonectina e fibronectina, que regulam a adesão e a diferenciação celular (Nefussi et al., 1997; Mackie, 2003). A interação célula-célula é importante entre as células da linhagem osteogênica para determinar sua diferenciação e função. Essas células apresentam junções intercelulares como as junções de oclusão, de adesão e as junções *gap*, sendo que as junções de adesão são compostas por N-caderinas e caderinas 11 enquanto que as junções *gap* são compostas principalmente pela conexina 43. Essas junções estão envolvidas no transporte de íons e de micromoléculas entre as células, bem como na transdução de sinais, via interação celular por meio da  $\beta$ -catenina, bem como da tirosina quinase (Tsukita et al., 1991).

As interações célula-matriz também exercem função importante durante o processo da diferenciação. A interação entre  $\beta$ 1-integrinas e o colágeno tipo I através da via da proteína quinase ativada mitogenicamente (MAPK) exerce função chave na diferenciação e na função dos osteoblastos. Ao cessar a proliferação, as células sofrem alterações morfológicas de superfície e entram em um estágio de diferenciação caracterizado pela expressão de Runx-2, fosfatase alcalina, osteopontina e sialoproteína óssea (Aubin et al., 1995; Jaiswal et al., 1997; Nefussi et al., 1997; Donahue et al., 2000). Já no estágio de mineralização, elevam-se os níveis de osteocalcina, forma-se a hidroxiapatita e reduz a expressão de fosfatase alcalina, levando a mudanças na forma e no metabolismo celular, até a formação de osteócitos circundados pela matriz óssea mineralizada (Aronow et al., 1990; Aubin et al., 1995; Ducy et al., 1997; Jaiswal et al., 1997; Nefussi et al., 1997; Kern et al., 2001; Mackie, 2003; Fujita et al., 2004).

### 2.2.1. Síntese de matriz óssea

A matriz extracelular óssea é sintetizada e regulada pelos osteoblastos, sendo composta predominantemente por proteínas colagênicas, mais especificamente o colágeno tipo I e quantidades menores, mas significativas de proteínas não colagênicas como osteocalcina, osteopontina, osteonectina e sialoproteína óssea. Os osteoblastos também sintetizam e secretam proteoglicanos como decorin e biglican, que exercem importantes funções na matriz óssea. Esses proteoglicanos se ligam ao cálcio, controlando o crescimento da hidroxiapatita e prevenindo, dessa forma, a calcificação excessiva. Outros componentes representados pela fosfatase alcalina, BMPs, TGF- $\beta$ , e pelos IGFI e IGFII também estão presentes na matriz óssea (Ecarot-charrier et al., 1983; Bellows et al., 1986; Nanci et al., 1996; Nefussi et al., 1997; Mackie, 2003; Tsuang et al., 2006; Moiola et al., 2007; Nakamura, 2008).

As propriedades dos constituintes da matriz têm sido muito estudadas e a compreensão das suas funções na estrutura e na regulação celular vem progredindo. A interação célula-matriz é essencial, pois permite que a célula monitore a composição e a propriedade da matriz e responda às alterações modificando sua atividade de síntese, além da matriz ser fundamental para o controle do crescimento e da diferenciação celular (Heinegard e Oldberg, 1989; Roughley, 2006; Souza e Pinhal, 2011).

Sabe-se que as proteínas colagênicas e não colagênicas desempenham papel chave em diferentes etapas da diferenciação celular e da maturação e mineralização da matriz óssea, regulando a adesão e a atividade celular durante a formação e a reabsorção ósseas (Nefussi et al., 1997). Dentre as proteínas colagênicas, o colágeno tipo I é o constituinte mais abundante da matriz extracelular, totalizando 90% da constituição protéica óssea, cuja função é servir de arcabouço estrutural para a mineralização (Nefussi et al., 1997), bem como mediar a cascata de sinalização para a expressão de um fenótipo osteoblástico maduro e para a formação da matriz mineralizada (Lynch et al., 1995). Outros tipos de colágeno também estão presentes em quantidades bem menores, representados pelos colágenos tipo III e V que auxiliam na formação do diâmetro das fibrilas de colágeno tipo I. Além desses, podem ser observados colágenos não fibrilares como os tipos IX, XII, XIV, XIX, XX, e XXI, que servem para ancorar moléculas importantes para a organização e a estabilização da matriz (Clarke, 2008). Mas, apesar do colágeno ser um constituinte necessário para a formação da matriz óssea, ele por si só é insuficiente para promover a expressão fenotípica do osteoblasto (Shi et al., 1996).

A síntese de colágeno tipo I é um dos eventos iniciais na via de diferenciação osteoblástica, e precede a síntese dos demais componentes da matriz. Esse processo ocorre por meio das vias de fosforilação de tirosina e da interação do colágeno com os receptores para integrina ( $\alpha 1\beta 1$  ou  $\alpha 2\beta 1$ ), que por sua vez induzem a expressão de importantes fatores de transcrição como o Runx-2 e a fosfatase alcalina (Xiao et al., 1998; Aubin, 2001).

O Runx-2 é expresso em altos níveis pelas células osteoprogenitoras, bem como em (Kim et al., 1999; Takeda et al., 2001; Vaes et al., 2006) osteoblastos (Ducy et al., 1997), sendo regulado por outros fatores como BMP-7, Ihh-PTHrP e pela vitamina D3 (Ducy et al., 1997; Kim et al., 1999). Estudos tem demonstrado a importância da atividade transcricional do Runx-2 na regulação de genes *in vivo* e *in vitro*. Estes genes pertencem principalmente ao grupo das proteínas da matriz extracelular óssea, tais como osteonectina, osteopontina, sialoproteína óssea, osteocalcina, bem como os fatores de crescimento e seus receptores como a osteoprotegerina e o TGF, dentre outros (Ducy et al., 1997; Javed et al., 2001; Kern et al., 2001; Stock et al., 2004; Takagi et al., 2004; Vaes et al., 2006). A expressão da fosfatase alcalina também têm sido relacionada com as isoformas de Runx-2 (I e II) (Harada et al., 1999).

A fosfatase alcalina óssea pode ser encontrada ligada às proteínas de superfícies dos osteoblastos (Thy-1 e N-CAM) por meio de ligações covalentes com complexos lipídicos de fosfoinositol na membrana plasmática, sugerindo seu envolvimento nas sinalizações transmembrana. Além disso, a fosfatase alcalina também pode ser encontrada livre na matriz mineralizada (Aubin, 2001; Clarke, 2008), sendo sua função a de aumentar as concentrações locais de fósforo, remover os inibidores do crescimento dos cristais de hidroxiapatita ou modificar as fosfoproteínas para controlar a sua capacidade de atuar como nucleadores. A fosfatase alcalina também tem sido associada à regulação da proliferação, migração e diferenciação de células da linhagem osteoblástica, sendo considerada um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Hui et al., 1996).

As proteínas não colagênicas aparecem em diferentes estágios do processo de formação e mineralização da matriz óssea, sendo a osteonectina, osteopontina e a sialoproteína óssea consideradas marcadores precoces e a osteocalcina marcador tardio da diferenciação osteogênica (Delany et al., 2003; Gericke et al., 2005; Aksu et al., 2008; Karaoz et al., 2009).

A osteonectina é expressa tanto por células osteoprogenitoras quanto por células maduras. Em células maduras, ela está relacionada com a mineralização da matriz no estágio inicial da formação óssea, porém sua função não está claramente definida. Apresenta a propriedade de se ligar às moléculas de colágeno e de adesão, tendo participação mediada pelo cálcio na organização da matriz extracelular (Delany et al., 2003; Karaoz et al., 2009). Além disso, cultivos de células estromais da medula óssea e de osteoblastos de ratos mutantes com deleção gênica de osteonectina demonstraram redução do número de células osteo-precursoras e de osteoblastos, da expressão de osteocalcina e da formação de nódulos mineralizados, indicando a importância dessa proteína também na formação, maturação e sobrevivência dos osteoblastos, além de atuar na manutenção e remodelação ósseas (Delany et al., 2003).

Outras duas proteínas não colagênicas representadas pela osteopontina (SPP1) e pela sialoproteína óssea exercem funções importantes na síntese de matriz. Elas são glicoproteínas fosforiladas que contêm uma sequência de tripeptídeos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), importantes para a adesão das proteínas que interagem com as integrinas da superfície celular, por meio de receptores do tipo vitronectina. A osteopontina e a sialoproteína óssea contêm resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico, carregados negativamente e com alto potencial de ligação ao cálcio, além de agirem como nucleadoras dos cristais de hidroxiapatita (Gericke et al., 2005). A expressão dessas proteínas é regulada em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular e por fatores como ácido ascórbico, dexametasona, TGF- $\beta$ , ácido retinóico, endotelinas, BMPs e vitamina D (Beck et al., 2000).

A osteopontina e a sialoproteína óssea são consideradas proteínas multifuncionais, pois estão envolvidas na adesão, na proliferação e migração celular e no controle da mineralização (Nanci et al., 1999; Sodek et al., 2000; Donzelli et al., 2007). A osteopontina é expressa durante o período de proliferação celular e no início da mineralização (Zohar et al., 1998), promovendo a precipitação prematura dos cristais de fosfato de cálcio na matriz colagênica (Doi et al., 1992). Já a sialoproteína óssea é expressa por osteoblastos recém diferenciados (Ganss et al., 1999) e está presente na matriz óssea mineralizada (Heinegard e Oldberg, 1989).

A osteocalcina, que é encontrada mais tardiamente no decorrer do processo de mineralização óssea (Price et al., 1976; Roach, 1994; Aksu et al., 2008), caracteriza-se por ser uma proteína de baixo peso molecular que contém em sua molécula resíduos do ácido carboxyglutâmico-I. Esses resíduos promovem a ligação com o cálcio, dependente de vitamina K, promovendo mineralização óssea por meio da regulação do crescimento dos cristais de hidroxiapatita. Essa proteína é expressa apenas pelos osteoblastos maduros durante o processo de síntese da matriz óssea, assim como pelos osteócitos, representando 20% das proteínas de matriz não colagênicas. A expressão do gene da osteocalcina é regulada principalmente pela Vitamina D e pelo paratormônio (Stein e Lian, 1993; Aubin et al., 1997).

Pesquisas têm demonstrado que a associação dessas proteínas não colagênicas ao longo da maturação da matriz extracelular com as fibrilas colágenas cria alta concentração local de cálcio, levando então a precipitação mineral e, por conseguinte, à mineralização da matriz (Heinegard e Oldberg, 1989).



### 3. Cafeína

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcaloide natural que está presente na dieta na forma de café, chás, refrigerantes, energéticos, chocolates e medicamentos, dentre outros (Heckman et al., 2010). Estima-se que a cafeína seja um dos compostos farmacológicos ativos mais consumidos em todo o mundo, nas diversas faixas etárias, inclusive durante o período gestacional (Dews, 1982; Benowitz, 1990). Cerca de 95% das mulheres gestantes ingerem alguma quantidade de cafeína, seja por meio da alimentação ou por meio de medicamentos (Watkinson e Fried, 1985).

A quantidade de cafeína presente nessas bebidas e alimentos pode variar enormemente, de acordo com o tamanho da porção, do tipo de produto e com o método de preparo. No caso do café e dos chás, a variedade da planta também interfere na quantidade de cafeína. Estima-se que o conteúdo desse alcaloide no café possa variar de 29 a 176 mg/xícara, no chá de 8 a 107mg/xícara, no chocolate de 5 a 10 mg e no refrigerante do tipo cola de 32 a 65 mg/360 mL (Bunker e McWilliams, 1979; Dews, 1982).

Além disso, milhares de drogas prescritas ou não, podem ser fontes importantes de cafeína, particularmente para as pessoas que não consomem alimentos e/ou bebidas cafeínadas (Goyan, 1980). Dentre essas drogas, destacam-se comprimidos para resfriados, alergias, analgésicos (15 a 64mg/U), moderadores de apetite (50 a 200 mg/U) e estimulantes (100 a 200 mg/U) (Srisuphan e Bracken, 1986).

O consumo de cafeína per capita pela população geral varia em média entre 3-7 mg/Kg/dia. No entanto, há uma grande dificuldade por parte dos pesquisadores em estimar esses valores, devido às diversas fontes onde esse alcaloide pode ser encontrado, bem como a variabilidade de consumo por país de acordo com a cultura de cada população (Dews, 1982; Barone e Roberts, 1996).

Também vale ressaltar que a cafeína é inserida na alimentação de animais, entre eles ruminantes, monogástricos e/ou aves, quando da utilização da polpa e da palha de café, que são subprodutos de baixo custo oriundos do processamento do café (Jarquín et al., 1974; Cabezas et al., 1987; Mazzafera, 2002; Parra et al., 2008). No entanto, como a cafeína apresenta gosto amargo e baixa palatabilidade, seu uso dependendo da quantidade, pode reduzir o peso dos animais, além de provocar alterações comportamentais como a hiperatividade (Cabezas et al., 1987; Mazzafera, 2002). Sabe-se que em suínos, a adição de polpa de café em uma quantidade de 8 a 16% da ração consumida é bem aceita. Além disso, a casca de café pode ser inserida de 5 a 9,5% na ração, sem prejuízo no desenvolvimento do animal, além de produzir carcaças mais magras (Jarquín et al., 1974; Parra et al., 2008).

Os efeitos da cafeína no organismo humano e animal têm sido amplamente estudados. Apesar de algumas ações benéficas da cafeína, há vários relatos também de efeitos adversos no organismo. Tanto em humanos quanto em animais, pode estimular o sistema nervoso central. Nos seres humanos, observa-se aumento das atividades psicoestimulantes levando à insônia, ansiedade e ataques de pânico (Smith, 2002; Fisone et al., 2004). Alterações comportamentais também tem sido observadas nos recém nascidos cujas mães consomem produtos cafeínados e/ou medicamentos contendo cafeína durante a gestação como alterações do sono e do aprendizado e ansiedade (Devoe et al., 1993).

A cafeína e seus metabólitos também podem aumentar a frequência cardíaca e a pressão arterial (Mandel, 2002), além de agir nos sistemas respiratório (Smith, 2002), urinário (Smith, 2002), digestório (Mandel, 2002), tegumentar (Fischer et al., 2007; Lou et al., 2010) e nas glândulas mamárias (Nagasawa e Sakurai, 1986; Sheffield, 1991; Li e Hacker, 1995), dentre outros, causando efeitos que necessitam ser mais amplamente estudados.

No osso, a cafeína é considerada um fator de risco para a osteoporose (Kamagata-Kiyoura et al., 1999) e um agente causador de malformações fetais (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991). Na cartilagem, a cafeína afeta a matriz condrogênica e os condrócitos das placas de crescimento, causando alterações na formação e no crescimento ósseo endocondral (Reis et al., 2014; Choi et al., 2016). Diante disto, suas ações sobre o tecido ósseo e cartilaginoso têm sido estudadas (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991; Barone et al., 1993; Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Reis et al., 2015; Choi et al., 2016). No entanto, os mecanismos pelos quais a cafeína altera o osso e a cartilagem, ainda são pouco compreendidos (Barone et al., 1993; Reis et al., 2014).

### **3.1. Farmacocinética da cafeína**

#### **3.1.1. Absorção e distribuição**

A cafeína quando administrada por via oral, é rapidamente absorvida atingindo uma concentração plasmática máxima dentro de 15 a 45 minutos, distribuindo-se de forma uniforme em todos os tecidos do organismo. Essa metilxantina é principalmente absorvida no intestino delgado, embora parte seja também absorvida no estômago (Per et al., 2004). Além disso, a cafeína administrada por via retal associada a outros medicamentos através de supositórios ou de enemas a base de café, também apresentam absorção para a circulação sistêmica, com concentrações plasmáticas máximas variáveis de 1,9 horas e 18 min, respectivamente (Hoy e Scott, 2011; Teekachunhatean et al., 2013).

A cafeína, devido à sua característica lipofílica, atravessa todas as membranas biológicas, incluindo a hematoencefálica e a placentária (Maickel e Snodgrass, 1973), passando para o embrião e o feto, onde atinge concentrações plasmáticas semelhantes às maternas. Além disso, a cafeína também tem sido encontrada na saliva, leite, bile, sêmen, sangue do cordão umbilical, urina e no plasma de neonatos (Souza e Sichieri, 2005).

#### **3.1.2. Metabolismo e eliminação**

O metabolismo da cafeína ocorre por desmetilação através do citocromo P-450 (CYP) no fígado, sendo apenas uma pequena parte eliminada na urina de forma inalterada (Neal e Benowitz, 1990; Arnaud, 1993). No entanto, esse metabolismo altera-se em função da idade (Aldridge et al., 1977). Em adultos, a meia-vida plasmática é de duas a quatro horas. Em fetos e neonatos, em contrapartida, este tempo pode aumentar para cerca de 80 a 100 horas, devido à deficiência das enzimas hepáticas do sistema P-450 (Neal e Benowitz, 1990).

A biotransformação da cafeína é complexa, e pelo menos dezessete metabólitos urinários podem ser detectados após o seu consumo. Os principais metabólitos originados são a teobromina, a paraxantina e a teofilina e quantidades vestigiais de ácido 1,3,7-trimetilúrico (Soares e Fonseca,

2004; Souza e Sichieri, 2005). Após a desmetilação da cafeína, sua via metabólica principal pode variar de acordo com a espécie. Em ratos, origina-se predominantemente a teobromina através da 8-hidroxilação, enquanto que em humanos origina-se a paraxantina por meio da 3-N-desmetilação (Eteng et al., 1997, Klebanoff et al., 1999). Em ambas as espécies, a desmetilação é catalisada pela enzima CYP1A2 (Kot e Daniel, 2007; Kot e Daniel, 2008).

A farmacocinética da cafeína e seus metabólitos em humanos e ratos pode ser alterada por diversos fatores exógenos que afetam a atividade de CYP1A2. Dentre eles pode-se citar o tabagismo, o alcoolismo, a atividade física e os fármacos como os contraceptivos, antibióticos, antidepressivos ou neurolépticos (Neal e Benowitz, 1990; Kot e Daniel, 2008; Hallström et al., 2010). Dessa forma, esses fatores podem alterar a taxa de depuração e de eliminação da cafeína, aumentando ou diminuindo sua meia vida. A gestação também altera a taxa de depuração da cafeína tornando-a três vezes mais lenta (Neal e Benowitz, 1990).

Durante a gestação, a diminuição da eliminação da cafeína ocorre sobretudo no segundo e terceiro trimestres (Knutti et al., 1982). Esse aumento da meia-vida da cafeína nas mães coincide com o período em que o desenvolvimento fetal é exponencial. Nesse sentido, o acúmulo dessa substância pode aumentar o risco de toxicidade para a mãe, além de representar um potencial risco para o feto e para a placenta, que é a responsável pela transferência de nutrientes (Aldridge et al., 1977; Parsons e Pelletiers, 1982; Kirkinen et al., 1983). A redução da eliminação da cafeína durante esse período coincide com as mudanças que ocorrem na concentração dos hormônios esteroides. Níveis aumentados de estrogênio e progesterona possuem efeito antagonista no metabolismo da cafeína, pois esses hormônios levam a um progressivo decréscimo no citocromo P-450, e conseqüente aumento na concentração de cafeína (Scott, 1986).

### **3.2. Efeitos da cafeína e seus receptores sobre as células cartilaginosas, ósseas e suas células precursoras**

A cafeína e seus metabólitos, direta ou indiretamente, são capazes de agir em vários tecidos do corpo, dentre eles os tecidos cartilaginoso e ósseo. Esse alcaloide pode influenciar o metabolismo ósseo indiretamente por aumentar a excreção urinária de cálcio (Bergman et al., 1990), podendo atuar, ainda, direta ou indiretamente sobre a viabilidade e a atividade de síntese dos osteoblastos e condrócitos (Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010; Choi et al., 2016), ou sobre a diferenciação das células precursoras (Liu et al., 2011).

Culturas de osteoblastos tratadas com diferentes concentrações de cafeína (0,4 a 10mM) podem morrer não somente por apoptose, mas também por necrose. Além disso, há menor expressão de genes, enzimas e proteínas que são naturalmente expressos durante a osteogênese, como o Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, histona, bem como receptores para vitamina D (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). Acredita-se que a interação da cafeína com os receptores para vitamina D em osteoblastos possa ser um possível mecanismo pelo qual ela afeta o tecido ósseo, em virtude desta vitamina apresentar importante papel no controle do metabolismo do cálcio (Rapuri et al., 2007). É importante ressaltar que culturas de osteoblastos expostos a concentrações inferiores a 0,4 mM não apresentam alterações relevantes (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008).

Além disso, pesquisadores observaram que em culturas de células osteoblásticas, a cafeína também amplifica a atividade transcricional dos receptores para glicocorticoides (Föcking et al., 2005), induzindo supressão do crescimento celular, além de aumentar indiretamente a sensibilidade aos glicocorticoides, o que seria outro mecanismo proposto para a apoptose dessas células (Ogawa et al., 2002). Esses estudos *in vitro* corroboram com estudos *in vivo* que verificaram que altas doses de cafeína (100 mg/Kg) aumentam os níveis plasmáticos de cortisol de ratas mães, o que está relacionado às alterações mais intensas na esqueletogênese da prole (Tan et al., 2012; Reis et al., 2014).

Recentemente, pesquisadores observaram também o efeito de diferentes concentrações de cafeína (0,1 a 1mM) sobre culturas de condrócitos. Essas células apresentaram redução da atividade de síntese, com redução da expressão de importantes constituintes da matriz condrogênica como agregano, colágeno tipo II e X, fosfatase alcalina, além de inibição da mineralização. Esses efeitos foram em parte mediados pela interação direta da cafeína com os receptores para adenosina tipo 1 presentes nos condrócitos, uma vez que o bloqueio desses receptores promoveu efeitos negativos, porém mais atenuados (Choi et al., 2016). Além disso, estudos já comprovaram que condrócitos produzem adenosina endogenamente que regula a homeostase da matriz da cartilagem articular (Tesch et al., 2004) e que a depleção de receptores para adenosina estimulam a degradação da matriz (Varani et al., 1999; Ribeiro e Sebastião, 2010). Dessa forma, evidenciou-se que a cafeína atua diretamente antagonizando os receptores para adenosina tipo 1 presentes nas superfícies dos condrócitos, mas também pode atuar direta ou indiretamente sobre outros receptores ou fatores, que ainda necessitam ser elucidados.

Em células precursoras, doses de cafeína ( $\geq 0,1$  mM), suprimem a diferenciação osteogênica de CTMs extraídas da medula óssea e do tecido adiposo, diminuindo a viabilidade celular, mineralização, a atividade da fosfatase alcalina, e a regulação de genes da matriz óssea, tais como osteocalcina, osteoprotegerina e Runx-2 (Zhou et al., 2010; Su et al., 2013). Em baixa concentração (0,1 mM), também já é possível observar morte celular por necrose e apoptose, dessa forma, as CTMs são mais sensíveis que os osteoblastos ao serem expostos à mesma concentração de cafeína (Zhou et al., 2010). Com relação aos condrócitos, mais estudos são necessários para comparar sua sensibilidade à cafeína, uma vez que não há relatos sobre os efeitos desse alcaloide sobre a diferenciação condrogênica de CTMs.

Há vários relatos sobre os efeitos da cafeína sobre o tecido ósseo e suas células (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008), mas poucos estudos sobre seu efeito no tecido cartilaginoso. Sabe-se que o consumo de cafeína pelas ratas durante a gestação e a lactação afeta as cartilagens de crescimento da prole (Tan et al., 2012; Reis et al., 2014), pois a cafeína, que é transferida da mãe para o filhote, promove a desorganização das zonas da placa epifisária, bem como degeneração e morte de condrócitos e deficiência dos glicosaminoglicano da matriz condrogênica (Reis et al., 2014; Choi et al., 2016). Além disso, redução do comprimento dos ossos e da densidade óssea também têm sido observada (Huang et al., 2002; Reis et al., 2014; Shin et al., 2015).

Postula-se que a cafeína possa afetar a osteogênese e a condrogênese por meio das vias de sinalização, ligação a receptores para adenosina e rianodina ou modulando tantos outros receptores expressos em osteoblastos, condrócitos e células osteocondroprogenitoras, dentre eles os receptores para vitamina D, glicocorticoides, insulina, estrógeno e andrógeno, glutamato e os receptores adrenérgicos (Shi et al., 1993; Ogata et al., 2000; Föcking et al., 2005; Cake e Litwack, 1978; Rapuri et al., 2007; Rauch et al., 2010; Egawa et al., 2011; Xu et al., 2012; Xie

et al., 2013; Yamada-Fowler et al., 2014; Hirai et al., 2014; Melville et al., 2014; Wang et al., 2014). Apesar desses receptores, modulados pela cafeína, exercerem funções importantes durante a diferenciação das células ósseas e cartilaginosas (Taylor, 2002; Wiren et al., 2002; Ferron et al., 2010; Cuscito et al., 2011; Donatti et al., 2011; Wang et al., 2014), pouco se sabe sobre o papel desses receptores em mediar a ação da cafeína nas alterações da formação e do crescimento ósseo endocondral. Mas, é possível que sua ação por meio desses receptores seja de forma indireta através da estimulação ou inibição de hormônios ou moléculas sinalizadoras (Ogawa et al., 2002; Komori et al., 2008; Zhou et al., 2009; Xu et al., 2012; Lu et al., 2013).

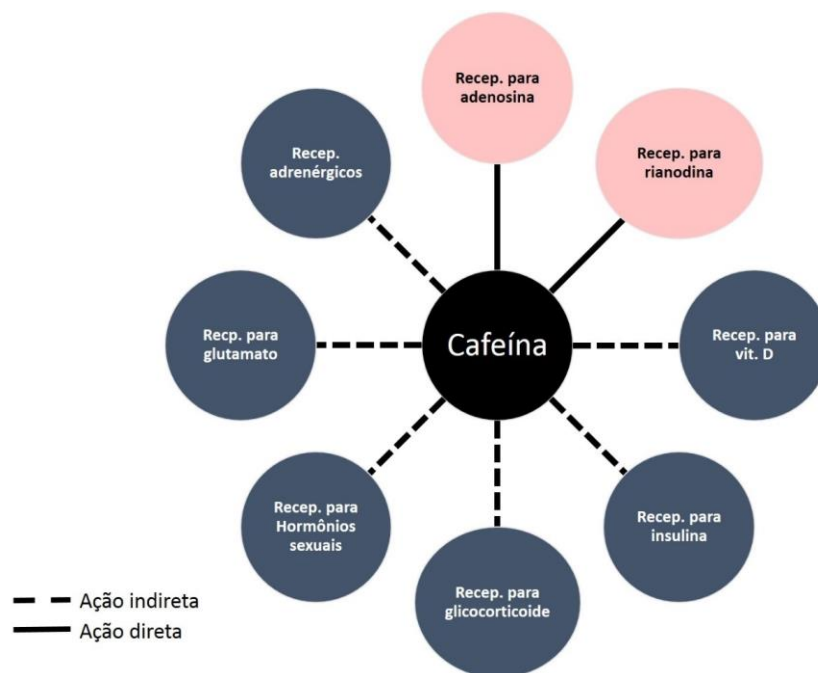


Figura 3. Esquema demonstrativo da ação direta e indireta da cafeína sobre receptores importantes durante a diferenciação das células ósseas e cartilaginosas.

No entanto, sabe-se que a diferenciação osteogênica e condrogênica são controladas primariamente por genes como o *Cbfa1/Runx-2* e *Sox-9*, respectivamente (Ducy et al., 1997) e que estes processos podem ser regulados por um segundo mensageiro, o cAMP (Tintut et al., 1999; Yang et al., 2008; Carroll et al., 2013). Além disso, já está bem estabelecido que a cafeína atua diretamente antagonizando receptores para adenosina, inibindo a fosfodiesterase e promovendo a ativação da via da proteína quinase A (PKA) com consequente aumento de cAMP intracelular (Zhou et al., 2009; Ribeiro e Sebastião, 2010). Dessa forma, postula-se que a cafeína por meio da via do cAMP possa regular a expressão dos genes *Runx-2* e *Sox-9*, essenciais durante o processo da diferenciação osteogênica e condrogênica, alterando a taxa de proliferação e diferenciação dessas células, bem como afetando a hipertrofia de condrócitos, a invasão vascular e consequentemente a formação óssea (Zhou et al., 2009).

Os receptores para adenosina, são um tipo de receptor purinérgico acoplado à proteína G que exercem sua ação via sinalização por AMP cíclico (Carroll et al., 2013). Dentre os tipos de receptores para adenosina predominam os receptores para adenosina A2B (A2BAR). Esses

receptores são expressos em CTMs (Costa et al., 2011; Gharibi et al., 2011), células osteoprogenitoras (Evans et al., 2006) e condrócitos (Koolpe et al., 1999).

Estudos *in vitro* com CTMs de humanos e ratos com ativação de receptores A2BAR após tratamento com agonistas ou adição de um análogo de AMPc demonstraram estímulo da diferenciação dos osteoblastos através da modulação de fatores de transcrição essenciais como o Runx-2, fosfatase alcalina, osterix e osteocalcina aumentando a mineralização (Gharibi et al., 2011; Carrol et al., 2012; Trincavelli et al., 2014). A deleção do receptor A2BAR em camundongos mutantes causa redução do potencial de diferenciação osteogênico com menor expressão de Runx-2, osterix e menor número de nódulos mineralizados, bem como osteopenia e atraso na recuperação de fratura óssea (Carrol et al., 2012).

A supressão da função osteoblástica pela via do cAMP se dá por meio da degradação proteolítica do Runx-2 envolvendo o mecanismo dependente de ubiquitina/ proteassoma que por sua vez é estimulado pelo paratormônio (Tintut et al., 1999). Além disso, o aumento do nível de cAMP promovido pela cafeína pode suprimir a proliferação celular, bem como a síntese de matriz extracelular por células precursoras e maduras afetando a formação óssea (Ribeiro e Sebastião, 2010). Mas se os efeitos negativos da cafeína sobre a formação óssea e sua manutenção são unicamente devido ao seu antagonismo aos receptores para adenosina ainda não foi determinado (Carrol et al., 2013).

A cafeína provoca a maioria dos seus efeitos biológicos por meio do antagonismo a todos os tipos de receptores para adenosina (ARs): A1, A2A, A2B e A3 (Varani et al., 1999; Ribeiro e Sebastião, 2010). Mas, também têm sido correlacionada com as alterações ósseas, pois além do antagonismo aos receptores para adenosina, a cafeína também inibe as fosfodiesterases (PDE) (por exemplo, a PDE1, PDE4, PDE5), promovendo a liberação de cálcio e regulando a atividade transcricional de genes como o Runx-2 e Sox-9 (Zhou et al., 2009; Ribeiro e Sebastião, 2010).

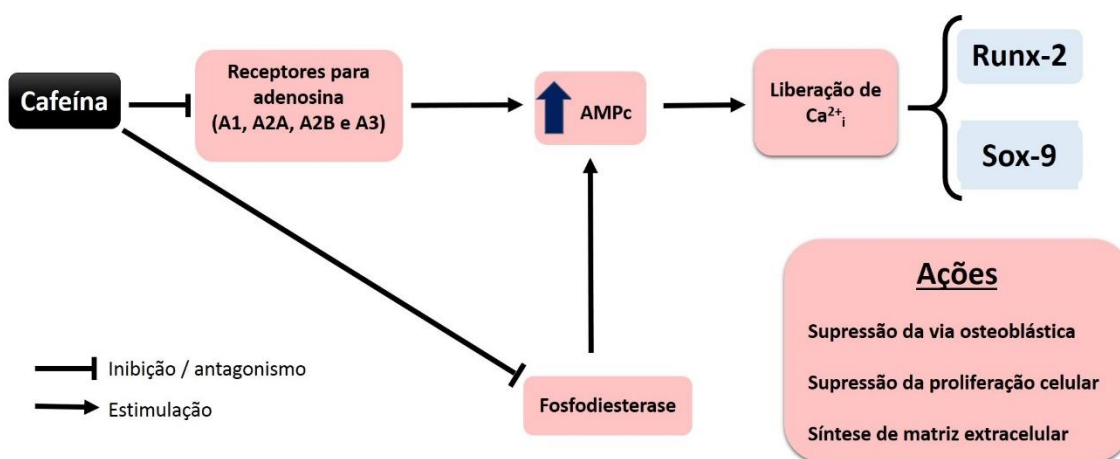


Figura 4. Esquema demonstrativo da ação da cafeína sobre os níveis de AMPc através do antagonismo a receptores de adenosina e inibição de fosfodiesterase, que por sua vez modula a expressão dos transcritps gênicos Sox-9 e Runx-2.

Sabe-se também que a cafeína tem afinidade por receptores para rianodina e que apesar desses receptores mediar canais de cálcio e estarem envolvidos na remodelação óssea, pouco se sabe sobre o seu envolvimento nas alterações da cafeína sobre a osteogênese e a condrogênese (Fill e Copello, 2002; Robinson et al., 2010). Receptores para rianodina são amplamente estudados em uma variedade de células, entre elas as células musculares (Fill e Copello, 2002). A cafeína em altas concentrações nessas células ativa os receptores para rianodina (RYR), levando à liberação de cálcio do retículo endoplasmático (Cheek et al., 1993; Riddoch et al., 2005). No tecido ósseo, apesar da sua expressão em osteoclastos (Robinson et al., 2010), não há estudos sobre sua expressão em osteoblastos, condrócitos ou em células osteocondroprogenitoras. Mas sabe-se que a expressão dos canais de cálcio têm sido relatados durante a condrogênese e a osteogênese (Shao et al., 2005; Varga et al., 2011) e que os níveis de cálcio intracelular exercem funções cruciais durante este processo, bem como na proliferação, morfologia e função celular (Berridge et al., 2000; Seo et al., 2009) sendo o retículo endoplasmático o principal compartimento de estoque do cálcio (Fill e Copello, 2002). Sabe-se também que os osteoblastos utilizam o cálcio intracelular como segundo mensageiro para modular as respostas hormonais e como um co-fator para a mineralização óssea.

Diante disso, pesquisadores têm identificado outras proteínas como a Pannexin 3 (Panx 3) na superfície de osteoblastos, de condrócitos e de células osteocondroprogenitoras, que funcionam como um canal de cálcio no retículo endoplasmático, capazes de promover a diferenciação osteoblástica e condroblástica por meio da regulação dos níveis de ATP/cAMP intracelulares, bem como de sua ativação via sinalização por receptor purinérgico/fosfoinositida-3-quinase (PI3K)/Akt, seguida por ativação da sinalização da calmodulina que é conhecida como um dos maiores mediadores da sinalização de cálcio. Panx 3 também forma junções *gap* em osteoblastos e condrócitos permitindo a propagação de cálcio entre as células (Berridge et al., 2000; Iwamoto et al., 2010; Ishikawa et al., 2011).

Estudos prévios mostraram que o bloqueio dos canais de cálcio Panx 3 e das junções *gap* inibe a diferenciação das células ósseas e cartilagenosas. Assim, Panx 3 parece ser um novo regulador multifuncional que promove a diferenciação dessas células (Iwamoto et al., 2010; Ishikawa et al., 2011). Outras proteínas como a adrenomedulina (ADM) também interferem com o influxo de cálcio promovendo o crescimento e a proliferação de osteoblastos, e o aumento da massa óssea (Tazaki et al., 2012).

## **CAPÍTULO 2**

### **(Experimento 1)**

#### **Inibição da diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais da prole de ratas tratadas com cafeína durante a gestação e lactação**

*(publicado em Connective Tissue Research)*

*Anexo 1*

#### **Resumo**

Este estudo avaliou a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais (CTMs) extraídas da prole ao desmame de ratas tratadas com cafeína durante a gestação e lactação. 24 ratas Wistar adultas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, sendo um controle e três grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. A cafeína foi diluída em água destilada e administrada para as mães por sonda oro-gástrica por toda a gestação e lactação. Ao desmame, três filhotes com 21 dias de idade de cada fêmea e de cada grupo foram eutanasiados para extração das células da medula óssea para realização dos ensaios *in vitro*. Culturas de CTMs dos quatro grupos em sextuplicata foram submetidas aos seguintes ensaios: teste de viabilidade celular pelo MTT e atividade da fosfatase alcalina por ensaios colorimétricos aos sete, 14 e 21 dias. Culturas de CTMs de todos os grupos também foram cultivadas em sextuplicata sob lamínulas e coradas pela técnica de Von Kossa para determinação da porcentagem de CTMs/campo e para a avaliação da síntese de nódulos mineralizados aos 21 dias. Também foi realizada a avaliação da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 pela técnica qRT-PCR, aos 21 dias de cultivo, em quadruplicata. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). As doses de 50 e 100mg/Kg de cafeína reduziram significativamente a atividade da fosfatase alcalina em todos os períodos estudados e a expressão relativa de colágeno tipo I aos 21 dias. Mas a expressão dos transcritos gênicos para fosfatase alcalina, Runx-2 e sialoproteína óssea e a síntese dos nódulos mineralizados reduziram significativamente em todos os grupos tratados com cafeína. A expressão de osteocalcina somente reduziu significativamente no grupo tratado com 50mg/Kg de cafeína. Conclui-se que a cafeína que passa da mãe para a prole durante a gestação e lactação reduz a diferenciação osteogênica das CTMs. Postula-se que essa redução no potencial osteogênico de CTMs possa estar envolvida na gênese da osteopenia decorrente do consumo de cafeína.

Palavras-chave: Células tronco mesenquimais, cafeína, gestação, lactação, rata



## Introdução

As células tronco mesenquimais (CTMs) são células precursoras encontradas na medula óssea e em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos (Minguell et al., 2000), bem como do sangue, fígado e medula óssea do feto (Campagnoli et al., 2001). Por serem células multipotentes capazes de se diferenciar em diversas linhagens celulares como condrócitos, osteócitos e adipócitos (Friedenstein et al., 1974; Minguell et al., 2000), estas células têm sido muito estudadas, com ênfase no potencial de regeneração de tecidos e órgãos lesados e na sua capacidade de modular a resposta imunológica (Minguell et al., 2000; Abdi et al., 2008).

No entanto, poucas pesquisas tem estudado a participação das CTMs na gênese de doenças ósseas metabólicas (Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). Por isso, muitas questões sobre a biologia das CTMs, bem como da sua participação na gênese de doenças ósseas ainda necessitam ser elucidadas. São vários os agentes causadores de doenças ósseas em jovens e adultos. A cafeína é um desses fatores que pode comprometer o tecido ósseo desde sua formação na vida pré-natal até a vida adulta, sendo portanto considerada teratogênica e um dos agentes envolvidos na gênese da osteoporose humana (Scott et al., 1983; Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Reis et al., 2014).

A cafeína têm sido muito estudada por ser um alcaloide natural amplamente consumido por homens e mulheres, inclusive no período gestacional (Dews, 1982; Reissing et al., 2009). Esse composto através da placenta e do leite, pode passar para a prole (Tyrala e Dodson, 1979) e causar alterações teratogênicas nos ossos de fetos (Scott, 1983) e alterações no crescimento ósseo endocondral de ratos lactantes, caracterizadas por degeneração e necrose dos condrócitos das cartilagens de crescimento, bem como redução da massa óssea (Huang et al., 2002; Reis et al., 2014; Tan et al., 2012).

A adição de cafeína em culturas de CTMs inibe a diferenciação osteogênica (Tassinari et al., 1991; Zhou et al., 2010). Porém não há estudos que tenham verificado a diferenciação osteogênica de CTMs da prole de indivíduos que receberam a cafeína *in vivo*, levando em consideração o metabolismo do fármaco.

Portanto, por serem as CTMs responsáveis por originar todo o esqueleto e por sua capacidade de autorenovação (Friedenstein et al., 1974), estas células poderiam ser alvo da cafeína, culminando com as alterações ósseas encontradas em neonatos e lactentes de mães que receberam cafeína (Reis et al., 2014).

Além disso, um estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em que neonatos e lactentes de ratas tratadas com as mesmas doses de cafeína do presente estudo, 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram inibição da ossificação endocondral, de uma forma dose-dependente (Reis et al., 2014). Observou-se nesses animais uma redução de peso e comprimento dos ossos longos e vértebras bem como alterações na morfologia dos condrócitos na cartilagem articular e placas epifisárias. Osteopenia também estava presente (Reis et al., 2014).

A partir dos efeitos observados *in vivo* sobre a morfologia dos ossos da prole, iniciamos os estudos sobre a diferenciação osteogênica de CTMs derivadas da prole de ratas tratadas com cafeína nas mesmas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação, na tentativa de elucidar alguns mecanismos pelos quais as alterações ósseas ocorreram. Diante disso, o objetivo

foi estudar a diferenciação osteogênica das CTMs da medula óssea da prole de ratas tratadas com cafeína durante toda a gestação e lactação.

## **Material e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo n.º. 177/2010) (*Anexo 2*).

### ***Acasalamento e formação dos grupos experimentais***

Foram utilizadas 24 ratas Wistar com dois meses de idade, separadas, ao acaso, em quatro grupos, sendo três grupos tratados com cafeína e um grupo controle. As ratas foram alojadas em caixas plásticas (6 animais/caixa) onde receberam a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 30 dias de adaptação, todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para monitorar o ciclo estral. As que se apresentaram em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas. Após esse período, foram realizados esfregaços vaginais diariamente para detecção de espermatozoides (Marcondes et al., 2002). A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal, sendo este dia considerado dia zero de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais dos grupos tratados e controle receberam diariamente, por sonda oro-gástrica, cafeína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em 5 mL de água destilada, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg que foi administrada por todo o período experimental (gestação e lactação). Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada como placebo também administrada por sonda oro-gástrica.

Ao desmame, ou seja aos 21 dias de idade, três filhotes de cada fêmea e de cada grupo foram eutanasiados para extração das CTMs da medula óssea, sendo realizado um *pool* de todas as células por grupo para realização dos ensaios *in vitro*.

### ***Extração e cultivo de CTMs da medula óssea***

A extração das CTMs da medula óssea foi realizada conforme protocolos previamente estabelecidos (Ocarino et al., 2008).

As células estromais da medula óssea foram isoladas dos fêmures e tíbias dos animais de todos os grupos experimentais. Os fêmures e as tíbias foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos adjacentes e as epífises foram retiradas, de forma asséptica, para obtenção da medula óssea da diáfise.

A medula óssea foi lavada com Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco, Grand Island, NY). As células isoladas foram ressuspensas em DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco), antibióticos [gentamicina (60mg/L), penicilina (100U/mL), estreptomicina (10µg/mL) e anfotericina B (250µg/L) (Merck, Alemanha)] e cultivadas em

garrafas T75. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 3 dias. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

### ***Caracterização fenotípica das CTMs por citometria de fluxo***

Após o quarto repique as células foram tripsinizadas, e centrifugadas por 10 minutos a 1400g e ressuspendidas em concentração de  $1 \times 10^6$  células/poço, em solução tampão de fosfato padrão (PBS) 0,15M estéril (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Alíquotas de células em triplicata foram incubadas com anticorpo primário e controle sem marcação por 30 min a 4°C. As células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo secundário conjugado com fluoróforo por 30 min a 4 °C.

As amostras foram analisadas utilizando um citómetro FACScan (Becton Dickinson), e os dados foram analisados utilizando o software CellQuest (Becton Dickinson). Os anticorpos utilizados foram, anti-CD11, anti-CD34, anti-CD90 (clone Ox-7 mouse), anti-CD73 (clone 5 F/B9 mouse), anti-RT1A e antiCD54 (clone 1A29 mouse) (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA).

### ***Cultivo das CTMs em meio de diferenciação osteogênico***

Após o quarto repique as células foram tripsinizadas, contadas e cultivadas em placas de 6 e 24 poços ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) até atingir a confluência de 80-90%. As células foram cultivadas em meio osteogênico que consiste de DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco), gentamicina (60mg/L), penicilina (100U/mL), estreptomicina (10µg/mL) e anfotericina B (250µg/L), ácido ascórbico (50µg/mL), β-glicerofosfato (10mM) (Merck, Germany) e dexametasona (10nM) (Sigma). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por sete, 14 e 21 dias. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

### ***Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan***

O ensaio de redução do MTT em cristais de formazan mensura a viabilidade celular. Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), as CTMs dos lactentes de todos os grupos cultivados em placas de 24 poços foram submetidos ao teste de redução do MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]*} (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com SFB em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL). A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-10% HCl (Synth, São Paulo, SP, Brazil) que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm (Lu et al., 2008; Su et al., 2013). A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo experimental.

### ***Avaliação da atividade da fosfatase alcalina***

Aos sete, 14 e 21 dias, as CTMs dos lactentes de todos os grupos cultivados em placas de 24 poços foram lavadas com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIP/NBT (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {nitro-blue tetrazolium chloride} e 3,3µL de BCIP {5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate p-toluidine salt}) (Invitrogen, Camarilho, CA, USA). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi adicionado 210µL de solução detergente SDS 10% HCl (Synth, São Paulo, SP, Brazil) para incubação *overnight*. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm (Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

### ***Avaliação da síntese de nódulos mineralizados e porcentagem de área coberta por CTMs/campo***

Aos sete, 14 e 21 dias, as CTMs dos lactentes de todos os grupos cultivados em placas de seis poços com lamínulas 22 x 22 mm estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e fixadas com paraformaldeído a 4% (Synth, São Paulo, SP, Brazil) por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa para avaliação do número de nódulos/campo. Após a adição de solução de nitrato de prata (Synth, São Paulo, SP, Brazil) a 5%, os poços foram expostas à luz durante 2 h. As placas foram lavadas com água deionizada, e o nitrato de prata residual foi neutralizado por tiosulfato de sódio a 5% (Synth, São Paulo, SP, Brazil). As células foram contracoradas com eosina. O número de nódulos mineralizados e a porcentagem de área coberta pelas CTMs foram avaliados por microscopia de luz. O número de nódulos foi quantificado em 50 campos usando objetiva 10x. A porcentagem de área coberta pelas CTMs foi quantificada em 50 campos em objetiva de 10x utilizando uma graticula, sobreposta à secção histológica, com 121 pontos. A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

### ***Expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***

Foi realizada a avaliação quantitativa da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina, e Runx-2 pela técnica de qRT-PCR nas culturas de CTMs de todos os grupos aos 21 dias de cultivo. A extração do RNA das células cultivadas foi realizada pelo uso do Trizol (Gibco), de acordo com as instruções do fabricante. 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada em um termociclador Smart Cycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA) por 120s a 50°C, seguido pelas reações de PCR no equipamento Applied Biosystems 7.500 com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 s a 95°C e 30s a 60°C. No final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT.

A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde os valores das amostras foram calculadas em relação a valores de GAPDH C<sub>i</sub>. Os iniciadores específicos utilizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes e sequências de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR

<b>Gene</b>	<b>Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')</b>	<b>Nº acesso</b>
GAPDH	<i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM 002046
Colágeno tipo I	<i>foward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG <i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG	NM 000088
Osteocalcina	<i>foward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT <i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG	NM 013414.1
Sialoproteína óssea	<i>foward</i> : TGTCCTTCTGAACGGGTTTC <i>reverse</i> : CTTCCCATACTCAACCGTG	NM 012587.2
Osteopontina	<i>foward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT <i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA	AB001382
Fosfatase Alcalina	<i>foward</i> : CTAGTTCCTGGGAGATGGTA <i>reverse</i> : GTGTTGTACGTCTTGGAGAGA	AC_000073.1
Runx-2	<i>foward</i> : GCGTCAACACCATCATTCTG <i>reverse</i> : CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348

## **Análise Estatística**

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK) (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

## **Resultados**

### ***Caracterização fenotípica das CTMs por citometria de fluxo***

A fenotipagem das células extraídas da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle foram compatíveis com as de CTMs, de acordo com as características propostas pelo “Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” (Schäffler e Büchler, 2007). No entanto, as CTMs da prole ao desmame cujas mães foram tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram diferenças significativas em alguns marcadores com relação ao controle, apesar desses valores estarem de acordo com os valores propostos pelo Comitê Internacional. Apenas a expressão do CD11 nas células dos grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg foi bem superior à dos demais grupos (Figura 1).

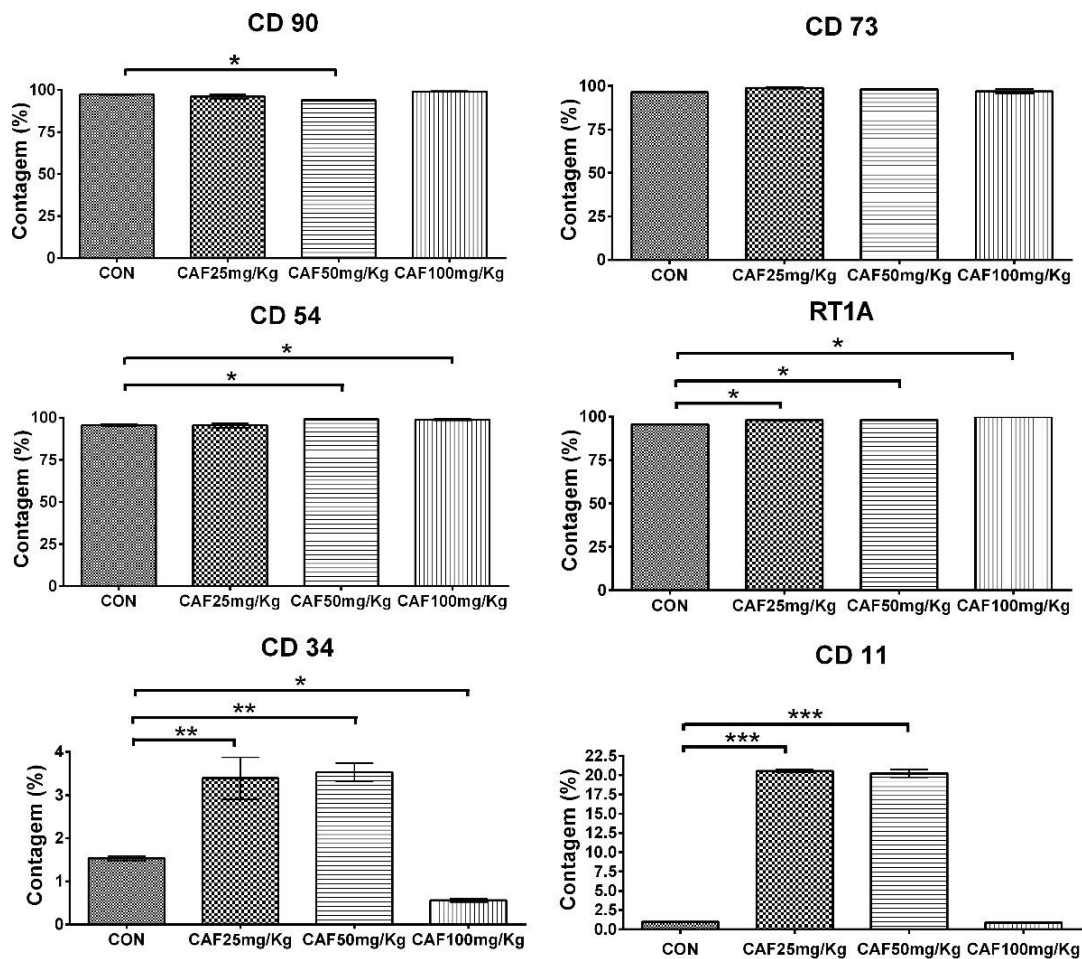


Figura 1. Caracterização fenotípica pela expressão de CD90, CD73, CD54, RT1A, CD34 e CD11 por citometria de fluxo em CTMs indiferenciadas da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio DMEM. \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### *Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan*

Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram maior redução do MTT em cristais de formazan, em comparação ao grupo controle. Aos 14 e 21 dias somente os grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg continuaram apresentando maior redução do MTT em cristais de formazan, em comparação ao controle (Figura 2).

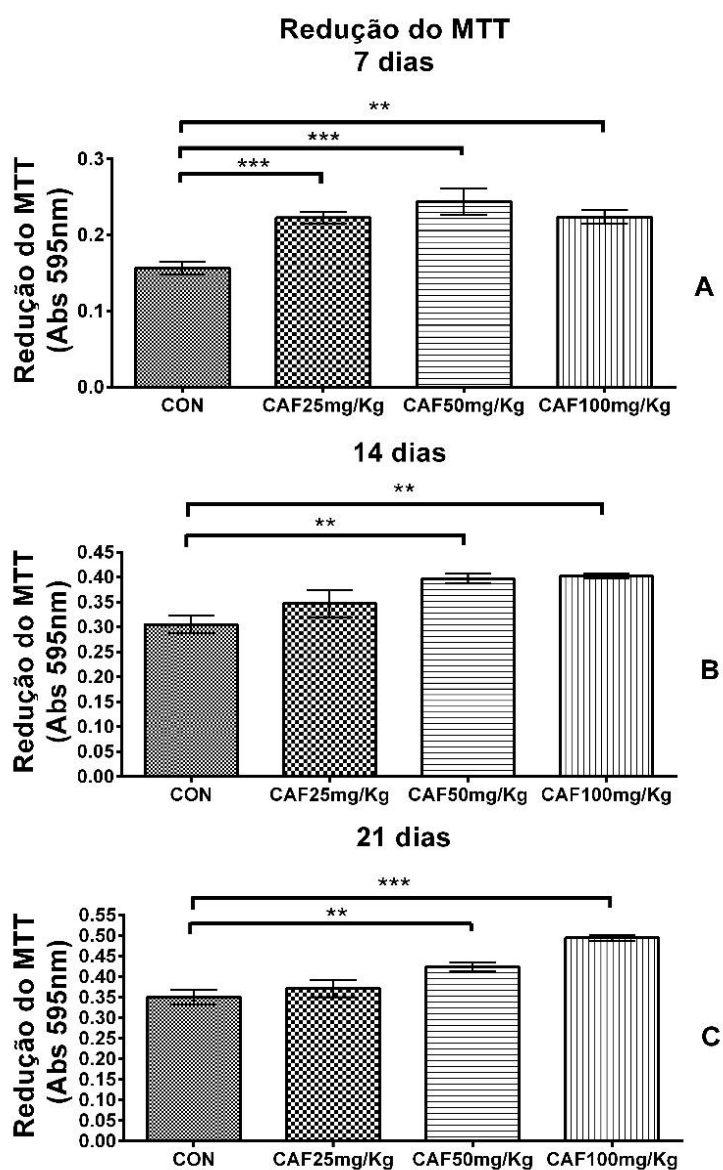


Figura 2. Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### *Avaliação da atividade da fosfatase alcalina*

Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao controle. Aos 14

dias somente os grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao grupo controle. Mas, aos 21 dias, semelhante aos sete dias, todos os grupos tratados com cafeína (25, 50 e 100 mg/Kg) apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao controle (Figuras 3 e 4).

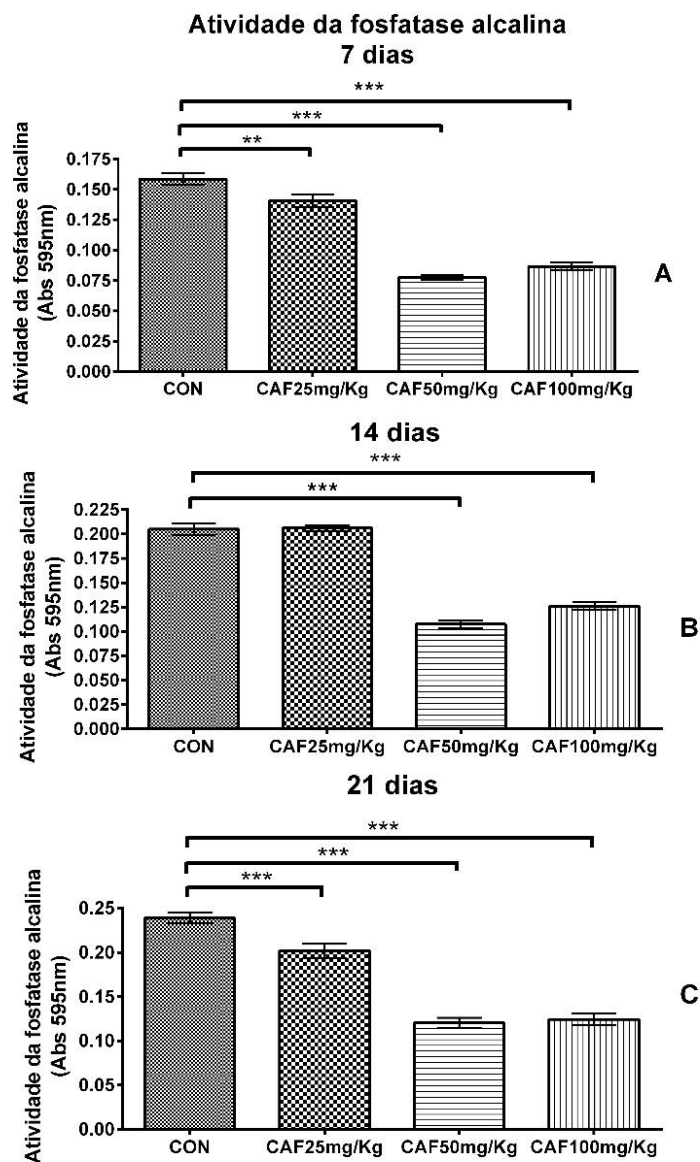


Figura 3. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) de culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A), 14 (B) e 21 (C) dias. \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.



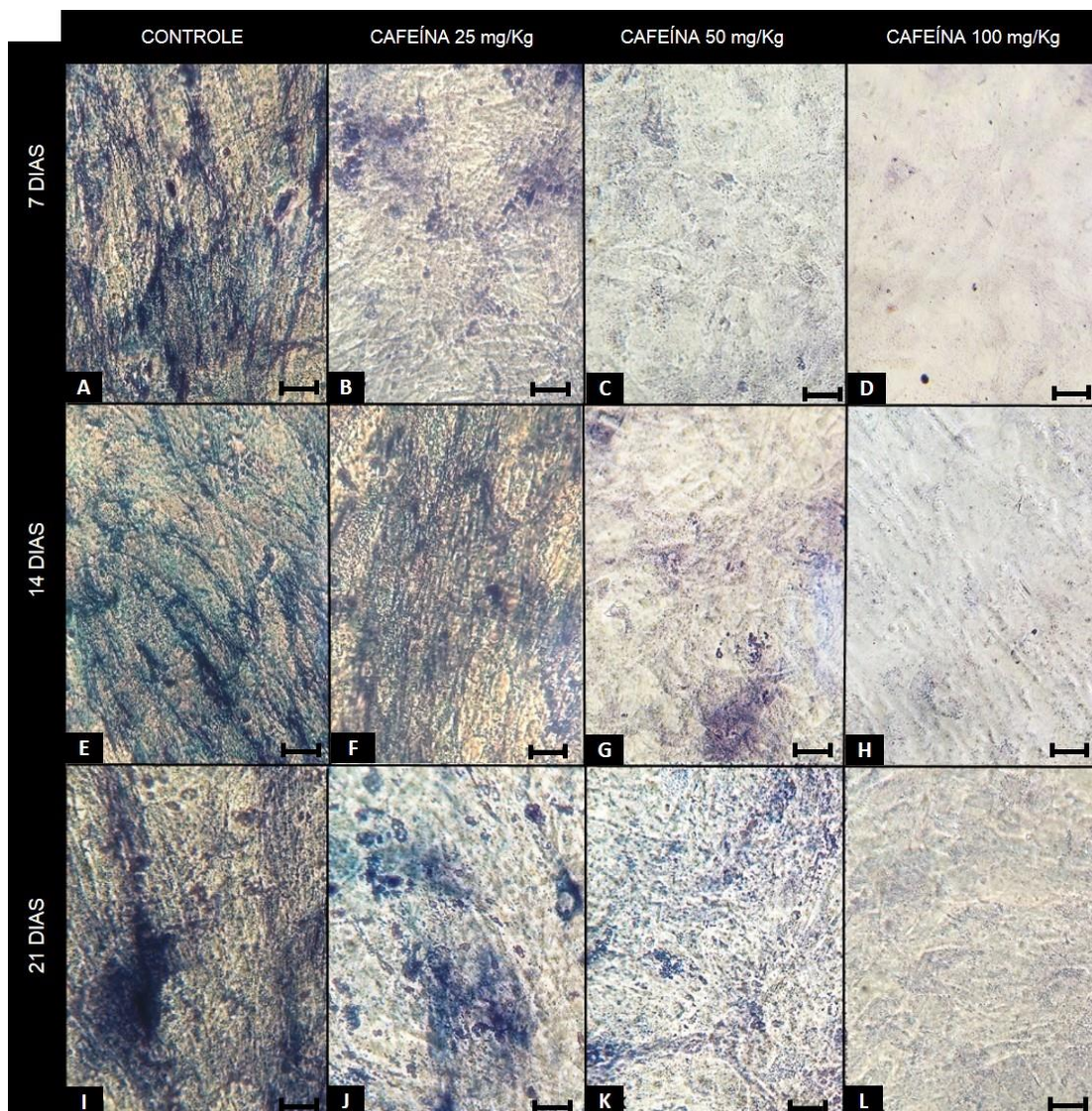


Figura 4. Fotomicroscopia da atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratos controle e tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete (A,B,C,D), 14 (E,F,G,H) e 21 (I,J,K,L) dias. Bar: 58,5  $\mu$ m.

#### *Porcentagem de área coberta por CTMs/campo*

Aos 21 dias, somente o grupo tratado na dose de 100 mg/Kg apresentou redução significativa da porcentagem de área coberta por células/campo em comparação ao controle (Figura 5).

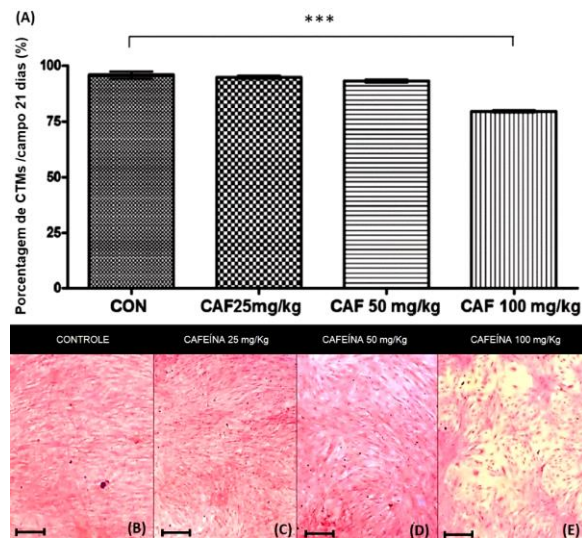


Figura 5. Porcentagem de área coberta por CTMs/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias. Bar: 58,5  $\mu$ m. \*\*\* p <0,001.

#### *Avaliação da síntese de nódulos mineralizados*

Aos 21 dias, todos os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram número de nódulos mineralizados significativamente menor em comparação ao controle (Figura 6).

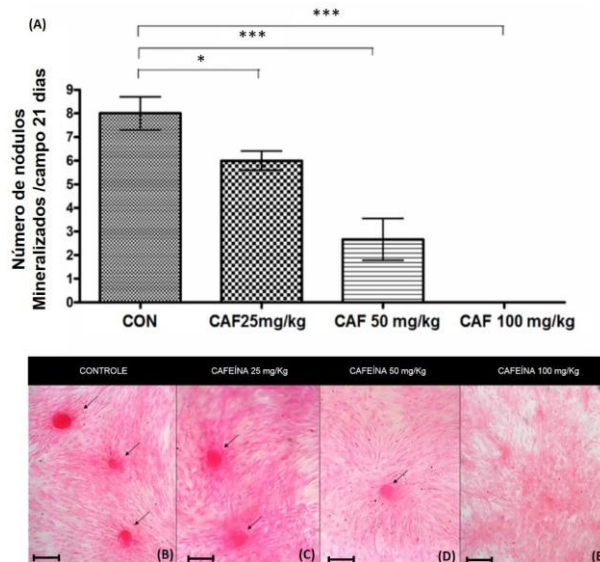


Figura 6. Número de nódulos mineralizados/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg durante a gestação

e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias de cultivo. Bar: 58,5  $\mu$ m. \* $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

**Expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 pelo qRT-PCR**

Aos 21 dias, somente o grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg apresentou menor expressão de osteocalcina pelas CTMs em comparação ao controle (Figura 7). No entanto, todos os grupos tratados apresentaram expressão de sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, e Runx-2 significativamente menor em comparação ao controle (Figura 7). Menor expressão de colágeno tipo I foi observada apenas no grupo tratado com a dose de 50 mg/Kg de cafeína (Figura 7). Com relação à expressão de osteopontina, não houve diferença significativa entre grupos (Figura 7).

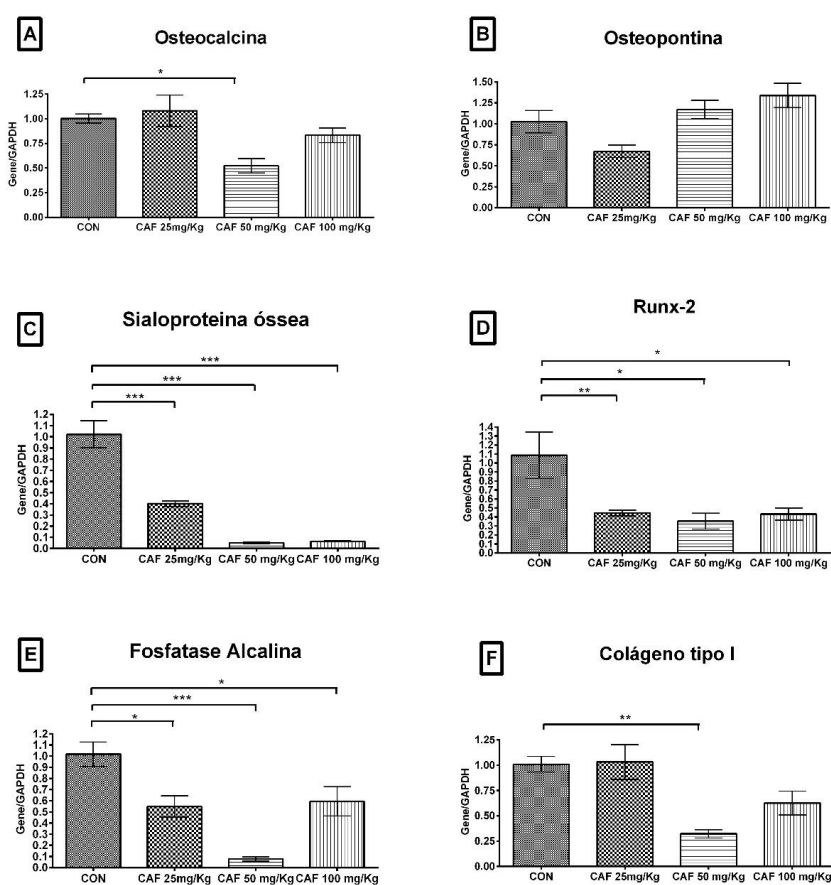


Figura 7. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (A), osteopontina (B), sialoproteína óssea (C), Runx-2 (D), fosfatase alcalina (E) e colágeno tipo I (F) pela técnica de qRT-PCR em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico por 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Em resumo, as culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram variações na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, bem como na expressão gênica dos fatores da diferenciação osteogênica, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 em relação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos efeitos da cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina (ALP), porcentagem de CTMs e nódulos/campo, e na expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 em comparação com o grupo controle.

	CAF 25mg/Kg			CAF 50mg/Kg			CAF 100mg/Kg		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Redução MTT	↑	-	-	↑	↑	↑	↑	↑	↑
Atividade ALP	↓	-	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
(%) CTMs/campo			-			-			↓
Nódulos			↓			↓			↓
Osteocalcina			-			↓			-
Osteopontina			-			-			-
Sialoproteína óssea			↓			↓			↓
Colágeno tipo I			-			↓	-	-	-
ALP			↓			↓			↓
Runx-2			↓			↓			↓

\*(-): sem diferença significativa; ↑ aumentou significativamente; ↓ diminuiu significativamente; (-): Não foi mensurado.

## Discussão

A caracterização fenotípica das células extraídas da medula demonstrou que, independente do grupo, estas apresentaram características semelhantes e compatíveis com a de CTMs, ou seja, entre outras moléculas expressaram CD54, CD73, CD90 e RT1A e quase não expressaram CD11 e CD34 (Pittenger et al., 1999; Schäffler e Büchler, 2007). No entanto, a elevada expressão de CD11 evidenciada nas CTMs dos grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg é importante de ser analisada. Essa molécula está envolvida com resposta imunológica, além de ser expressa em células endoteliais (Pittenger et al., 1999; Bobis et al., 2006).

Não há estudos que tenham verificado alterações na fenotipagem de CTMs pela cafeína, no entanto, estudos prévios têm mostrado que em outras células como as da microglia e astroglia provenientes de camundongos machos adultos tratados com 3,4 methylenedioxymethamphetamine associada à cafeína ocorre aumento de marcadores de membrana como o CD11 (Khairnar et al., 2010), evidenciando o envolvimento destas drogas na resposta imunológica.

Na maioria dos estudos, a droga é adicionada *in vitro* posteriormente a realização da caracterização fenotípica (Liu et al., 2011; Su et al., 2013). No presente estudo, como a cafeína foi administrada *in vivo*, ou seja anteriormente à coleta das CTMs, foi possível observar o efeito da cafeína sobre a fenotipagem dessas células. Estudos com indução de hipertireoidismo associado à ovariectomia também demonstraram alterações na expressão de marcadores de membrana das CTMs, porém diferente do presente estudo, observou-se redução significativa de CD 73 (Boeloni, et al 2013).

Com relação aos demais marcadores utilizados no presente estudo, não há pesquisas que tenham verificado que a cafeína possa causar alterações da fenotipagem em outras células, mas estudos prévios tem demonstrado que exposição crônica à cafeína em ratas gestantes diminui a expressão de proteínas de membrana celular como a proteína glial fibrilar ácida (GFAP) nos astrócitos, além de aumentar a expressão de receptores para adenosina A2A (Ballesteros-Yáñez et al., 2012). Em humanos, a cafeína aumenta a expressão de receptores para rianodina em células renais embrionárias (Querfurth et al 1998), e diminui a expressão de receptores para vitamina D em osteoblastos (Rapuri et al., 2007), demonstrando assim a ação da cafeína sobre as proteínas da membrana celular.

Estudos prévios têm demonstrado que a cafeína pode ser um agente maléfico para as culturas de CTMs e de osteoblastos (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008; Su et al., 2013), sendo considerada um fator de risco para fraturas ósseas osteoporóticas (Macedo et al., 2012), doenças periodontais (Kamagata-Kiyoura et al., 1999) e malformações fetais (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991; Reis et al., 2014). Mas, este parece ser o primeiro estudo sobre o potencial osteogênico de CTMs extraídas da prole ao desmame de mães tratadas com cafeína durante a gestação e a lactação.

Após determinar a pureza das CTMS estas foram cultivadas em meio osteogênico para estimular sua diferenciação, que foi avaliada por meio de vários parâmetros como a atividade de fosfatase alcalina, expressão de transcritos gênicos como Runx-2, síntese e mineralização da matriz extracelular. O Runx-2 é necessário para a diferenciação das células progenitoras em



osteoblastos (diferenciação osteogênica), além de ser um fator regulador das proteínas colagênicas e não colagênicas que desempenham papel chave nas diferentes etapas da diferenciação da matriz extracelular (Ducy et al., 1997; Nefussi et al., 1997; Tsuang et al., 2006; Vaes et al., 2006; Muioli et al., 2007), enquanto que a fosfatase alcalina é um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006), por isso a importância de serem avaliados.

Os resultados foram interessantes, pois a cafeína diminuiu o potencial osteogênico das CTMs extraídas da medula óssea da prole, em todas as doses utilizadas e de forma dose-dependente, caracterizada pela diminuição da atividade da fosfatase alcalina e de nódulos mineralizados e pela diminuição da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina, colágeno tipo I e Runx-2.

Outros pesquisadores observaram que a concentração de cafeína adicionada ao meio de cultura pode influenciar na resposta sobre a diferenciação osteogênica das CTMs (Su et al., 2013). Em CTMs provenientes tanto da medula óssea quanto do tecido adiposo, baixas concentrações de cafeína (0,1 mM) aumentam a mineralização e atividade da fosfatase alcalina, regulando genes marcadores da diferenciação como a osteocalcina, osteoprotegerina e Runx-2, enquanto que concentrações mais elevadas ( $\geq 0,3$  mM) suprimem a sua diferenciação (Su et al., 2013), semelhante ao que foi observado no presente estudo.

Em osteoblastos, pesquisadores observaram que a viabilidade e a atividade osteogênica diminuem significativamente quando expostos à diferentes concentrações de cafeína (0,4, 0,5, 1,0 e 10 mM) acrescidas ao meio de cultura, confirmados pela menor expressão de genes e enzimas expressos durante a osteogênese, como Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina e histona (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010). Já em estudos com cultivos de CTMs e de osteoblastos simultaneamente expostos à mesma dose de cafeína, constatou-se que as CTMs são mais sensíveis (Liu et al., 2011). Por isso postula-se serem essas células os alvos da cafeína no que se refere ao desencadeamento da osteoporose, embora os seus efeitos sejam dose-dependentes.

A diferença entre nosso estudo e o desses outros pesquisadores é que a cafeína aqui não foi adicionada no meio de cultura, tendo sido administrada para as mães durante a gestação e lactação e veiculada através da placenta e do leite para a prole, tendo sido nosso objetivo avaliar os efeitos da cafeína sobre o potencial de diferenciação osteogênica de CTMs que sofreram interferência da droga no organismo, levando em consideração a metabolização da droga pela mãe e sua passagem para o feto através da placenta e do leite materno.

Quando adicionada diretamente ao meio de cultivo, a cafeína têm os seus efeitos potencializados sobre as células, causando inibição da atividade de síntese dessas células pela ativação de morte celular dependente de mitocôndrias (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008).

Aos sete e 21 dias de cultivo, a atividade da fosfatase alcalina foi significativamente inferior nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína em comparação ao controle, tanto pelo ensaio colorimétrico quanto pela técnica de RT-PCR aos 21 dias. Aos 14 dias, apenas a dose de 25 mg/Kg de cafeína não apresentou diferença significativa em comparação ao controle. Como dito anteriormente, a fosfatase alcalina é um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder

et al., 1998; Payushina et al., 2006), e por isso, sua diminuição nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, sugere atraso na diferenciação osteogênica em comparação ao controle.

Nos ensaios de redução do MTT em cristais de formazan, as CTMS dos grupos que receberam 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína apresentaram maior redução. Aos sete dias de cultivo, enquanto que aos 14 e 21 dias, apenas as doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram maior redução de MTT em cristais de formazan em comparação ao controle. Postula-se que isso possa ter ocorrido não pelo aumento da viabilidade celular e sim pela ação da cafeína sobre a atividade mitocondrial das células, estimulando a expressão de citocromo oxidase c subunidades 1 e 4 (Dragicevic et al., 2012). Já está bem estabelecido que culturas de osteoblastos tratadas com diferentes concentrações de cafeína morrem não só por apoptose mas também por necrose via ativação mitocondrial (Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008; Tan et al., 2012). No entanto, o mecanismo de ação pelo qual a cafeína altera a atividade mitocondrial requer mais estudos.

Têm sido proposto que a interação da cafeína com os receptores para vitamina D em osteoblastos pode ser um possível mecanismo pelo qual ela afeta o tecido ósseo. Estudos avaliaram os efeitos de diferentes concentrações de cafeína (0,2; 0,5; 1,0 e 2,0 mM) na expressão de receptores para vitamina D em osteoblastos humanos. Foi observada redução dose-dependente na expressão desses receptores e inibição da atividade da fosfatase alcalina. Esses efeitos não foram revertidos pela adição de Vitamina D. Portanto, sugere-se que as alterações causadas pela cafeína no metabolismo ósseo seja decorrente de sua interferência com a expressão de receptores para vitamina D em células osteoblásticas (Rapuri et al., 2007). A cafeína modula vários outros receptores incluindo receptores para glicocorticoides, insulina, estrógeno e andrógeno, sendo todos eles expressos por células osteoprogenitoras e osteoblastos (Wiren et al., 2002; Föcking et al., 2005; Ribeiro e Sebastião, 2010; Ferron et al., 2010; Egawa et al., 2011; Costa et al., 2011; Sarobo et al., 2012).

Também é conhecido que a diferenciação de CTMs em osteoblastos é primariamente controlada por genes como o *cbfa1/Runx-2* (Ducy et al., 1997) e que este processo é regulado por um segundo mensageiro cAMP (Tintut et al., 1997; Yang et al., 2009). Além disso, já está bem estabelecido que a cafeína age diretamente antagonizando receptores para adenosina, inibindo fosfodiesterase e promovendo ativação da proteína quinase A (PKA) com consequente aumento de cAMP (Zhou et al., 2010; Föcking et al., 2005). Portanto, postula-se que cafeína através do cAMP pode regular a expressão do gene *Runx-2*, que é essencial durante o processo de diferenciação osteogênica, alterando portanto a taxa de diferenciação de CTMs em osteoblastos e afetando a formação óssea (Zhou et al., 2010).

A expressão dos transcritos gênicos para sialoproteína óssea, *Runx-2* e fosfatase alcalina reduziu significativamente nas CTMs de todos os grupos tratados com cafeína. Com exceção da fosfatase alcalina, a sialoproteína óssea e o *Runx-2* são indicadores da diferenciação osteogênica tardia (Aronow et al., 1990; Nefussi et al., 1997; Bellows et al., 1999). Portanto, pode-se inferir que, a redução desses transcritos seja responsável pela redução na síntese de matriz mineralizada decorrente do consumo de cafeína. É provável que esse seja um dos mecanismos pelo qual a cafeína possa estar envolvida na gênese da osteoporose humana.

Conclui-se que a cafeína que passa da mãe para a prole durante a gestação e lactação reduz a síntese de matriz mineralizada pelas CTMs por reduzir a expressão dos transcritos gênicos para fosfatase alcalina, *Runx-2* e sialoproteína óssea.

## **CAPÍTULO 3** **(Experimento 2)**

### **Potencial osteogênico de osteoblastos extraídos de ratos neonatos de mães tratadas com cafeína durante toda a gestação**

*(publicado em BMC Musculoskeletal Disorders)*  
*Anexo-3*

#### **Resumo**

Este estudo teve como objetivo pesquisar o potencial osteogênico de osteoblastos extraídos de ratos neonatos de mães tratadas com cafeína durante toda a gestação. 24 ratas Wistar adultas foram distribuídas aleatoriamente nos grupos controle e tratados com 25, 50 e 100 mg/Kg de cafeína administrada por sonda oro-gástrica por todo o período experimental (gestação). Ao nascimento, três filhotes de cada fêmea e de cada grupo foram eutanasiados para extração dos osteoblastos da calvária para a realização dos ensaios *in vitro*. Culturas de osteoblastos dos quatro grupos em sextuplicata foram submetidas aos seguintes ensaios: teste de viabilidade celular pelo MTT, atividade da fosfatase alcalina e síntese de colágeno por ensaios colorimétricos aos sete, 14 e 21 dias. Culturas de osteoblastos de todos os grupos também foram cultivadas em sextuplicata sob lamínulas e coradas pela técnica de Von Kossa para determinação da porcentagem de osteoblastos/campo e para a avaliação da síntese de nódulos mineralizados aos 21 dias. Também foi realizada a avaliação da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 pela técnica qRT-PCR, aos 21 dias de cultivo, em quadruplicata. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). Osteoblastos extraídos de filhos de ratas que receberam cafeína na dose de 50mg/Kg durante a gestação apresentaram aumento da síntese de nódulos mineralizados e dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina e colágeno tipo I. Osteoblastos extraídos de filhos de ratas que receberam cafeína nas doses de 25 e 100 mg/Kg durante a gestação apresentaram variações nos parâmetros avaliados, sendo que os osteoblastos do grupo cafeína 25 mg/Kg apresentaram aumento na síntese de colágeno e dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea. Já o grupo cafeína 100 mg/Kg apresentou aumento na síntese de colágeno e dos transcritos gênicos para osteopontina e sialoproteína óssea. Conclui-se que neonatos, filhos de ratas tratadas com cafeína na dose de 50 mg/Kg durante a gestação apresentaram osteoblastos com maior potencial osteogênico caracterizado pelo aumento da expressão de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina e colágeno tipo I e aumento da síntese de nódulos mineralizados.

Palavras-chave: Osteoblastos, cafeína, neonatos, diferenciação osteogênica, ratos



## Introdução

A cafeína (1,3,7-trimetilxantina) é um alcaloide natural farmacologicamente ativo presente em cafés, chás, refrigerantes, alimentos, e medicamentos (Dews, 1982). Apesar de existir alguns efeitos benéficos da cafeína, como redução da fadiga e efeito broncodilatador, entre outros (Smith, 2002), há muito mais relatos dos seus efeitos adversos no organismo (Nakamoto et al., 1989; Narod et al., 1991; Mandel et al., 2002; Fisone et al., 2004). Esse alcaloide é conhecido por causar insônia e ansiedade, bem como aumento da pressão arterial e do pulso. Além disso, ele é considerado um fator de risco para a osteoporose, doença periodontal e um agente causador de malformações fetais, redução do peso corporal e redução do comprimento dos ossos longos e vértebras em neonatos (Dews, 1982; Smith, 2002; Fisone et al., 2004; Nakamoto et al., 1989; Narod et al., 1991; Mandel, 2002).

A cafeína atravessa a placenta e é encontrada em quantidades substanciais no líquido amniótico, sangue do cordão umbilical, plasma e urina de neonatos, além de ser transferida pelo leite materno tanto em ratos, quanto em seres humanos (Souza e Schieri, 2005; Grosso et al., 2008; Berlin et al., 1984). Mulheres gestantes no terceiro trimestre da gravidez com baixo consumo de cafeína possuem níveis séricos médios de cafeína no sangue do cordão umbilical de 0,48 µg/mL (0-10,49 µg/mL). As mulheres gestantes com ingestão média de cafeína superior a 300 mg/dia, apresentam 2,1 µg/mL de cafeína no sangue do cordão umbilical (Grosso et al., 2008). Nos seres humanos, a ingestão materna de 36-335 mg de cafeína é encontrada no leite na concentração de 2,09-7,17 µg/mL (Berlin et al., 1984).

Estudos prévios têm demonstrado que a cafeína causa alterações nos ossos de fetos e de ratos jovens. Em fetos de ratas tratadas com doses elevadas de cafeína, têm sido observadas alterações teratogênicas como a fenda palatina, malformações de membros e a ectrodactilia (Collins et al., 1983; Scott, 1983), além de redução da massa óssea (Reis et al., 2014) e do conteúdo mineral ósseo (Nakamoto et al., 1989). Na prole de ratas tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg têm sido observada osteopenia nos ossos longos e vértebras (Reis et al., 2014). Altas doses de cafeína administradas para ratas durante a gestação e lactação, inibem o crescimento ósseo endocondral dos filhotes. Os efeitos da cafeína são mais danosos nas cartilagens de crescimento dos neonatos do que dos filhotes ao desmame (Reis et al., 2014). Em humanos, a ingestão de cafeína acima de 540 mg/dia durante a gravidez está associada à diminuição do peso e do crescimento fetal, e a ingestão de cafeína associada à tabagismo e/ou consumo de álcool pode aumentar ainda mais os efeitos maléficos sobre o feto (Bakker et al., 2010).

A gênese das alterações causadas pela cafeína, particularmente sobre o osso, ainda necessita ser mais estudada. Os efeitos da cafeína sobre o metabolismo ósseo são controversos. Alguns estudos sugerem que o consumo de cafeína tem sido associado com a redução da massa óssea, aumento do risco de fraturas e que a cafeína age diretamente aumentando a diferenciação e maturação de osteoclastos (Liu et al., 2011). Adicionalmente têm sido postulado que um dos mecanismos de ação da cafeína que altera a formação e o crescimento ósseo seja seu efeito em células tronco mesenquimais e osteoblastos (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006).

Estudos *in vitro* apontam a cafeína como um agente potencialmente maléfico para os osteoblastos, causando redução da viabilidade e da atividade de síntese dessa célula (Tassinari

et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). A cafeína pode influenciar a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais (Su et al., 2013). Baixas doses (0,1 mM) no meio de cultivo pode aumentar a mineralização, a atividade da fosfatase alcalina e os genes da diferenciação como osteocalcina, osteoprotegerina e Runx-2, enquanto que altas doses ( $\geq 0,3$  Mm) pode suprimir a diferenciação (Su et al., 2013).

A maioria dos estudos tem investigado os efeitos diretos da adição de cafeína em cultura de células-tronco mesenquimais e de osteoblastos (Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). Mas, este parece ser o primeiro estudo que teve como objetivo pesquisar o potencial osteogênico de osteoblastos extraídos de ratos neonatos de mães tratadas com diferentes doses de cafeína durante toda a gestação, por meio da avaliação de parâmetros como atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, expressão gênica de Runx-2, proteínas colagênicas e não colagênicas (osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea) e a síntese e a mineralização da matriz extracelular.

## **Material e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo n.º. 177/2010) (*Anexo 2*).

### ***Acasalamento e formação dos grupos experimentais***

Foram utilizadas 24 ratas Wistar com dois meses de idade, separadas, ao acaso, em quatro grupos, sendo três grupos tratados com cafeína e um grupo controle. Os animais foram alojados em caixas plásticas (6 animais/caixa) onde receberam a mesma ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum*. As ratas foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 30 dias de adaptação, todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para monitorar o ciclo estral (Marondes et al., 2002). As que se apresentaram em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas numa proporção de quatro fêmeas para um macho. Após esse período, foram realizados esfregaços vaginais diariamente para detecção de espermatozoides. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozoides na citologia vaginal, sendo este dia considerado dia zero de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais dos grupos tratados receberam diariamente, por sonda oro-gástrica, cafeína (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluída em 5 mL de água destilada, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg que foi administrada por todo o período gestacional. As doses de cafeína utilizadas neste estudo foram escolhidas com base nos efeitos observados anteriormente nos estudos da ossificação endocondral da prole de ratos tratados com cafeína (Reis et al., 2014). Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada como placebo também administrada por sonda oro-gástrica.

Ao nascimento, três filhotes de cada fêmea e de cada grupo foram eutanasiados para extração dos osteoblastos da calvária, sendo realizado um *pool* de todas as células por grupo para realização dos ensaios *in vitro*.

### ***Extração e cultivo de osteoblastos da calvária dos neonatos***

A extração dos osteoblastos foi realizada conforme protocolos já estabelecidos (Nefussi et al., 1985; Valério et al., 2004). A calvária foi dissecada, retirando-se os tecidos musculares e conectivos adjacentes de forma asséptica, para obtenção dos pré-osteoblastos e osteoblastos. Inicialmente a calvária foi fragmentada e lavada com solução tampão de fosfato padrão (PBS) 0,15M estéril (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Posteriormente, os fragmentos foram incubados com tripsina 1% (Gibco, Grand Island, NY, USA) por 5 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida a tripsina foi descartada e os fragmentos foram incubados com 0,2% de colagenase II (Sigma, St Louis, MO, USA) por 45 minutos a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período o sobrenadante foi descartado e em seguida foi feita uma nova incubação com colagenase II nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante dessa segunda incubação foi centrifugado por 5 minutos a 1400g. O *pellet* foi então ressuscitado com 10 mL de DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Grand Island, NY, USA) e antibióticos (60 mg/L gentamicina, 250 µg/L anfotericina B, 100 U/mL penicilina e 10 µg/mL estreptomicina; Gibco, Grand Island, NY, USA) e colocado em garrafas T-25 cm<sup>2</sup> e cultivado em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana. A população de células não-aderentes foi removida, e a camada aderente foi lavada uma vez com meio fresco. Todas as soluções e meios de cultivo foram preparados com água pura livre de íons e de microorganismos.

### ***Cultivo dos osteoblastos em meio de diferenciação osteogênico***

Após o cultivo em meio de indiferenciação (DMEM), quatro passagens e obtenção de confluência de 80 a 90%, as células aderidas foram recolhidas com tratamento por tripsina. Elas foram então contadas e transferidas para placas de cultura de 6 ou 24 poços e garrafas T-25 cm<sup>2</sup> em uma densidade previamente padronizada ( $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>), dependendo do tipo de ensaio. As células foram cultivadas em meio de diferenciação osteogênico que consiste de DMEM suplementado com 10% de SFB, antibióticos (60 mg/L gentamicina, 250 µg/L anfotericina B, 100 U/mL penicilina e 10 µg/mL estreptomicina), ácido ascórbico (50µg/mL; Merck, Germany), β-glicerofosfato (10mM; Sigma, St. Louis, MO, USA) e dexametasona (0,1µM; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Nefussi et al., 1985; Valério et al., 2004). As células foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Assim, os osteoblastos dos neonatos de cada um dos quatro grupos experimentais foram cultivados por períodos de sete, 14 e 21 dias para a avaliação da redução do MTT em cristais de formazan, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, nódulos mineralizados e para avaliação da expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, Runx-2, fosfatase alcalina e colágeno tipo I por qRT-PCR.

### ***Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan***

O ensaio de redução do MTT em cristais de formazan mensura a viabilidade celular. Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), os osteoblastos dos neonatos de todos os grupos cultivados em placas de 24 poços foram submetidos ao teste de redução do MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio]*} (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) em cristais de formazan. O meio foi substituído por 210µL de meio osteogênico com SFB em cada poço e 170µL de MTT (5mg/mL). A placa foi incubada por 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Os

cristais de formazan foram observados ao microscópio antes do acréscimo de 210µL de SDS (sódio dodecil sulfato)-10% HCl (Synth, São Paulo, SP, Brazil) que permaneceu *overnight* em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm (Lu et al., 2008; Su et al., 2013). A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

#### ***Avaliação da atividade da fosfatase alcalina***

Aos sete, 14 e 21 dias, os osteoblastos dos neonatos de todos os grupos cultivados em placas de 24 poços foram lavados com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Em cada poço, foram acrescentados 200µL de solução de BCIP/NBT (1mL de tampão da fosfatase alcalina, 4,4µL de NBT {*nitro-blue tetrazolium chloride*} e 3,3µL de BCIP {*5-bromo-4-chloro-3'-indolyolphosphate p-toluidine salt*}) (Invitrogen, Camarilho, CA, USA). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida foi adicionado 210µL de solução detergente SDS 10% HCl (Synth, São Paulo, SP, Brazil) para incubação *overnight*. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 595nm (Ocarino et al., 2008; Boeloni et al., 2009). A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

#### ***Avaliação da síntese de colágeno***

Aos sete, 14 e 21 dias, os osteoblastos dos neonatos de todos os grupos cultivados em placas de 6 poços foram lavados com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Em cada poço, foram acrescentados 4 mL de solução de Bouin (Merk, Germany). As amostras permaneceram 2 horas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida as amostras foram colocadas em geladeira. No dia seguinte a placa foi lavada e seca, com posterior adição de Sirius Red (2 mL) (Reagent, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) e incubada por 30 min. Após remoção do corante as células foram lavadas com HCL (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e posterior adição de NaOH (Synth, São Paulo, SP, Brazil) com incubação por 30 min. Posteriormente, 100µL/poço foram transferidos para placas de 96 poços para análise na leitora de placas com comprimento de onda de 540nm (Valério et al., 2004). A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo experimental.

#### ***Avaliação da síntese de nódulos mineralizados***

Ao término de cada período (sete, 14 e 21 dias), os osteoblastos dos neonatos de todos os grupos cultivados em placas de seis poços com lamínulas 22 x 22 mm estéreis, foram lavados com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e fixados com paraformoldeído a 4% (Synth, São Paulo, SP, Brazil) por 24 horas e coradas pelo método de Von Kossa para avaliação da porcentagem de nódulos/campo.

No dia seguinte, os poços foram lavados com água deionizada, e posterior adição de nitrato de prata 5% (Synth, São Paulo, SP, Brazil) com exposição a luz por 2 horas. Os poços foram lavados com água deionizada, e os resíduos do nitrato de prata foram neutralizados com tiossulfato de sódio 5% (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e posteriormente contracorados com eosina. Após neutralização, os depósitos de cálcio eram visíveis por coloração marrom escuro.

A porcentagem de nódulos mineralizados/campo foi avaliada por microscopia de luz. Somente os nódulos de coloração marrom ou negro foram quantificados. A porcentagem foi determinada em 50 campos em objetiva de 10X, utilizando uma graticula, sobreposta à secção histológica, com 121 pontos. A média e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata para cada grupo.

***Expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***

A extração do mRNA das células cultivadas foi realizada pelo uso do Trizol (Ambion, Carlsbad, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os osteoblastos dos neonatos de todos os grupos experimentais foram cultivados em meio osteogênico em garrafas T-25 cm<sup>2</sup> por sete, 14 e 21 dias para avaliação quantitativa da expressão dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2, pela técnica de qRT-PCR. A média e o desvio padrão foram determinados em quadruplicata para cada grupo.

A extração do RNA das células cultivadas foi realizada pelo uso do Trizol (Gibco), de acordo com as instruções do fabricante. 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada em um termociclador Smart Cycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA) por 120s a 50°C, seguido pelas reações de PCR no equipamento Applied Biosystems 7.500 com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 s a 95°C e 30s a 60°C. No final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT. A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde os valores das amostras foram calculadas em relação a valores de GAPDH C<sub>t</sub>. O iniciadores foram delineados com base na sequência do mRNA *rattus norvegicus* (Tabela 1).

Tabela 1. Lista de genes e sequência de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR.

Gene	Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
GAPDH	<i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM 002046
Colágeno tipo I	<i>foward</i> : GCAAGGTGTTGTGCGATGACG <i>reverse</i> : GGGAGACCACGAGGACCAGAG	NM 000088
Osteocalcina	<i>foward</i> : CATCTATGGCACCACCGTTT <i>reverse</i> : AGAGAGAGGGAACAGGGAGG	NM 013414.1
Sialoproteína óssea	<i>foward</i> : TGTCCCTTCTGAACGGGTTTC <i>reverse</i> : CTTCCCCATACTCAACCGTG	NM 012587.2
Osteopontina	<i>foward</i> : ATCTCACCATTCCGATGAATCT <i>reverse</i> : TCAGTCCATAAGCCAAGCTATCA	AB001382
Fosfatase Alcalina	<i>foward</i> : CTAGTTCCTGGGAGATGGTA <i>reverse</i> : GTGTTGTACGTCTGGAGAGA	AC_000073.1
Runx-2	<i>foward</i> : GCGTCAACACCATCATTCTG <i>reverse</i> : CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348

## Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

## Resultados

### Redução do MTT em cristais de formazan

A redução de MTT em cristais de formazan variou com a dose de cafeína administrada à mãe e o período de cultura. Aos sete dias, observou-se que os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50mg/Kg apresentaram redução do MTT em cristais de formazan significativamente menor em comparação ao controle. No entanto, aos 14 dias, todos os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100mg/Kg apresentaram menor redução do MTT em cristais de formazan, em comparação ao controle. Aos 21 dias, ao contrário do grupo de 100mg/Kg que apresentou aumento significativo da redução do MTT em cristais de formazan, os demais grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50mg/Kg não apresentaram diferenças significativas em comparação ao controle (Figura 1).

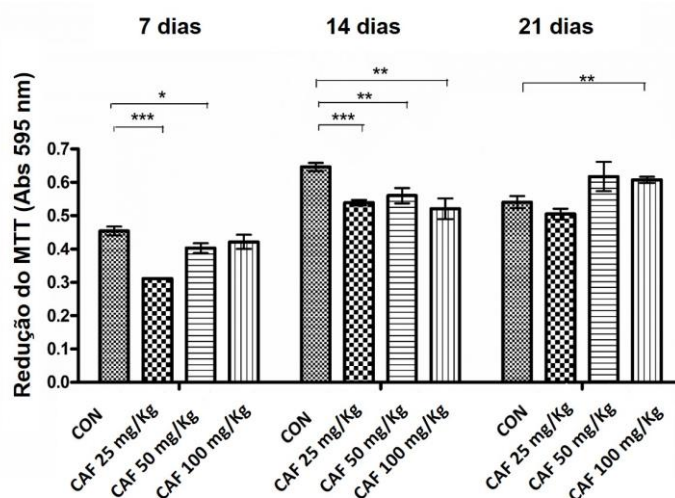


Figura 1. Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de osteoblastos extraída da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### Avaliação da atividade da fosfatase alcalina

Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100 mg/Kg apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente maior em comparação ao controle. Aos 14 dias, os grupos tratados nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente maior em comparação ao controle. Aos 21 dias, somente o grupo

tratado com cafeína na dose de 50mg/Kg manteve a atividade da fosfatase alcalina significativamente maior em comparação ao controle. O grupo 25 mg/Kg apresentou menor atividade da fosfatase alcalina em comparação ao grupo controle (Figura 2).

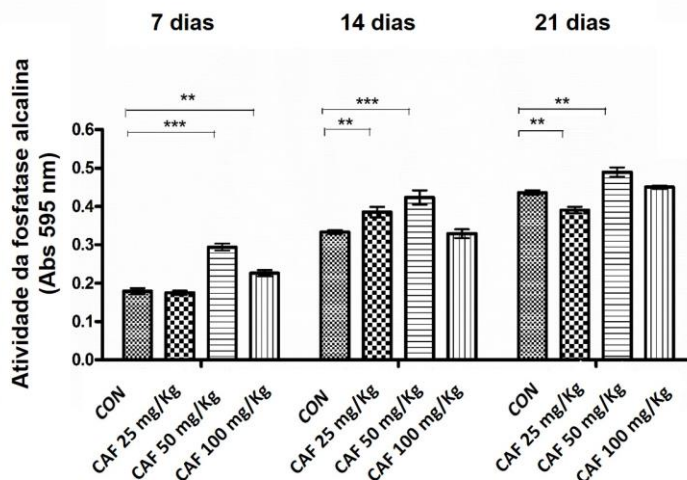


Figura 2. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001.

### Avaliação da síntese de colágeno

Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 50 e 100mg/Kg apresentaram síntese de colágeno significativamente maior em comparação ao controle. Aos 14 dias, todos os grupos tratados com cafeína apresentaram maior síntese de colágeno em relação ao controle. Mas, aos 21 dias somente o grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg manteve a síntese de colágeno significativamente maior em comparação ao controle (Figura.3).

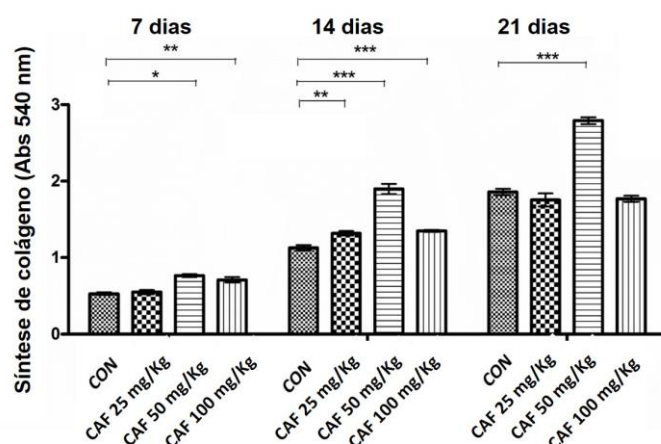


Figura 3. Síntese de colágeno (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e

cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

### *Avaliação da síntese de nódulos mineralizados*

Aos sete e 14 dias, houve intensa variação entre as culturas com relação a porcentagem de nódulos mineralizados, mas sem diferença significativa entre grupos. Entretanto, aos 21 dias, a variação na porcentagem de nódulos mineralizados entre as culturas foi pequena, como demonstrado pelo desvio padrão. As culturas de osteoblastos do grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg apresentaram aumento significativo da porcentagem de nódulos mineralizados em comparação ao controle. Além disso, o teor de cálcio dos nódulos, refletido pela coloração enegrecida foi mais intenso no grupo tratado com cafeína 50 mg/Kg comparado aos outros grupos (Figura 4).

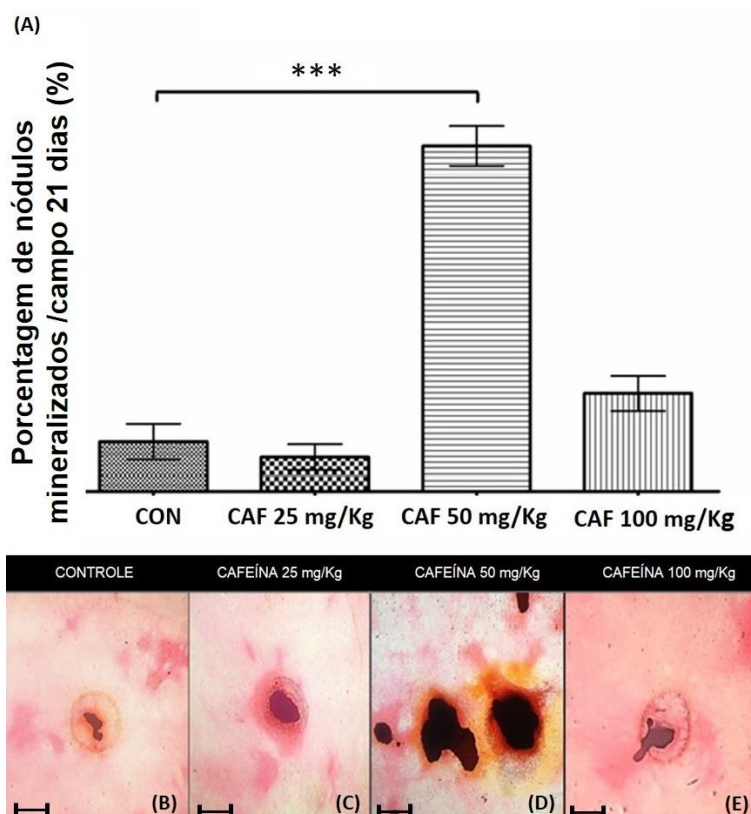


Figura 4. Porcentagem de nódulos mineralizados/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia do ensaio de Von Kossa em culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratos controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos 21 dias. Bar=58,5  $\mu$ m. \*\*\*  $p < 0,001$ .

***Expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***



Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram aumento significativo da expressão de osteocalcina, enquanto o grupo de 100mg/Kg apresentou redução significativa da expressão deste transcrito gênico. Aos 14 dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram aumento significativo da expressão de osteocalcina em comparação ao controle. Enquanto que aos 21 dias somente o grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg apresentou aumento na expressão em relação ao controle (Figura 5).

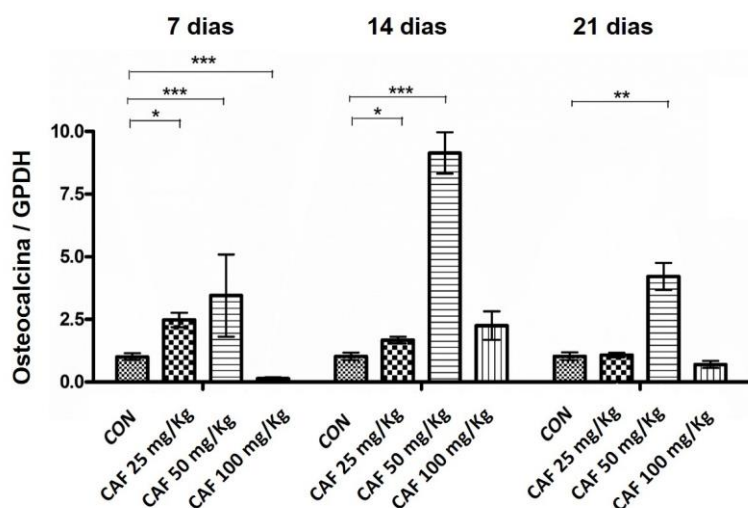


Figura 5. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para osteocalcina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram aumento significativo da expressão de osteopontina pelos osteoblastos em comparação ao controle. Mas, aos 14 e 21 dias, somente os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg mantiveram o aumento significativo da expressão de osteopontina em comparação ao controle (Figura 6).

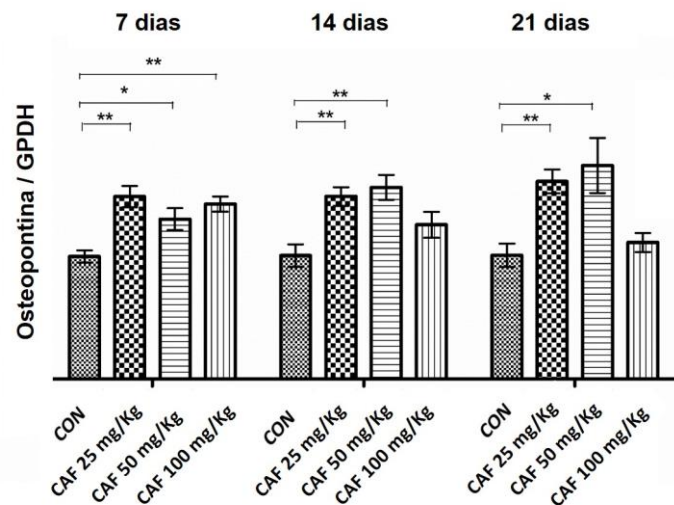


Figura 6. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para osteopontina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .

Aos sete dias, o grupo tratado com a dose de 25 mg/Kg apresentou aumento significativo da expressão de sialoproteína óssea, enquanto o grupo de 100mg/Kg apresentou redução significativa da expressão deste transcrito gênico. Aos 14 dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50mg/Kg apresentaram aumento significativo da expressão de sialoproteína óssea pelos osteoblastos em comparação ao controle. Mas, aos 21 dias somente o grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg manteve o aumento significativo da expressão de osteopontina pelos osteoblastos em comparação ao controle (Figura 7).

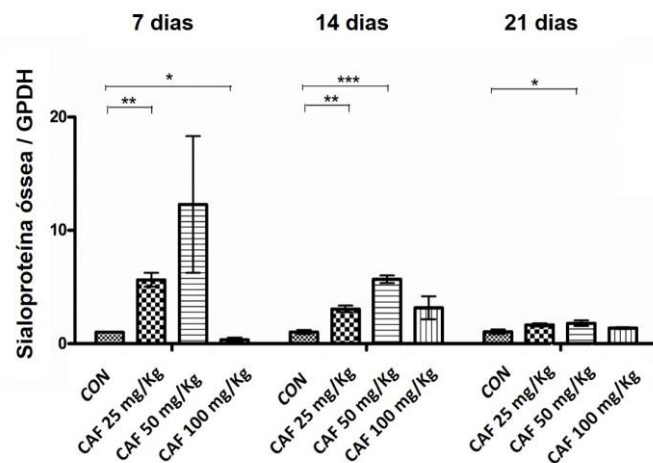


Figura 7. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para sialoproteína óssea pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária da prole de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Aos sete e 14 dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram diferença significativa da expressão de colágeno tipo I em comparação ao controle, sendo que o grupo tratado com cafeína na dose de 25mg/Kg apresentou menor expressão de colágeno tipo I, enquanto que o grupo tratado com cafeína na dose de 50mg/Kg apresentou maior expressão, em comparação ao controle. Aos 21 dias não houve diferença significativa entre grupos (Figura 8).

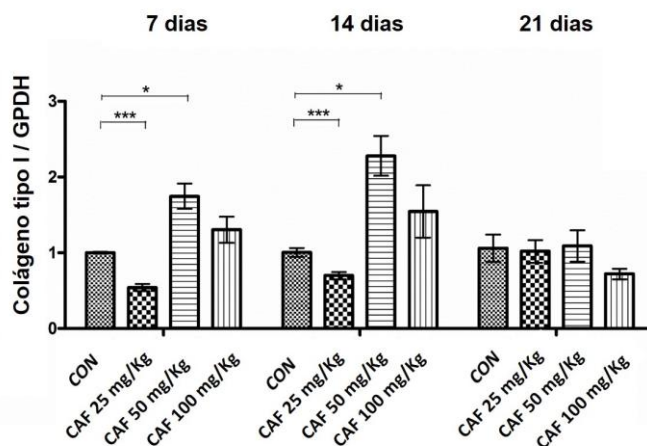


Figura 8. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para colágeno tipo I pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

Aos sete e 14 dias, somente o grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg apresentou aumento significativo da expressão de fosfatase alcalina em comparação ao controle. Aos 21 dias, não houve diferença significativa entre grupos (Figura 9).

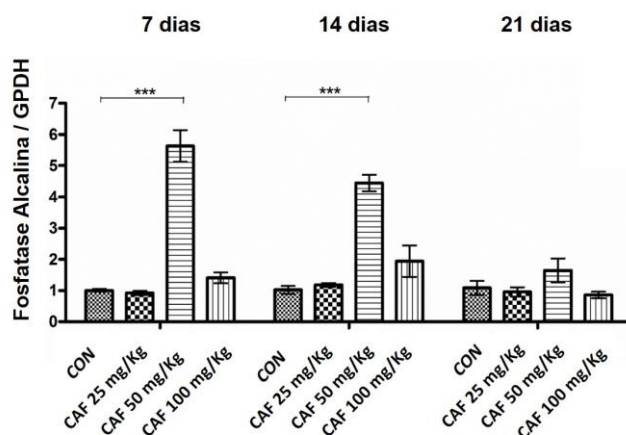


Figura 9. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para fosfatase alcalina pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Aos sete e 14 dias, os grupos tratados com cafeína não apresentaram diferença significativa da expressão de Runx-2 em comparação ao controle. Aos 21 dias, apenas o grupo tratado com

caféina 50 mg/Kg apresentou redução da expressão de Runx-2 em relação ao grupo controle (Figura 10).

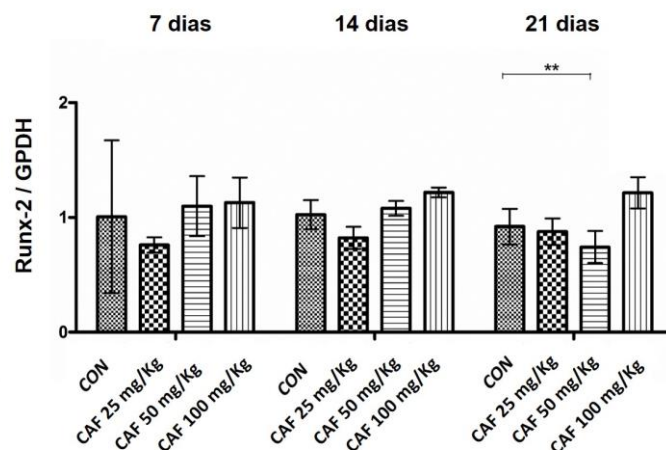


Figura 10. Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) do transcrito gênico para Runx-2 pela técnica de qRT-PCR entre culturas de osteoblastos da calvária de neonatos de ratos controle (CON) e tratadas com caféina (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio de diferenciação osteogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\*  $p < 0,01$ .

Em resumo, as culturas de osteoblastos da calvária da prole de ratas tratadas com caféina nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram variações na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, bem como na expressão gênica dos fatores da diferenciação osteogênica, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 em relação ao grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos efeitos da caféina nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina (ALP), síntese de colágeno (COL), porcentagem de nódulos/campo, e na expressão gênica de osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, colágeno tipo I, fosfatase alcalina e Runx-2 em comparação com o grupo controle.

	CAF 25mg/Kg			CAF 50mg/Kg			CAF 100mg/Kg		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Redução MTT	↓	↓	-	↓	↓	-	-	↓	↑
Atividade ALP	-	↑	↓	↑	↑	↑	↑	-	-
Síntese de COL	-	↑	-	↑	↑	↑	↑	↑	-
(%) Nódulos	-	-	-	-	-	↑	-	-	-
Osteocalcina	↑	↑		↑	↑	↑	↓	-	-
Osteopontina	↑	↑	↑	↑	↑	↑	↑	-	-
Sialoproteína óssea	↑	↑	-	-	↑	↑	↓	-	-
Colágeno tipo I	↓	↓	-	↑	↑	-	-	-	-
ALP	-	-	-	↑	↑	-	-	-	-
Runx-2	-	-	-	-	-	↓	-	-	-

\*(-): sem diferença significativa; ↑: aumentou significativamente; ↓: diminuiu significativamente.

## Discussão

Estudos prévios têm demonstrado que a cafeína pode ser um agente danoso para as culturas de osteoblastos (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008), sendo considerada um fator de risco para a osteoporose (Kamagata-Kiyoura et al., 1999) e um agente causador de malformações fetais (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991; Reis 2012). Diante disto, seus mecanismos de ação sobre o osso, ainda pouco compreendidos, têm sido estudados (Scott Jr, 1983; Narod et al., 1991; Barone et al., 1993; Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Reis, 2012). Mas, este parece ser o primeiro estudo sobre o potencial osteogênico de osteoblastos extraídos de ratos neonatos de mães tratadas com cafeína durante a gestação.

As células extraídas da calvária são na sua maioria osteoblastos, embora haja também pré-osteoblastos (Nefussi et al., 1997). Assim, no presente estudo estas células foram avaliadas após três períodos, em meio osteogênico, para estimular a diferenciação de todas as células que foram extraídas. Para caracterizar e comparar o potencial osteogênico dos osteoblastos extraídos de cada grupo experimental, vários parâmetros foram avaliados, como a atividade de fosfatase alcalina, síntese de colágeno e síntese e mineralização da matriz. Durante o processo de diferenciação celular, os osteoblastos produzem matriz óssea que é constituída por proteínas colagênicas e não-colágenas que desempenham um papel chave nas diferentes etapas da

diferenciação e da mineralização da matriz óssea, dentre elas destacam-se a osteocalcina, a osteopontina e a sialoproteína óssea (Nefussi et al., 1997; Tsuang et al., 2006; Moiola et al., 2007), tendo sido também avaliadas no presente estudo.

Os resultados observados foram surpreendentes e interessantes, pois ao contrário dos resultados observados nos estudos *in vitro* (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006), a cafeína, predominantemente na dose de 50 mg/Kg, aumentou o potencial osteogênico dos osteoblastos, caracterizado pelo aumento da atividade da fosfatase alcalina e da síntese de colágeno e de nódulos mineralizados e pelo aumento da expressão de transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, fosfatase alcalina e colágeno tipo I.

A metodologia utilizada e os resultados obtidos no presente estudo foram diferentes dos relatados por outros pesquisadores que demonstraram que a viabilidade e a atividade dos osteoblastos diminuem significativamente quando expostos à diferentes concentrações de cafeína (0,1, 0,2, 0,4, 0,5, 1,0 e 10 mM) acrescidas ao meio de cultura (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). A diferença entre nosso estudo e o desses outros pesquisadores é que a cafeína aqui não foi adicionada ao meio de cultura, tendo sido administrada para as mães durante a gestação e veiculada através da placenta para os fetos. Quando adicionada diretamente ao meio de cultivo, a cafeína induz ativação irreversível da cascata de morte celular dependente de mitocôndrias e inativação do sinal de sobrevivência da célula, não somente por apoptose, mas também por necrose (Tassinari et al., 1996; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). Além disso, observa-se menor expressão de genes, enzimas e proteínas que são naturalmente expressos durante a osteogênese, como o Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, e histona (Tassinari et al., 1996; Rapuri et al., 2007; Lu, et al., 2008; Zhou et al., 2010). Os resultados obtidos com a adição de cafeína em culturas de osteoblastos demonstram que além da redução da viabilidade celular, um dos efeitos desta droga é inibir a síntese de matriz extracelular (Rapuri et al., 2007; Lu, et al., 2008).

Mas, ensaios *in vitro* podem ter resultados diferentes aos observados *in vivo* e *ex vivo*, uma vez que o microambiente celular é difícil de ser reproduzido *in vitro*, pois há inúmeros fatores intrínsecos e extrínsecos interdependentes. O controle da proliferação, diferenciação e manutenção das células é realizado por genes, citocinas, fatores de crescimento e pela interação celular (Badillo and Flake, 2006; Sugiyama et al., 2011). Assim, mesmo com o conhecimento que se tem no que se refere à regulação do microambiente celular, é difícil desenvolver modelos *in vitro* que simulem as alterações do organismo causadas por drogas (Badillo e Flake, 2006; Sugiyama et al., 2011). Embora, os ensaios *in vitro* com culturas de osteoblastos reproduzam as sequências celulares que ocorrem antes e durante a formação da matriz óssea *in vivo* (Nefussi et al., 1997), nos estudos *in vitro*, a droga adicionada diretamente ao meio de cultivo, não sofre metabolização pelo organismo, o que pode potencializar seus efeitos sobre as células (Tassinari et al., 1996; Zhou et al., 2010). No presente estudo, nosso objetivo foi observar os efeitos da cafeína sobre o metabolismo de osteoblastos que sofreram interferência da droga no organismo, além de levar em consideração a metabolização da droga pela mãe e sua passagem para o feto através da placenta.

Aos sete e 14 dias, a atividade da fosfatase alcalina e a síntese do colágeno foram significativamente superiores na dose de 50 mg/Kg em comparação ao controle, tanto pelos ensaios colorimétricos quanto pela técnica de qRT-PCR. A fosfatase alcalina é um marcador precoce da diferenciação osteogênica (Bruder et al., 1998; Payushina et al., 2006), e por isso,

seu aumento na dose de 50 mg/Kg aos sete dias de cultivo, sugere diferenciação osteogênica precoce em comparação ao grupo controle. Nas doses de 25 e 100mg/Kg, os resultados da fosfatase alcalina e do colágeno obtidos pelos ensaios colorimétricos diferiram dos resultados observados nos ensaios de qRT-PCR. Essa divergência reafirma a limitação dos testes colorimétricos, cujo resultado pode variar de acordo com o número e a atividade das células da cultura, havendo sempre a necessidade de complementação com outros ensaios como o qRT-PCR. Além disso, o aumento na transcrição do gene, não significa necessariamente que a proteína também foi aumentada.

Nos ensaios de redução do MTT em cristais de formazan, os osteoblastos dos neonatos das ratas que receberam a dose de 25 e 50 mg/Kg de cafeína apresentaram menor redução de MTT em cristais de formazan aos sete e 14 dias de cultivo. Postula-se que isso possa ter ocorrido não pela redução da viabilidade celular e sim pela elevada diferenciação, comprovada não somente pela síntese de colágeno e MTT, como também pela síntese de proteínas não colagênicas e de nódulos mineralizados, que serão discutidas à frente. O MTT é um teste da viabilidade celular, onde a formação de cristais de formazan depende da atividade mitocondrial de células viáveis. Mas, a atividade mitocondrial também varia de acordo com a maturidade celular, havendo queda da atividade mitocondrial em células diferenciadas com conseqüente redução da formação de cristais de formazan (Xu et al., 2013). Aos 21 dias, o grupo tratado com cafeína na dose de 100mg/Kg apresentou maior redução do MTT em cristais de formazan em comparação ao controle. Com exceção do resultado observado no grupo tratado com 50mg/Kg de cafeína, é difícil propor uma explicação para as alterações observadas nos ensaios do MTT dos grupos que receberam as outras doses de cafeína, baseando-se nos resultados dos ensaios realizados. Como o teste do MTT é dependente da atividade mitocondrial, mais estudos devem ser conduzidos a fim de estudar o efeito da cafeína nessas organelas celulares.

Dentre todas as doses de cafeína estudadas, a dose de 50 mg/Kg apresentou não somente elevação da expressão de transcritos gênicos para colágeno tipo I e fosfatase alcalina, como também maior síntese de nódulos mineralizados e maior expressão de proteínas não colagênicas como osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea em comparação ao grupo controle nos períodos avaliados. Essas proteínas são indicadores importantes da diferenciação osteogênica tardia (Aronow et al., 1990; Nefussi et al., 1997; Bellows et al., 1999). Portanto, pode-se inferir que os osteoblastos de filhotes de ratas tratadas com cafeína na dose de 50 mg/Kg apresentaram aumento do potencial osteogênico na fase precoce e tardia da diferenciação.

O aumento do potencial osteogênico de osteoblastos neste estudo deve ser interpretado com cautela e mais estudos são necessários para entender a relação entre estes resultados e as alterações ósseas observadas *in vivo*. A elevação do potencial osteogênico dos osteoblastos não deve ser vista aqui como um efeito benéfico da cafeína para o crescimento ósseo, porque qualquer desequilíbrio na função celular, caracterizada por aumento ou diminuição da atividade de síntese da célula, pode prejudicar a esqueletogênese (Scott et al., 1983).

A cafeína se liga a receptores para adenosina, e modula vários outros receptores, incluindo os receptores para glicocorticoides, insulina, estrogênio, andrógeno, vitamina D, canabinoide, o glutamato e os receptores adrenérgicos, os quais são expressos em osteoblastos ou células osteoprogenitoras e têm funções importantes durante a diferenciação dos osteoblastos (Taylor, 2002; Wiren et al., 2002; Föcking et al., 2005; Lu et al., 2008; Tam et al., 2008; Ferron et al., 2010; Ribeiro e Sebastião, 2010; Costa et al., 2011; Ma et al., 2011; Egawa et al., 2011; Sarobo et al., 2012; Wang et al., 2014. No entanto, pouco se sabe sobre a ação da cafeína sobre estes

receptores ou os efeitos resultantes sobre a formação e o crescimento ósseo endocondral. Portanto, infelizmente, ainda é muito cedo para determinar as implicações para os seres humanos ou para sugerir um mecanismo de ação para o aumento observado nos fatores osteogênicos. Numerosos fatores no microambiente celular também podem ser responsáveis pelos efeitos observados, embora mais estudos são necessários para identificar esses fatores e elucidar seus mecanismos de ação.

Apesar da dose de 25 mg/Kg também ter aumentado a expressão de osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea em pelo menos dois períodos avaliados, não houve aumento da síntese de nódulos mineralizados. É provável que esse resultado tenha ocorrido uma vez que neste grupo houve redução da expressão de colágeno. A formação dos nódulos mineralizados depende não somente da síntese das proteínas não colagênicas, mas também da síntese de colágeno que antecede o processo de mineralização (Nefussi et al., 1997). A dose de 100 mg/Kg também promoveu alteração dos transcritos gênicos para osteocalcina, osteopontina e sialoproteína óssea aos sete dias, sem no entanto, alterar a síntese de nódulos mineralizados, em comparação ao controle. Mas é importante ressaltar, que com exceção do teste do MTT, aos 21 dias, tanto a dose de 25 mg/Kg quanto a de 100mg/Kg apresentaram-se semelhantes ao controle em todos os parâmetros avaliados.

Conclui-se que osteoblastos extraídos de filhotes de ratas que receberam cafeína na dose de 50mg/Kg durante a gestação apresentam aumento da síntese de transcritos gênicos para fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, sialoproteína óssea, resultando em aumento da síntese de nódulos mineralizados. Nosso trabalho apresenta resultados novos utilizando metodologia não realizada anteriormente e demonstra a necessidade de mais estudos para entender melhor o significado e as diferenças dos efeitos sobre o potencial osteogênico, quando a cafeína é administrada *in vivo* ou diretamente em meios de cultura.



## **CAPÍTULO 4** **(Experimento 3)**

### **Efeito não linear da cafeína sobre a viabilidade, atividade de síntese e expressão gênica de condrócitos da prole de ratas tratadas durante a gestação**

#### **Resumo**

Esse estudo teve como objetivo avaliar o efeito de diferentes doses de cafeína administradas às ratas gestantes sobre a viabilidade, a atividade de síntese e a expressão gênica de condrócitos da cartilagem articular da prole. Vinte e quatro ratas Wistar adultas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos, sendo um grupo controle e três grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg. A cafeína foi diluída em água destilada e administrada para as mães por sonda oro-gástrica por toda a gestação. Ao nascimento, três filhotes de cada fêmea foram eutanasiados para extração dos condrócitos da cartilagem articular da tíbia e do fêmur. Culturas de condrócitos dos quatro grupos em sextuplicata foram submetidas aos seguintes ensaios: teste de viabilidade celular pelo MTT, atividade da fosfatase alcalina e síntese de colágeno por ensaios colorimétricos aos sete, 14 e 21 dias de cultura. Culturas de condrócitos de todos os grupos também foram cultivadas em sextuplicata sob lamínulas e coradas pela Hematoxina-eosina, PAS, Safranina O e Alcian Blue para determinação da porcentagem/campo de células e de matriz condrogênica PAS+, Safranina O+ e Alcian Blue+ aos 21 dias de cultivo. Também foi realizada a avaliação da expressão de transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agrecano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina pela técnica qRT-PCR, aos 21 dias de cultivo, em quadruplicata. Foi realizada ANOVA e comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK). Os efeitos observados não foram lineares ou dependentes da dose de cafeína. As culturas de condrócitos extraídos dos grupos tratados com 25 mg/Kg foram as que apresentaram os menores resultados, com redução da viabilidade e da porcentagem de células, da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e de matriz condrogênica, bem como da expressão de Sox-9, fosfatase alcalina e colágeno tipo II. Culturas de condrócitos do grupo tratado com 50 mg/Kg de cafeína apresentaram redução da síntese de colágeno e da expressão de Sox-9. A dose de 100 mg/Kg também reduziu a síntese de colágeno, bem como a expressão de Sox-9 e de fosfatase alcalina. Conclui-se que a cafeína administrada às ratas gestantes altera negativamente os condrócitos da cartilagem articular da prole, reduzindo, independentemente da dose, a síntese de colágeno e a expressão de Sox-9 e que seus efeitos não são lineares ou dose-dependentes, uma vez que as culturas de condrócitos dos filhos de mães que receberam a menor dose de cafeína (25mg/Kg) apresentaram os menores resultados com redução da viabilidade e da porcentagem de células, da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e de matriz condrogênica, bem como da expressão de Sox-9, fosfatase alcalina e colágeno tipo II.

Palavras-chave: Condrócitos, cafeína, condrogênese, efeito não linear, gestação, lactação, rata

## Introdução

O tecido cartilaginoso é constituído de condroblastos (células jovens, recém diferenciadas) e condrócitos (células maduras), que são células altamente especializadas de origem mesenquimal responsáveis pela síntese, manutenção e degradação da matriz condrogênica extracelular. Esta matriz é composta principalmente de colágeno tipo II em associação com macromoléculas de proteoglicanos, ácido hialurônico e glicoproteínas adesivas (Gosset et al., 2008; Studer et al., 2012).

Na condrogênese, a formação óssea endocondral envolve múltiplas etapas, células condroprogenitoras sofrem condensação, se diferenciam em condroblastos produtores de matriz extracelular e estes, por sua vez, se diferenciam em condrócitos que se tornam aprisionados pela matriz produzida. Dentre os fatores envolvidos na regulação dos mecanismos moleculares dessa diferenciação, destaca-se o Sox-9 que age na agregação das células mesenquimais, no controle dos genes das proteínas da matriz extracelular, bem como no alinhamento de colunas de células paralelas na placa de crescimento (Crombrughe et al., 2001; Akiyama et al., 2002; Ikeda et al., 2005; Oh et al., 2010).

Posteriormente, os condrócitos tornam-se hipertróficos, repletos de retículo endoplasmático rugoso, complexos de golgi e de vesículas secretoras, expressam Runx-2, que por sua vez induz a expressão de colágeno tipo X, fosfatase alcalina, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores de metaloproteinases específicas de tecidos (TIMPs) (Gerstenfeld e Landis, 1991; Kergosien et al., 1998). Esses fatores facilitam a invasão da cartilagem por vasos sanguíneos, resultando na formação dos centros de ossificação dos ossos longos (Vortkamp et al., 1998; Crombrughe et al., 2001; Komori, 2003; Horton e Degnin, 2009; Ding et al., 2012).

Muitos são os agentes que podem afetar as etapas consecutivas da diferenciação condroblástica e de seus reguladores críticos (Yan et al., 2012), dentre eles destaca-se a cafeína, que é um alcaloide farmacologicamente ativo de grande consumo pela população, presente na dieta humana na forma de café, chás, chocolates, refrigerantes, energéticos e medicamentos, dentre outros (Heckman et al., 2010) e também na alimentação de animais de produção na forma de polpa ou casca de café (Cabezas et al., 1987; Mazzafera, 2002).

Direta ou indiretamente, a cafeína e seus metabólitos são capazes de agir em vários tecidos do corpo, entre eles os tecidos cartilaginoso e ósseo, apesar dos efeitos da cafeína sobre o tecido e as células ósseas terem sido bem mais investigados (Tassinari et al., 1991; Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008; Zhou et al., 2010; Reis et al., 2014; Choi et al., 2016), pelo fato desse alcaloide ser considerado um fator de risco para osteoporose (Macedo et al., 2012), doença periodontal (Kamagata-kiyoura et al., 1999) e malformações fetais (Scott, 1983; Narod et al., 1991).

A cafeína pode influenciar o metabolismo ósseo indiretamente por aumentar a excreção urinária de cálcio (Bergman et al., 1990), atuando, ainda, direta ou indiretamente sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais (CTMs) (Liu et al., 2011). Além disso, pode influenciar também a viabilidade e atividade de síntese dos osteoblastos (Zhou et al., 2010), reduzindo a expressão de genes, enzimas e proteínas que são naturalmente expressos durante a osteogênese, como o Runx-2, Sox-9, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina,

osteopontina, histona e os receptores para vitamina D (Tassinari et al., 1991; Rapuri et al., 2007; Zhou et al., 2010).

Sabe-se que em ratos neonatos e lactentes, o consumo de cafeína pela mãe durante a gestação e a lactação afeta as cartilagens de crescimento (Wink et al., 1996; Tan et al., 2012; Reis et al., 2014), causando menor diferenciação dos condroblastos, com desorganização e indistinção das zonas da placa epifisária dos ossos longos e vértebras, bem como deficiência de glicosaminoglicanos na matriz condrogênica (Reis et al., 2014). Além disso, tem sido observadas alterações nos ossos longos e vértebras, como redução do comprimento e osteopenia (Huang et al., 2002; Reis et al., 2014; Shin et al., 2015). No entanto, para elucidar a gênese das alterações causadas pela cafeína sobre os condrócitos, mais estudos sobre os mecanismos celulares e moleculares são necessários. Este parece ser o primeiro estudo que avaliou o efeito de diferentes doses de cafeína administradas às ratas gestantes sobre a viabilidade e a atividade de síntese dos condrócitos da prole.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a viabilidade celular pelo ensaio do MTT e a atividade de síntese de condrócitos extraídos das cartilagens de crescimento da prole de ratas tratadas com diferentes doses de cafeína, por meio de análises da porcentagem de células e de matriz condrogênica PAS+, Safranina O+ e Alcian Blue+ e da expressão de transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agrecano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina pela técnica qRT-PCR, a fim de tentar elucidar alguns mecanismos pelos quais a cafeína reduz o crescimento ósseo endocondral.

## **Material e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo n.º. 3/2013) (*Anexo 4*).

### ***Acasalamento e formação dos grupos experimentais***

Foram utilizadas 24 ratas Wistar com dois meses de idade, separadas, ao acaso, em quatro grupos, sendo três grupos tratados com cafeína e um grupo controle. Os animais foram alojados em caixas plásticas (6 animais/caixa) onde receberam ração comercial (1,4% de cálcio, 0,60% de fósforo e 22% de proteína) e água *ad libitum* e foram mantidas em regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após um período de 30 dias de adaptação, todas as fêmeas foram submetidas diariamente à citologia vaginal para monitorar o ciclo estral. As que se apresentaram em proestro e estro foram alojadas em caixas plásticas com ratos adultos por 12 horas. Após esse período, foram realizados esfregaços vaginais diariamente para detecção de espermatozóides. A cópula foi confirmada pela presença de espermatozóides na citologia vaginal, sendo este dia considerado o dia zero de gestação. Após a cópula, as ratas foram alojadas em caixas separadas. Os animais dos grupos tratados e controle receberam diariamente, por sonda oro-gástrica, cafeína diluída em 5 mL de água destilada, nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg que foi administrada por todo o período gestacional. Os animais do grupo controle receberam apenas água destilada como placebo também administrada por sonda oro-gástrica.

Três dias após o nascimento, três filhotes de cada fêmea e de cada grupo foram eutanasiados para extração dos condrócitos das cartilagens de crescimento, sendo realizado um *pool* de células por grupo para realização dos ensaios *in vitro* em sextuplicata ou quadruplicata, conforme detalhado à frente.

### ***Extração e cultivo dos condrócitos das cartilagens de neonatos***

A extração dos condrócitos das cartilagens de crescimento foi realizada conforme protocolos previamente estabelecidos (Gosset et al., 2008; Chen et al., 2009).

Os filhotes com três dias de idade foram submetidos à eutanasia utilizando a associação de quetamina (120 mg/Kg) e xilazina (30 mg/Kg) via intraperitoneal. Foi realizada a antisepsia com álcool 70% e povidona-iodo (PVPI) na pele dos membros posteriores e em seguida os fêmures e tíbias de todos os animais foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos adjacentes com instrumental estéril, dentro de fluxo laminar e lavados em solução tampão de fosfato padrão (PBS) 0,15M estéril (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Fragmentos de cartilagem foram imediatamente colhidas das extremidades distal e proximal destes ossos com auxílio de um estereomicroscópio.

Para o isolamento dos condrócitos, os fragmentos de cartilagem foram lavados, no fluxo laminar com DMEM (Gibco, USA), gentamicina (60mg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (10mg/mL) e anfotericina B (250mg/L). Posteriormente, a cartilagem foi digerida por meio de incubação *overnight* com 1,5 mg/mL colagenase II (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em DMEM contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Soral, Brasil) (Chen et al, 2010; Hellingman et al., 2010).

As suspensões de células foram centrifugadas por 10 minutos a 1400g e lavadas com PBS. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas e cultivadas em garrafas T75 (TPP -Techno Plastic Products in Trasadingen) contendo meio condrogênico. Este meio foi composto por DMEM acrescido de 1% de soro fetal bovino e suplementado com ácido ascórbico (50µg/mL) (Sigma),  $10^{-7}$ M dexametasona (Sigma), 6,25 µg/mL de insulina (Biobras), 6,25 µg/mL de transferrina (Sigma), 1mM de piruvato (Sigma), 1,25 µg/mL de BSA (Sigma) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 h as garrafas foram lavadas com PBS 0,15M para remoção das células não aderidas. O meio de cultivo foi trocado duas vezes por semana.

### ***Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan***

Ao final dos sete, 14 e 21 dias, as células de todos os grupos experimentais, foram cultivadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células em placas de 24 poços e submetidas ao teste de redução do MTT {*brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazolio]*} em cristais de formazan nos períodos de sete, 14 e 21 dias. Resumidamente, as células foram incubadas com MTT por 2 horas a 37°C. Após incubação, as células foram tratadas por 12 horas com solução de solubilização (SDS-10% HCl). Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. A média da

absorbância e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata, para cada grupo experimental.

#### ***Avaliação da atividade da fosfatase alcalina***

Ao final dos sete, 14 e 21 dias de cultivo, as células de todos os grupos experimentais, foram cultivadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células em placas de 24 poços para avaliação da atividade da fosfatase alcalina. As células foram incubadas com solução de BCIP/NBT (5-bromo,4-chloro,3-indolylphosphate-nitroblue tetrazolium) (Gibco) durante 2 h a 37°C. Após incubação, as células foram tratadas por 12 horas com solução de solubilização (SDS-10% HCl). Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. A média da absorbância e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata, para cada grupo experimental.

#### ***Avaliação da síntese de colágeno***

Ao final dos sete, 14 e 21 dias, as células de todos os grupos experimentais, foram cultivadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células em placas de 6 poços para avaliação da síntese de colágeno. As culturas de células foram lavadas em PBS (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e fixadas em Bouin durante 2 h à 37 °C. Após a incubação, foram lavadas com água deionizada e secadas ao ar. As células foram coradas com sircol red durante 30 minutos à temperatura ambiente. As placas de cultura de células foram lavadas com solução de 0,01N HCl, duas vezes e então foram tratadas com solução de 0,5 M NaOH. Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm. A média da absorbância e o desvio padrão foram determinados em sextuplicata, para cada grupo experimental.

#### ***Avaliação da porcentagem de área coberta por condrócitos/campo e síntese de matriz condrogênica safranina-O+, alcian blue+ e PAS+***

Aos 21 dias, as células de todos os grupos experimentais, foram cultivadas na densidade de  $3 \times 10^4$  células em placas de seis poços com lamínulas 22 x 22 mm estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e fixadas em paraformoldeído 4% e submetidas à coloração por hematoxilina e eosina (HE), safranina-O, alcian blue e ácido periódico-Schiff (PAS) (Prophet et al., 1992). Posteriormente foram determinadas a porcentagem de células pela coloração de HE, bem como a porcentagem de matriz condrogênica safranina-O+, alcian blue+ e PAS+ em 50 campos, com auxílio de uma graticula de 121 pontos acoplada a um microscópio óptico com objetiva de 40x.

#### ***Expressão de transcritos gênicos para agrecano, colágeno tipo II, fosfatase alcalina, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***

O PCR em tempo real foi realizado nas culturas de condrócitos de todos os grupos experimentais na densidade de  $25 \times 10^4$  células, após 21 dias, para a avaliação quantitativa da expressão de agrecano, colágeno tipo II, fosfatase alcalina, Runx-2 e Sox-9. A média e o desvio padrão foram determinados em quadruplicata para cada grupo experimental.

A extração do RNA das células cultivadas foi realizada pelo uso do Trizol (Gibco), de acordo com as instruções do fabricante. 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada em um termociclador Smart Cycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA) por 120s a 50°C, seguido pelas reações de PCR no equipamento Applied Biosystems 7.500 com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 s a 95°C e 30s a 60°C. No final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT.

A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde os valores das amostras foram calculadas em relação a valores de GAPDH C<sub>t</sub>. Os iniciadores específicos utilizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes e sequências de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR

Gene	Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')	Nº acesso
GAPDH	<i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
Agrecano	<i>foward</i> : CACACGCTACACACTGGACT <i>reverse</i> : TCACACTGGTGGAAGCCATC	NM_022190.1
Colágeno tipo II	<i>foward</i> : GTTCACGTACACTGCCCTGA <i>reverse</i> : AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
Fosfatase Alcalina	<i>foward</i> : CTAGTTCCTGGGAGATGGTA <i>reverse</i> : GTGTTGTACGTCTTGGAGAGA	AC_000073.1
Runx-2	<i>foward</i> : GCGTCAACACCATCATTCTG <i>reverse</i> : CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348
Sox-9	<i>foward</i> : CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC <i>reverse</i> : GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432

## Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA com comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK) (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

## Resultados

### *Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan*

Aos sete dias, as culturas de condrócitos tratadas com cafeína na dose de 25 e 50 mg/Kg apresentaram redução do MTT em cristais de formazan significativamente menor, em comparação ao controle. Aos 14 dias, os grupos tratados com cafeína não apresentaram

diferença significativa em relação ao controle e aos 21 dias de cultivo, somente a cultura de condrócitos do grupo tratado com cafeína na dose de 25 mg/Kg apresentou menor viabilidade celular caracterizada pela redução do MTT em cristais de formazan significativamente menor, em comparação ao controle (Figura 1).

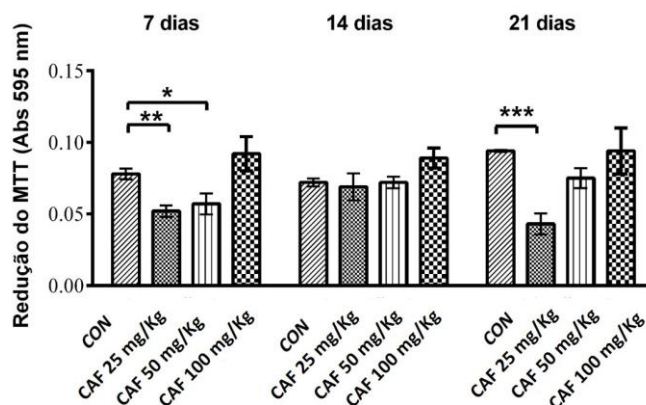


Figura 1. Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico aos sete, 14 e 21 dias. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### *Avaliação da atividade da fosfatase alcalina*

Aos sete, 14 e 21 dias, o grupo tratado com cafeína na dose de 25 mg/Kg apresentou atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao controle. No entanto, aos 21 dias, o grupo tratado com a dose de 100 mg/Kg apresentou atividade da fosfatase alcalina significativamente maior em comparação ao controle (Figura 2). Aos 21 dias de cultivo, todos os grupos tratados com cafeína apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si (Figura 2).

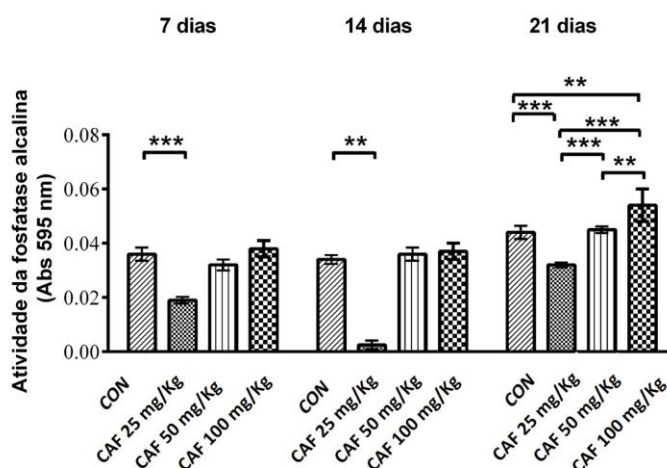


Figura 2. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas mães controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico aos sete, 14 e 21 dias. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### *Avaliação da síntese de colágeno*

Aos sete e 14 dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram síntese de colágeno significativamente menor em comparação ao controle. Aos 21 dias apenas os grupos tratados com cafeína nas doses de 25 e 50 mg/Kg apresentaram síntese de colágeno menor em comparação ao controle. Aos sete, 14 e 21 dias, os grupos tratados com cafeína 25 e 50 mg/Kg apresentaram redução da síntese de colágeno em comparação com o grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg (Figura 3).

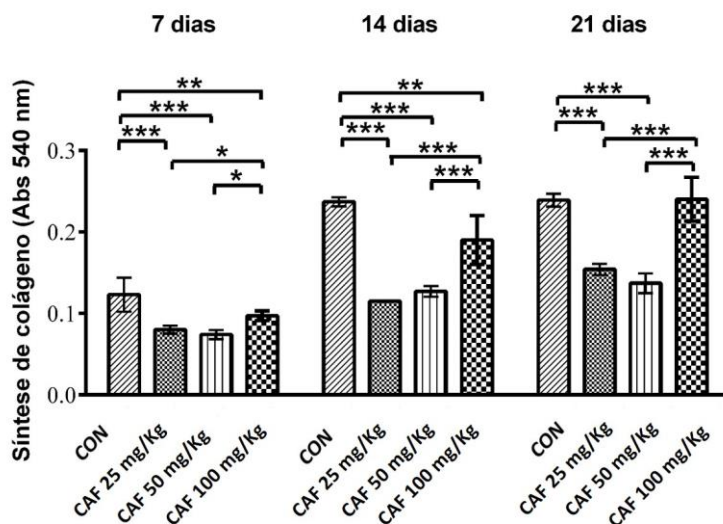


Figura 3. Síntese de colágeno (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico aos sete, 14 e 21 dias. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### ***Avaliação da porcentagem de área coberta por condrócitos/campo***

Aos 21 dias, apenas o grupo tratado com cafeína na dose de 25 mg/Kg apresentou redução significativa da porcentagem de condrócitos/campo em comparação ao controle. Aos 21 dias, o grupo tratado com cafeína 25 mg/Kg apresentou redução significativa da porcentagem de condrócitos/campo em comparação aos grupos 50 e 100 mg/Kg (Figura 3). (Figura 4).



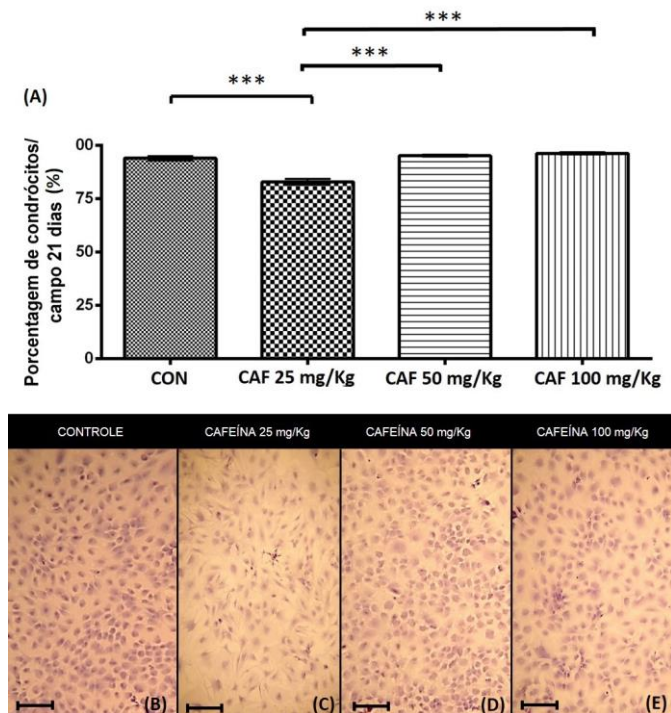


Figura 4. Porcentagem de área coberta por condrócitos/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Hematoxilina e eosina (HE) de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico aos 21 dias. Bar= 58,8  $\mu$ m.\*\*\*p<0,05.

#### ***Avaliação da porcentagem de matriz condrogênica PAS+, alcian blue+ e safranina+***

Aos 21 dias, apenas o grupo tratado com cafeína na dose de 25mg/Kg apresentou redução significativa da porcentagem/campo de matriz condrogênica PAS+ (Figura 5), alcian blue+ (Figura 6) e safranina+ (Figura 7) em comparação ao controle. Aos 21 dias, os grupos tratados com cafeína 25 e 50 mg/Kg apresentaram redução significativa da porcentagem/campo de matriz condrogênica PAS+ (Figura 5), alcian blue+ (Figura 6) e safranina+ (Figura 7) em comparação ao grupo 100 mg/Kg.

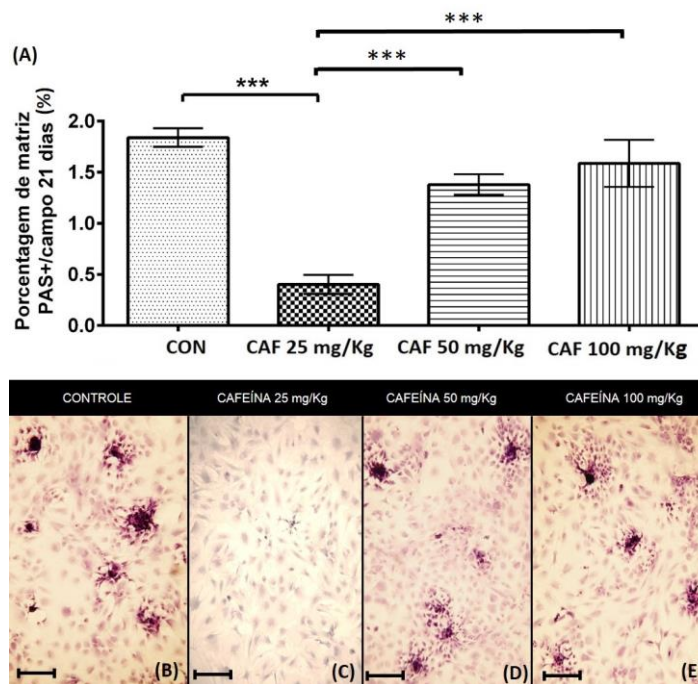


Figura 5. Porcentagem de matriz condrogênica PAS+/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A), e fotomicroscopia em Ácido periódico-Schiff (PAS) de cultura de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratos controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico, aos 21 dias. Bar: 58,5  $\mu$ m. \*\*\* $p$ <0,001.

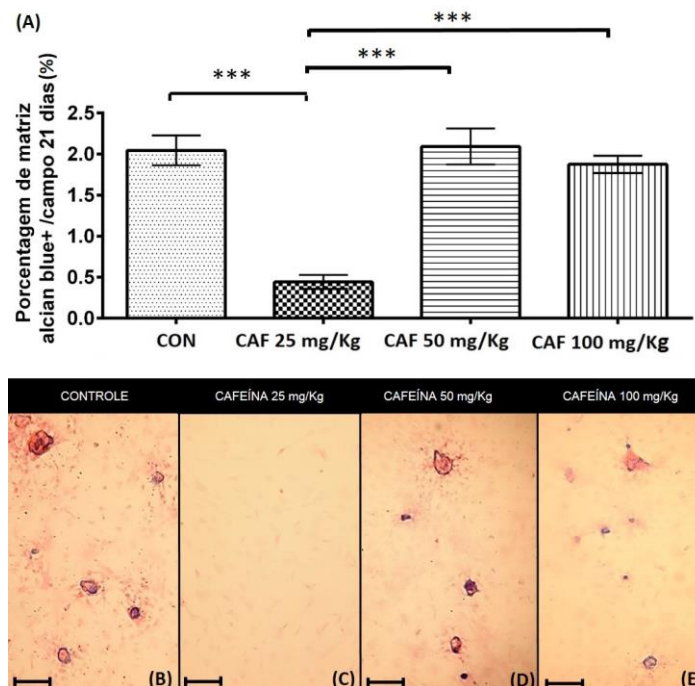


Figura 6. Porcentagem de matriz condrogênica Alcian Blue+/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A), e fotomicroscopia em Alcian blue de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de

neonatos de ratas controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico aos 21 dias. Bar: 58,5  $\mu$ m. \*\*\* $p$ <0,001.

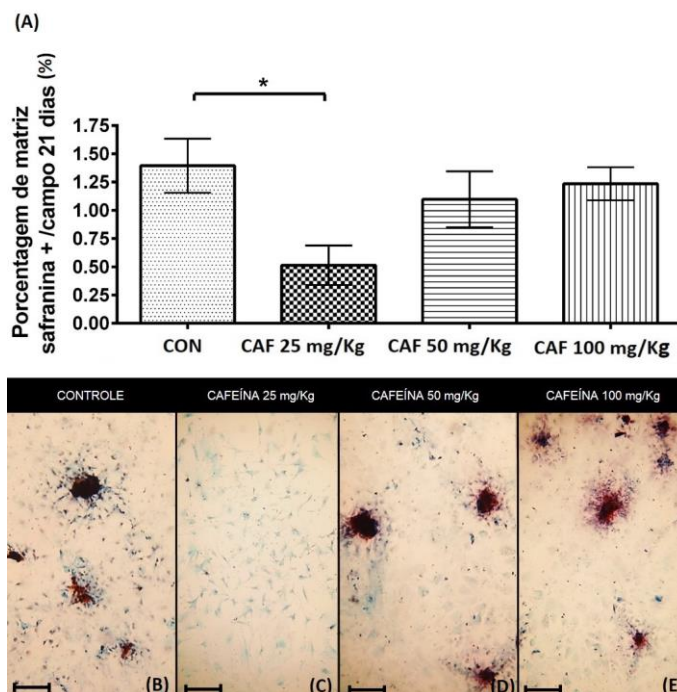


Figura 7. Porcentagem de matriz condrogênica Safranina O+/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A), e fotomicroscopia em Safranina-O de cultura de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratas controle (CON) (B) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25 (C), 50 (D) e 100 (E) mg/Kg e cultivadas em meio condrogênico aos 21 dias. Bar: 58,5  $\mu$ m. \* $p$ <0,05.

### ***Expressão de transcritos gênicos para agrecano, colágeno tipo II, fosfatase alcalina, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***

Aos 21 dias, o grupo tratado com cafeína na dose de 25 mg/Kg apresentou redução significativa na quantificação de transcritos gênicos para colágeno tipo II, Sox-9 e fosfatase alcalina e aumento na quantificação do transcrito gênico para agrecano em comparação ao controle (Figura 8A,B,C,D). O grupo tratado com cafeína na dose de 50 mg/Kg apresentou redução significativa na quantificação de transcritos gênicos para Sox-9 em comparação ao controle (Figura 8A). Enquanto que o grupo tratado com cafeína na dose de 100 mg/Kg apresentou redução significativa na quantificação de transcritos gênicos para Sox-9 e fosfatase alcalina em comparação ao grupo controle (Figura 8A,B).

Aos 21 dias, os grupos tratados com cafeína 25 e 100 mg/Kg apresentaram redução significativa da expressão de fosfatase alcalina (Figura 8B) em comparação ao grupo 50 mg/Kg. Aos 21 dias, o grupo tratado com cafeína 25 mg/Kg apresentou redução significativa da expressão de colágeno tipo II (Figura 8C) em comparação aos grupos 50 e 100 mg/Kg. Aos 21 dias, o grupo tratado com cafeína 100 mg/Kg apresentou redução significativa da expressão de agrecano (Figura 8D) em comparação aos grupos 25 mg/Kg.

Aos 21 dias, os grupos tratados com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg não apresentaram diferença significativa na quantificação do transcrito gênico para Runx-2 quando comparados ao controle (Figura 8E).

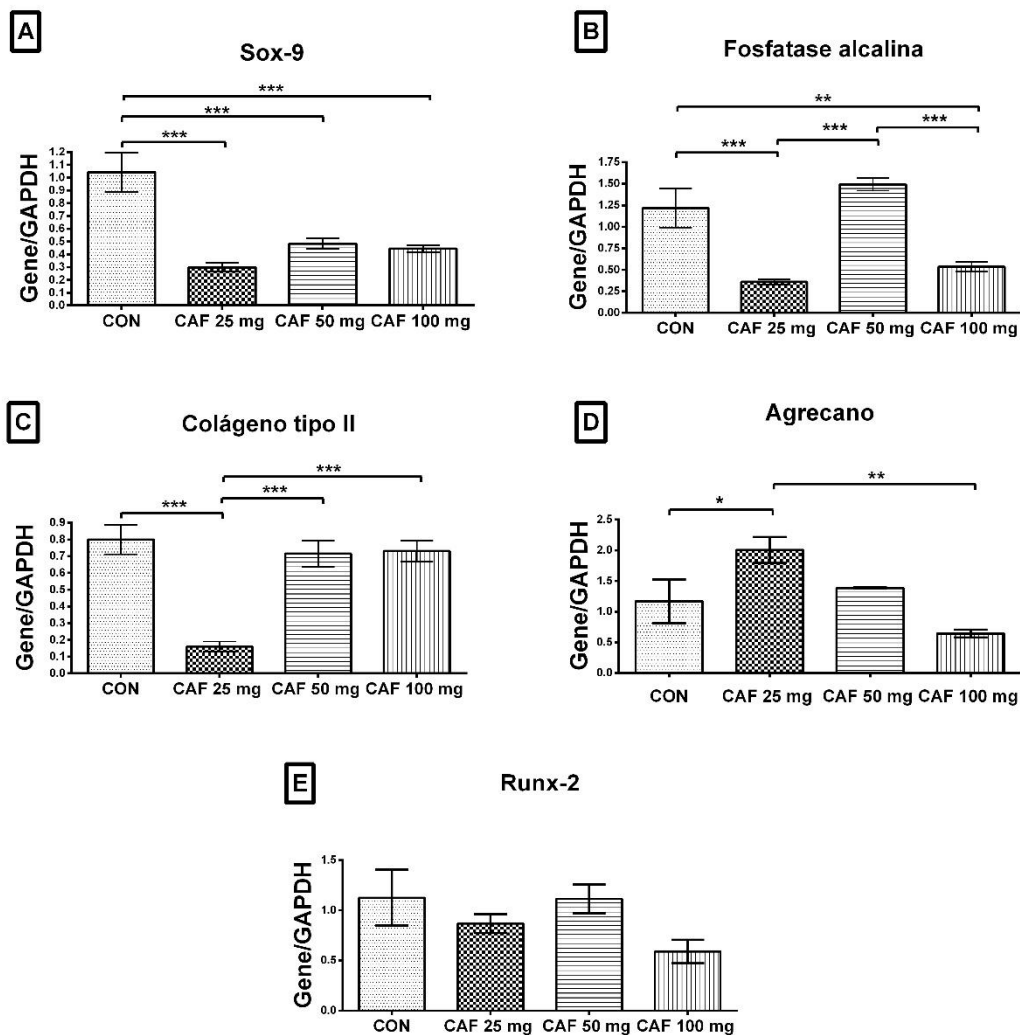


Figura 8. Comparação da quantificação relativa de transcritos gênicos (média  $\pm$  desvio padrão) para Sox-9 (A), fosfatase alcalina (B), colágeno tipo II (C), agrecano (D) e Runx-2 (E) pelo qRT-PCR em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de neonatos de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg, e cultivadas por 21 dias. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Em resumo, as culturas de condrócitos das cartilagens da prole ao nascimento de ratas tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg apresentaram variações na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, bem como na porcentagem de condrócitos e matriz condrogênica PAS+, Alcian Blue +, Safranina O+/campo, e na expressão gênica de Sox-9, fosfatase alcalina, agrecano, colágeno tipo II e Runx-2 em comparação com o grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos efeitos da cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno (COL), porcentagem de condrócitos e matriz condrogênica PAS+, Alcian Blue +, Safranina O+/campo, e na expressão gênica de Sox-9, fosfatase alcalina (ALP), agrecano, colágeno tipo II e Runx-2 em comparação com o grupo controle

	CAF 25mg/Kg			CAF 50mg/Kg			CAF 100mg/Kg		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Redução MTT	↓	-	↓	↓	-	-	-	-	-
Atividade ALP	↓	↓	↓	-	-	-	-	-	↑
Síntese de COL	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	-
(%) Condrócitos			↓			-			-
(%) Matriz PAS +/campo			↓			-			-
(%) Matriz Alcian Blue +/campo			↓			-			-
(%) Matriz Safranina O+/campo			↓			-			-
Sox-9			↓			↓			↓
ALP			↓			-			↓
Agrecano			↓			-			-
Colágeno tipo II			↓			-			-
Runx-2			-			-			-

\*(-): sem diferença significativa; ↑: aumentou significativamente; ↓ diminuiu significativamente; ( ): não foi mensurado.

## Discussão

Este estudo demonstra que a cafeína administrada às ratas gestantes afeta negativamente os condrócitos das cartilagens articulares da prole, reduzindo, independentemente da dose, a síntese de colágeno e a expressão de Sox-9 e que seus efeitos não são lineares ou dose-dependentes, uma vez que as culturas de condrócitos dos filhos de mães que receberam a menor dose de cafeína (25mg/Kg) apresentaram os menores resultados com redução da viabilidade e da porcentagem de células, da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e de matriz condrogênica, bem como da expressão de Sox-9, fosfatase alcalina e colágeno tipo II.

Ao contrário dos resultados aqui apresentados, estudos *in vitro* realizados com diferentes concentrações de cafeína (0,5; 1,0 e 2,0 mM) adicionadas diretamente às culturas de condrócitos também extraídos das cartilagens articulares de ratos neonatos, demonstram que todas as concentrações de cafeína inibem a condrogênese e que alguns desses efeitos são dependentes da concentração com redução mais intensa causada pela maior concentração de cafeína e vice-versa (capítulo 5). Também foi demonstrado que a cafeína adicionada à cultura de condrócitos tem seus efeitos negativos sobre a condrogênese atenuados quando antagonistas dos receptores para adenosina são adicionados ao meio de cultivo, demonstrando o envolvimento desses receptores no mecanismo de ação da cafeína sobre o tecido cartilaginoso (Choi et al., 2016). Uma das hipóteses para tentar explicar a diferença dos resultados *in vivo* e *in vitro* é que em decorrência da cafeína ter sido adicionada diretamente na cultura de condrócitos, seu efeito é direto e potencializado, uma vez que ela não sofre a metabolização e a eliminação pelo organismo e nem tão pouco a interferência de qualquer fator seja hormonal, nutricional, dentre outros fatores intrínsecos ao indivíduo.

Os resultados dos ensaios *in vitro*, podem diferir dos ensaios *in vivo* e *ex vivo*, uma vez que é difícil reproduzir *in vitro* todo o microambiente celular com os inúmeros fatores de crescimento, hormônios, citocinas, genes, dentre outros. Dessa forma, no presente estudo, como a cafeína foi administrada às ratas gestantes *in vivo* e veiculada pela placenta para os fetos, além da metabolização da droga, sua ação também pode sofrer interferência das mudanças que ocorrem durante a gestação e de outros fatores intrínsecos ao indivíduo. Dessa forma, é provável que a cafeína nas maiores doses de 50 e 100 mg/Kg possa influenciar a ação de outros fatores sobre as cartilagens, antagonizando alguns dos efeitos obtidos na dose de 25mg/Kg.

Exemplificando o raciocínio anterior, a administração de cafeína em ratos na dose de 100 mg/Kg causa elevação dos níveis plasmáticos de cortisol (Reis et al 2014) e sabe-se que os glicocorticoides agem positivamente sobre a diferenciação condrogênica de células tronco em humanos, aumentando a expressão de genes da matriz extracelular cartilaginosa como agrecano, dermatopontin, colágeno tipo IX, bem como aumentando a expressão de TGF- $\beta$  que por sua vez regula a expressão de colágeno tipo II e da proteína oligomérica da matriz condrogênica (COMP) (Derfoul et al., 2006). Dessa forma, a elevação dos níveis de cortisol poderiam estar atuando de forma antagonista aos efeitos promovidos pela cafeína.

Além disso, estudos tem relatado que doses de cafeína acima de 10 mg/Kg apresentam cinética não linear, sendo que a concentração de cafeína no sangue aumenta, mas não em proporção com a dose, apresentando alterações em vários parâmetros farmacocinéticos dependentes do metabolismo hepático (Bortolotti et al., 1985; Bortolotti et al., 1990). A biotransformação da cafeína ocorre principalmente no fígado através do sistema microsomal citocromo P450, sendo

este processo afetado pela concentração da droga (Bortolotti et al., 1985; Bortolotti et al., 1990). Doses baixas de cafeína apresentam um padrão semelhante com relação à cinética de eliminação, no entanto, doses acima de 10 mg/Kg apresentam capacidade limitada de eliminação, com possível saturação das reações enzimáticas, principalmente em relação a paraxantina, principal metabólito da cafeína. Em adição, estudos em humanos observaram que doses altas de cafeína (>500 mg) em indivíduos saudáveis, também apresentaram efeito não linear, com redução da taxa de depuração e meia vida prolongada. Os efeitos observados por estes pesquisadores também não foram dose-dependentes (Kaplan et al., 1997). Algumas pesquisas e estudos clínicos também indicam que a cinética da cafeína pode ser não linear, mas o mecanismo da não linearidade não está estabelecido (Denaro et al., 1990; Kaplan et al., 1992; Kamimori et al., 1995).

Nos ensaios de redução do MTT em cristais de formazan, os condrócitos do grupo tratado com 25 mg/Kg de cafeína apresentaram menor redução aos sete e 21 dias de cultivo. Enquanto que o grupo tratado com 50 mg/Kg apresentou menor redução de MTT em cristais de formazan apenas aos sete dias. A redução do MTT em cristais de formazan é um ensaio que avalia a viabilidade celular por meio da atividade enzimática da succinato desidrogenase presente em mitocôndrias de células viáveis (Altman, 1976; Holt et al., 1987). Mas este ensaio sofre influência da celularidade da cultura. Sendo assim, não se pode afastar a possibilidade da redução de MTT em cristais de formazan no grupo tratado com cafeína na dose de 25 mg/Kg aos 21 dias de cultivo ter sido influenciada pela redução da celularidade.

Com base nos nossos resultados, não se pode explicar de que forma a cafeína reduziu a porcentagem de células, se por reduzir a proliferação ou por aumentar a apoptose. Em osteoblastos, pesquisadores relataram que altas doses de cafeína *in vitro* podem reduzir a viabilidade celular por comprometer a integridade mitocondrial, alterando seu potencial de membrana e sua permeabilidade causando morte celular por apoptose (Wink et al., 1996; Tassinari et al., 1991; Tsuang et al., 2006; Rapuri et al., 2007; Lu et al., 2008). No entanto, estudos do efeito da cafeína sobre a proliferação e apoptose de condrócitos são necessários.

Com relação à fosfatase alcalina, a dose de 25 mg/Kg reduziu não somente a atividade dessa enzima como também a expressão do transcrito gênico para fosfatase alcalina. A fosfatase alcalina é um marcador da maturação de condrócitos (Wuthier et al., 1985; Garimella et al., 2004), e por isso, sua diminuição tanto no teste colorimétrico quanto pelo qRT-PCR na dose de 25 mg/Kg de cafeína, sugere atraso na diferenciação condrogênica, o que fica mais evidente associado a outros parâmetros avaliados como a redução dos nódulos condrogênicos, importantes indicadores da diferenciação e maturação celular (Wuthier et al., 1985; Garimella et al., 2004). No entanto, os condrócitos do grupo que recebeu 100 mg/Kg de cafeína apresentaram, aos 21 dias, maior atividade da fosfatase alcalina pelo ensaio colorimétrico e menor expressão do transcrito gênico para fosfatase alcalina pelo qRT-PCR em comparação ao controle. Essa divergência pode ser explicada pelo fato do teste colorimétrico avaliar a atividade da enzima, enquanto que o qRT-PCR avalia a expressão gênica.

Em todos os períodos estudados, a síntese de colágeno pelo ensaio colorimétrico reduziu nas doses de 25 e 50 mg/Kg e na dose de 100 mg/Kg houve redução da síntese de colágeno aos sete e 14 dias. No entanto, somente a dose de 25 mg/Kg reduziu também o transcrito gênico para colágeno tipo II pelo qRT-PCR. O fato das doses de 50 e 100 mg/Kg de cafeína reduzir o colágeno somente pelo ensaio colorimétrico sem afetar a expressão do transcrito pode ser explicada pelo fato do ensaio colorimétrico avaliar a síntese total de colágeno, enquanto que

pelo qRT-PCR foi avaliada a expressão do transcrito gênico para o colágeno tipo II. Como a dose de 25 mg/Kg reduziu a expressão do transcrito para colágeno tipo II e a celularidade, talvez essa seja algumas das razões pela qual a redução dos nódulos condrogênicos somente tenha sido observada nesta dose.

O colágeno é um importante constituinte da matriz extracelular (Wuthier et al., 1985; Garimella et al., 2004), e por isso, sua diminuição juntamente com a redução de outros constituintes importantes da matriz como os proteoglicanos e glicosaminoglicanos totais avaliados pelas colorações Alcian blue, PAS e Safranina O na dose de 25 mg/Kg de cafeína, demonstram que esse alcaloide afeta negativamente a matriz condrogênica, não apenas pela redução da celularidade, mas também pela redução dos demais constituintes da matriz. No entanto, sabe-se que condrócitos expressam receptores para adenosina A2B (Koolpe et al., 1999) e também produzem adenosina endogenamente (Tesch et al., 2002 in Tesch et al., 2004) que regula a homeostase da matriz da cartilagem articular. A cafeína por sua vez é um antagonista dos receptores para adenosina, inibidor de fosfodiesterase e ativador de proteína quinase A (Varani et al., 1999; Zhou et al., 2009; Ribeiro e Sebastião, 2010). Dessa forma uma hipótese seria que a sua ligação a esses receptores poderia inibir a ação da adenosina, estimulando a liberação de substâncias que degradam a matriz como as metaloproteinases. Além disso, sabe-se que condrócitos expressam tanto metaloproteinases (MMPs) quando seus inibidores (TIMPs), entre eles TIMP-2, e níveis basais desses inibidores são necessários para manter a integridade da matriz (Zafarullah et al., 1996). Dessa forma, postulamos que cafeína na dose de 25 mg/Kg possa reduzir a formação dos nódulos condrogênicos por interferir no equilíbrio entre a produção de MMPs e TIMPs.

Aos 21 dias, em todas as doses de cafeína estudadas houve redução do transcrito gênico para Sox-9, sem, no entanto, haver diferença entre grupos com relação à expressão do transcrito gênico Runx-2. *In vitro*, a cafeína também não altera a expressão de Runx-2 (capítulo 5). Postulamos que isso possa ter ocorrido por esses dois transcritos gênicos exercerem funções em etapas diferentes da diferenciação condrogênica, sendo o Runx-2 um gene que atua mais nas etapas finais da maturação de condrócitos e principalmente na substituição da cartilagem por tecido ósseo, dessa forma o Runx-2 está mais relacionado à osteogênese do que à condrogênese propriamente dita. A redução do Sox-9 demonstra que a cafeína interfere com a expressão de um fator que controla a condrogênese nas fases iniciais da proliferação e da diferenciação celular (Lefebvre et al 1998; Bi et al 1999; Smits et al., 2001; Komori, 2003). Sabe-se que a condrogênese é controlada primariamente por genes como Sox-9 e Runx-2 (Ducy et al., 1997) e que estes processos podem ser regulados por um segundo mensageiro, cAMP (Tintut et al., 1999; Yang et al., 2008; Carroll et al., 2013). Além disso, a cafeína ao antagonizar receptores para adenosina promove aumento de cAMP intracelular (Zhou et al., 2009; Ribeiro e Sebastião, 2010; Choi et al., 2016). Postula-se que a cafeína pela via do cAMP possa regular a expressão do Sox-9, essencial durante a diferenciação e maturação condrogênica, afetando a hipertrofia de condrócitos, a invasão vascular das cartilagens de crescimento e consequentemente a formação e o crescimento ósseos (Zhou et al., 2009).

Conclui-se que a cafeína administrada às ratas gestantes altera negativamente os condrócitos da cartilagem articular da prole, reduzindo, independentemente da dose, a síntese de colágeno e a expressão de Sox-9 e que seus efeitos não são lineares ou dose-dependentes, uma vez que as culturas de condrócitos dos filhos de mães que receberam a menor dose de cafeína (25mg/Kg) apresentaram os menores resultados com redução da viabilidade e da porcentagem de células,



da atividade da fosfatase alcalina, da síntese de colágeno e de matriz condrogênica, bem como da expressão de Sox-9, fosfatase alcalina e colágeno tipo II.

## **CAPÍTULO 5** **(Experimento 4)**

### **Efeito inibidor direto da cafeína sobre a viabilidade, atividade de síntese e expressão gênica em culturas de condrócitos da cartilagem articular de ratos**

#### **Resumo**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito direto de diferentes concentrações de cafeína sobre a viabilidade, atividade de síntese e expressão gênica em culturas de condrócitos extraídos das cartilagens articulares de ratos. As cartilagens dos fêmures e tíbias de 15 ratos Wistar com três dias de idade foram incubadas com colagenase 0,4% para isolamento dos condrócitos. Os condrócitos foram cultivados em meio condrogênico (grupo controle) ou em meio condrogênico acrescido de diferentes concentrações de cafeína (0,5mM, 1,0 mM e 2,0 mM). Foi realizada a avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio de redução do MTT e da atividade da fosfatase alcalina e da síntese de colágeno por ensaios colorimétricos aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. Culturas de condrócitos dos quatro grupos cultivadas sob lamínulas foram coradas pela Hematoxilina e Eosina para determinar a porcentagem de células/campo e coradas pelo PAS, Safranina O e Alcian Blue para determinar a porcentagem de matriz condrogênica PAS+, Safranina O+ e Alcian Blue+ aos 21 dias de cultivo. Também foi realizada a avaliação da expressão de transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agrecano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina pela técnica qRT-PCR, aos 21 dias de cultivo. As médias foram comparadas pelo teste Student Newman Keuls. A cafeína reduziu significativamente a redução do MTT em cristais de formazan, a porcentagem de células/campo, a síntese de colágeno, a atividade da fosfatase alcalina e a síntese de matriz condrogênica PAS+, safranina O+, alcian blue+, bem como a expressão dos transcritos gênicos para agrecano, Sox-9 e colágeno tipo II. Seus efeitos sobre a viabilidade celular, síntese de colágeno e atividade da fosfatase alcalina foram dependentes da sua concentração no meio de cultura. Conclui-se que a cafeína nas concentrações de 0,5mM, 1,0 mM e 2,0 mM apresenta efeito inibidor direto sobre a condrogênese, por diminuir a viabilidade celular, a atividade de síntese e a expressão dos transcritos gênicos para agrecano, colágeno tipo II e Sox-9 em condrócitos das cartilagens articulares de ratos neonatos.

Palavras chave: cafeína, condrócitos, condrogênese, ratos

## Introdução

No período fetal, a maior parte dos ossos deriva da formação óssea endocondral, na qual as células tronco mesenquimais (CTMs) diferenciam-se em condroblastos, que formam um modelo cartilaginoso que será gradativamente substituído por osso (Adams et al., 2007). No período pós-natal, os condroblastos da placa epifisária e da cartilagem articular, resquícios do molde cartilaginoso, proliferam-se e se diferenciam para que ocorra o crescimento ósseo endocondral, determinando o comprimento final do osso adulto (Mackie et al., 2008).

Durante a proliferação, estas células secretam matriz rica em colágeno tipo II e agrecano enquanto que durante a maturação os condrócitos se hipertrofiam, sendo caracterizado pela presença de vesículas de matriz, e pela expressão de marcadores fenotípicos tais como colágeno tipo X e fosfatase alcalina (Wuthier et al., 1985; Garimella et al., 2004).

Estes constituintes da matriz são regulados por fatores envolvidos diretamente na condrogênese como fatores de transcrição Sox-9 e Runx-2, que exercem seus efeitos nas etapas iniciais e tardias da diferenciação condrogênica, respectivamente (Lefebvre et al 1998; Bi et al 1999; Smits et al., 2001; Komori, 2003). Sox-9 atua como indutor das condensações mesenquimais e do início da diferenciação condrogênica, enquanto que o Runx-2 atua como um regulador determinante para a hipertrofia dos condrócitos, invasão vascular e consequente substituição da cartilagem por tecido ósseo (Komori, 2003; Ding et al., 2012).

Algumas patologias ósseas podem surgir da interferência nas diversas etapas da condrogênese e também em seus reguladores (Yan et al., 2012). A cafeína é uma das substâncias que pode alterar o crescimento ósseo (Reis et al., 2014). Sua importância deve-se ao fato de ser amplamente consumida pela população humana, além de ser veiculada por via transplacentária e transmamária, interferindo na formação e no crescimento ósseo endocondral da prole (Dews, 1982; Reissig et al., 2009; Reis et al., 2014). Há relatos das consequências e das alterações da cafeína sobre o tecido ósseo e suas células (Tassinari et al., 1991; Barone et al., 1993; Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Huang et al., 2002; Tsuang et al., 2006; Reis et al., 2014), mas os estudos do seu efeito em condrócitos são escassos (Choi et al., 2016), apesar de saber que o consumo de cafeína pela mãe durante a gestação e lactação afeta o crescimento da cartilagem da prole (Wink et al., 1996; Tan et al., 2012; Reis et al., 2014).

A cafeína que passa da mãe para a prole causa desorganização e indistinção das zonas da placa epifisária dos ossos longos e vértebras, bem como deficiência de glicosaminoglicanos na matriz condrogênica (Reis et al., 2014). Além disso, tem sido observadas alterações nos ossos longos e vértebras, como redução do comprimento, da massa e da densidade mineral óssea (Huang et al., 2002; Reis et al., 2014, Shin et al., 2015). No entanto, para elucidar a gênese das alterações causadas pela cafeína na cartilagem, mais estudos sobre os mecanismos celulares e moleculares pelos quais a cafeína age sobre condrócitos são necessários.

No que diz respeito as células do tecido ósseo, sabe-se que a cafeína atua sobre os osteoblastos (Kamagata-Kiyoura et al., 1999; Zhou et al., 2009; Zhou et al., 2010; Macedo et al., 2015), reduzindo a viabilidade dessas células (Tsuang et al., 2006) e inibindo a síntese através da ativação de morte celular (Tassinari et al., 1991; Kamagata-Kiyoura et al., 1999, Lu et al., 2008).

Culturas de osteoblastos tratadas com elevadas concentrações de cafeína apresentam menor expressão de genes, enzimas e proteínas que são naturalmente expressos durante a osteogênese, como o Runx-2, fosfatase alcalina, colágeno tipo I, osteocalcina, osteopontina, histona e receptores para vitamina D (Tassinari et al., 1991; Rapuri et al., 2007; Zhou et al., 2010). Já em cultura de CTMs tratadas com elevadas concentrações de cafeína observa-se supressão da diferenciação celular, redução da mineralização, da atividade da fosfatase alcalina e de genes reguladores para osteocalcina, osteoprotegerina e Runx-2 (Su et al., 2013). Também foi observado o efeito inibidor da cafeína sobre a diferenciação osteogênica de CTMs em um estudo que investigou as CTMs da prole dos ratos que receberam a cafeína durante a gestação e lactação (Reis et al., 2016).

O efeito da cafeína em osteoblastos e CTMs pode explicar alguns dos mecanismos pelos quais ela causa osteopenia, mas não fornece informações sobre a gênese das alterações de crescimento causados por este alcaloide (Tassinari et al., 1991; Zhou et al., 2010; Rapuri et al., 2007; Reis et al., 2016).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito direto de diferentes concentrações de cafeína sobre a viabilidade e atividade de síntese de condrócitos extraídos da cartilagem articular de ratos neonatos, por meio de análises da porcentagem de células e de matriz condrogênica PAS+, Safranina O+ e Alcian Blue+ e da expressão de transcritos gênicos para Sox-9, Runx-2, agregano, colágeno tipo II e fosfatase alcalina pela técnica qRT-PCR.

## **Material e Métodos**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (protocolo n.º 3/2013) (*Anexo 4*).

### ***Extração e cultivo de condrócitos das cartilagens***

A extração dos condrócitos das cartilagens foi realizada conforme protocolos previamente estabelecidos (Chen et al, 2009; Hellingman et al., 2010).

15 ratos Wistar com três dias de idade foram eutanasiados utilizando a associação de cloridrato de quetamina (120 mg/Kg) e cloridrato de xilazina (30 mg/Kg) via intraperitoneal. Foi realizada a antisepsia com álcool 70% e povidona-iodo (PVPI) na pele dos membros posteriores e em seguida os fêmures e as tíbias de todos os animais foram dissecados dos tecidos musculares e conectivos adjacentes com instrumental estéril, dentro de fluxo laminar e lavados em solução tampão de fosfato padrão (PBS) 0,15M estéril (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Fragmentos de cartilagem articular foram imediatamente colhidas das extremidades proximal e distal destes ossos e incubadas *overnight* com colagenase II 0,4% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) acrescido de DMEM (Gibco, Grand Island, NY), gentamicina (60mg/L), penicilina (100 U/mL), estreptomicina (10mg/mL) e anfotericina B (250mg/L) (Merck, Germany) e 5% de soro fetal bovino (SFB- Sorali, Brasil) para isolamento dos condrócitos.

As suspensões de condrócitos foram centrifugadas por 10 minutos a 1400g e lavadas com PBS. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas e cultivadas em garrafas T25 (TPP - Techno Plastic Products in Trasadingen) contendo meio condrogênico. Este meio foi composto

por DMEM acrescido de 1% de soro fetal bovino e suplementado com ácido ascórbico (50µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 10<sup>-7</sup>M dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 6,25 µg/mL de insulina (Biobras, Brasil), 6,25 µg/mL de transferrina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1mM de piruvato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1,25 µg/mL de BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram mantidas em estufa a 37° com 5% de CO<sub>2</sub> e o meio de cultura foi trocado a cada dois dias. Após atingir a confluência de 80-90% das células, as culturas foram tripsinizadas e cultivadas em meio condrogênico (grupo controle) ou em meio condrogênico acrescido de diferentes concentrações de cafeína (0,5Mm, 1,0 mM e 2,0 mM) em placas com 6 ou 24 poços, dependendo do tipo de ensaio a ser realizado. Assim, foram estabelecidos quatro grupos com um n amostral de seis culturas/grupo para avaliação da viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina e síntese de colágeno aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. A porcentagem de células e de matriz condrogênica e a expressão de transcritos gênicos da matriz condrogênica representados pelo agrecano, colágeno tipo II, fosfatase alcalina, Runx-2 e Sox-9 foram avaliados aos 21 dias de cultivo.

### ***Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan***

Aos sete, 14 e 21 dias de cultivo, os condrócitos foram incubados com MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide) (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA) por 2 horas a 37°C. Após incubação, as células foram tratadas por 12 horas com solução de solubilização (sodium dodecyl sulphate in 10% HCl) (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. A análise foi realizada em sextuplicata por grupo.

### ***Avaliação da atividade da fosfatase alcalina***

Aos sete, 14 e 21 dias de cultivo, os condrócitos foram incubados com solução de BCIP/NBT (5-bromo,4-chloro,3-indolyphosphate-nitroblue tetrazolium) (Gibco, Grand Island, NY) durante 2 h a 37°C. Após incubação, as células foram tratadas por 12 horas com solução de solubilização (sodium dodecyl sulphate in 10% HCl) (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 595nm. A análise foi realizada em sextuplicata por grupo.

### ***Avaliação da síntese de Colágeno***

Aos sete, 14 e 21 dias de cultivo, as culturas de células foram lavadas em PBS (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e fixadas em Bouin (Merk, Germany) durante 2 h à 37 °C. Após a incubação, foram lavadas com água deionizada e secas ao ar. As células foram coradas com sircol red (Reagent, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) durante 30 minutos à temperatura ambiente. As placas de cultura de células foram lavadas com solução de 0,01N HCl (Synth, São Paulo, SP, Brazil), duas vezes e então foram tratadas com solução de 0,5 M NaOH (Synth, São Paulo, SP, Brazil). Posteriormente, 100µL foram transferidos para placas de 96 poços para leitura em espectrofotômetro com comprimento de onda de 540nm. A análise foi realizada em sextuplicata por grupo.

### ***Avaliação da porcentagem de área coberta por condrócitos/campo e síntese de matriz condrogênica safranina-O+, alcian blue+ e PAS+***

Aos 21 dias de cultivo, as células de todos os grupos experimentais, cultivadas em placas de seis poços com lamínulas 22 x 22 mm estéreis, foram lavadas com PBS 0,15M (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e fixadas em paraformaldeído 4% (Synth, São Paulo, SP, Brazil) e submetidas à coloração por hematoxilina-eosina, safranina O, alcian blue e ácido periódico-Schiff (PAS) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (Prophet et al., 1992). Posteriormente foi determinada a porcentagem/campo de condrócitos nas secções coradas por HE e de matriz condrogênica safranina O+, alcian blue+ e PAS+. A análise foi realizada com auxílio de uma gráticula de 121 pontos acoplada a um microscópio óptico com objetiva de 10x em 50 campos. A análise foi realizada em sextuplicata por grupo.

### ***Expressão de transcritos gênicos para agrecano, colágeno tipo II, fosfatase alcalina, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***

Foi realizada a avaliação quantitativa da expressão de transcrito gênico para colágeno tipo II, agrecano, sox9, Runx-2, e fosfatase alcalina pela técnica de qRT-PCR em tempo real em quatro culturas de CTMs de cada um dos grupos, aos 21 dias de cultivo.

A extração do RNA das células cultivadas foi realizada pelo uso do Trizol (Gibco), de acordo com as instruções do fabricante. 1 µg de RNA foi utilizado para a síntese de cDNA utilizando o Kit SuperScript III Platinum Two-Step qPCR kit com SYBR Green (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A transcrição reversa foi realizada em um termociclador Smart Cycler II (Cepheid, Carpinteria, CA, EUA) por 120s a 50°C, seguido pelas reações de PCR no equipamento Applied Biosystems 7.500 com os seguintes parâmetros: 45 ciclos de 15 s a 95°C e 30s a 60°C. No final de cada ensaio, os dados de fluorescência foram analisados para obtenção de valores CT. A expressão gênica foi calculada utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , onde os valores das amostras foram calculadas em relação a valores de GAPDH  $C_t$ . Os iniciadores específicos utilizados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Genes e seqüências de nucleotídeos dos iniciadores para qRT-PCR

<b>Gene</b>	<b>Iniciadores (seqüências de nucleotídeos 5' a 3')</b>	<b>Nº acesso</b>
GAPDH	<i>foward</i> : CAACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA <i>reverse</i> : GGCATGGACTGTGGTCATGA	NM_002046
Agrecano	<i>foward</i> : CACACGCTACACACTGGACT <i>reverse</i> : TCACACTGGTGGGAAGCCATC	NM_022190.1
Colágeno tipo II	<i>foward</i> : GTTACGTACACTGCCCTGA <i>reverse</i> : AAGGCGTGAGGTCTTCTGTG	NM_012929.1
Fosfatase Alcalina	<i>foward</i> : CTAGTTCCTGGGAGATGGTA <i>reverse</i> : GTGTTGTACGTCTTGGAGAGA	AC_000073.1
Runx-2	<i>foward</i> : GCGTCAACACCATCATTCTG <i>reverse</i> : CAGACCAGCAGCACTCCATC	NM_004348
Sox-9	<i>foward</i> : CCCGATCTGAAGAAGGAGAGC <i>reverse</i> : GTTCTTCACCGACTTCCTCCG	NW_0473432

## Análise Estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso e para cada variável foram determinados a média e o desvio padrão. Foi realizada ANOVA com comparação das médias pelo teste Student Newman Keuls (SNK) (Instat, version 3.00, 32 Win 95/NT; GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Diferenças foram consideradas significativas se  $p < 0,05$  (Sampaio, 1998).

## Resultados

### *Ensaio de redução do MTT em cristais de formazan*

Aos sete dias, apenas as culturas de condrócitos tratadas com cafeína na dose de 0,5 mM apresentaram redução do MTT em cristais de formazan significativamente menor, em comparação ao controle e significativamente menor, em comparação aos demais grupos tratados com cafeína. No entanto, aos 14 e 21 dias de cultivo, todas as culturas de condrócitos dos grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram menor viabilidade celular caracterizada pela redução do MTT em cristais de formazan significativamente menor, em comparação ao controle. Aos 14 dias todos os grupos tratados com cafeína apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Figura 1).

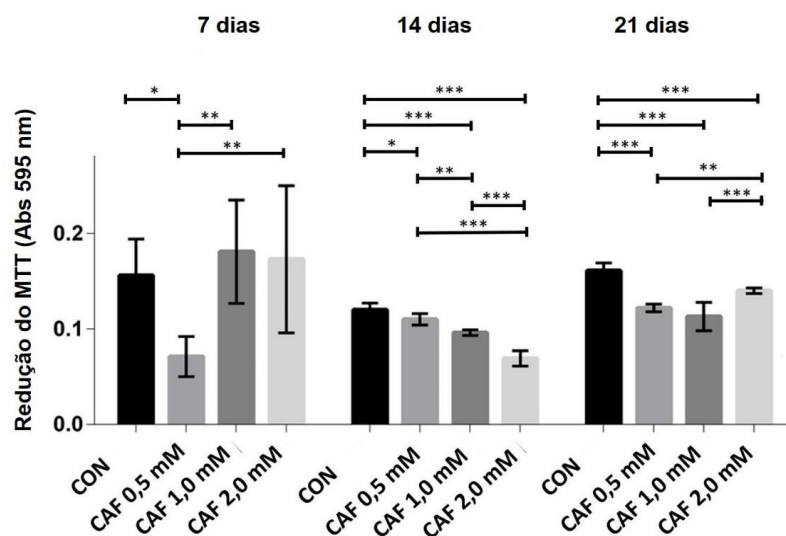


Figura 1. Redução do MTT em cristais de formazan (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### *Avaliação da atividade da fosfatase alcalina*

Aos sete dias, os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente maior em comparação ao controle. No entanto, os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM apresentaram redução significativa quando comparados com o grupo tratado com cafeína na concentração de 0,5 mM. Aos 14 e 21 dias, os grupos tratados com as mesmas concentrações de cafeína, ou seja, 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram atividade da fosfatase alcalina significativamente menor em comparação ao controle e os grupos tratados diferiram significativamente quando comparados entre si (Figura 2).

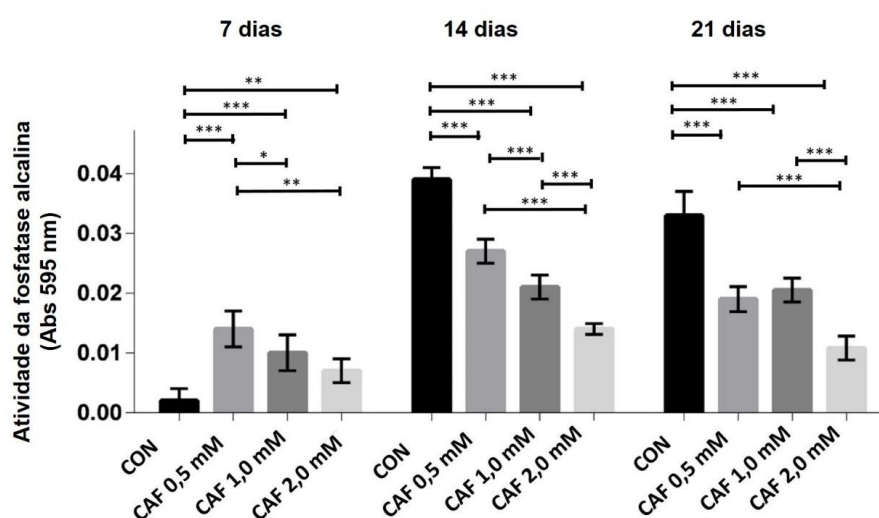


Figura 2. Atividade da fosfatase alcalina (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) ans concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### *Avaliação da síntese de colágeno*

Aos sete, 14 e 21 dias, os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram síntese de colágeno significativamente menor em comparação ao controle. Aos sete dias os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 1,0 e 2,0 mM apresentaram síntese de colágeno significativamente menor, em comparação ao grupo tratado com cafeína 0,5 mM. Aos 14 e 21 dias todos os grupos tratados com cafeína apresentaram diferenças significativas quando comparados entre si (Figura 3).



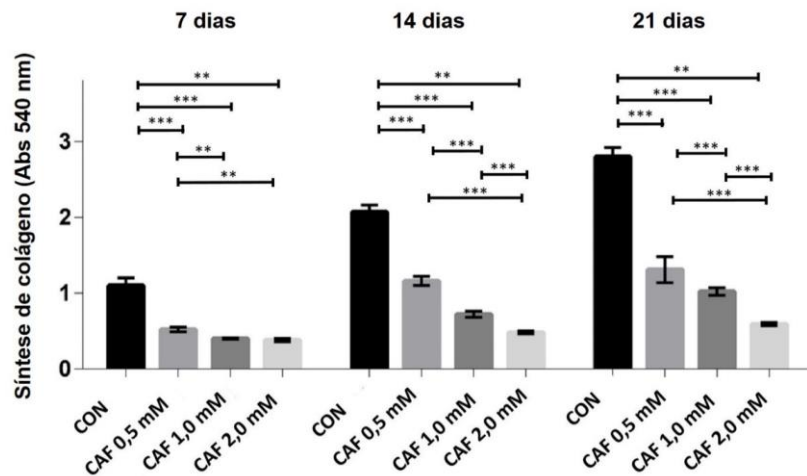


Figura 3. Síntese de colágeno (média  $\pm$  desvio padrão) em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos sete, 14 e 21 dias de cultivo. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

#### *Avaliação da porcentagem de área coberta por condrócitos/campo*

Aos 21 dias, todos os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram redução significativa na porcentagem de condrócitos/campo em comparação ao controle e também apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Figura 4).

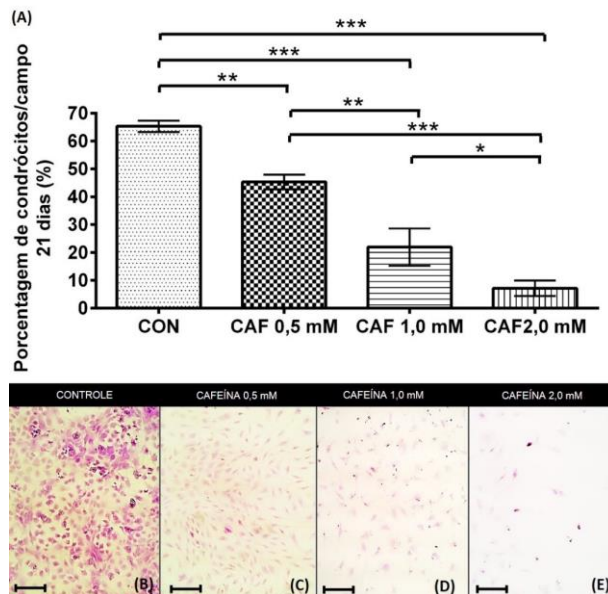


Figura 4. Porcentagem de área coberta por condrócitos/campo (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Hematoxilina e eosina (HE) de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína (CAF) nas concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias de cultivo. Bar: 58,5  $\mu\text{m}$ . \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

### Avaliação da porcentagem de matriz condrogênica PAS+, alcian blue+ e safranina+

Aos 21 dias, os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram redução significativa da porcentagem/campo de matriz condrogênica PAS+ (Figura 5), alcian blue+ (Figura 6) e safranina+ (figura 7) em comparação ao controle.

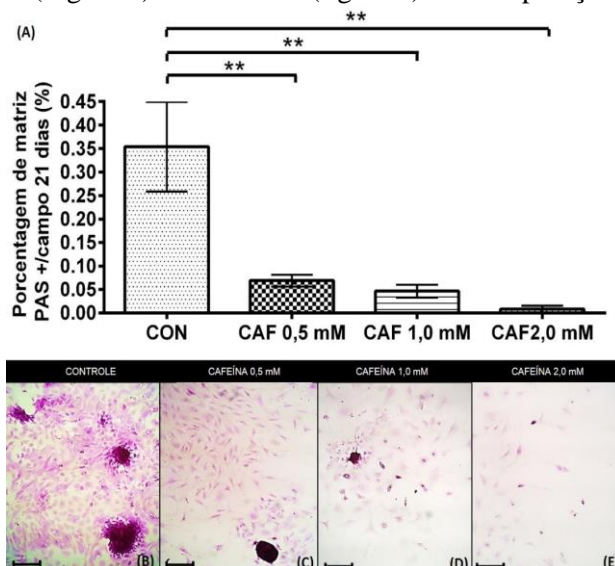


Figura 5. Porcentagem de matriz condrogênica/campo PAS+ (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Ácido periódico-Schiff (PAS) de culturas de condrocitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína nas concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias de cultivo. Bar: 58,5  $\mu$ m. \*\* $p < 0,01$ .

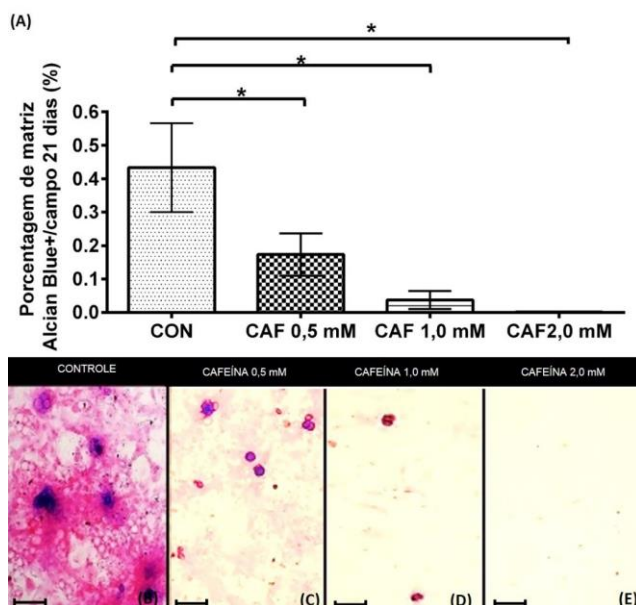


Figura 6. Porcentagem de matriz condrogênica/campo Alcian Blue+ (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Alcian blue de culturas de condrocitos extraídas das cartilagens articulares de ratos

neonatos, cultivados sem cafeína (controle) (CON) (B) e com diferentes concentrações de cafeína (CAF) 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias de cultivo. Bar: 58,5  $\mu$ m. \* $p$ <0,05.

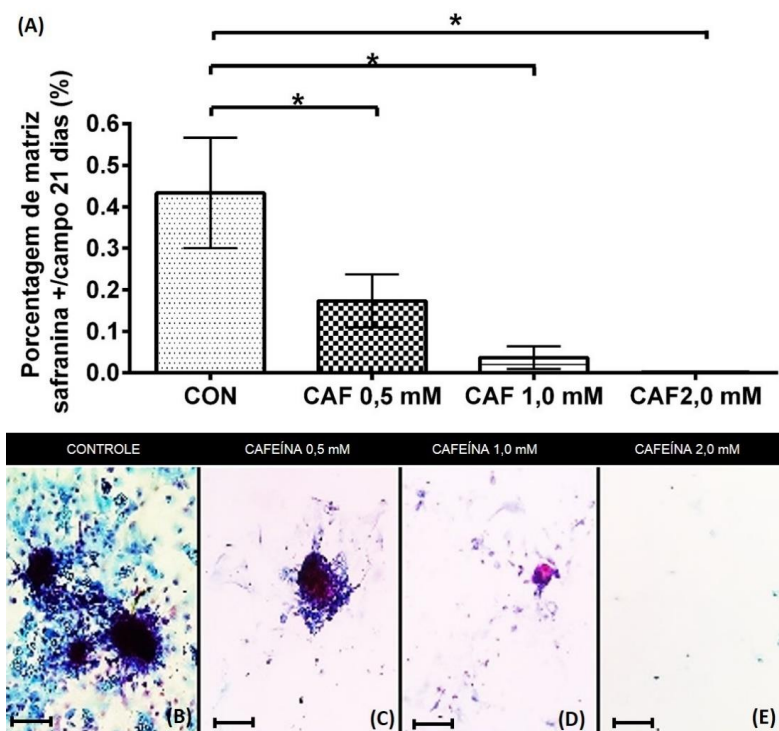


Figura 7. Porcentagem de matriz condrogênica/campo Safranina O+ (média  $\pm$  desvio padrão) (A) e fotomicroscopia em Safranina-O de culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivados em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) (B) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5 (C), 1,0 (D) e 2,0 (E) mM, aos 21 dias de cultivo. Bar: 58,5  $\mu$ m. \* $p$ <0,05.

#### ***Expressão de transcritos gênicos para agregano, colágeno tipo II, fosfatase alcalina, Runx-2 e Sox-9 pela técnica de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)***

Aos 21 dias, os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram redução significativa na quantificação de transcritos gênicos para colágeno tipo II, agregano e Sox-9 em comparação ao controle. No entanto, os grupos tratados nas diferentes concentrações de cafeína não apresentaram diferença significativa quando comparados entre si (Figura 8A, B, C).

Aos 21 dias, os grupos tratados com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM não apresentaram diferença significativa na quantificação de transcritos gênicos para Runx-2 e fosfatase alcalina quando comparados ao controle e entre si (Figura 8D e E).

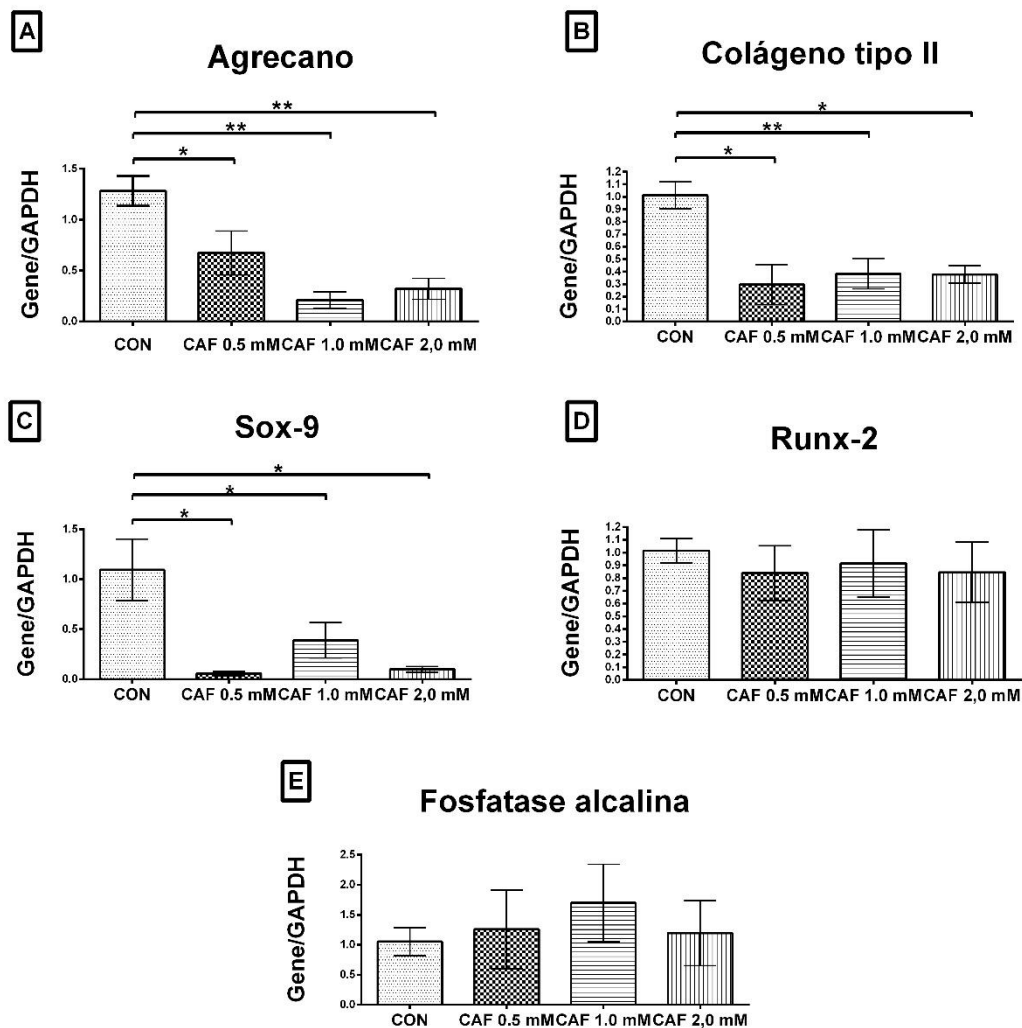


Figura 8. Comparação da quantificação relativa de transcritos gênicos (média  $\pm$  desvio padrão) para agrecano (A), colágeno tipo II (B), Sox-9 (C), Runx-2 (D) e fosfatase alcalina (E) pelo qRT-PCR em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens articulares de ratos neonatos, cultivadas em meio condrogênico sem cafeína (controle) (CON) e com cafeína (CAF) em concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM, aos 21 dias de cultivo. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

Em resumo, as culturas de condrócitos das cartilagens de ratos neonatos tratadas com cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM apresentaram variações na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno, bem como na porcentagem de condrócitos e matriz condrogênica PAS+, Alcian Blue +, Safranina O+/campo, e na expressão gênica de Sox-9, fosfatase alcalina, agrecano, colágeno tipo II e Runx-2 em comparação com o grupo controle, conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo dos efeitos da cafeína nas concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0 mM na redução do MTT, atividade da fosfatase alcalina, síntese de colágeno (COL), porcentagem de condrócitos e matriz condrogênica PAS+, Alcian Blue +, Safranina O+/campo, e na expressão gênica de Sox-9, fosfatase alcalina (ALP), agrecano, colágeno tipo II e Runx-2 em comparação com o grupo controle.

	CAF 0,5 mM			CAF 1,0 mM			CAF 2,0 mM		
	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias	7 dias	14 dias	21 dias
Redução MTT	↓	↓	↓	-	↓	↓	-	↓	↓
Atividade ALP	↑	↓	↓	↑	↓	↓	↑	↓	↓
Síntese de COL	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
(%) Condrócitos			↓			↓			↓
(%) Matriz PAS +/campo			↓			↓			↓
(%) Matriz Alcian Blue +/campo			↓			↓			↓
(%) Matriz Safranina O+/campo			↓			↓			↓
Sox-9			↓			↓			↓
ALP			-			-			-
Agregano			↓			↓			↓
Colágeno tipo II			↓			↓			↓
Runx-2			-			-			-

\*(-): sem diferença significativa; ↑: aumentou significativamente; ↓: diminuiu significativamente; (-): Não foi mensurado.

## Discussão

Este estudo demonstra claramente o efeito direto e negativo da cafeína sobre a condrogênese em culturas de condrócitos das cartilagens articulares de ratos, uma vez que a cafeína adicionada ao meio de cultura diminuiu a viabilidade celular pela redução da redução de MTT em cristais de formazan e da porcentagem de condrócitos/campo, reduziu a atividade de síntese caracterizada pela redução da atividade da fosfatase alcalina, da síntese colagênica e da porcentagem de matriz condrogênica PAS+, alcian blue+ e safranina O+ e alterou a expressão gênica caracterizada pela diminuição da expressão de transcritos gênicos para agregano, colágeno tipo II e Sox-9. Nos ensaios de redução do MTT em cristais de formazan, embora aos sete dias, apenas a concentração de 0,5 mM de cafeína tenha reduzido a viabilidade celular, aos 14 e 21

dias, a viabilidade celular reduziu gradativamente em todas as concentrações de cafeína havendo também diferença entre todos os grupos. Resultado semelhante também foi observado com relação à porcentagem de células. Isso demonstra não somente o efeito negativo direto da cafeína sobre a viabilidade dos condrócitos como também que seu efeito é dependente da concentração.

O ensaio do MTT é um método colorimétrico quantitativo que avalia a viabilidade celular e a atividade enzimática mitocondrial, uma vez que, a formação de cristais de formazan depende da atividade enzimática da succinato desidrogenase presente em mitocôndrias de células viáveis (Altman, 1976; Holt et al., 1987). É provável que a redução de MTT em cristais de formazan observada em condrócitos tratados com cafeína possa ser devido ao efeito da cafeína nas mitocôndrias, uma vez que em osteoblastos, a cafeína reduz a integridade mitocondrial, alterando o seu potencial de membrana e a permeabilidade (Wink et al., 1996; Macedo et al., 2015). Em osteoblastos, a cafeína nas concentrações de 10-20 mM também reduz a viabilidade celular, estimulando o stress oxidativo intracelular, causando morte das células por apoptose (Wink et al., 1996; Lu et al., 2008). Em condrócitos, mais estudos são necessários para verificar se a redução da viabilidade celular causada pela cafeína também é decorrente da morte por apoptose.

Todas as concentrações de cafeína alteraram a atividade da fosfatase alcalina, aumentando-a aos sete dias e, em seguida, reduzindo de forma significativa aos 14 e 21 dias em comparação com o controle. A oscilação da resposta deste parâmetro pode ocorrer principalmente nas fases iniciais da cultura (Hoemann et al., 2009). De forma semelhante, em cultivo de células tronco mesenquimais tratadas com dexametasona (10 nM ou 100 nM) também há aumento da atividade de fosfatase alcalina na primeira semana de cultura (Cheng et al., 1994) e supressão de sua atividade depois de três semanas (Schecroun et al., 2003; Yin et al., 2006). Com base nisso e no fato de que a cafeína atua em sinergismo com a dexametasona e ativa receptores para glicocorticoides em cultura de células ósseas (Focking et al., 2005), uma das hipóteses deste estudo é que a resposta da atividade da fosfatase alcalina tenha sido influenciada pela adição de dexametasona ao meio condrogênico no entanto, mais estudos são necessários para comprovar essa hipótese.

Aos 14 e 21 dias, a menor atividade de fosfatase alcalina foi observada no grupo tratado com a concentração mais elevada de cafeína e vice-versa, o que demonstra que, semelhante ao ensaio do MTT, o efeito da cafeína na atividade da fosfatase alcalina também é dependente da concentração. A fosfatase alcalina é um marcador da maturação de condrócitos, e por isso, sua diminuição na fase mais tardia, sugere atraso na diferenciação condrogênica. Esta pode ser uma das razões pela qual a cafeína reduz a síntese da matriz condrogênica, que é um indicador importante da diferenciação e maturação celular (Garimella et al., 2004).

Apesar da redução da atividade da fosfatase alcalina nos grupos tratados com cafeína aos 21 dias de cultura pelo teste colorimétrico, não houve diferença significativa da expressão do transcrito gênico para fosfatase alcalina pelo qRT-PCR durante o mesmo período. Essa divergência pode ser explicada pelos testes colorimétricos avaliarem a atividade enzimática, enquanto que o qRT-PCR avalia a expressão gênica. Além disso, deve-se levar em consideração as limitações dos testes colorimétricos, cujo resultado pode variar de acordo com o número de células da cultura, havendo sempre a necessidade de complementação com ensaios mais precisos como o qRT-PCR e até mesmo o Elisa. Sendo assim, é provável que neste estudo, a redução da atividade da fosfatase alcalina tenha sido devido a redução da viabilidade celular e

consequentemente da celularidade e não por redução dos níveis de fosfatase sintetizada pelos condrócitos.

Ao contrário da fosfatase alcalina, o colágeno reduziu em todos os grupos tratados com cafeína em comparação ao controle tanto pelo ensaio colorimétrico quanto pelo qRT-PCR. Assim, é provável que a redução na porcentagem de células não seja a única razão pela qual houve redução na síntese de colágeno. Os condrócitos sob o efeito da cafeína podem apresentar capacidade reduzida de sintetizar colágeno. O colágeno é um dos principais constituintes da matriz extracelular (Garimella et al., 2004; Wuthier et al., 2006), e, por conseguinte, a sua redução pode ser uma razão para explicar a inibição da síntese de matriz condrogênica pela cafeína.

Em adição, a síntese reduzida de matriz condrogênica de todos os grupos tratados com cafeína estava associada à expressão reduzida de agrecano pelo qRT-PCR, à redução de glicogênio e glicoproteínas pela coloração de PAS, redução de ácido hialurônico e mucosubstâncias sulfatadas pela coloração de alcian blue, e redução de proteoglicanos e glicosaminoglicanos pela coloração de safranina O. Estes resultados sugerem que a cafeína reduz a síntese de matriz condrogênica, não só pela redução da celularidade, mas também pela redução da expressão de transcritos gênicos da matriz, tais como o colágeno tipo II e o agrecano.

Além disso, a matriz extracelular, por meio dos proteoglicanos, glicosaminoglicanos, agrecanos e colágeno, desempenha papel importante no controle do crescimento e da diferenciação celular (Roughley, 2006; Souza e Pinhal, 2011). Na célula, o esqueleto protéico dos proteoglicanos é sintetizado nos ribossomos e transferido para o retículo endoplasmático rugoso. Já a ligação com as cadeias de glicosaminoglicanos é efetuada no complexo de golgi em etapas que envolvem a atividade de várias enzimas (Souza e Pinhal, 2011). Após a sua liberação na matriz é necessário que ocorra a dessulfatação dos glicosaminoglicanos para que ocorra a degradação dos mesmos (Settembre et al., 2008; Cortes et al., 2009; Mertz et al., 2012). Portanto, a deficiência de glicosaminoglicanos e proteoglicanos na matriz acarreta em diminuição da diferenciação celular e conquentemente do crescimento (Delise et al., 2000; Mertz et al., 2012), sendo provável que a deficiência de glicosaminoglicanos e proteoglicanos em culturas de condrócitos tratados com cafeína seja uma das razões pela qual houve redução na viabilidade das células e da celularidade em todos os grupos tratados.

Todas as concentrações de cafeína reduziram a expressão do transcrito gênico Sox-9 pelo qRT-PCR, no entanto não houve diferença entre grupos com relação à expressão do transcrito gênico Runx-2. A expressão de Sox-9 é essencial em várias etapas sucessivas da diferenciação das células condroprogenitoras via ativação ou repressão transcricional (Leung et al., 2011). Sox-9 é o regulador máster da diferenciação condrogênica (Akiyama et al., 2002), atuando nas fases iniciais da proliferação e diferenciação de condrócitos (Lefebvre et al., 1998; Bi et al., 1999; Komori et al., 2003; Hino et al., 2014). Assim, é provável que a cafeína exerça o seu efeito sobre a redução da celularidade e síntese da matriz através da interferência com o Sox-9.

Estudos prévios tem demonstrado que o Runx-2 é expresso em altos níveis durante o início da condrogênese (Lefebvre et al., 1998). Entretanto após o nascimento, Runx-2 torna-se menos expresso por condrócitos pré-hipertróficos e hipertróficos (Inada et al., 1999). Estudos têm demonstrado que Runx-2 por si só não é suficiente para induzir a diferenciação de condrócitos, sendo necesssária a ação conjunta com outros fatores, incluindo, Ihh, BMPs, VEGFs e colágeno tipo X (Takeda et al., 2001). No entanto, no presente estudo, apesar da cafeína alterar todos os

parâmetros estudados, não houve diferenças entre os grupos tratados e o controle no que diz respeito à expressão de Runx-2.

Conclui-se que a cafeína nas concentrações de 0,5mM, 1,0 mM e 2,0 mM apresenta efeito inibidor direto sobre a condrogênese em culturas de condrócitos das cartilagens articulares de ratos neonatos, por diminuir a viabilidade celular, pela redução da redução de MTT em cristais de formazan e da porcentagem de condrócitos, por reduzir a atividade de síntese caracterizada pela redução da atividade da fosfatase alcalina, da síntese colagênica e da porcentagem de matriz condrogênica PAS+, alcian blue+ e safranina O+ e por reduzir a expressão dos transcritos gênicos para agregcano, colágeno tipo II e Sox-9. Conclui-se também que seus efeitos sobre a viabilidade celular, síntese de colágeno e atividade da fosfatase alcalina são dependentes da sua concentração no meio de cultura e que os demais parâmetros avaliados são alterados independentemente da sua concentração.



## Considerações finais

A condrogênese e a osteogênese são processos que envolvem desde a diferenciação celular até a síntese de matriz que são regulados por inúmeros genes, fatores de crescimento, fatores hormonais locais e sistêmicos, bem como vias de sinalização, tendo sido vários deles estudados aqui. Esses processos ocorrem tanto na vida pré-natal quanto pós-natal, sendo imprescindíveis para a formação, remodelação e reparo dos tecidos cartilaginoso e ósseo. Os objetivos aqui apresentados foram alcançados, uma vez que foram demonstradas várias ações e mecanismos pelos quais a cafeína interfere na osteogênese e na condrogênese, sem a pretensão de extinguir toda dúvida a cerca de seus mecanismos de ação, mas com o intuito principal de trazer informação nova, atual e relevante e ao mesmo tempo, levantar questões que merecem ser futuramente investigadas.

A cafeína é uma das substâncias que comprovadamente interfere na formação e no crescimento ósseo endocondral. Apesar dela estar envolvida na gênese da osteoporose de indivíduos adultos, suas alterações sobre o esqueleto em formação e crescimento são mais graves com várias questões pouco estudadas. Durante a gestação, esse composto atravessa a barreira placentária e causa malefícios ao feto. Pesquisas anteriormente desenvolvidas pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que filhos de ratas tratadas com cafeína nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e a lactação apresentaram alterações tanto no tecido ósseo, quanto cartilaginoso. Nesses animais, foram observados redução do peso, do comprimento de ossos longos e vértebras, bem como alterações na morfologia de condrócitos e da matriz condrogênica de placas epifisárias e cartilagens articulares. Também foram observados nesses animais osteopenia, por mecanismos que não foram totalmente desvendados ainda.

Diante dos efeitos da cafeína, observados *in vivo*, sobre a morfologia dos ossos e da cartilagem da prole, deu-se início aos estudos apresentados aqui sobre a diferenciação osteogênica de células tronco mesenquimais e atividade de síntese de osteoblastos e condrócitos derivados da prole de ratas tratadas com cafeína nas mesmas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e/ou gestação e lactação, a fim de tentar elucidar quais alterações na diferenciação, no metabolismo geral e de síntese dessas células, bem como nos fatores que as controlam, seriam afetados pela cafeína, possibilitando a compreensão de alguns dos mecanismos pelos quais a cafeína induz alterações no esqueleto.

Estudos realizados por outros autores, com a adição de cafeína diretamente em culturas de células provenientes de animais saudáveis, demonstraram efeitos maléficos sobre os osteoblastos, condrócitos e sobre a diferenciação osteogênica das células tronco mesenquimais, com diminuição da atividade de síntese dessas células. Porém nesses estudos, o efeito da cafeína pode ter sido potencializado por ela ter sido adicionada diretamente na cultura celular sem ter sido metabolizada, à semelhança do que ocorre no organismo. Diante disso, a fim de levar em consideração a metabolização da droga pelo organismo e sua influência sobre o nicho celular, foram extraídos os osteoblastos, condrócitos e as células tronco mesenquimais da prole de mães que receberam a droga *in vivo*.

Os resultados encontrados nesse trabalho demonstram que os efeitos da cafeína são variáveis de acordo com sua ação *in vivo* ou *in vitro*, com sua concentração ou dose e com o tipo de célula sob a qual ela atua. De forma geral, os efeitos *in vivo* da cafeína sobre as células tronco e os condrócitos e o efeito *in vitro* sobre os condrócitos são negativos e danosos, enquanto que seus efeitos *in vivo* sobre os osteoblastos, nas mesmas doses testadas sobre as CTMs e os

condrócitos, são contrários, aumentando a viabilidade e a atividade de síntese dessas células, o que pode estar relacionado com a hiperplasia osteoblástica que foi observada nos experimentos *in vivo* realizados pelo nosso grupo de pesquisa.

Os resultados apresentados aqui demonstram claramente o envolvimento dos genes Sox-9 e Runx-2 no decorrer das alterações causadas pela cafeína. O efeito da cafeína tanto *in vivo* quanto *in vitro* em culturas de condrócitos extraídas das cartilagens de ratos neonatos demonstraram redução do transcrito gênico Sox-9 e ausência de efeitos sobre o Runx-2. Enquanto que nas culturas de CTMs e de osteoblastos a cafeína reduz a expressão de Runx-2. Esses resultados corroboram com dados da literatura que demonstram que os transcritos gênicos Sox-9 e Runx-2 são reguladores chaves do processo da diferenciação condrogênica e osteogênica, respectivamente, e devem estar regulados, pois eles são responsáveis por coordenar a expressão de vários outros genes e moléculas sinalizadores imprescindíveis para a formação normal do esqueleto. E apesar de outros estudos terem comprovado parte da ação da cafeína pelo antagonismo aos receptores para adenosina, ainda precisa ser elucidado o seu envolvimento com outros receptores e/ou vias de sinalização pelos quais ela atua.

## Referências bibliográficas

- ABDALLAH, B.M.; KASSEM, M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. *Gene Ther.*, v.15 (2), p.109-16, 2008.
- ABDI, R.; FIORINA, P.; ADRA, C.N. et al., Immunomodulation by Mesenchymal Stem Cells. *Diabetes*, v.57, p.1759-1767, 2008.
- ADAMS, S.L.; COHEN, A.J.; LASSOVA, L. Integration of signaling pathways regulating chondrocyte differentiation during endochondral bone formation. *J. Cell. Physiol.*, v.213, p. 635-641, 2007.
- AHMED, Y.A.; Tatarczuch, L.; PAGEL, C.N.; DAVIES, H.M.S., et al., Physiological death of hypertrophic chondrocytes. *Osteoarthritis and Cartilage.*, v.15, p.575-586, 2007.
- AKIYAMA, H.; CHABOISSIER, M.C.; MARTIN, J.F. et al., The transcription factor Sox-9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox-5 and Sox-6. *Genes Dev.*, v.16, p.2813-2828, 2002.
- ALDRIDGE, A.; PARSONS, W.D.; NEIMS, A.H. Stimulation of caffeine metabolism in rat by 3-methylcholanthrene. *Life Sci.*, v.21, p.967-974, 1977.
- ALMEIDA, M.; IYER, S.; MARTIN-MILLAN, M. et al., Estrogen receptor- $\alpha$  signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J. Clin. Invest.*, v.123, p.394-404, 2013.
- ALVAREZ, J.; SOHN, P.; ZENG, X. et al., TGF $\beta$ 2 mediates the effects of Hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression. *Dev.*, v.129, p.1913-1924, 2002.
- AKSU, A.E.; RUBIN, J.P.; DUDAS, J.R.; MARRA, K.G. Role of gender and anatomical region on induction of osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells. *Ann Plast Surg.*, v.60 (30), p.306-322. 2008.
- ALTMAN, F.P. The quantification of formazans in tissue sections by microdensitometry. I. The use of neotetrazolium chloride. *Histochem. J.*, v. 8, p. 373-381, 1976.
- ANDERSON, H.C.; HODGES, P.T.; AGUILERA, X.M. et al. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J. Histochem. Cytochem.*, v.48, p.1493-1502, 2000.
- ARNAUD, M.J. Pharmacokinetics and metabolism of natural methylxanthines in animal and man. *Handb. Exp. Pharmacol.*, v.200, p.33-91, 2011.
- ARONOW, M.A.; GERSTENFELD, L.C.; OWEN, T.A., et al. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J. Cell Physiol.*, v. 143, p. 213-221, 1990.
- AUBIN, J.E.; LIU, F.; MALAVAL, L., et al. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, v. 17, p. 77s-83s, 1995.

- AUBIN, J.E. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev. Endocr. Metab. Disord.*, v. 2, p. 81-94, 2001.
- BADILLO, A.T.; FLAKE, A.W. The regulatory role of stromal microenvironments in fetal hematopoietic ontogeny. *Stem Cell Rev.*, v.2, p.241-6, 2006.
- BAKKER, R.; STEEGERS, E.A.; OBRADOV, A.; RAAT, H.; HOFMAN, A.; JADDOE, V.W. Maternal caffeine intake from coffee and tea, fetal growth, and the risks of adverse birth outcomes: the Generation R Study. *Am. J. Clin. Nutr.*, v.91, p.1691-8, 2010.
- BALLESTEROS-YÁÑEZ, I.; CASTILLO, C.A.; AMO-SALAS, M.; ALBASANZ, J.L.; MARTÍN, M. Differential Effect of Caffeine Consumption on Diverse Brain Areas of Pregnant Rats. *J. Caf. Res.*, v.2, p.90-98, 2012.
- BALLOCK, R.T.; O'KEEFE, R.J. Physiology and pathophysiology of the growth plate. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews.*, v.69, p.123-143, 2003.
- BANDYOPADHYAY, A.; TSUJI, K.; COX, K. et al., Genetic analysis of the roles of BMP-2, BMP-4, and BMP7 in limb patterning and skeletogenesis. *Plos Genet.*, v.2, p.e216, 2006.
- BANERJEE, C.; JAVED, A.; CHOI, J. et al., Differential regulation of the two principal Runx-2/cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology.*, v.142, p.4026-4039, 2001.
- BARD, D.R.; DICKENS, M.J.; SMITH, A.U.; AND ZAREK, J. M. Isolation of living cells from mature mammalian bone, *Nature*, v.236, p.314-315, 1972.
- BARNA, M.; NISWANDER, L. Visualization of cartilage formation: insight into cellular properties of skeletal progenitors and chondrodysplasia syndromes. *Dev Cell.*, v.12 (6) ,p.931-41, 2007.
- BARONE, L.M.; TASSINARI, M.S.; BORTELL, R. et al., Inhibition of induced endochondral bone development in caffeine treated rats. *J. Cell. Biochem.*, v.52, p.171-182, 1993.
- BARONE, J.J.; ROBERTS, H.R. Caffeine consumption. *Food Chem. Toxicol.*, v.34, p.119-129, 1996.
- BARRY, F.; BOYNTON, R.E.; LIU, B.; MURPHY, J.M. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components. *Exp. Cell. Res.*, v.268, p.189-200, 2001.
- BEAVEN, C.M.; HOPKINS, W.G.; HANSEN, K.T. et al., Dose effect of caffeine on testosterone and cortisol responses to resistance exercise. *Int. J. Sport. Nutr. Exerc. Metab.*, v.18, p.131-41, 2008.
- BECK, G.R.JR.; ZERLER, B.; MORAN, E. Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.97 (15), p.8352-8357, 2000.
- BEIER, F. Cell-cycle control and the cartilage growth plate. *J. Cell. Physiol.*, v.202, p.1-8, 2005.
- BELLOWS, C.G.; SODEK, J.; YAO, K.L., et al. Phenotypic differences in subclones and long-term cultures of clonally derived rat bone cell lines. *J. Cell Biochem.*, v. 31, p. 153-169, 1986.

- BELLOWS, C.G. e AUBIN, J.E. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells in vitro. *Dev. Biol.*, v. 133, p. 8-13, 1989.
- BELLOWS, C.G.; HEERSCHKE, J.N. e AUBIN, J.E. Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner.*, v. 17, p. 15-29, 1992.
- BELLUOCCIO, D.; BERNARDO, B.C.; ROWLEY, L.; et al. A microarray approach for comparative expression profiling of the discrete maturation zones of mouse growth plate cartilage. *Biochimica et Biophysica Acta.*, v.1779, p.330-340, 2008.
- BELOTI, M.M. e ROSA, A.L. Osteoblast differentiation of human bone marrow cells under continuous and discontinuous treatment with dexamethasone. *Braz. Dent. J.*, v. 16, p. 156-161, 2005.
- BENJAMIN, M.; ARCHER, C.W.; RALPHS, J.R. Cytoskeleton of cartilage cells. *Microsc. Res. Tech.*, v.28, p.372-7, 1994.
- BENOWITZ, N.L. Clinical pharmacology of caffeine. *Annu. Rev. Med.*, v. 41, p. 277-288, 1990.
- BEYER NARDI, N. e DA SILVA MEIRELLES, L. Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb. Exp. Pharmacol.*, p. 249-282, 2006.
- BERGMAN, E.A.; MASSEY, L.K.; WISE, K.J. et al., Effects of dietary caffeine on renal handling of minerals in adult women. *Life Sci.*, v.47, p.557-564, 1990.
- BERGWITZ, C.; WENDLANDT, T.; KISPERT, A.; BRABANT, G. Wnts differentially regulate colony growth and differentiation of chondrogenic rat calvaria cells. *Biochim Biophys Acta.*, v.1538, p.129-40 2001.
- BERLIN, C.M.; DENSON, H.M.; DANIEL, C.H.; WARD, M. Disposition of Dietary Caffeine in Milk, Saliva, and Plasma of Lactating Women. *Ped. Gastr.*, v.73, p. 59-63, 1984.
- BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, v.1, p.11-21, 2000.
- BI, W.; DENG, J.M.; ZHANG, Z., et al. Sox9 is required for cartilage formation. *Nat. Genet.*, v. 22, p. 85-89, 1999.
- BIAN, L.; ZHAI, D.Y.; TOUS, E. et al., Enhanced MSC chondrogenesis following delivery of TGF- $\beta$ 3 from alginate microspheres within hyaluronic acid hydrogels *in vitro* and *in vivo*. *Biomaterials.*, v.32, p.6425-34, 2011.
- BIANCO, P.; SACCHETTI, B. e RIMINUCCI, M. Osteoprogenitors and the hematopoietic microenvironment. *Best. Pract. Res. Clin. Haematol.*, v. 24, p. 37-47, 2011.
- BIRD, T.A.; SCHWARTZ, N.B. e PETERKOFISKY, B. Mechanism for the decreased biosynthesis of cartilage proteoglycan in the scorbutic guinea pig. *J. Biol. Chem.*, v. 261, p. 11166-11172, 1986.

- BIRD, T.A.; SPANHEIMER, R.G. e PETERKOFISKY, B. Coordinate regulation of collagen and proteoglycan synthesis in costal cartilage of scorbutic and acutely fasted, vitamin C-supplemented guinea pigs. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 246, p. 42-51, 1986.
- BIRMINGHAM, E.; NIEBUR, G.L.; MCHUGH, P.E., et al. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur. Cell. Mater*, v. 23, p. 13-27, 2012.
- BLAND, R. Steroid hormone receptor expression and action in bone. *Clin. Sci. (Lond)*, v. 98, p. 217-240, 2000.
- BOBICK, B.E.; CHEN, F.H.; LE, A.M.; TUAN, RS. Regulation of the chondrogenic phenotype in culture. *Birth Defects Res. C. Embryo Today.*, v.87(4), p.351-71, 2009.
- BOBIS, S.; JAROCHA, D.; MAJKA, M. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochem. Cytobiol.*, v.44, p.215-30, 2006.
- BOELONI, J.N.; OCARINO, N.M.; BOZZI, A. et al.,Dose-dependent effects of triiodothyronine on osteogenic differentiation of rat bone marrow mesenchymal stem cells. *Horm Res.*, v.71, p.88-97, 2009.
- BÖHME, K.; CONSCIENCE-EGLI, M.; TSCHAN, T.; WINTERHALTER, K.H.; BRUCKNER, P. Induction of proliferation or hypertrophy of chondrocytes in serum-free culture: the role of insulin-like growth factor-I, insulin, or thyroxine. *J. Cell Biol.*, v.116 ,p.1035-42, 1992.
- BONUCCI, E.; DERENZINI, M. e MARINOZZI, V. The organic-inorganic relationship in calcified mitochondria. *J. Cell. Biol.*, v. 59, p. 185-211, 1973.
- BORTOLOTTI, A., JIRITANO, L., BONATI, M. Pharmacokinetics of paraxantine, one of the primary metabolites of caffeine in the rat. *Drug metabolism and disposition.*, v.13, p. 227-231, 1985.
- BORTOLOTTI, A.; TRAINA, G.L.; GUAITANI, A.; MARZI, E.; LATINI, R.; YOUNG, J.F.; BONATI. *In vivo* and perfused liver caffeine kinetics in the rat. *Res. Com. Chem. Pathol. Pharmacol.*, v.69, p. 285-295, 1990.
- BOURZAC, C.; SMITH, L.C.; VINCENT, P.; BEAUCHAMP, G.; LAVOIE, J.P.; LAVERTY, S. Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols. *Equine Vet J.*, v.42(6), p.519-27, 2010.
- BOZCHALOEI, S.S.; GONG, S.G.; DEHPOUR, A.R. et al.,Caffeine alters mitochondrial dehydrogenase and alkaline phosphatase activity of human gingival fibroblasts in vitro. *J. Investig. Clin. Dent.*, v.4, p.233-9, 2013.
- BRAKSPEAR, K.S.; MASON, D.J. Glutamate signaling in bone. *Front. Endocrinol. (Lausanne).*, v.3, p.1-8, 2012.

- BRIDGEWATER, L.C.; LEFEBVRE, V.; CROMBRUGGHE, B. Chondrocyte specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J. Biol. Chem.*, v.273, p.14998-15006, 1998.
- BROWN, E.M.; HURWITZ, S.; AURBACH, G.D. Beta-adrenergic stimulation of cyclic AMP content and parathyroid hormone release from isolated bovine parathyroid cells. *Endocrinology.*, v.100, p.1696-1702, 1977.
- BRUDER, S.P.; JAISWAL, N.; RICALTON, N.S. et al., Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop.*, v.355, p.S247-256, 1998.
- BRUDERER, M.; RICHARDS, R.G.; ALINI, M., et al. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *Eur. Cell. Mater.*, v. 28, p. 269-286, 2014.
- BULOW, H.E. e HOBERT, O. The molecular diversity of glycosaminoglycans shapes animal development. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v. 22, p. 375-407, 2006.
- BUNKER, M.L. e MCWILLIAMS, M. Caffeine content of common beverages. *J. Am. Diet. Assoc.*, v. 74, p. 28-32, 1979.
- BYDLOWSKI, S.P.; DEBES, A.A.; MASSELI, L.M.F.; JANZ, F.L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia.*, v.31, p.25-35, 2009.
- CABEZAS, M.T.; FLORES, A.; EGANA, J.I. Use of coffee pulp in ruminant feeding. In: BRAHAN, J.E.; BRESSANI, R. (Ed.) *Coffee pulp: Composition, technology, and utilization*. Guatemala City: Institute of Nutrition of Central America and Panama, 1987, p.25-38.
- CAETANO-LOPES, J.; CANHAO, H. e FONSECA, J.E. Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol. Port.*, v. 32, p. 103-110, 2007.
- CAKE, M.H. e LITWACK, G. Effect of methylxanthines on binding of the glucocorticoid receptor to DNA-cellulose and nuclei. *Eur. J. Biochem.*, v. 82, p. 97-103, 1978.
- CAMPAGNOLI, C.; ROBERTS, I.A.; KUMAR, S. et al., Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.*, v.98, p.2396-2402, 2001.
- CANALIS, E.; ECONOMIDES, A.N.; GAZZERRO, E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr. Rev.*, v.24, p.218-235, 2003.
- CANALIS, E.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: summary of a workshop. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.86, p.5681-5, 2001.
- CANCEDDA, R.; DESCALZI CANCEDDA, F. e CASTAGNOLA, P. Chondrocyte differentiation. *Int. Rev. Cytol.*, v. 159, p. 265-358, 1995.
- CANCEDDA, R.; CASTAGNOLA, P.; CANCEDDA, F.D., et al. Developmental control of chondrogenesis and osteogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, v. 44, p. 707-714, 2000.

- CANCEDDA, R.; DOZIN, B.; GIANNONI, P.; et al. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biol*; v.22, p.81-91, 2003.
- CAPLAN, A.I. Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v. 9, p. 641-650, 1991.
- CARON, M.M.; EMANS, P.J.; CREMERS, A. et al., Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. *Osteoarthritis Cartilage.*, v.4, p.604-13, 2013.
- CARROLL, S.H.; WIGNER, N.A.; KULKARNI, N. et al., A2B Adenosine Receptor Promotes Mesenchymal Stem Cell Differentiation to Osteoblasts and Bone Formation *in Vivo*. *J. Biol. Chem.*, v.287, p.15718-27, 2012.
- CARROLL, S.H.; RAVID, K. Differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and chondrocytes: a focus on adenosine receptors. *Expert. Rev. Mol. Med.*, v.15, p.e1, 2013.
- CHAMBERLAIN, G.; FOX, J.; ASHTON, B. et al., Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*, v.25, p.2739-2749, 2007.
- CHEEK, T.R.; MORETON, R.B.; BERRIDGE, M.J. et al., Quantal Ca<sup>2+</sup> release from caffeine-sensitive stores in adrenal chromaffin cells. *J. Biol. Chem.*, v.268, p.27076-27083, 1993.
- CHEN, C.W.; TSAI, Y.H.; DENG, W.P.; SHIH, S.N. et al., Type I and II collagen regulation of chondrogenic differentiation by mesenchymal progenitor cells. *J. Orthop. Res.*, v.23, p.446-53, 2005.
- CHEN, Y.; SHAO, J-Z.; XIANG, L-X. et al., Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.40, p.815-820, 2008.
- CHEN, L.Y.; LIU, L. Current progress and prospects of induced pluripotent stem cells. *Sci. China Ser. C. Life Sci.*, v52, p.622-636, 2009.
- CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y.P. TGF- $\beta$  and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Int J Biol Sci.*, v.8, p.272-288, 2012.
- CHENG, S.L.; YANG, J.W.; RIFAS, L., et al. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells in vitro: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. *Endocrinology*, v. 134, p. 277-286, 1994.
- CHOI, H.; CHOI, Y.; KIM, J.; BAE, J.; ROH, J. Longitudinal bone growth is impaired by direct involvement of caffeine with chondrocyte differentiation in the growth plate. *J. Anat.*, 2016.
- CHRISTIANSEN, J.H.; DENNIS, C.L.; WICKING, C.A. et al., Murine Wnt-11 and Wnt-12 have temporally and spatially restricted expression patterns during embryonic development. *Mech. Dev.*, v.51, p.341-50, 1995.



- CHRISTOPHER, J.; PERCIVAL, RICHTSMEIER, J.T. Angiogenesis and Intramembranous Osteogenesis. *Dev Dyn.*, v.242, p.909-922, 2013.
- CHUNG, C.H.; GOLUB, E.E.; FORBES, E.; TOKUOKA, T.; SHAPIRO, I.M. Mechanism of action of beta-glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcif. Tissue Int.*, v.51, p.305-311, 1992.
- CHUNG, U.; LANSKE, B.; LEE, K. et al., The parathyroid hormone/parathyroid hormone-related peptide receptor coordinates endochondral bone development by directly controlling chondrocyte differentiation. *Dev. Biol.*, v.95, p.13030-13035, 1998.
- CHURCH, V.; FRANCIS-WEST, P. Wnt signaling during limb development. *Int. J. Dev. Biol.*, v.46, p.927-936, 2002.
- CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, v. 3 Suppl 3, p. S131-139, 2008.
- CLEMENS, T.L.; KARSENTY, G. The osteoblast: an insulin target cell controlling glucose homeostasis. *J. Bone Miner. Res.*, v.4, p.677-80, 2011.
- COLLINS TF, WELSH JJ, BLACK TN, RUGGLES DI. A study of the teratogenic potential of caffeine ingested in drinking-water. *Food Chem Toxicol.*, v.21, 763-77, 1983.
- COLVIN, J.S.; BOHNE, B.A.; HARDING, G.W. et al., Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nature genetics.*, v.12, p.390-397, 1996.
- COLVIN, J.S.; FELDMAN, B.; NADEAU, J.H., et al. Genomic Organization and Embryonic Expression of the Mouse Fibroblast Growth Factor 9 Gene. *Dev. Dyn.*, v.216, p.72-88, 1999.
- CONGET, P.A. e MINGUELL, J.J. Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.*, v. 181, p. 67-73, 1999.
- CONTALDO, C.; MYERS, T.J.; ZUCCHINI, C. et al., Expression levels of insulin receptor substrate-1 modulate the osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells and osteosarcoma cells. *Growth Factors.*, v.32, p.41-52, 2014.
- COOPER, C.; HARVEY, N.; JAVAID, K., et al. Growth and bone development. *Nestle. Nutr. Workshop Ser. Pediatr. Program.*, v. 61, p. 53-68, 2008.
- CORTES, M.; BARIA, A.T.; SCHWARTZ, N.B. Sulfation of chondroitin sulfate proteoglycans is necessary for proper Indian hedgehog signaling in the developing growth plate. *Development.*, v.136, p.1697-1706, 2009.
- COSTA, M.A.; BARBOSA, A.; NETO, E. et al., On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *J. Cell. Physiol.*, v.226, p.1353-1366, 2011.

- COUSSENS, A.K.; HUGHES, I.P.; MORRIS, C.P., et al. In vitro differentiation of human calvarial suture derived cells with and without dexamethasone does not induce in vivo-like expression. *J. Cell. Physiol.*, v. 218, p. 183-191, 2009.
- CROMBRUGGHE, B.; LEFEBVRE, V.; NAKASHIMA, K. Regulatory mechanism in the pathways of cartilage and bone formation. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, v.13, p.721-727, 2001.
- CUSCITO, C.; COLAIANNI, G.; TAMMA, R. et al., Adrenergic stimulation decreases osteoblast oxytocin synthesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1237, p.53-7, 2011.
- CZEKANSKA, E.M.; STODDART, M.J.; RICHARDS, R.G., et al. In search of an osteoblast cell model for *in vitro* research. *Eur. Cell. Mater*, v. 24, p. 1-17, 2012.
- DATTA, H.K.; NG, W.F.; WALKER, J.A., et al. The cell biology of bone metabolism. *J. Clin. Pathol.*, v. 61, p. 577-587, 2008.
- DECLERCQ, H.A.; DE CALUWE, T.; KRYSKO, O., et al. Bone grafts engineered from human adipose-derived stem cells in dynamic 3D-environments. *Biomaterials*, v. 34, p. 1004-1017, 2013.
- DEGNIN, CR; LAEDERICH, MB; HORTON, WA. FGFs in endochondral skeletal development. *Journal of Cellular Biochemistry*. v.110, p.1046–1057, 2010.
- DELANY, A.M.; KALAJZIC, I.; BRADSHAW, A.D., et al. Osteonectin-null mutation compromises osteoblast formation, maturation, and survival. *Endocrinology*, v. 144, p. 2588-2596, 2003.
- DELISE, AM; FISCHER, L; TUAN, RS. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage*. v.8, p.309–334, 2000.
- DENARO, C.P.; BROWN, C.R.; WILSON, M.; PEYTON, J.; BENOWITZ, N.L. Dose-dependency of caffeine metabolism with repeated dosing. *Clin. Pharmacol. Ther.*, v.48 ,p.277-285, 1990.
- DERFOUL, A.; PERKINS, G.L.; HALL, D.J., et al. Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*, v. 24, p. 1487-1495, 2006.
- DEVINE, S.M.; COBBS, C.; JENNINGS, M.; BARTHOLOMEW, A.; HOFFMAN R. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*, v.101, p.2999-3001, 2003.
- DEWS, P.B. Caffeine. *Ann. Rev. Nutr.*, v.2, p.323-341, 1982.
- DEVOE, L.D.; MURRAY, C.; YOUSSEF, A.; ARNAUD, M. Maternal caffeine consumption and fetal behaviour in normal third-trimester pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.168, p.1105-1111, 1993.
- DIEZ-ROUX, G. e BALLABIO, A. Sulfatases and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, v. 6, p. 355-379, 2005.

- DING, M.; LU, Y.; ABBASSI, S.; LI, F.; LI, X.; SONG, Y., et al., Targeting Runx-2 expression in hypertrophic chondrocytes impairs endochondral ossification during early skeletal development. *J. Cell Physiol.*, v.227, p.3446-56, 2012.
- DOI, Y.; HORIGUCHI, T.; KIM, S.H., et al. Effects of non-collagenous proteins on the formation of apatite in calcium beta-glycerophosphate solutions. *Arch. Oral Biol.*, v. 37, p. 15-21, 1992.
- DONAHUE, H.J.; LI, Z.; ZHOU, Z., et al. Differentiation of human fetal osteoblastic cells and gap junctional intercellular communication. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, v. 278, p. C315-322, 2000.
- DONATTI, T.L.; KOCH, V.H.; TAKAYAMA, L.; PEREIRA, R.M. Effects of glucocorticoids on growth and bone mineralization. *J. Pediatr.*, v.87, p.4-12, 2011.
- DONEJKO, M.; PRZYLIPIAK, A.; RYSIAK, E. et al. Influence of caffeine and hyaluronic acid on collagen biosynthesis in human skin fibroblasts. *Drug Design Dev. Therapy*, v.8, p.1923-1928, 2014.
- DONZELLI, E.; SALVADE, A.; MIMO, P., et al. Mesenchymal stem cells cultured on a collagen scaffold: In vitro osteogenic differentiation. *Arch. Oral Biol.*, v. 52, p. 64-73, 2007.
- DRAGICEVIC, N.; DELIC, V.; CAO, C.; COPES, N.; LIN, X.; MAMCARZ, M.; WANG, L.; ARENDASH, G.W.; BRADSHA, W.P.C. Caffeine increases mitochondrial function and blocks melatonin signaling to mitochondria in Alzheimer's mice and cells. *Neuropharm.*, v.63, p.1368-79, 2012.
- DUCY, P.; ZHANG, R.; GEOFFROY, V. et al., *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, v.89, p.747-754, 1997.
- DUCY, P.; STARBUCK, M.; PRIEMEL, M. et al. A *Cbfa1*-dependent genetic pathway embryonic development. *Genes Dev.*, v.13, p.1025-1036, 1999.
- DUCY, P. *Cbfa1*: a molecular switch in osteoblast biology. *Dev. Dyn.*, v. 219, p. 461-471, 2000.
- DUPREZ, P.; BELL, J.H.; RICHARDSON, M.K. et al. Overexpression of BMP-2 and BMP-4 alters the size and shape of developing skeletal elements in the chick limb. *Mech. Dev.*, v.57, p.145-157, 1996.
- ECAROT-CHARRIER, B.; GLORIEUX, F.H.; VAN DER REST, M., et al. Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture. *J. Cell. Biol.*, v. 96, p. 639-643, 1983.
- ERNST, M.; SCHMID, C. e FROESCH, E.R. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 85, p. 2307-2310, 1988.
- EGAWA, T.; TSUDA, S.; MA, X. et al., Caffeine modulates phosphorylation of insulin receptor substrate-1 and impairs insulin signal transduction in rat skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.*, v,116, p.1629-36, 2011.

ENOMOTO-IWAMOTO, M.; IWAMOTO, M.; MUKUDAI, Y. et al., Bone morphogenetic protein signaling is required for maintenance of differentiated phenotype, control of proliferation, and hypertrophy in chondrocytes. *J. Cell Biol.*, v.140, p.409-418, 1998.

ETENG, M. U.; EYONG, E. U.; AKPANYUNG E.O. et al., Recent advances in caffeine and theobromine toxicities: a review. *Plant. Foods Human Nutr.*, v.51, p.231-243, 1997.

EVANS, B.A.; ELFORD, C.; PEXA, A. et al., Human osteoblast precursors produce extracellular adenosine, which modulates their secretion of IL-6 and osteoprotegerin. *J. Bone Miner. Res.*, v.21, p.228-236, 2006.

FERRON, M.; WEI, J.; YOSHIZAWA, T. et al., Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell.*, v.142, p.296-308, 2010.

FILL, M.; COPELLO, J.A. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.*, v.82, p.893-922, 2002.

FISCHER, T.W.; HIPLER, UC.; ELSNER, O. Effect of caffeine and testosterone on the proliferation of human hair follicles *in vitro*. *Int. J. Derm.*, v.46, p.27-35, 2007.

FISONE, G.; BORGKVIST, A.; USIELLO, A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.*, v.61, p.857-872, 2004.

FÖCKING, M.; SCHMIEGELT, D.; TRAPP, T. Caffeine-mediated enhancement of glucocorticoid receptor activity in human osteoblastic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 337, p.435-9, 2005.

FORONJY, R.F. e MAJKA, S.M. The potential for resident lung mesenchymal stem cells to promote functional tissue regeneration: understanding microenvironmental cues. *Cells.*, v. 1, p. 874, 2012.

FRANCIS-WEST, P.H.; ABDELFATTAH, A.; CHEN, P. et al. Mechanism of GDF-5 action during skeletal development. *Development.*, v.126, p.1305-1315, 1999.

FRANZ-ODENDAALM, T.A.; HALL, B.K.; WITTEN, P.E. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.*, v.235, p.176-190, 2006.

FREYRIA, A.M.; COURTES, S.; MALLEIN-GERIN, F. Differentiation of adult human mesenchymal stem cells: chondrogenic effect of BMP-2. *Pathol. Biol. (Paris)*, v.56, p.326-33, 2008.

FRIEDENSTEIN, A.J.; DERIGLAZOVA, U.F.; KULAGINA, N.N. et al., Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the *in vitro* colony assay method. *Exp. Hematol.*, v.2, p.83-92, 1974.

FU, H.; DOLL, B.; MCNELIS, T.; HOLLINGER, J.O. Osteoblast differentiation *in vitro* and *in vivo* promoted by Osterix. *J. Biomed. Mater Res.*, v.83, p.770-8, 2007.

- FUJITA, T.; OHTANI, J.; SHIGEKAWA, M., et al. Effects of sex hormone disturbances on craniofacial growth in newborn mice. *J. Dent. Res.*, v. 83, p. 250-254, 2004.
- FULZELE, K.; RIDDLE, R.C.; DIGIROLAMO, D.J. et al., Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition. *Cell.*, v.142, p.309-19, 2010.
- FURUMATSU, T.; OZAKI, T.; ASAHARA, H. Smad3 activates the Sox9-dependent transcription on chromatin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.41, p.1198-204, 2009.
- GALEA, G.L.; MEAKIN, L.B.; SUGIYAMA, T. et al., Estrogen receptor  $\alpha$  mediates proliferation of osteoblastic cells stimulated by estrogen and mechanical strain, but their acute down-regulation of the Wnt antagonist Sost is mediated by estrogen receptor  $\beta$ . *J. Biol. Chem.*, v.288, p.9035-48, 2013.
- GANSS, B.; KIM, R.H. e SODEK, J. Bone sialoprotein. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 10, p. 79-98, 1999.
- GAO, Y., LIU, S., HUANG, J., GUO, W. et al., The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes. *Biomed Res Int.*, p.648459, 2014.
- GARIMELLA, R.; BI, X.; CAMACHO, N., et al. Primary culture of rat growth plate chondrocytes: an in vitro model of growth plate histotype, matrix vesicle biogenesis and mineralization. *Bone*, v. 34, p. 961-970, 2004.
- GAROFALO, S.; KLIGER-SPATZ, M.; COOKE, J. et al., Skeletal dysplasia and defective chondrocyte differentiation by targeted overexpression of fibroblast growth factor 9 in transgenic mice. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, p.1909-1915, 1999.
- GARTLAND, A.; MECHLER, J.; MASON-SAVAS, A.; MACKAY, C.A.; MAILHOT, G., et al., *In vitro* chondrocyte differentiation using costochondral chondrocytes as a source of primary rat chondrocyte cultures: an improved isolation and cryopreservation method. *Bone*. 2005 Oct;37(4):530-44.
- GERSTENFELD, L.C.; LANDIS, W.J. Gene expression and extracellular matrix ultrastructure of a mineralizing chondrocyte cell culture system. *J. Cell Biol.*, v.112, p.501-13, 1991.
- GERICKE, A.; QIN, C.; SPEVAK, L.; FUJIMOTO, Y.; BUTLER, W.T.; SORENSEN, E.S. et al., Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif. Tissue Int.*, v.77, p.45-54. 2005.
- GHARIBI, B.; ABRAHAM, A.A.; HAM, J.; EVANS, B.A. Adenosine receptor subtype expression and activation influence the differentiation of mesenchymal stem cells to osteoblasts and adipocytes. *J. Bone Miner. Res.*, v.26, p.2112-2124, 2011.
- GIANNONI, P., CANCEDDA, R. Articular chondrocyte culturing for cell-based cartilage repair: needs and perspectives. *Cells Tissues Organs.*, v.184(1), p.1-15, 2006.

- GIULIANI, N.; LISIGNOLI, G.; MAGNANI, M.; RACANO, C.; BOLZONI, M.; DALLA, P.B., et al. New insights into osteogenic and chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells and their potential clinical applications for bone regeneration in pediatric orthopaedics. *Stem Cells Int.* v.2013, p.312501, 2013.
- GOESSLER, U.R.; HÖRMANN, K.; RIEDEL, F. Tissue engineering with chondrocytes and function of the extracellular matrix (Review). *Int. J. Mol. Med.*, v.13(4), p.505-13, 2004.
- GOLDRING, M.B.; TSUCHIMOCCHI, K.; IJIRI, K. The control of chondrogenesis. *J. Cell Biochem.*, v.93, p.33-44, 2006.
- GOSSET, M.; BERENBAUM, F.; THIRION, S.; JACQUES, C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. *Nat. Protoc.*, v.3(8), p.1253-60, 2008.
- GOYAN, J.E. Who reviews the ads? *N. Engl. J. Med.*, v. 302, p. 296, 1980.
- GROSSO, L.M.; TRICHE, E.; BENOWITZ, N.L.; BRACKEN, M.B. Prenatal Caffeine Assessment: Fetal and Maternal Biomarkers or Self-Reported Intake? *Ann. of Epidem.*, v.18, p.172-178, 2008.
- GROVE, J.E.; BRUSCIA, E.; KRAUSE, D.S. Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells.*, v.22, p.487-500, 2004.
- GUO, J.; CHUNG, U.; YANG, D. et al. PTH/PTHrP receptor delays chondrocyte hypertrophy via both Runx-2 dependent and independent pathways. *Dev. Biol.*, v.292, p.116-128, 2006.
- GUREVITCH, O.; KURKALLI, B.G.S.; PRIGOZHINA, T.; et al. Reconstruction of cartilage, bone, and hematopoietic microenvironment with demineralized bone matrix and bone marrow cells. *Stem Cells* v. 21, p.588-97, 2003.
- HADJIDAKIS, D.J. e ANDROULAKIS, II. Bone remodeling. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, v. 1092, p. 385-396, 2006.
- HANADA, K.; DENNIS, J.E. e CAPLAN, A.I. Stimulatory effects of basic fibroblast growth factor and bone morphogenetic protein-2 on osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner Res.*, v. 12, p. 1606-1614, 1997.
- HALLSTRÖM, H.; MELHUS, H.; GLYNN, A. et al. Coffee consumption and CYP1A2 genotype in relation to bone mineral density of the proximal femur in elderly men and women: a cohort study. *Nutr. Metab.*, v.7, p.1-9, 2010.
- HAN, Y.; LEFEBVRE, V. L-Sox-5 and Sox-6 drive expression of the Aggrecan gene in cartilage by securing binding of Sox-9 to a far-upstream enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, v.28, p.4999-5013, 2008.
- HARADA, H.; TAGASHIRA, S.; FUJIWARA, M. et al. Cbfa1 isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 6972-6978, 1999.
- HARTMANN, C.; TABIN, C.J. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Dev.*, v.127, p.3141-3159, 2000.

- HASHIMOTO, J.; KARIYA, Y.; MIYAZAKI, K. Regulation of proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by laminin-5 (laminin-332). *Stem Cells.*, v.24 ,p.2346-54, 2006.
- HASS, R.; KASPER, C.; BOHM, S., et al. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell. Commun. Signal*, v. 9, p. 12, 2011.
- HAYNESWORTH, S.E.; GOSHIMA, J.; GOLDBERG, V.M. et al.,Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone.*, v.13, p.81-88, 1992.
- HECKMAN, M.A.; WEIL, J.; MEJIA, G.J. Caffeine (1, 3, 7-trimethylxanthine) in Foods: A Comprehensive Review on Consumption, Functionality, Safety, and Regulatory Matters. *R: Con. Rev. Hyp. In Food Sci.*, v.75, p.77-87, 2010.
- HEINEGARD, D. e OLDBERG, A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb. J.*, v. 3, p. 2042-2051, 1989.
- HELLINGMAN, C.A.; KOEVOET, W.; KOPS, N. et al.,Fibroblast growth factor receptors in *in vitro* and *in vivo* chondrogenesis: relating tissue engineering using adult mesenchymal stem cells to embryonic development. *Tissue Eng Part A.*, v.2, p.545-56, 2010.
- HENG, B.C.; CAO, T.; LEE, E.H. Directing stem cell differentiation into the chondrogenic lineage *in vitro*. *Stem Cells* v. 22, p.1152-67, 2004.
- HIDAKA, C.; GOLDRING, M.B. Regulatory mechanism of chondrogenesis and implications for understanding articular cartilage homeostasis. *Curr. Rheumatol. Rev.*, v.4, p.1-12, 2008.
- HINO, K.; SAITO, A.; KIDO, M., et al. Master regulator for chondrogenesis, Sox9, regulates transcriptional activation of the endoplasmic reticulum stress transducer BBF2H7/CREB3L2 in chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, v. 289, p. 13810-13820, 2014.
- HINTON, R.J.; JING, Y.; JING, J.; FENG, J.Q. Roles of Chondrocytes in Endochondral Bone Formation and Fracture Repair. *J. Dent. Res.* 2016.
- HIRAI, T.; TANAKA, K.; TOGARI, A.  $\alpha$ 1-adrenergic receptor signaling in osteoblasts regulates clock genes and bone morphogenetic protein 4 expression through up-regulation of the transcriptional factor nuclear factor IL-3 (Nfil3)/E4 promoter-binding protein 4 (E4BP4). *J. Biol. Chem.*, v.289, p.17174-83, 2014.
- HOEMANN, C.D.; EL-GABALAWY, H. e MCKEE, M.D. In vitro osteogenesis assays: influence of the primary cell source on alkaline phosphatase activity and mineralization. *Pathol. Biol. (Paris)*, v. 57, p. 318-323, 2009.
- HOLT, P.S.; BUCKLEY, S. e DELOACH, J.R. Detection of the lethal effects of T-2 mycotoxin on cells using a rapid colorimetric viability assay. *Toxicol. Lett.*, v. 39, p. 301-312, 1987.

- HORRIGAN, L.A.; KELLY, J.P.; CONNOR, T.J. Caffeine suppresses TNF-alpha production via activation of the cyclic AMP/protein kinase A pathway. *Int. Immunopharmacol.*, v.4, p.1409-17, 2004.
- HORTON, W.A.; DEGNIN, C.R. FGFs in endochondral skeletal development. *Trends Endocrinol. Metabol.*, v.20, p.341-348, 2009.
- HORWITZ, E.M.; LE BLANC, K.; DOMINICI, M., et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, v. 7, p. 393-395, 2005.
- HOY, S.M.; SCOTT, L.J. Indomethacin/prochlorperazine/caffeine: a review of its use in the acute treatment of migraine and in the treatment of episodic tension-type headache. *CNS Drugs.*, v.4, p.343-58, 2011.
- HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S., et al. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone*, v. 30, p. 293-299, 2002.
- HUI, M.Z.; SUKHU, B. e TENENBAUM, H.C. Expression of tissue non-specific alkaline phosphatase stimulates differentiated behaviour in specific transformed cell populations. *Anat. Rec.*, v. 244, p. 423-436, 1996.
- HUANG, W.; CHUNG, U.; KRONENBERG, H.M. et al. The chondrogenic transcription factor Sox-9 is a target of signaling by the parathyroid hormone-related peptide in the growth plate of endochondral bones. *PNAS.*, v.98, p.160-165, 2001.
- HUANG, T.H.; YANG, R.S.; HSIEH, S.S. et al. Effects of caffeine and exercise on the development of bone: a densitometric and histomorphometric study in young Wistar rats. *Bone.*, v.30, p.293-299, 2002.
- HUANG Z, NELSON ER, SMITH RL, GOODMAN SB. The sequential expression profiles of growth factors from osteoprogenitors [correction of osteroprogenitors] to osteoblasts *in vitro*. *Tissue Eng.*, v.13, p.2311-2320, 2007.
- HUNG, I.H.; KORY, K.Y.; LAVINE, J. et al., FGF9 regulates early hypertrophic chondrocyte differentiation and skeletal vascularization in the developing stylopod. *Dev. Biol.*, v.307, p.300-313, 2007.
- HWANG, W.S. Ultrastructure of human foetal and neonatal hyaline cartilage. *J Pathol.*, v.126, p.209-14, 1978.
- HWANG, N.S.; KIM, M.S.; SAMPATTAVANICH, S. et al., Effects of Three-Dimensional Culture and Growth Factors on the Chondrogenic Differentiation of Murine Embryonic Stem Cells. *Stem cells*, v.24,p.284-291, 2006
- IKEDA, T.; KAWAGUCHI, H.; KAMEKURA, S. et al. Distinct roles of Sox-5, Sox-6, and Sox-9 in different stages of chondrogenic differentiation. *J. Bone Miner. Metab.*, v.23, p.337-340, 2005.



- INADA, M.; YASUI, T.; NOMURA, S. et al.,Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice. *Dev. Dyn.*, v.214, p.279-290, 1999.
- IOZZO, R.V. e PACIFICI, M. Ultrastructural localization of the major proteoglycan and type II procollagen in organelles and extracellular matrix of cultured chondroblasts. *Histochemistry*, v. 86, p. 113-122, 1986.
- ISHIKAWA, M.; IWAMOTO, T.; NAKAMURA, T. et al.,Pannexin 3 functions as an ER Ca(2+) channel, hemichannel, and gap junction to promote osteoblast differentiation. *J. Cell. Biol.*,v.193,p.1257-74, 2011.
- IWAMOTO, T.; NAKAMURA, T.; DOYLE, A., et al. Pannexin 3 regulates intracellular ATP/cAMP levels and promotes chondrocyte differentiation. *J. Biol. Chem.*, v. 285, p. 18948-18958, 2010.
- JACKSON, L.; JONES, D.R.; SCOTTING, P. et al.,Adult mesenchymal stem cells: differentiation potential and therapeutic applications. *J. Postgrad. Med.*, v.53, p.121-127, 2007.
- JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S.E.; CAPLAN, A.I. et al.,Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells *in vitro*. *J. Cell. Biochem.*, v.64, p.295-312, 1997.
- JANKOWSKI, R.J.; DEASY, B.M. e HUARD, J. Muscle-derived stem cells. *Gene Ther.*, v. 9, p. 642-647, 2002.
- JARQUÍN, R.; ROSALES, F.A.; GONZÁLEZ, J.M. et al.,Pulpa y pergamino de café. IX. Uso de la pulpa de café en la alimentación de cerdos en la fase de crecimiento y acabado. *Turrialba.*, v.24, p.41-46, 1974.
- JAVED, A.; BARNES, G.L.; JASANYA, B.O., et al. runt homology domain transcription factors (Runx, Cbfa, and AML) mediate repression of the bone sialoprotein promoter: evidence for promoter context-dependent activity of Cbfa proteins. *Mol. Cell. Biol.*, v. 21, p. 2891-2905, 2001.
- JIANG, Y.; JAHAGIRDAR, B.N.; REINHARDT, R.L. et al.,Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, v.418, p.41-9, 2002.
- JILKA, R.L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone.*,v.40, p.1434-1446, 2007.
- JOHNSON, R.L.; TABIN, C.J. Molecular models for vertebrate development. *Cell.*, v.90, p.979-990, 1997.
- JOHNSTONE, B.; HERING, T.M.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M.; YOO, J.U. *In vitro* chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res.*, v.238 ,p.265-72, 1998.

- JOYCE, M.E.; ROBERTS, A.B.; SPORN, M.B.; BOLANDER, ME. Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol.*, v.110, p.2195-207, 1990.
- KAMAGATA-KIYOURA, Y.; OHTA, M.; CHEUK, G. et al. Combined effects of caffeine and prostaglandin E2 on the proliferation of osteoblast-like cells. *J. Periodontol.*, v.70, p.283-288, 1999.
- KAMALIA, N.; MCCULLOCH, C.A.; TENEBBAUM, H.C., et al. Dexamethasone recruitment of self-renewing osteoprogenitor cells in chick bone marrow stromal cell cultures. *Blood*, v. 79, p. 320-326, 1992.
- KAMIMORI, C.H.; LUGO, S.I.; PENETAR, D.M.; CHAMBERLAIN, A.C.; BRUNHART, G.E.; BRUNHART, A.E.; EDDINGTON, N.D. Dose-dependent caffeine pharmacokinetics during severe sleep deprivation in humans. *J. Clin. Pharmacol. Ther.*, v.32, p.182-186, 1995.
- KAPLAN, G.B.; GREENBLATT, D.J.; KENT, M.A.; COTREAU, M.M.; ARCELIN, G.; SHADER, R.I. Caffeine-induced behavioral stimulation is dose-dependent and associated with A1 adenosine receptor occupancy. *Neuropsychopharmacology*, v.6, p.145-153, 1992.
- KAPLAN, G.B.; GREENBLATT, D.J.; EHRENBERG, B.L.; GODDARD, J.E.; COTREAU, M.M.; HARMATZ, J.S.; SHADER, R.I. Dose-Dependent Pharmacokinetics and Psychomotor Effects of Caffeine in humans. *J. Clin. Pharmacol.*, v.37, p.693-703, 1997.
- KARAPLIS, A.C.; HE, B.; NGUYEN, M.T.A. et al. Inactivating mutation in the human parathyroid hormone receptor type 1 gene in Blomstrand Chondrodysplasia. *Endocrinology.*, v. 139, p.5255- 5258, 1998.
- KARAPLIS, A.C.; LUZ, A.; GLOWACKI, J. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone related peptide gene. *Genes Dev.*, v.8, p.277-289, 1994.
- KARAPLIS, A.C. Embryonic development of bone and regulation of intramembranous and endochondral bone formation. *Principles of Bone Biology*, 3 ed. 2008.
- KARAOZ, E.; AKSOY, A.; AYHAN, S., et al. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochem. Cell. Biol.*, v. 132, p. 533-546, 2009.
- KARP, S.J.; SCHIPANI, E.; ST-JACQUES, B. et al., Indian Hedgehog coordinates endochondral bone growth and morphogenesis via parathyroid hormone related-protein-dependent and independent pathways. *Development.*, v.127, p.543-548, 2000.
- KARPERIEN, M.; DIJK, T.B.V.; HOEIJMAKERS, T. et al., Expression pattern of parathyroid hormone/parathyroid hormone related peptide receptor mRNA in mouse postimplantation embryos indicates involvement in multiple developmental processes. *Mech. Dev.*, v.47, p.29-42, 1994.
- KASSEM, M.; RUNGBY, J.; MOSEKILDE, L., et al. Ultrastructure of human osteoblasts and associated matrix in culture. *Apmis.*, v. 100, p. 490-497, 1992.

- KATAGIRI, T.; TAKAHASHI, N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis.*, v.8, p.147-159, 2002.
- KATO, M.; PATEL, M.S.; LEVASSEUR, R., et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *J. Cell. Biol.*, v. 157, p. 303-314, 2002.
- KAWASHIMA, H.; LI, Y.F.; WATANABE, N.; HIROSE, J.; HIROSE, M.; MIYASAKA, M. Identification and characterization of ligands for L-selectin in the kidney. I. Versican, a large chondroitin sulfate proteoglycan, is a ligand for L-selectin. *Int. Immunol.*, v.11, p.393-405, 1999.
- KAWAKAMI, Y.; WADA, N.; NISHIMATSU, S.I. et al., Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Dev. Growth Differ.*, v.41, p.29-40, 1999.
- KERGOSIEN N, SAUTIER J, FOREST N. Gene and protein expression during differentiation and matrix mineralization in a chondrocyte cell culture system. *Calcif. Tissue Int.*, v.62, p.114-21, 1998.
- KERN, B.; SHEN, J.; STARBUCK, M., et al., Cbfa1 Contributes to the Osteoblast-specific Expression of type I collagen Genes. *J. Biol. Chem.*, v.276, p.7101-7107, 2001.
- KHAIRNAR, A.; PLUMITALLO, A.; FRAU, L.; SCHINTU, N.; MORELLI, M. Caffeine enhances astroglia and microglia reactivity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') in mouse brain. *Neurotox. Res.*, v.17, p.435-9, 2010.
- KIANI, C.; CHEN, L.; WU, Y.J., et al. Structure and function of aggrecan. *Cell. Res.*, v. 12, p. 19-32, 2002.
- KIM, L.S.; OTTO, F.; ZABEL, B. et. Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1. *Mech. Dev.*, v.80, p.159-170, 1999.
- KIM, J.; KANG, J.W.; PARK, J.H. et al., Biological characterization of long-term cultured human mesenchymal stem cells. *Arch. Pharm. Res.*, v.32, p.117-126, 2008.
- KIMURA, J.; HARDINGHAM, T.; HASCALL, V. Assembly of newly synthesized proteoglycan and link protein into aggregates in cultures of chondrosarcoma chondrocytes. *J. Biol. Chem.*, v.255, p.7131-7134, 1980.
- KISIDAY, J.D.; KURZ, B.; DIMICCO, M.A.; GRODZINSKY, A.J. Evaluation of medium supplemented with insulin-transferrin-selenium for culture of primary bovine calf chondrocytes in three-dimensional hydrogel scaffolds. *Tissue Eng.*, v.11, p.141-51, 2005.
- KLEBANOFF, M.A.; LEVINE, R.J.; DERSIMONIAN, R., et al. Maternal serum paraxanthine, a caffeine metabolite, and the risk of spontaneous abortion. *N. Engl. J. Med.*, v. 341, p. 1639-1644, 1999.
- KNUDSON, C.B.; KNUDSON, W. Cartilage proteoglycans. *Cell. Dev. Biol.*, v.12, p.69-78, 2001.

- KNUTTI, R.; ROTHWEILER, H. e SCHLATTER, C. The effect of pregnancy on the pharmacokinetics of caffeine. *Arch. Toxicol. Suppl.*, v. 5, p. 187-192, 1982.
- KOBAYASHI, T.; SOEGIARTO, D.W.; Yang, Y. et al. Indian hedgehog stimulates periarticular chondrocyte differentiation to regulate growth plate length independently of PTHrP. *J. Clin. Invest.*, v.115, p.1734-1742, 2005.
- KOMORI, T.; YAGI, H.; NOMURA, S., et al. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, v. 89, p. 755-764, 1997.
- KOMORI, T. Requisite roles of *Runx-2* and *Cbfb* in skeletal development. *J. Bone Miner. Metab.*, v.21, p.193-7, 2003.
- KOMORI, T. Regulation of bone development and maintenance by *Runx-2*. *Front. Biosci.*, v.13, p.898-903, 2008.
- KOOLPE, M.; PEARSON, D.; BENTON, H.P. Expression of both P1 and P2 purine receptor genes by human articular chondrocytes and profile of ligand-mediated prostaglandin E2 release. *Arthritis Rheum.* 42, 258-267, 1999.
- KOSHER, R.A.; WALKER, K.H. The effect of prostaglandins on *in vitro* limb cartilage differentiation. *Exp. Cell Res.*, v.145, p.145-153, 1983.
- KOT, M. e DANIEL, W.A. Effect of cytochrome P450 (CYP) inducers on caffeine metabolism in the rat. *Pharmacol Rep.*, v. 59, p. 296-305, 2007.
- KOT, M. e DANIEL, W.A. The relative contribution of human cytochrome P450 isoforms to the four caffeine oxidation pathways: an *in vitro* comparative study with cDNA-expressed P450s including CYP2C isoforms. *Biochem. Pharmacol.*, v. 76, p. 543-551, 2008.
- KRAUS, K.H. e KIRKER-HEAD, C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet. Surg.*, v. 35, p. 232-242, 2006.
- KRISHNAN, V.; MA, Y.; MOSELEY, J. et al., Bone anabolic effects of sonic/indian hedgehog are mediated by *bmp-2/4*-dependent pathways in the neonatal rat metatarsal model. *Endocrinology.*, v.142, p.940-7, 2001.
- KRONENBERG, H.M. PTHrP and skeletal development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1068, p.1-13, 2006.
- KUGIMIYA, F.; OHBA, S.; NAKAMURA, K. et al., Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J. bone Miner. Metab.*, v.24, p.95-99, 2006.
- KULYK, W.M.; UPHOLT, W.B.; KOSHER, R. A. Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation. *Development*, v.106, p.449-455, 1989.

- KUNDROTAS, P.J.; ZHU, Z. e VAKSER, I.A. GWIDD: a comprehensive resource for genome-wide structural modeling of protein-protein interactions. *Hum. Genomics.*, v. 6, p. 7, 2012.
- LA CORTE, R.; TROTTA, F.; ADAMI, S. Glucocorticoid receptors and bone. *Curr. Pharm. Des.*, v.16, p.3586-92, 2010.
- LA ROCCA, G.; ANZALONE, R., CORRAO, S.; MAGNO, F.; LORIA, T. et al., Isolation and characterization of Oct-4+/HLA-G+ mesenchymal stem cells from human umbilical cord matrix: differentiation potential and detection of new markers. *Histochem. Cell Biol.*, v.131, p.287-282, 2009.
- LANGILLE, R.M. Chondrogenic differentiation in cultures of embryonic rat mesenchyme. *Microsc. Res. Tech.*, v. 28, p. 455-469, 1994.
- LANSKE, B.; KARAPLIS, A.C.; LEE, K. et al., PTH/PTHrP Receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth. *Science.*, v.273, p.663-666, 1996.
- LARROQUE, B.; KAMINSKI, M.; LELONG, N. et al. Effects on birth weight of alcohol and caffeine consumption during pregnancy. *Am. J. Epidemiol.*, v.137, p.941- 950, 1993.
- LAZARUS, J.E.; HEGDE, A.; ANDRADE, A.C. et al. Fibroblast growth factor expression in the postnatal growth plate. *Bone.*, v.40, p.577-586, 2007.
- LEBOY, P.S. Regulating bone growth and development with bone morphogenetic proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1068, p.14-18, 2006.
- LEDESMA-MARTINEZ, E.; MENDOZA-NUNEZ, V.M. e SANTIAGO-OSORIO, E. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Pulp: A Review. *Stem Cells Int.*, v. 2016, p. 4709572, 2016.
- LEE, K.; DEEDS, J.D.; SEGRE, G.V. Expression of parathyroid hormone-related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal development of rats. *Endocrinology.*, v.136, p.453-463, 1995.
- LEFEBVRE, V.; LI, P.; CROMBRUGGHE, B. A new long form of Sox-5 (L-Sox-5), Sox-6 and Sox-9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *J. Embo.*, v.17, p.5718-5733, 1998.
- LEHNINGER, A.L. Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem. J.*, v. 119, p. 129-138, 1970.
- LEITE-MORRIS, K.A.; KAPLAN, G.B.; SMITH, J.G.; SEARS, M.T. Regulation of G proteins and adenylyl cyclase in brain regions of caffeine-tolerant and -dependent mice. *Brain Res.*, v.804, p.52-62, 1998.
- LERNER, U.H.; MELLSTROM, D. Caffeine has the capacity to stimulate calcium release in organ culture of neonatal mouse calvaria. *Calcif. Tissue Int.*, v.51, p.424-428, 1992.

- LEUNG, V.Y.J.; GAO, B.; LEUNG, K.K.H. et al., Sox-9 Governs differentiation stage-specific gene expression in growth plate chondrocytes via direct concomitant transactivation and repression. *Plos One.*, v.7, n.11, p.e1002356, 2011.
- LI, S.; HACKER, R.R. The effects of caffeine on mammary gland development and milk yield in primiparous sows. *J. Anim. Sci.*, v. 73, p.534-540, 1995.
- LIAO, J.; HU, N.; ZHOU, N. et al., Sox9 potentiates BMP2-induced chondrogenic differentiation and inhibits BMP2-induced osteogenic differentiation. *PLoS One.*, v.9, p.e89025, 2014.
- LIN, Z.; PEREZ, P.; LEI, D., et al. Two-phase analysis of molecular pathways underlying induced pluripotent stem cell induction. *Stem Cells*, v. 29, p. 1963-1974, 2011.
- LIN, S.; SHEN, H.; JIN, B., et al. Brief report: Blockade of Notch signaling in muscle stem cells causes muscular dystrophic phenotype and impaired muscle regeneration. *Stem Cells*, v. 31, p. 823-828, 2013.
- LIU, J.; ZOU, L.; WANG, J., et al. Validation of beta-actin used as endogenous control for gene expression analysis in mechanobiology studies. *Stem Cells*, v. 27, p. 2371-2372, 2009.
- LIU, S.H.; CHEN, C.; YANG, R.S. et al. Caffeine enhances osteoclast differentiation from bone marrow hematopoietic cells and reduces bone mineral density in growing rats. *J. Orth. Res.*, v.29, p.954-960, 2011.
- LOMRI, A.; MARIE, P.J.; TRAN, P.V., et al. Characterization of endosteal osteoblastic cells isolated from mouse caudal vertebrae. *Bone*, v. 9, p. 165-175, 1988.
- LONG, F.; ZHANG, X.M.; KARP, S. et al., Genetic manipulation of hedgehog signaling in the endochondral skeleton reveals a direct role in the regulation of chondrocyte proliferation. *Development.*, v.128, p.5099-5108, 2001.
- LONGOBARDI, L.; O'REAR, L.; AAKULA, S. et al., Effect of IGF-I in the chondrogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells in the presence or absence of TGF- $\beta$  signaling. *J. Bone Miner. Res.*, v.21, p.626-36, 2006.
- LORDA-DIEZ, C.I.; MONTERO, J.A.; MENDOZA, M.J.D. et al., Defining the earliest transcriptional steps of chondrogenic progenitor specification during the formation of the digits in the embryonic limbs. *Plos one.*, v.6, p.e24546, 2011.
- LOU, Y.; PENG, Q.; NOLAM, B. et al., Oral administration of caffeine during voluntary exercise markedly decrease tissue fat and stimulates apoptosis and cyclin B1 in UVB treated skin of hairless p53-knockout mice. *Carcinogenesis.*, v.31, p.671-678, 2010.
- LOWCOCK, E.C.; COTTERCHIO, M.; ANDERSON, L.N. et al., High coffee intake, but not caffeine, is associated with reduced estrogen receptor negative and postmenopausal breast cancer risk with no effect modification by CYP1A2 genotype. *Nutr. Cancer.*, v.65, p.398-409, 2013.

LU, M.; BRÄNSTRÖM, R.; BERGLUND, E. et al., Expression and association of TRPC subtypes with Orai1 and STIM1 in human parathyroid. *J. Mol. Endocrinol.*, v.44, p.285-294, 2010.

LU, M.; FARNEBO, L.O.; BRÄNSTRÖM, R.; LARSSON, C. Inhibition of parathyroid hormone secretion by caffeine in human parathyroid cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, v.98, p.E1345-51, 2013.

LU, P.Z.; LAI, C.Y.; CHAN, W.H. Caffeine induces cell death via activation of apoptotic signal and inactivation of survival signal in human osteoblasts. *Int. J. Mol. Sci.*, v.9, p.698-718, 2008.

LUU, H.H.; SONG, W.X.; LUO, X.; MANNING, D.; LUO, J.; DENG, Z.L.; SHARFF, K.A.; MONTAG, A.G.; HAYDON, R.C.; HE, T.C. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.*, v.25, p.665-77, 2007.

LUYTEN, F.P. Mesenchymal stem cells in osteoarthritis. *Curr. Opin. Rheumatol.* v.16, p.599-603, 2004.

LYNCH, M.P.; STEIN, J.L.; STEIN, G.S., et al. The influence of type I collagen on the development and maintenance of the osteoblast phenotype in primary and passaged rat calvarial osteoblasts: modification of expression of genes supporting cell growth, adhesion, and extracellular matrix mineralization. *Exp. Cell. Res.*, v. 216, p. 35-45, 1995.

LYONS, K.M.; PELTON, R.W.; HOGAN, B.L.M. Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for Bone Morphogenetic Protein-2A (BMP-2A). *Development.*, v.109, p.833-844, 1990.

MA, Y.; NYMAN, J.S.; TAO, H. et al.,  $\beta_2$ -Adrenergic receptor signaling in osteoblasts contributes to the catabolic effect of glucocorticoids on bone. *Endocrinology*, v.152, p.1412-22, 2011.

MACEDO, R.M.; BRENTGANI, L.G. e LACERDA, S.A. Effects of coffee intake and intraperitoneal caffeine on bone repair process--a histologic and histometric study. *Braz. Dent. J.*, v. 26, p. 175-180, 2015.

MACEDO, R.M.; BRENTGANI, L.G.; LACERDA, S.A. Effects of caffeine on bones of osteoporotic rats. *J. Caffeine. Res.*, v.2 p.140-145, 2012.

MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; MURPHY, J.M.; BARRY, F.P.; CHICHESTER, C.O.; PITTENGER, M.F. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng.*, v.4, p.415-28, 1998.

MACKIE, E.J. Osteoblasts: novel roles in Orchestration of skeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, v.35, p.1301-5, 2003.

MACKIE, E.J.; AHMED, Y.A.; TATARCZUCH, L. et al., Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The Int. J. Bioch. Cell Biol.*, v.40, p.46-62, 2008.

MACKIE, E.J.; TATARCZUCH, L.; MIRAMS, M. The skeleton: a multi-functional complex organ: the growth plate chondrocyte and endochondral ossification. *Journal of Endocrinology*. v.211, p.109-121, 2011.

MAFI, R.; HINDOCHA, S.; MAFI, P., et al. Sources of adult mesenchymal stem cells applicable for musculoskeletal applications - a systematic review of the literature. *Open Orthop. J.*, v. 5 Suppl 2, p. 242-248, 2011.

MAICKEL, R.P.; SNODGRASS, W.R. Physicochemical factors in maternal-fetal distribution of drugs. *Toxicol. App. Pharmacol.*, v.26, p.218-230, 1973.

MAJUMDAR, M.K.; WANG, E.; MORRIS, E.A. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. *J. Cell Physiol.*, v.189, p.275-84, 2001.

MALEKI, M.; GHANBARVAND, F.; REZA, B.M.; EJTEMAEI, M.; GHADIRKHOMI, E. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int. J. Stem Cells.*, v.7 ,p.118-26, 2014.

MALESKI, M.P. e KNUDSON, C.B. Hyaluronan-mediated aggregation of limb bud mesenchyme and mesenchymal condensation during chondrogenesis. *Exp. Cell. Res.*, v. 225, p. 55-66, 1996.

MALÉMUD, C.J. Matrix metalloproteinases: role in skeletal development and growth plate disorders. *Front. Biosci.*, v.11, p.1702-1715, 2006.

MANDEL, H.G. Update on caffeine consumption, disposition and action. *Food Chem. Toxicol.*, p.1231-1234, 2002.

MANIATOPOULOS, C.; SODEK, J. e MELCHER, A.H. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell. Tissue Res.*, v. 254, p. 317-330, 1988.

MANOLAGAS, S.C.; O'BRIEN, C.A.; ALMEIDA, M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.*, v.9, p.699-712, 2013.

MARIE, P.J. The molecular genetics of bone formation. *Am. J. Pharmacogenomics*, v.1, p.175-187, 2001.

MARRET, S.; DELPECH, B.; GIRARD, N. et al., Caffeine decreases glial cell number and increases hyaluronan secretion in newborn rat brain cultures. *Pediatr. Res.*, v.34p.716-9, 1993.

MARRET, S.; GRESSENS, P.; VAN-MAELE-FABRY, G. et al., Caffeine-induced disturbances of early neurogenesis in whole mouse embryo cultures. *Brain Res.*, v.773, p.213-6, 1997.



- MARTIN, J.A.; SCHERB, M.B.; LEMBKE, L.A.; BUCKWALTER, J.A. Damage control mechanisms in articular cartilage: the role of the insulin-like growth factor I axis. *Iowa Orthop J.*, v.20, p.1-10, 2000.
- MASON, D.J. Glutamate signalling and its potential application to tissue engineering of bone. *Eur. Cell. Mater.*, v.7, p.12-25, 2004.
- MATTOT, V.; RAES, M.B.; HENRIET, P. et al., Expression of interstitial collagenase is restricted to skeletal tissue during mouse embryogenesis. *J. Cell. Sci.*, v.108, p.529-535, 1995.
- MAYHALL, E.A.; PAFFETT-LUGASSY, N.; ZON, L.I. The clinical potential of stem cells. *Curr. Opin. Cell. Biol.* v. 16, p.713-20, 2004.
- MAZZAFERA, P. Degradation of caffeine by microorganisms and Potential use of decaffeinated coffee husk and pulp in animal feeding. *Sci. Agric.*, v.59, p.815-821, 2002.
- MCCALL, J.D.; LUOMA, J.E.; ANSETH, K.S. Covalently tethered transforming growth factor beta in PEG hydrogels promotes chondrogenic differentiation of encapsulated human mesenchymal stem cells. *Drug Deliv. Transl. Res.*, v.2, p.305-312, 2012.
- MCCULLOCH, C.A.; STRUGURESCU, M.; HUGHES, F., et al. Osteogenic progenitor cells in rat bone marrow stromal populations exhibit self-renewal in culture. *Blood*, v. 77, p. 1906-1911, 1991.
- MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.*, v.119, p.2204-2213, 2006.
- MELVILLE, K.M.; KELLY, N.H.; KHAN, S.A. et al., Female mice lacking estrogen receptor-alpha in osteoblasts have compromised bone mass and strength. *J. Bone Miner. Res.*, v.29, p.370-9, 2014.
- MERTZ, E.L.; FACCHINI, M.; PHAM, A.T. et al., Matrix disruptions growth and degradation of cartilage with impaired sulfation. *J. Biol. Chem.*, v.287, p.22030-22042, 2012.
- MIAO, D.; HE, B.; KARAPLIS, A.C. et al., Parathyroid hormone is essential for normal fetal bone formation. *J. Clin. Invest.*, v.109, p.1173-1182, 2002.
- MILLS, B.G.; SINGER, F.R.; WEINER, L.P.; HOLST, P.A. Long-term culture of cells from bone affected by Paget's disease. *Calcif. Tissue Int.*, v.29, p.79-87, 1979.
- MINDELL, E.R.; Rodbard S, Kwasman BG. Chondrogenesis in bone repair. A study of the healing fracture callus in the rat. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, v.79, p.187-96, 1971.
- MINGUELL, J.J.; ERICES, A. e CONGET, P. Mesenchymal stem cells. *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, v. 226, p. 507-520, 2001.
- MINGUELL, J.J.; CONGET, P.; ERICES, A. Biology and clinical utilization of mesenchymal progenitor cells. Biology and clinical use of mesenchymal progenitors. *BJMBR*, v.33, p.881-887, 2000.

- MININA, E.; WENZEL, H.M.; KRESCHER, C. et al., BMP and Ihh/PTHrP signaling interact to coordinate chondrocyte proliferation and differentiation. *Development.*, v.128, p.4523-34, 2001.
- MODROWSKI, D. e MARIE, P.J. Cells isolated from the endosteal bone surface of adult rats express differentiated osteoblastic characteristics in vitro. *Cell. Tissue Res.*, v. 271, p. 499-505, 1993.
- MOIOLI, E.K.; HONG, L. e MAO, J.J. Inhibition of osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Wound Repair Regen.*, v. 15, p. 413-421, 2007.
- MONTERO, A.; OKADA, Y.; TOMITA, M. et al., Disruption of the fibroblast growth factor-2 gene results in decreased bone mass and bone formation. *J. Clin. Invest.*, v.105, p.1085-1093, 2000.
- MORIYA, S.; NODA, M. PTH regulates  $\beta$ 2-adrenergic receptor expression in osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *J. Cell. Biochem.*, v.116, p.142-148, 2014.
- MOURSI, A.M.; DAMSKY, C.H.; LULL, J., et al. Fibronectin regulates calvarial osteoblast differentiation. *J. Cell. Sci.*, v. 109 ( Pt 6), p. 1369-1380, 1996.
- MUELLER, M.B.; TUAN, R.S. Functional characterization of hypertrophy in chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Arthritis. Rheum.*, v.58, p.1377-1388, 2008.
- MUELLER, M.B.; FISCHER, M.; ZELLNER, J. et al., Hypertrophy in Mesenchymal Stem Cell Chondrogenesis: Effect of TGF- $\beta$  Isoforms and Chondrogenic Conditioning. *Cells Tissues Organs*, v.192, p.158-166, 2010.
- MURAD, S.; GROVE, D.; LINDBERG, K.A., et al. Regulation of collagen synthesis by ascorbic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 78, p. 2879-2882, 1981.
- MURPHY, J.M.; FINK, D.J.; HUNZIKER, E.B. et al., Stem cell therapy a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, v.48, p.3464-74, 2003.
- MURTAUGH, L.C.; CHYUNG, J.H.; LASSAR, A.B. Sonic hedgehog promotes somatic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev.*, v.13, p.225-237, 1999.
- NADER, H.B. Characterization of a heparan sulfate and a peculiar chondroitin 4-sulfate proteoglycan from platelets. Inhibition of the aggregation process by platelet chondroitin sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 10518-10523, 1991.
- NAGASAWA, H.; SAKURAI, N. Effects of chronic ingestion of caffeine on mammary growth and reproduction in mice. *Life Sci.*, v.39, p.351-357, 1986.
- NAKAMOTO, T.; GRANT, S.; YAZDANI, M. The effects of maternal caffeine intake during pregnancy on mineral contents of fetal rat bone. *Res. Exp. Med.*, v.189, p.275-280, 1989.

- NAKAMURA, K.; TSUGAWA, N.; SAITO, T., et al. Vitamin D status, bone mass, and bone metabolism in home-dwelling postmenopausal Japanese women: Yokogoshi Study. *Bone*, v. 42, p. 271-277, 2008.
- NAKASHIMA, K.; ZHOU, X.; KUNKEL, G., et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, v. 108, p. 17-29, 2002.
- NAKASHIMA, K. e DE CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. *Trends Genet.*, v. 19, p. 458-466, 2003.
- NAKAYAMA, M.; DURYEY, D.; MANOUKIAN, R. et al., Macroscopic cartilage formation with embryonic stemcell-derived mesodermal progenitor cells. *J. Cell. Sci.* v.116, p.2015-2028, 2003.
- NANCI, A.; ZALZAL, S.; GOTOH, Y., et al. Ultrastructural characterization and immunolocalization of osteopontin in rat calvarial osteoblast primary cultures. *Microsc. Res. Tech.*, v. 33, p. 214-231, 1996.
- NANCI, A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J. Struct. Biol.*, v. 126, p. 256-269, 1999.
- NAROD, S.A.; SANTOSE, S.; VICTORA, C. Coffee during pregnancy: a reproductive hazard? *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v.164, p.1109-1114, 1991.
- NEAL, L.; BENOWITZ, M.D. Clinical pharmacology of caffeine. *Ann. Rev. Med.*, v.41, p.277-288, 1990.
- NEFUSSI, J.R.; BRAMI, G.; MODROWSKI, D.; OBOEUF, M.; FOREST, N. Sequential expression of bone matrix proteins during rat calvaria osteoblast differentiation and bone nodule formation *in vitro*. *J. Histochem. Cytochem.*, v.45, p.493-503, 1997.
- NG, L.; WHEATLEY, S.; MUSCAT, G.E.O. et al., Sox-9 Binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev. Biol.*, v.183, p.108-121, 1997.
- NILSSON, O.; MARINO, R.; LUCA, F.; et al. Endocrine regulation of the growth plate. *Hormone Research*. v.64, p.157-165, 2005.
- NISHIMURA, R.; WAKABAYASHI, M.; HATA, K. et al., Osterix regulates calcification and degradation of chondrogenic matrices through matrix metalloproteinase 13 (MMP13) expression in association with transcription factor Runx-2 during endochondral ossification. *J. Biol. Chem.*, v.287, p.33179-33190, 2012.
- OCARINO, N.M.; MARUBAYASHI, U.; CARDOSO, T.G., et al. Physical activity in osteopenia treatment improved the mass of bones directly and indirectly submitted to mechanical impact. *J. Musculoskelet Neuronal Interact*, v. 7, p. 84-93, 2007.

OCARINO, N.M.; BOELONI, J.N.; GOES, A.M. et al., Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from osteopenic rats subjected to physical activity with and without nitric oxide synthase inhibition. *Nitric Oxide*, v.19, p.320-325, 2008.

OGATA, N.; CHIKAZU, D.; KUBOTA, N. Insulin receptor substrate-1 in osteoblast is indispensable for maintaining bone turnover. *J. Clin. Invest.*, v.105, p.935-43, 2000.

OGAWA, R.; STREIFF, M.B.; BUGAYENKO, A.; KATO, G.J. Inhibition of PDE4 phosphodiesterase activity induces growth suppression, apoptosis, glucocorticoid sensitivity, p53, and p21 WAF1/CIP1 proteins in human acute lymphoblastic leukemia cells. *Blood*, v.99, p.3390-3397, 2002.

OH, C.; MAITY, S.N.; LU, J.F. et al., Identification of Sox-9 interaction sites in the genome of chondrocytes. *Plos One.*, v.5, p.e10113, 2010.

OHBAYASHI, N.; SHIBAYAMA, M.; KUROTAKI, Y. et al., FGF18 is required for normal cell proliferation and differentiation during osteogenesis and chondrogenesis. *Genes Dev.*, v.16, p.870-879, 2002.

OKAZAKI, R.; INOUE, D.; SHIBATA, M. et al., Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) alpha or beta. *Endocrinology.*, v.143, p.2349-56, 2002.

OKUBO, Y.; REDDI, A.H. Thyroxine downregulates Sox-9 and promotes chondrocyte hypertrophy. *Biochem. Bioph. Res. Com.*, v.306, p.186-190, 2003.

OLSEN, B.R.; REGINATO, A.M.; WANG, W. Bone development. *Annu. Ver. Cell Dev. Biol.*, v.16, p.191-220, 2000.

ORNITZ, D.M.; ITOH, N. Fibroblast growth factors. *Gen. Biol.*, v.2, p.1-12, 2001.

ORNITZ, D.M.; MARIE, P.J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. *Genes Dev.*, v.16, p.1446-1465, 2002.

OTTO, F.; THORNELL, A.P.; CROMPTON, T., et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, v. 89, p. 765-771, 1997.

PACHECO, A.H.; BARREIROS, N.S.; SANTOS, I.S.; KAC, G. Caffeine consumption during pregnancy and prevalence of low birth weight and prematurity: a systematic review. *Cad. Saude Publica.*, v.23, p.2807-19, 2007.

PANETTA, N.J.; GUPTA, D.M.; QUARTO, N.; LONGAKER, M.T. Mesenchymal stem cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva Med.*, v.51, p.25-41, 2009.

PANIUSHIN, O.V.; DOMARATSKAIA, E.I. e STAROSTIN, V.I. [Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential]. *Izv. Akad. Nauk. Ser. Biol.*, p. 6-25, 2006.

- PARK, H.J.; HONG, M.; BRONSON, R.T., et al. Elevated Id2 expression results in precocious neural stem cell depletion and abnormal brain development. *Stem Cells*, v. 31, p. 1010-1021, 2013.
- PARR, B.A.; SHEA, M.J.; VASSILEVA, G.; MCMAHON, A.P. Mouse Wnt genes exhibit discrete domains of expression in the early embryonic CNS and limb buds. *Development.*, v.119, p.247-61, 1993.
- PARRA, A.R.P.; MOREIRA, I.; FURLAN, A.C. et al., Utilização da casca de café na alimentação de suínos nas fases de crescimento e terminação. *Rev. Bras. Zootec.*, v.37, p.433-442, 2008.
- PARSONS, W.D.; PELLETIER, J.G. Delayed elimination of caffeine by women in the last 2 weeks of pregnancy. *CMAJ.*, v.127, p.377-380, 1982.
- PAYUSHINA, O.V.; DOMARATSKAYA, E.I.; STAROSTIN, V.I. Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Cell. Biol.* v.33, p.6-25, 2006.
- PER, H.; LOTTA, N.; JOHAN, A. Caffeine fatalities-four case reports. *Foren. Sci. Int.*, v.139, p.71-73, 2004.
- PERCIVAL, C.J. e RICHTSMEIER, J.T. Angiogenesis and intramembranous osteogenesis. *Dev. Dyn.*, v. 242, p. 909-922, 2013.
- PROCKOP, D.J.; KIVIRIKKO, K.I.; TUDERMAN, L., et al. The biosynthesis of collagen and its disorders (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, v. 301, p. 13-23, 1979.
- PERIS, J.L.; PRAT, J.; DEJOZ, R., et al. Proteínas morfogenéticas óseas (BMPs): Efecto de la proteína osteogénica-1 (OP-1/BMP-7) en la condrogénesis y osteogenesis. *Rev. Esp. Cir. Osteoart.*, v.31, p.37-48, 1996.
- PETERS, K.G.; WERNER, S.; CHEN, G. et al., Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development.*, v.114, p.233-243, 1992.
- PIERROZ, D.D.; BONNET, N, BIANCHI, E.N. Deletion of  $\beta$ -adrenergic receptor 1, 2, or both leads to different bone phenotypes and response to mechanical stimulation. *J. Bone Miner. Res.*, v.27, p.1252-62, 2012.
- PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C. et al., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v.284, p.143-147, 1999.
- PLAAS, A.H.K.; SANDY, J.D.; MUIR, H. Proteoglycan aggregate formation by articular chondrocytes. *Biochem. J.*, v.214, p.855-864, 1983.
- PRESNELL, S.C.; PETERSEN, B.; HEIDARAN, M. Stem cells in adult tissues. *Cell Dev. Biol.* v. 13, p.369-76, 2002.

- PRICE P A, OTSUKA A A, POSER J W, KRISTAPONIS J, RAMAN N. Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.73, p.1447-1451, 1976.
- PRIOR, H.M.; WALTER, M.A. Sox genes: Architects of development. *Mol. Med.*, v. 2, p.405-412, 1996.
- QUERFURTH, H.W.; HAUGHEY, N.J.; GREENWAY, S.C.; YACONO, P.W.; GOLAN, D.E.; GEIGER, J.D. Expression of ryanodine receptors in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Biochem. J.*, v.334, p.79-86, 1998.
- RAISZ, L.G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin. Chem.*, v. 45, p. 1353-1358, 1999.
- RANERA, B.; LYAHYAI, J.; ROMERO, A., et al. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived from equine bone marrow and adipose tissue. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 144, p. 147-154, 2011.
- RAPURI, P.B.; GALLAGHER, J.C.; NAWAZ, Z. Caffeine decreases vitamin D receptor protein expression and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> stimulated alkaline phosphatase activity in human osteoblast cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.103, p.368-371, 2007.
- RAUCH, A.; SEITZ, S.; BASCHANT, U. et al., Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab.*, v.11, p.517-31, 2010.
- REIS, A.M.S. Efeitos *in vivo* e *in vitro* da cafeína sobre o tecido cartilaginoso de ratos em crescimento. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2012.
- REIS, A.M.S.; BATISTA, A.C.M.; OCARINO, N.M.; SERAKIDES, R. Effects of caffeine intake in mothers on maternal cortisol levels and offspring endochondral ossification. *Actualizaciones en Osteología*, v.10, p.20-36, 2014.
- REIS, A.M.; OCARINO NDE, M.; BOELONI, J.N., et al. Inhibition of the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from the offspring of rats treated with caffeine during pregnancy and lactation. *Connect Tissue Res.*, v. 57, p. 131-142, 2016.
- REIS, A.M.; RIBEIRO, L.G.; OCARINO NDE, M., et al. Osteogenic potential of osteoblasts from neonatal rats born to mothers treated with caffeine throughout pregnancy. *BMC Musculoskelet Disord.*, v. 16, p. 10, 2015.
- REISSIG, C.J.; STRAIN, E.G.; GRIFFITHS, R.R. Caffeinated energy drinks: a growing problem. *Drug Alcohol Depend.*, v.99, p.1-10, 2009.
- REVEL, J.P.; AND HAY, E.D. An autoradiographic and electron microscopic study of collagen synthesis in differentiating cartilage. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, v.61, p.110-114, 1963.
- RIBEIRO, J.A.; SEBASTIÃO, A.M. Caffeine and adenosine. *J. Alzheimers Dis.*, v.20, p.S3-15, 2010.

- RIDDOCH, F.C.; ROWBOTHAM, S.E.; BROWN, A.M. et al., Release and sequestration of Ca<sup>2+</sup> by a caffeine- and ryanodine-sensitive store in a sub-population of human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Cell Calcium.*, v.38, p.111-120, 2005.
- RESPONTE, D.J.; NATOLI, R.M. e ATHANASIOU, K.A. Collagens of articular cartilage: structure, function, and importance in tissue engineering. *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, v. 35, p. 363-411, 2007.
- ROACH, H.I. Why does bone matrix contain non-collagenous proteins? The possible roles of osteocalcin, osteonectin, osteopontin and bone sialoprotein in bone mineralisation and resorption. *Cell. Biol. Int.*, v. 18, p. 617-628, 1994.
- ROACH, H.I. Association of matrix acid and alkaline phosphatases with mineralization of cartilage and endochondral bone. *Histochem. J.*, v. 31, p. 53-61, 1999.
- ROBINSON, L.J.; BLAIR, H.C.; BARNETT, J.B. et al., Regulation of bone turnover by calcium-regulated calcium channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.1192, p.351-7, 2010.
- ROUGHLEY, P.J. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Eur. Cell. Mat.*, v.12, p.92-101, 2006.
- ROSS, R.; TRIPATTI, R.C. Connective Tissue Cells, Cell Proliferation and Synthesis of Extracellular Matrix - A Review [and Discussion]. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, v.271, p. 247-259, 1975.
- RUDNICKI, J.A.; BROWN, A.M. Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression *in vivo* and *in vitro*. *Dev. Biol.*, v.185, p.104-18, 1997.
- SUNDELACRUZ, S.; KAPLAN, D.L. Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin. Cell Dev. Biol.*, v.20, p.646-55, 2009.
- SAKAMOTO, W.; NISHIHARA, J.; FUJIE, K. et al., Effect of coffee consumption on bone metabolism. *Bone.*, v.28, p.332-6, 2001.
- SALANT, W.; RIEGER, J.B. The elimination and toxicity of caffeine in nephrectomized rabbits. *Exp. Biol. Med.*, v.9, p.58-59, 1912.
- SAROBO, C.; LACORTE, L.M.; MARTINS, M. et al., Chronic caffeine intake increases androgenic stimuli, epithelial cell proliferation and hyperplasia in rat ventral prostate. *Int. J. Exp. Pathol.*, v.93, p.429-37, 2012.
- SCHÄFFLER, A.; BÜCHLER, C. Concise Review: adipose tissue-derived stromal cells - basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, v.25, p.818-827, 2007.
- SEPULVEDA, J.C.; TOME, M.; FERNANDEZ, M.E., et al. Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. *Stem Cells*, v. 32, p. 1865-1877, 2014.

- SHAO Y., M. ALICKNAVITCH AND M. C. FARACH-CARSON. Expression of voltage sensitive calcium channel (VSCC) L-type Cav1.2 (alpha1C) and T-type Cav3.2 (alpha1H) subunits during mouse bone development. *Dev. Dyn.*, v.234, p.54-62, 2005.
- SCHECROUN, N. e DELLOYE, C. Bone-like nodules formed by human bone marrow stromal cells: comparative study and characterization. *Bone*, v. 32, p. 252-260, 2003.
- SCHIPANI, E.; LANSKE, B.; HUNZELMAN, J. et al., Targeted expression of constitutively active receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide delays endochondral bone formation and rescues mice that lack parathyroid hormone-related peptide. *Dev. Biol.*, v.94, p.13689-13694, 1997.
- SCHIPANI, E.S.; LANGMAN, C.B.; PARFITT, A.M. et al. Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *New Engl. J. Med.*, v.335, p.708-714, 1996.
- SCHIPANI, E.; PROVOT, S. PTHrP, PTH, and the PTH/PTHrP receptor in endochondral bone development. *Birth Def. Res.*, v.69, p.352-362, 2003.
- SCOTT Jr., W.J. Caffeine-induced limb malformations: description of malformations and quantitation of placental transfer. *Teratology*, v.28, p.427-435, 1983.
- SEIDLITZ EP, SHARMA MK, SINGH G. Extracellular glutamate alters mature osteoclast and osteoblast functions. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, v.88, p.929-36, 2010.
- SEO, J.H.; JIN, Y.H.; JEONG, H.M. et al., Calmodulin-dependent kinase II regulates Dlx5 during osteoblast differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.384, p.100-104, 2009.
- SETTEMBRE, C.; ARTEAGA-SOLIS, E.; MCKEE, M.D. et al., Proteoglycan desulfation determines the efficiency of chondrocyte autophagy and the extent of FGF signaling during endochondral ossification. *Genes Dev.*, v.22, p.2645-2650, 2008.
- SHEFFIELD, L.G. Caffeine administered during pregnancy augments subsequent lactation in mice. *J. Anim. Sci.*, v.69, p.1128-1132, 1991.
- SHEN, B.; BHARGAV, D.; WEI, A. et al., BMP-13 Emerges as a Potential Inhibitor of Bone Formation. *Int. J. Biol. Sci.*, v.5, p.192-200, 2009.
- SHENFIELD, F.; PENNING, G.; SUREAU, C. et al., Stem cells. *Hum. Reprod.*, v.17, p.1409-1410, 2002.
- SHI, D.; NIKODIJEVIĆ, O.; JACOBSON, K.A.; DALY, J.W. Chronic caffeine alters the density of adenosine, adrenergic, cholinergic, GABA, and serotonin receptors and calcium channels in mouse brain. *Cell. Mol. Neur.*, v. 13, p.247-261, 1993.
- SHI, S.; KIRK, M. e KAHN, A.J. The role of type I collagen in the regulation of the osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.*, v. 11, p. 1139-1145, 1996.



SHIN, J.; CHOI, Y.; KIM, J., et al. High doses of caffeine reduce in vivo osteogenic activity in prepubertal rats. *J. Anat.*, v. 227, p. 10-20, 2015.

SHU, B.; ZHANG, M.; XIE, R. et al., BMP2, but not BMP4, is crucial for chondrocyte proliferation and maturation during endochondral bone development. *J. Cell. Sci.*, v.124, p.3428-40, 2011.

SHUM, L; COLEMAN, CM; HATAKEYAMA, Y; et al., Morphogenesis and dysmorphogenesis of the appendicular skeleton. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today*. v. 69, p.102-122, 2003.

SINGH, P., CARRAHER, C., SCHWARZBAUER, J.E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 397-419, 2010.

SINGH, P.; SCHWARZBAUER, J.E. Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis. *J. Cell Sci.*, v.125(Pt 16), p.3703-12, 2012.

SMITH, A. Effects of caffeine on human behavior. *Food chem. Toxicol.* v.40, p.1243-1255, 2002.

SMITS, P.; DY, P.; MITRA, S., LEFEBVRE, V. Sox-5 and Sox-6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate. *J. Cell Biol.*, v.164, p.747-758, 2004.

SMITS, P.; LI, P.; MANDEL, J. et al., The Transcription Factors L-Sox-5 and Sox-6 Are Essential for Cartilage Formation. *Dev. Cell.*, v.1, p.277-290, 2001.

SOARES, A.I.S.M.; FONSECA, B.M.R. Cafeína. Trabalho realizado no âmbito da disciplina Toxicologia e Análises toxicológicas I. Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Portugal. 2004.

SODEK, J.; GANSS, B. e MCKEE, M.D. Osteopontin. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v. 11, p. 279-303, 2000.

SOLCHAGA LA, PENICK KJ, WELTER JF. Chondrogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: tips and tricks. *Methods Mol. Biol.*, v.698, p.253-78, 2011.

SOUZA, R.A.G.; SICHIERI, R. Consumo de cafeína e prematuridade. *Rev. Nutr.*, v.18, p.643-650, 2005.

SOUZA, R.S.; PINHAL, M.A.S. Interações em processos fisiológicos: a importância da dinâmica entre matriz extracelular e proteoglicanos. *Arq. Bras. Ciên. Saúde.*, v.36, p.48-54, 2011.

SRISUPHAN, W. e BRACKEN, M.B. Caffeine consumption during pregnancy and association with late spontaneous abortion. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, v. 154, p. 14-20, 1986.

STAINES, K.A.; POLLARD, A.S.; MCGONNELL, I.M.; et al. Cartilage to bone transitions in health and disease. *Journal of Endocrinology*. v.219, p.1-12, 2013.

- STEIN, G.S. e LIAN, J.B. Molecular mechanisms mediating proliferation/ differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. *Endocr. Rev.*, v. 14, p. 424-442, 1993.
- STEIN, G.S.; LIAN, J.B.; STEIN, J.L. et al., Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiol. Rev.*, v.76:p.593-629, 1996.
- STENDERUP, K.; JUSTESEN, J.; CLAUSEN, C. et al., Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, v.33, p.919-926, 2003.
- STOCK, M.; SCHAFER, H.; FLIEGAUF, M. et al., Identification of novel target genes of the bone-specific transcription factor Runx-2. *J. Bone Miner. Res.*, v.19, p.959-972, 2004.
- STOCKWELL, R.A. Chondrocytes. *J. Clin. Pathol. Suppl. (R Coll Pathol)*., v.12, p.7-13, 1978.
- STUDER, D.; MILLAN, C.; ÖZTÜRK, E.; MANIURA-WEBER, K.; ZENOBI-WONG, M. Molecular and biophysical mechanisms regulating hypertrophic differentiation in chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Eur. Cell Mater.*, v.24, p.118-35, 2012.
- ST-JACQUES, B.; HAMMERSCHMIDT, M.; MCMAHON, A.P. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev.*, v.13, p.2072-2086, 1999.
- SU, S.J.; CHANG, K.L.; SU, S.H. et al. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. *Int. J. Food Sci. Nut.*, v.64, p.429-36, 2013.
- SUGIYAMA, H.; ONUKI, K.; ISHIGE, K.; BBA, N.; UEDA, T.; MATSUDA, S.; TAKEUCHI, K. et al. Potent in vitro and in vivo antitumor activity of sorafenib against human intra hepatic cholangiocarcinoma cells. *J. Gastroenterol.*, v.46 ,p.779-89, 2011.
- SUN, G.J.; GUO, T.; CHEN, Y., et al. Significant pathways detection in osteoporosis based on the bibliometric network. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, v. 17, p. 1-7, 2013.
- SUUTRE S.; TOOM, A.; AREND, A. et al., Involvement of BMP-2, TGF- $\beta$ 2 and TGF $\beta$ 3 Signaling in Initial and Early Stages of Heterotopic Ossification in a rat Experimental Model. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.*, v.37, p.31-40, 2010.
- SWEET, C.; SILBERGLEIT, R. e MEHTA, B. Primary intraosseous hemangioma of the orbit: CT and MR appearance. *AJNR Am. J. Neuroradiol.*, v. 18, p. 379-381, 1997.
- SWIFT, J.M.; HOGAN, H.A.; BLOOMFIELD, S.A.  $\beta$ -1 adrenergic agonist mitigates unloading-induced bone loss by maintaining formation. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.45, p.1665-73, 2013.

- SYKARAS, N.; OPPERMAN, L.A. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? *J. Oral Sci.*, v.45, p.57-73, 2003.
- TAE, S.; LEE, S.; PARK, J. et al., Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. *Biomed. Mater.*, v.1, p.63-71, 2006.
- TAKAGI, M.; KAMIYA, N.; TAKAHASHI, T., et al. Effects of bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta1 on gene expression of transcription factors, AJ18 and Runx2 in cultured osteoblastic cells. *J. Mol. Histol.*, v. 35, p. 81-90, 2004.
- TAKEDA, S.; BONNAMY, J.; OWEN, M.J. et al., Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes Dev.*, v.15, p.467-481, 2001.
- TALLHEDEN T, BRITTBERG M, PETERSON L, LINDAHL A. Human articular chondrocytes--plasticity and differentiation potential. *Cells Tissues Organs.*, v.184, p.55-67, 2006.
- TAM, J.; TREMBOVLER, V.; DI MARZO V. et al., The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling. *FASEB J.*, v22, p.285-94, 2008.
- TAN, Y.; LIU, J.; DENG, Y. et al., Caffeine-induced fetal rat over-exposure to maternal glucocorticoid and histone methylation of liver IGF-1 might cause skeletal growth retardation. *Toxicology Letters*, v.214, p.279-287, 2012.
- TASSINARI, M.S.; GERSTENFELD, L.C.; STEIN, G.S.; LIAN, J.B. Effect of caffeine on parameters of osteoblast growth and differentiation of a mineralized extracellular matrix *in vitro*. *J. Bone Miner. Res.*, v.6, p.1029-36, 1991.
- TAULER, P.; MARTÍNEZ, S.; MORENO, C. et al., Effects of caffeine on the inflammatory response induced by a 15-km run competition. *Med. Sci. Sports Exerc.*, v.45, p.1269-76, 2013.
- TAYLOR, A.F. Osteoblastic glutamate receptor function regulates bone formation and resorption. *J. Musc. Neur. Interact.*, v.2, p.285-90, 2002.
- TAYLOR, S.E.; SHAH, M. e ORRISS, I.R. Generation of rodent and human osteoblasts. *Bonekey. Rep.*, v. 3, p. 585, 2014.
- TAZAKI, M.; ENDOH, T.; KOBAYASHI, H. et al., Adrenomedullin facilitates calcium channel currents in osteoblasts. *Bull Tokyo Dent Coll.*, v.53, p.203-6, 2012.
- TEEKACHUNHATEAN S.; TOSRI, N.; ROJANASTHIEN, N.; SRICHAIRATANAKOOL, S.; SANGDEE, C. Pharmacokinetics of caffeine following a single administration of coffee enema versus oral coffee consumption in healthy male subjects. *Pharmacol.*, p.147238, 2013.
- TESCH, A.M.; MACDONALD, M.H.; KOLLIAS-BAKER, C. et al., Chondrocytes respond to adenosine via A2 receptors and activity is potentiated by an adenosine deaminase inhibitor and a phosphodiesterase inhibitor. *Osteoarthritis Cart.*, v.10, p.34-43, 2002.

- TESCH, A.M.; MACDONALD, M.H.; KOLLIAS-BAKER, C. et al., Endogenously produced adenosine regulates articular cartilage matrix homeostasis: enzymatic depletion of adenosine stimulates matrix degradation. *Osteoarthritis and Cartilage*, v. 12, p.5349-359, 2004.
- THIRION, S.; BERENBAUM, F. Culture and phenotyping of chondrocytes in primary culture. *Methods Mol. Med.*, v.100, p.1-14, 2004.
- THRAILKILL, K.; BUNN, R.C.; LUMPKIN, JR. C. et al., Loss of Insulin Receptor in Osteoprogenitor Cells Impairs Structural Strength of Bone. *J. Diabetes Res.*, v.1, p.1-10, 2014.
- TINTUT, Y.; PARHAMI, F.; LE, V. et al., Inhibition of osteoblast-specific transcription factor Cbfa1 by the cAMP pathway in osteoblastic cells. *J. Biol. Chem.*, v.274, p. 28875-28879, 1999.
- TOCCI, A.; FORTE, L. Mesenchymal stem cells: use and perspectives. *Hematol. J.*, v.4, p.92-96, 2003.
- TRINCAVELLI, M.L.; DANIELE, S.; GIACOMELLI, C. et al., Osteoblast differentiation and survival: A role for A<sub>2B</sub> adenosine receptor allosteric modulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Mol. Cell. Res.*, v.1843, p.2957-2966, 2014.
- TSUANG, Y.H.; SUN, J.S.; CHEN, L.T. et al. Direct effects of caffeine on osteoblastic cells metabolism: the possible causal effect of caffeine on the formation of osteoporosis. *J. Orth. Surg. Res.*, v.1, p.1-10, 2006.
- TSUKITA, S.; OISHI, K.; AKIYAMA, T., et al. Specific proto-oncogenic tyrosine kinases of src family are enriched in cell-to-cell adherens junctions where the level of tyrosine phosphorylation is elevated. *J. Cell. Biol.*, v. 113, p. 867-879, 1991.
- TSUMAKI, N.; YOSHIKAWA, H. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v.16, p.279-285, 2005.
- TUAN, R.S.; BOLAND, G. e TULI, R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis. Res. Ther.*, v. 5, p. 32-45, 2003.
- TULI, R.; SEGHATOLESLAMI, M.R.; TULI, S.; WANG, M.L.; HOZACK, W.J.; MANNER, P.A.; DANIELSON, K.G.; TUAN, R.S. A simple, high-yield method for obtaining multipotential mesenchymal progenitor cells from trabecular bone. *Mol. Biotechnol.* 2002, in press.
- TURINETTO, V.; VITALE, E. e GIACHINO, C. Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 17, p., 2016.
- TYRALA, E.E.; DODSON, W.E. Caffeine secretion into breast milk. *Arch. Dis. Child.*, v.54, p.787-9, 1979.
- UETA, C.; IWAMOTO, M.; KANATANI, N. et al., Skeletal Malformations Caused by Overexpression of Cbfa1 or Its Dominant Negative Form in Chondrocytes. *J. Cell. Biol.*, v.153, p.87-99, 2001.

- URIST, M.R. Bone morphogenetic protein: the molecularization of skeletal system development. *J. Bone Miner. Res.*, v.12, p.343-346, 1997.
- VAES, B.L.T.; DUCY, P.; SIJBERS, A.M. et al. Microarray analysis on Runx -2 deficient mouse embryos reveals novel Runx-2 functions and target genes during intramembranous and endochondral bone formation. *Bone.*, v.39, p.724-738, 2006.
- VAN DER KRAAN, P.M.; BLANEY DAVIDSON, E.N.; BLOM, A.; VAN DEN BERG, W.B. TGF- $\beta$  signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis: modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis Cartilage.*, v.17 , p.1539-45, 2009.
- VARANI, K.; PORTALUPPI, F.; MERIGHI, S. et al.,Caffeine Alters A2A Adenosine Receptors and Their Function in Human Platelets. *Circulation.*, v.99p.2499-2502, 1999.
- VARGA, Z.; T. JUHASZ, C.; MATTA, J.; FODOR, E.; KATONA, A.; BARTOK, T.; OLAH, A.; SEBE, L.; CSERNOCH, G.; PANYI, R.; ZAKANY. Switch of voltage-gated K<sup>+</sup> channel expression in the plasma membrane of chondrogenic cells affects cytosolic Ca<sup>2+</sup>- oscillations and cartilage formation. *PLoS One*, v.6, p.e27957, 2011.
- VIK, T.; BAKKETEIG, L.S; TRYGG, K.U.; LUND-LARSEN, K.; JACOBSEN, G. High caffeine consumption in the third trimester of pregnancy: gender-specific effects on fetal growth. *Paediatr Perinat Epidemiol.*, v.17, p.324-31, 2003.
- VORTKAMP, A. Skeleton morphogenesis: defining the skeletal elements. *Curr.Biol.*, v.7, p.104-107, 1998.
- WAGERS, A.J.; WEISSMAN, I.L. Plasticity of adult stem cells. *Cell*, v.116, p.639-648, 2004.
- WANG, Q.; GREEN, R.P.; ZHAO, G. et al. Differential regulation of endochondral bone growth and joint development by FGFR1 and FGFR3 tyrosine kinase domains. *Development.*, v.128, p.3867-3876, 2001.
- WANG, S.; MU, J.; FAN, Z.; YU, Y.; YAN, M.; LEI, G.; TANG, C.; WANG, Z.; ZHENG, Y.; YU, J.; ZHANG, G. Insulin-like growth factor 1 can promote the osteogenic differentiation and osteogenesis of stem cells from apical papilla. *Stem Cell Res.*, v.8, p.346-56, 2012.
- WANG, Y.; ZHU, J.; DELUCA, H.F. Identification of the vitamin D receptor in osteoblasts and chondrocytes but not osteoclasts in mouse bone. *J. Bone Miner. Res.*, v.29, p.685-92, 2014.
- WATKINSON, B. e FRIED, P.A. Maternal caffeine use before, during and after pregnancy and effects upon offspring. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, v. 7, p. 9-17, 1985.
- WEINSTEIN, R.S.; JILKA, R.L.; PARFITT, A.M.; MANOLAGAS, S.C. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *J. Clin. Invest.*, v.102, p.274-282, 1998.
- WEIR, E.C.; PHILBRICK, W.M.; AMLINGT,M. et al. Targeted overexpression of parathyroid hormonelated peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation. *Dev. Biol.*, v.93, p.10240-10245, 1996.

- WIGNER, N.A.; SOUNG, D.Y.; EINHORN, T.A. et al., Functional role of Runx3 in the regulation of aggrecan expression during cartilage development. *J. Cell. Phys.*, v.228, p.2232-2242, 2013.
- WILLERT, K.; JONES KA: Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.*, v.20, p.1394-1404, 2006.
- WILSMAN, N.J.; FARNUM, C.E.; HILLEY, H.D.; CARLSON, C.S. Ultrastructural evidence of a functional heterogeneity among physeal chondrocytes in growing swine. *Am. J. Vet. Res.*, v.42, p.1547-53, 1981.
- WINK, C.S.; ROSSOWSKA, M.J. e NAKAMOTO, T. Effects of caffeine on bone cells and bone development in fast-growing rats. *Anat. Rec.*, v. 246, p. 30-38, 1996.
- WIREN, K.M.; EVANS, A.C.; ZHANG, X.W. Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J. Endocrinol.*, v.175,p.683-94, 2002.
- WOZNEY, J.M. The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol. Reprod. Dev.*, v.32, p.160-167, 1992.
- WUTHIER, R.E.; CHIN, J.E.; HALE, J.E., et al. Isolation and characterization of calcium-accumulating matrix vesicles from chondrocytes of chicken epiphyseal growth plate cartilage in primary culture. *J. Biol. Chem.*, v. 260, p. 15972-15979, 1985.
- XIAO, G.; CUI, Y.; DUCY, P., et al. Ascorbic acid-dependent activation of the osteocalcin promoter in MC3T3-E1 preosteoblasts: requirement for collagen matrix synthesis and the presence of an intact OSE2 sequence. *Mol. Endocrinol.*, v. 11, p. 1103-1113, 1997.
- XIAO, Z.S.; THOMAS, R.; HINSON, T.K., et al. Genomic structure and isoform expression of the mouse, rat and human Cbfa1/Osf2 transcription factor. *Gene*, v. 214, p. 187-197, 1998.
- XIE, W.; DOLDER, S.; SIEGRIST, M. et al., Expression and function of glutamate transporters in mouse primary osteoblasts. *Bone Abst.*, v.1, p.202, 2013.
- XING, Y.; GU, Y.; BRESNAHAN, J.J. et al., The Roles of P2Y2 Purinergic Receptors in Osteoblasts and Mechanotransduction. *Plos one.*, v.9, p.e108417, 2014.
- XU, D.; ZHANG, B.; LIANG, G. et al., Caffeine-induced activated glucocorticoid metabolism in the hippocampus causes hypothalamic-pituitary-adrenal axis inhibition in fetal rats. *Plos one.*, v.7, p.e44497, 2012.
- YAMADA-FOWLER, N.; FREDRIKSON, M.; SÖDERKVIST, P. Caffeine Interaction with Glutamate Receptor Gene GRIN2A: Parkinson's Disease in Swedish Population. *PLoS One*, v.9, p.e99294, 2014.
- YAMAGUCHI, A.; KOMORI, T.; SUDA, T. Regulation of Osteoblast Differentiation Mediated by Bone Morphogenetic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocr. Rev.*, v.21, p.393-411, 2000.

- YAN, Q; FENG, Q; BEIER, F. Reduced chondrocyte proliferation, earlier cell cycle exit and increased apoptosis in neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *Osteoarthritis and Cartilage*, v.20, p.144-151, 2012.
- YANG, D.C.; TSAY, H.J.; LIN, S.Y. et al.,cAMP/PKA regulates osteogenesis, adipogenesis and ratio of RANKL/OPG mRNA expression in mesenchymal stem cells by suppressing leptin. *PLoS ONE*, v.3, p.e1540-e1549, 2008.
- YANG, Y. Skeletal Morphogenesis during embryonic development. *Critical Review in Eukaryotic Gene Expression*. v.19, p.197-218, 2009.
- YANG, Y.; SONG, H.L.; ZHANG, W.; WU, B.J.; FU, N.N.; ZHENG, W.P.; DONG, C.; SHEN, Z.Y. Reduction of acute rejection by bone marrow mesenchymal stem cells during rat small bowel transplantation. *PLoS One.*, v.9, p.e114528, 2014.
- YIN, L.; LI, Y.B. e WANG, Y.S. Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. *Chin. Med. J. (Engl.)*, v. 119, p. 581-588, 2006.
- YOO, J.U.; BARTHEL, T.S.; NISHIMURA, K.; SOLCHAGA, L.; CAPLAN, A.I.; GOLDBERG, V.M. et al.,The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J. Bone Joint. Surg. Am.*, v.80, p.1745-57, 1998.
- YOON, B.S.; OVCHINNIKOV, D.A.;YOSHII, I. et al., BMP1a and BPr1b have overlapping functions and are essential for chondrogenesis in vivo. *PNAS.*, v.102, p.5062-5067, 2005.
- YOON, D.M.; FISHER, J.P. Effects of exogenous IGF-1 delivery on the early expression of IGF-1 signaling molecules by alginate embedded chondrocytes. *Tissue Eng. Part. A.*, v.14, p.1263-73, 2008.
- YOSHIDA, C.A.; YAMAMOTO, H.; FUJITA, T. et al. Runx-2 and Runx-3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx-2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes Dev.*,v.18, p.952-963, 2004.
- YOU, L.D.; WEINBAUM, S.; COWIN, S.C., et al. Ultrastructure of the osteocyte process and its pericellular matrix. *Anat. Rec. A. Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.*, v. 278, p. 505-513, 2004.
- YU, D.; HAN, J.; KIM, B. Stimulation of Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Int. J. Stem Cells*, v.5, p.16-22, 2012.
- YU, K.; ORNITZ, D.M. The FGF ligand receptor signaling system in chongrogenesis, osteogenesis and vascularization of the endochondral skeleton. *Int. Congr. Ser.*, v.1302, p.67-78, 2007.
- ZAFARULLAH, M.; SU, S.; MARTEL-PELLETIER, J., et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes. *J. Cell. Biochem.*, v. 60, p. 211-217, 1996.
- ZEHENTNER, B.K.; DONY, C.; BURTSCHER, H. The transcription factor Sox9 is involved in BMP-2 signaling. *J. Bone Miner. Res.*, v.14, 1734-41, 1999.

ZHAO, Q.; EBERSPAECHER, H.; LEFEBVRE, V. et al., Parallel Expression of Sox-9 and Col2a1 in Cells Undergoing Chondrogenesis. *Dev. Dyn.*, v.209, p.377-386 1997.

ZHAO, M.; HARRIS, S.E.; HORN, D., et al., Bone morphogenetic protein receptor signaling is necessary for normal murine postnatal bone formation. *J. Cell. Biol.*, v.157, p.1049-1060, 2002.

ZHENG, Q.; ZHOU, G.; MORELLO, R. et al., Type X collagen gene regulation by Runx-2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression *in vivo*. *J. Cell. Biol.*, v.162, p.833-42, 2003.

ZHOU, Y.; ZHU, Z.L.; GUAN, X.X. et al., Reciprocal roles between caffeine and estrogen on bone via differently regulating cAMP/PKA pathway: the possible mechanism for caffeine induced osteoporosis in women and estrogen's antagonistic effects. *Med. Hypotheses.*, v.73, p.83-85, 2009.

ZHOU, Y.; GUAN, X.X.; ZHU, Z.L. et al. Caffeine inhibits the viability and osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *J. Pharmacol.*, v.161, p.1542-1552, 2010.

ZOHAR, R.; CHEIFETZ, S.; MCCULLOCH, C.A., et al. Analysis of intracellular osteopontin as a marker of osteoblastic cell differentiation and mesenchymal cell migration. *Eur. J. Oral. Sci.*, v. 106 Suppl 1, p. 401-407, 1998.



## **ANEXO 1**

## ANEXO 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL  
- C E T E A -

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 177/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Participação das células tronco e dos osteoblastos na gênese das alterações ósseas induzidas pelo consumo de cafeína em ratas e sua prole durante a gestação e amamentação**", que tem como responsável(is) **Rogéria Serakides**, 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 **22/ 09/ 2010**.

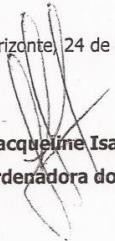
Este certificado expira-se em **22/ 09/ 2015**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 177/2010**, related to the project entitled "**Participation of stem cells and osteoblasts on the pathogenesis of bone changes induced by caffeine in rats and its offspring during pregnancy and breastfeeding**", under the supervisors of **Rogéria Serakides**, 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 22, 2010**.

This certificate expires in **September 22, 2015**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2010.


  
**Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite**  
Coordenadora 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 – Fax: (31) 3499-4592  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@prpq.ufmg.br](mailto:cetea@prpq.ufmg.br)

(Mod.Cert. v1.0)

## **ANEXO 3**

## ANEXO 4

	<p style="text-align: center;"><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS</b> <b>CEUA</b> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</b></p>
<p><b>UFMG</b></p>	
<p><b>CERTIFICADO</b> Certificamos que o Protocolo nº 3 / 2013, relativo ao projeto intitulado "Efeitos in vivo e in vitro de diferentes doses de cafeína na diferenciação condrogênica de CTM e na atividade de condroblastos", que tem como responsável Rogéria Serakides, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 11/04/2013. Este certificado expira-se em 11/04/2018.</p>	
<p><b>CERTIFICATE</b> We hereby certify that the Protocol nº 3 / 2013, related to the Project entitled "Effects in vivo and in vitro of different doses of caffeine on chondrogenic differentiation of MSC and the activity of chondroblast", under the supervision of Rogéria Serakides, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 11/04/2013. This certificate expires in 11/04/2018.</p>	
<p>FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS Coordenador(a) da CEUA/UFMG Belo Horizonte, 11/04/2013</p>	
<p>Atenciosamente</p>	
<p>Sistema CEUA-UFMG <a href="https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/">https://www.ufmg.br/bioetica/ceua/</a></p>	<p>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 – Fax: (31) 3499-4592 <a href="http://www.ufmg.br/bioetica/ceua">www.ufmg.br/bioetica/ceua</a> - <a href="mailto:ceua@prpq.ufmg.br">ceua@prpq.ufmg.br</a></p>

## ANEXO 5 CAPÍTULO 2

**Tabela 1.** Redução do MTT (média ± desvio padrão), atividade da fosfatase alcalina (FA) (média ± desvio padrão) e síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio osteogênico por 7, 14 e 21 dias.

MTT	CON	CAF 25	CAF 50	CAF 100
7 DIAS	0,15 ± 0,019 B	0,22 ± 0,018 A	0,24 ± 0,042 B	0,22 ± 0,021 B
14 DIAS	0,30 ± 0,043 B	0,34 ± 0,065 AB	0,39 ± 0,024 A	0,40 ± 0,011 A
21 DIAS	0,35 ± 0,044 C	0,37 ± 0,051 C	0,42 ± 0,026 B	0,49 ± 0,017 A
<b>FA</b>				
7 DIAS	0,15 ± 0,012 A	0,14 ± 0,012 B	0,07 ± 0,086 C	0,08 ± 0,008 C
14 DIAS	0,20 ± 0,013 A	0,20 ± 0,006 A	0,10 ± 0,010 C	0,12 ± 0,009 B
21 DIAS	0,23 ± 0,015 A	0,20 ± 0,017 B	0,12 ± 0,014 C	0,12 ± 0,015 C
<b>COL</b>				
7 DIAS	0,18 ± 0,006 B	0,20 ± 0,027 A	0,17 ± 0,008 B	0,16 ± 0,004 B
14 DIAS	0,23 ± 0,013 D	0,38 ± 0,034 A	0,31 ± 0,025 B	0,28 ± 0,011 C
21 DIAS	0,67 ± 0,026 C	1,16 ± 0,102 A	0,81 ± 0,062 B	0,72 ± 0,050 C

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Tabela 2.** Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (OC), osteopontina (OP), sialoproteína (SP), fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo I (COL-I) e Runx-2 em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio osteogênico por 21 dias.

PRIMERS	CON	CAF 25	CAF 50	CAF 100
<b>OC</b>	1,002 ± 0,07 A	1,08 ± 0,31 A	0,52 ± 0,14 B	0,83 ± 0,14 A
<b>OP</b>	1,026 ± 0,26 AB	0,673 ± 0,14 B	1,17 ± 0,22 A	1,33 ± 0,28 A
<b>SP</b>	1,022 ± 0,24 A	0,401 ± 0,05 B	0,04 ± 0,01 C	0,06 ± 0,01 C
<b>ALP</b>	1,017 ± 0,21 A	0,548 ± 0,19 B	0,078 ± 0,03 C	0,594 ± 0,26 B
<b>COL-I</b>	1,009 ± 0,15 A	1,03 ± 0,34 A	0,32 ± 0,08 B	0,62 ± 0,23 B
<b>RUNX-2</b>	1,085 ± 0,51 A	0,44 ± 0,06 B	0,35 ± 0,17 B	0,43 ± 0,13 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Tabela 3.** Porcentagem de área coberta por CTMs/campo (média ± desvio padrão) e número de nódulos de mineralização/campo (média ± desvio padrão) em culturas de CTMs da medula óssea da prole ao desmame de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio osteogênico por 21 dias.

CTM/campo	CON	CAF 25	CAF 50	CAF 100
<b>21DIAS</b>	95,76 ± 3,05 A	94,90 ± 1,35 A	93,22 ± 1,30 A	79,55 ± 1,04 B
<b>Nº Nódulos</b>				
<b>21 DIAS</b>	8 ± 1,414 A	6 ± 0,81 B	2,66 ± 0,14C	0 ± 0 D

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

### CAPÍTULO 3

**Figura 1.** Redução do MTT (média ± desvio padrão), atividade da fosfatase alcalina (FA) (média ± desvio padrão) e síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de osteoblastos da calvária da prole ao nascimento de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio osteogênico por 7, 14 e 21 dias.

MTT	COM	CAF 25	CAF 50	CAF 100
7 DIAS	0,45 ± 0,03 A	0,31 ± 0,03 B	0,4 ± 0,03 A	0,42 ± 0,05 A
14 DIAS	0,64 ± 0,03 A	0,53 ± 0,02 C	0,56 ± 0,05 B	0,52 ± 0,07 D
21 DIAS	0,54 ± 0,04 BC	0,50 ± 0,03 C	0,61 ± 0,10 AB	0,60 ± 0,02 A
FA				
7 DIAS	0,179 ± 0,01 CD	0,175 ± 0,01 D	0,294 ± 0,02 A	0,226 ± 0,01 B
14 DIAS	0,33 ± 0,01 BC	0,38 ± 0,03 A	0,423 ± 0,04 A	0,328 ± 0,02 C
21 DIAS	0,43 ± 0,01 C	0,39 ± 0,02 D	0,48 ± 0,02 A	0,45 ± 0,01 BC
COL				
7 DIAS	0,52 ± 0,04 C	0,54 ± 0,06 BC	0,76 ± 0,04 A	0,70 ± 0,08 A
14 DIAS	1,12 ± 0,08 D	1,31 ± 0,07 C	1,89 ± 0,16 A	1,34 ± 0,03 BC
21 DIAS	1,86 ± 0,09 BC	1,75 ± 0,21 D	2,79 ± 0,11 AC	1,77 ± 0,10 CD

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Figura 2.** Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para osteocalcina (OC), osteopontina (OP), sialoproteína (SP), fosfatase alcalina (ALP), colágeno tipo I (COL-I) e Runx-2 em culturas de osteoblastos da calvária da prole ao nascimento de ratos controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e lactação e cultivadas em meio osteogênico por 7, 14 e 21 dias.

PRIMERS	CON	CAF 25	CAF 50	CAF 100
<b>OC-7 dias</b>	1,016 ± 0,22 A	2,478 ± 0,58 A	3,450 ± 3,27 A	0,139 ± 0,09 A
<b>OC-14dias</b>	1,03 ± 0,292 B	1,67 ± 0,274 B	9,137 ± 1,65 A	2,25 ± 1,134 B
<b>OC-21dias</b>	1,033 ± 0,31 B	1,080 ± 0,189 B	4,21 ± 1,08 A	0,70 ± 0,273 B
<b>OP-7dias</b>	1,002 ± 0,087 B	1,492 ± 0,174 A	1,308 ± 0,179 A	1,431 ± 0,123 A
<b>OP-14 dias</b>	1,01 ± 0,183 B	1,493 ± 0,151 A	1,568 ± 0,203 A	1,262 ± 0,212 AB
<b>OP- 21 dias</b>	1,01 ± 0,191 B	1,61 ± 0,194 A	1,74 ± 0,452 A	1,117 ± 0,1554 B
<b>SP-7dias</b>	1,00 ± 0,09 A	5,64 ± 1,245 A	12,28 ± 12,05 A	0,35 ± 0,35 A
<b>SP-14dias</b>	1,03 ± 0,34 C	3,05 ± 0,59 B	5,68 ± 0,68 A	3,16 ± 2,01 B
<b>SP-21dias</b>	1,057 ± 0,39 B	1,653 ± 0,29 AB	1,81 ± 0,46 A	1,37 ± 0,17 AB
<b>ALP-7dias</b>	1,001 ± 0,07 B	1,919 ± 0,138 B	5,632 ± 1,01 A	1,410 ± 0,350 B
<b>ALP-14dias</b>	1,02 ± 0,25 B	1,180 ± 0,122 B	4,44 ± 0,53 A	1,939 ± 1,006 B
<b>ALP-21dias</b>	1,081 ± 0,45 A	0,955 ± 0,29 A	1,645 ± 0,762 A	0,855 ± 0,206 A

<b>COL-1-7dias</b>	1,00 ± 0,018 B	0,54 ± 0,09 C	1,74 ± 0,33 A	1,305 ± 0,343 B
<b>COL-1-14dias</b>	1,00 ± 0,11 BC	0,69 ± 0,09 C	2,28 ± 0,52 A	1,54 ± 0,69 B
<b>COL-1-21dias</b>	1,061 ± 0,35 A	1,01 ± 0,29 A	1,09 ± 0,41 A	0,72 ± 0,14 A
<b>Runx-2 7dias</b>	1,00 ± 0,15 A	0,76 ± 0,13 A	1,098 ± 0,526 A	1,12 ± 0,438 A
<b>Runx-2 14dias</b>	1,02 ± 0,25 A	0,82 ± 0,19 A	1,08 ± 0,127 A	1,219 ± 0,08 A
<b>Runx-2 21dias</b>	1,01 ± 0,169 B	1,86 ± 1,354 B	0,77 ± 0,448 A	1,084 ± 0,300 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Figura 3.** Porcentagem de nódulos de mineralização/campo (média ± desvio padrão) em culturas de osteoblastos da calvária da prole ao nascimento de ratas controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio osteogênico por 21 dias.

% Nódulos	CON	CAF 25	CAF 50	CAF 100
<b>21 DIAS</b>	7,92 ± 5,74 C	5,4 ± 5,11 D	55,2 ± 7,9 A	15,7 ± 7 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

#### CAPÍTULO 4

**Figura 1.** Redução do MTT (média ± desvio padrão), atividade da fosfatase alcalina (FA) (média ± desvio padrão) e síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos das cartilagens articulares de ratos neonatos de mães controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico por 7, 14 e 21 dias.

	CON	CAF 25	CAF T50	CAF 100
<b>MTT 7 dias</b>	0,078 ± 0,009 A	0,052 ± 0,01 B	0,057 ± 0,018 B	0,092 ± 0,012 A
<b>MTT 14 dias</b>	0,072 ± 0,007 A	0,069 ± 0,023 A	0,072 ± 0,01 A	0,089 ± 0,007 A
<b>MTT 21dias</b>	0,094 ± 0,016 A	0,043 ± 0,018 B	0,075 ± 0,017 A	0,094 ± 0,016 A
<b>FA 7 dias</b>	0,036 ± 0,006 A	0,019 ± 0,003 B	0,032 ± 0,005 A	0,038 ± 0,003 A
<b>FA 14 dias</b>	0,034 ± 0,004 A	0,025 ± 0,004 B	0,036 ± 0,006 A	0,037 ± 0,003 A
<b>FA 21 dias</b>	0,044 ± 0,006 B	0,032 ± 0,002 C	0,045 ± 0,003 B	0,054 ± 0,006 A
<b>COL 7 dias</b>	0,123 ± 0,051 A	0,08 ± 0,012 C	0,074 ± 0,014 C	0,097 ± 0,006 B
<b>COL 14 dias</b>	0,237 ± 0,014 A	0,115 ± 0,023 C	0,127 ± 0,016 C	0,19 ± 0,030 B
<b>COL 21 dias</b>	0,239 ± 0,019 A	0,154 ± 0,017 B	0,137 ± 0,030 B	0,240 ± 0,027 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Figura 2.** Comparação da quantificação relativa (média  $\pm$  desvio padrão) dos transcritos gênicos para agrecano, colágeno tipo II (COL II), Sox-9, Runx-2 e fosfatase alcalina (FA) em culturas de condrócitos das cartilagens articulares de ratos neonatos de mães controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação e cultivadas em meio condrogênico por 21 dias.

<u>PRIMERS</u>	<u>CON</u>	<u>CAF 25</u>	<u>CAF 50</u>	<u>CAF 100</u>
<b>Agrecano</b> <b>21 dias</b>	1,169 $\pm$ 0,712 B	2,005 $\pm$ 0,426 A	1,386 $\pm$ 0,01 AB	0,644 $\pm$ 0,127 B
<b>COL II</b> <b>21 dias</b>	0,79 $\pm$ 0,153 A	0,160 $\pm$ 0,06 B	0,715 $\pm$ 0,155 A	0,730 $\pm$ 0,108 A
<b>Sox9</b> <b>21 dias</b>	1,04 $\pm$ 0,307 A	0,298 $\pm$ 0,06 B	0,483 $\pm$ 0,08 B	0,444 $\pm$ 0,05 B
<b>Runx-2</b> <b>21 dias</b>	1,126 $\pm$ 0,558 A	0,869 $\pm$ 0,190 A	1,115 $\pm$ 0,282 A	0,589 $\pm$ 0,233 A
<b>FA</b> <b>21 dias</b>	1,216 $\pm$ 0,393 A	0,374 $\pm$ 0,05 B	1,492 $\pm$ 0,124 A	0,535 $\pm$ 0,113 B

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Figura 3.** Porcentagem de condrócitos/campo (média  $\pm$  desvio padrão) e matriz PAS+, Alcian blue +, safranina O +/campo em culturas de condrócitos de ratos neonatos de mães controle (CON) e tratadas com cafeína (CAF) nas doses de 25, 50 e 100 mg/Kg durante a gestação em meio condrogênico por 21 dias.

	<u>CON</u>	<u>CAF 25</u>	<u>CAF 50</u>	<u>CAF 100</u>
<b>Cél/campo</b> <b>21 dias</b>	93,97 $\pm$ 1,88 A	82,85 $\pm$ 2,67 B	95,15 $\pm$ 0,96 A	96,19 $\pm$ 1,008 A
<b>Matriz</b> <b>PAS+</b> <b>21 dias</b>	1,84 $\pm$ 0,1817 A	0,4025 $\pm$ 0,187 B	1,38 $\pm$ 0,2023 A	1,58 $\pm$ 0,458 A
<b>Matriz</b> <b>Alcian Blue +</b> <b>21 dias</b>	2,045 $\pm$ 0,364 A	0,442 $\pm$ 0,169 B	2,09 $\pm$ 0,437 A	1,875 $\pm$ 0,212 A
<b>Matriz</b> <b>Safranina+</b> <b>21 dias</b>	1,395 $\pm$ 0,477 A	0,514 $\pm$ 0,349 B	1,09 $\pm$ 0,494 AB	1,235 $\pm$ 0,292 AB

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)



## CAPÍTULO 5

**Figura 1.** Redução do MTT (média ± desvio padrão), atividade da fosfatase alcalina (FA) (média ± desvio padrão) e síntese de colágeno (média ± desvio padrão) em culturas de condrócitos das cartilagens articulares de ratos neonatos cultivados sem cafeína (CON) e com diferentes concentrações de cafeína (CAF) (0,5, 1,0 e 2,0 Mm) aos 7, 14 e 21 dias de cultivo.

MTT	COM	CAF 0,5	CAF 1,0	CAF 2,0
<b>7 dias</b>	0,156 ± 0,038 A	0,071 ± 0,021 B	0,181 ± 0,054 A	0,173 ± 0,077 A
<b>14 dias</b>	0,120 ± 0,007 A	0,110 ± 0,006 B	0,096 ± 0,003 C	0,069 ± 0,008 D
<b>21 dias</b>	0,161 ± 0,008 A	0,122 ± 0,004 C	0,113 ± 0,015 C	0,140 ± 0,003 B
<b>FA</b>				
<b>7 dias</b>	0,002 ± 0,002 C	0,014 ± 0,003 A	0,010 ± 0,003 B	0,007 ± 0,002 B
<b>14 dias</b>	0,039 ± 0,002 A	0,027 ± 0,002 B	0,021 ± 0,002 C	0,014 ± 0,0009 D
<b>21 dias</b>	0,033 ± 0,004 A	0,019 ± 0,0021B	0,0205 ± 0,002 B	0,0108 ± 0,002 C
<b>COL</b>				
<b>7 dias</b>	0,110 ± 0,010 A	0,052 ± 0,003 B	0,040 ± 0,001 C	0,038 ± 0,002 C
<b>14 dias</b>	0,207 ± 0,009 A	0,116 ± 0,006 B	0,072 ± 0,004 C	0,048 ± 0,002 D
<b>21 dias</b>	0,280 ± 0,012 A	0,131 ± 0,017 B	0,102 ± 0,005 C	0,059 ± 0,002 D

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Figura 2.** Comparação da quantificação relativa (média ± desvio padrão) dos transcritos gênicos para agrecano, colágeno tipo II (COL II), Sox-9, Runx-2 e fosfatase alcalina (FA) em culturas de condrócitos das cartilagens articulares de ratos neonatos cultivados sem cafeína (CON) e com diferentes concentrações de cafeína (CAF) (0,5, 1,0 e 2,0 Mm) aos 21 dias de cultivo.

PRIMERS	CON	CAF 0,5	CAF 1,0	CAF 2,0
<b>Agrecano</b>				
<b>21 dias</b>	1,281 ± 0,253 A	0,674 ± 0,430 B	0,211 ± 0,156 B	0,321 ± 0,206 B
<b>COL II</b>				
<b>21 dias</b>	1,01 ± 0,187 A	0,296 ± 0,319 B	0,383 ± 0,242 B	0,377 ± 0,142 B
<b>Sox9</b>				
<b>21dias</b>	1,09 ± 0,532 A	0,054 ± 0,037 B	0,39 ± 0,354 B	0,099 ± 0,049 B
<b>Runx-2</b>				
<b>21dias</b>	1,01 ± 0,195 A	0,838 ± 0,427 A	0,913 ± 0,526 A	0,844 ± 0,476 A
<b>FA</b>				
<b>21dias</b>	1,05 ± 0,405 A	1,257 ± 1,306 A	1,698 ± 1,288 A	1,196 ± 1,087 A

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

**Figura 3.** Porcentagem de condrócitos/campo (média  $\pm$  desvio padrão) e matriz PAS+, Alcian blue +, safranina O +/campo em culturas de condrócitos de ratos neonatos cultivados sem cafeína (CON) e com diferentes concentrações de cafeína (CAF) (0,5, 1,0 e 2,0 Mm) aos 21 dias de cultivo.

	<b>CON</b>	<b>CAF 25</b>	<b>CAF 50</b>	<b>CAF 100</b>
<b>Cél/campo</b> <b>21 dias</b>	65,29 $\pm$ 4,09 A	45,31 $\pm$ 4,60 B	21,95 $\pm$ 11,57 C	7,14 $\pm$ 4,87 D
<b>Matriz</b> <b>PAS+</b> <b>21 dias</b>	0,35 $\pm$ 0,165 A	0,069 $\pm$ 0,021 B	0,046 $\pm$ 0,02 C	0,008 $\pm$ 0,012 D
<b>Matriz</b> <b>Alcian Blue +</b> <b>21 dias</b>	0,43 $\pm$ 0,23 A	0,173 $\pm$ 0,109 B	0,037 $\pm$ 0,046 C	0,001 $\pm$ 0 D
<b>Matriz</b> <b>Safranina+</b> <b>21 dias</b>	0,42 $\pm$ 0,23 A	0,15 $\pm$ 0,149 B	0,042 $\pm$ 0,05 C	0,002 $\pm$ 0 D

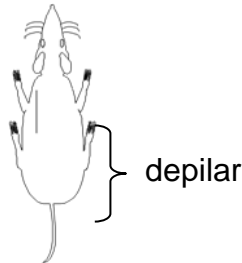
Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa (P<0,05)

## ANEXO 6 Protocolos

### EXTRAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA PARA OBTENÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS (CTMs)

#### Procedimento FORA DO FLUXO:

- Realizar anestesia geral do animal (0,15 mL de Rompun e 0,2 mL de Quetamina, via intramuscular)
- Realizar punção cardíaca para retirar o sangue do animal e evitar contaminação durante a colheita dos ossos
- Eutanasiar o rato
- Depilar toda a região posterior do animal ventral e dorsal



- Imersão do animal em dois frascos contendo álcool 70% por 1 minuto em cada

#### Procedimento NA ANTE SALA E DENTRO DO FLUXO com todo instrumental estéril:

- Passar iodo povidine em toda a região depilada
- Retirar o fêmur e a tíbia (bilateral) com o mínimo de musculatura colocando os ossos em tubo falcon com aproximadamente 40mL de DEMEM  
OBS: antes de usar o fluxo, ligar a UV por 20 minutos

#### Procedimento DENTRO DO FLUXO DA SALA DE CULTURA com todo instrumental estéril:

- Retirar as epífises proximal e distal de cada osso utilizando tesoura e pinça estéreis.
- Com uma seringa de 1 ou 3 mL e agulha de insulina, lava-se a medula para dentro do tubo falcon estéril com DMEM sem SFB (não ultrapassar 30 mL por tubo).
- Centrifugar por 10 min a 1.400g.
- Desprezar o sobrenadante e re-suspender o *pellet* em 20 mL de DMEM + 10% SFB.
- Transferir 10 mL para garrafas T 75 e 5 mL para garrafas T 25.
- Incubar em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

## **EXTRAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS DA CALVÁRIA**

### Procedimento FORA DO FLUXO mas com material estéril:

- Eutanasiar com Quetamina/Xilazina (IP) os ratos de no máximo 5 dias de idade.
- Retirar a pele que recobre os ossos parietais e frontais do crânio e retirar os ossos.
- Colocar os fragmentos de osso em tubo falcon de 40 mL contendo PBS 0,15 molar estéril (quantidade suficiente para cobrir os fragmentos).

### Procedimento DENTRO DO FLUXO com todo instrumental estéril:

- Limpar os ossos em placas de petri com PBS estéril e picotar as bordas dos fragmentos utilizando tesoura (não retirar fragmentos).
- Desprezar o PBS e transferir os fragmentos para tubo falcon adicionar tripsina 1% até cobrir os fragmentos.
- Incubar por 15 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.
- Descartar a tripsina e adicionar colagenase II a 0,2%. Incubar por 30 a 40 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Agitar de 10 em 10 min.
- Descartar a colagenase.
- Adicionar colagenase a 0,2% e incubar por mais 30 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. OBS: Repetir o tratamento com colagenase até completar 3 tratamentos, entre o segundo e o terceiro centrifugar 5min a 1200g. A partir do segundo tratamento recolher todo o sobrenadante!
- Centrifugar todo o sobrenadante por 5 min a 1400g.
- Descartar o sobrenadante e re-suspender o *pellet* com RPMI + 10% SFB
- Transferir os 5 mL para garrafas T25. Pode-se re-suspender e dividir em duas garrafas T25 se o *pellet* for muito grande.

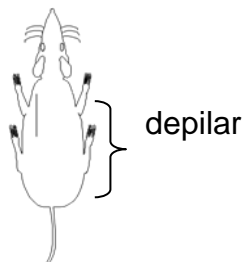
**ATENÇÃO: Preparar antes da extração, no mesmo dia.**

OBS→ Colagenase 0,2%: 0,08 g de colagenase em 40 mL de PBS 0,15 molar e filtrar utilizando membrana de 22 µm.
---

## **EXTRAÇÃO E DIGESTÃO ENZIMÁTICA DE CARTILAGEM PARA OBTENÇÃO DE CONDRÓCITOS**

### **Procedimento FORA DO FLUXO:**

- Utilizar ratos de 3 dias de idade.
- Eutanasiar os ratos com administração intraperitoneal da mistura de xylazina 0,15 mL e quetamina 0,20 mL em uma seringa de insulina.
- Depilar toda a região posterior do animal ventral e dorsal com auxílio de um tricotomo



- Imergir o animal em dois frascos contendo álcool 70% por 1 minuto em cada

### **Procedimento NA ANTE SALA E DENTRO DO FLUXO com todo instrumental estéril:**

#### **OBS: Antes de usar o fluxo, ligar a UV por 15 minutos**

- Passar iodo povidine em toda a região depilada
  - Fazer incisão na pele e retirar a musculatura que envolve fêmur e a tíbia (bilateral), colocando os ossos em tubo falcon com 30mL de DEMEM.
- OBS.: Utilizar pinças e tesouras diferentes para pele e musculatura.

### **Procedimento DENTRO DO FLUXO DA SALA DE CULTURA com todo instrumental estéril:**

- Remover o excesso de musculatura dos fêmures e tíbias.
- Em uma placa de *petri*, remover fatias finas de cartilagem das epífises proximais e distais utilizando bisturi e pinça estéreis. Não abrir o canal medular. Caso isso ocorra, descartar o osso.
- Lavar as fragmentos de cartilagem duas vezes com PBS 0,15 molar estéril.

### **Disgestão enzimática da cartilagem**

- Em um tubo falcon, adicionar colagenase a 0,2% até cobrir os fragmentos (3mL) e acrescentar 3mL de DEMEM com 5 % de SFB.
- Homogeneizar
- Incubar por 16h, na estufa a 37<sup>0</sup>C e 5% de CO<sub>2</sub>. Na estufa, desenroscar levemente a tampa do tubo falcon, semelhante ao que faz com as garrafas de cultivo, não esquecendo de fechar antes de retirá-los da estufa.
- Homogeneizar e centrifugar por 10 min a 1400g.
- Desprezar o sobrenadante, lavar com PBS (qual PBS 1X) e centrifugar a 1.400g por 5 min (repetir 2x este procedimento).

- Re-suspender o *pellet* em 2 mL de meio condrogênico 1% SFB.
- Transferir 1 mL para garrafa T 25 e completar com 9 mL de meio condrogênico 1% SFB. Incubar em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.

OBS: Na primeira troca de meio, retirar o meio da garrafa, centrifugar por 10 min a 1.400g e re-suspender o *pellet*. Nas demais trocas, desprezar o meio antigo.

OBS→ Colagenase 0,4%: 0,08 g de colagenase em 20 mL de PBS 0,15 molar e filtrar com auxílio de filtro membrana de 0,22 µm acoplado à seringa.

DMEM com 5% de soro fetal bovino: 95mL de DMEM + 5mL de soro fetal bovino inativado (descongelado). Filtrar novamente em bomba à vácuo com membrana de 0,22 µm.

### MEIO PARA CULTIVO DE CÉLULA TRONCO INDIFERENCIADA (DMEM)

- Diluir em 800mL de água ULTRAPURA, o DMEM + 2g de bicarbonato de sódio 7,5%.
- Acertar o pH para 7,2.
- Acrescentar gentamicina (60mg/L).
- Acrescentar 10mL do PSA (descongelado).
  - P: penicilina 100 U/mL.
  - S: estreptomicina 10 µg/mL.
  - A: anfotericina B 250 µg/mL.
- Completar o volume para 1000mL.
- Dentro do fluxo laminar, fazer a filtração em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm

➤ **DMEM com 10% de soro fetal bovino:** 180mL de DMEM + 20mL de soro fetal bovino inativado (descongelado). Filtrar novamente em bomba à vácuo com membrana de 0,22 µm

- ✓ OBS→ para as garrafas T75, colocar 10mL de DMEM com 10% SFB.  
para as garrafas T25, colocar 5mL de DMEM com 10% SFB .  
para as placas de 24 wells, colocar 1mL de DMEM com 10% SFB  
para as placas de 6 wells, colocar 3mL de DMEM com 10% SFB
- (O meio deve ser trocado, as segundas e sextas feiras ou quando necessário, também as quartas feiras)*

- ✓ OBS→ O SFB somente é inativado a 56°C por 30 min.

## MEIO DE DIFERENCIAÇÃO OSTEOGENICA (Dexametasona)

- Vitamina C - 50 µg/mL

$$\begin{array}{rcl} 50 \mu\text{g} & \text{---} & 1 \text{ mL} \\ x & \text{---} & 200 \text{ mL} \\ x & = & 10000 \mu\text{g} \\ x & = & 0,010 \text{ mg em } 200 \text{ mL de meio} \\ x & = & \mathbf{0,01 \text{ g em } 200 \text{ mL de meio}} \end{array}$$

**Vitamina C: 0,01 g para 200 mL de meio**

- β glicerofosfato - 10 mM

$$\begin{array}{rcl} \text{PM} = 216 \text{ g} & & \\ 0,432 \text{ g} & \text{---} & 100\% \\ x & \text{---} & 127\% \\ x & = & \mathbf{0,55 \text{ g em } 200 \text{ mL de meio}} \end{array}$$

**β glicerofosfato: 0,55 g para 200 mL de meio**

- Dexametasona - 0,1 µM

$$\text{PM} = 434,5 \quad 4 \text{ mg} \quad - \quad 1 \text{ mL}$$

$$\begin{array}{rcl} 434,5 \text{ g} & \text{---} & 1 \text{ M} \\ x & \text{---} & 0,1 \times 10^{-6} \text{ mol} \\ x & = & 43,45 \mu\text{g} \quad \text{---} \quad 1 \text{ L} \\ & & x \quad \text{---} \quad 0,2 \text{ L} \\ & & x & = & \mathbf{8,69 \mu\text{g}} \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} 4000 \mu\text{g} & \text{---} & 1000 \mu\text{l} \\ 8,69 \mu\text{g} & \text{---} & x \\ x & = & \mathbf{2,17 \mu\text{l em } 200 \text{ mL de meio}} \end{array}$$

**Dexametasona 4mg: 2,17 µL para 200 mL de meio)**

## MEIO DE DIFERENCIAÇÃO CONDRÓGENICO 1% SFB (p/100mL)

Dentro do fluxo laminar:

- 99 mL de DMEM estoque
- 1 mL de soro fetal bovino (1% SFB)
- 0,0125g de BSA (albumina sérica bovina)
- 1 µL da solução de Piruvato de sódio (100 µM)
- 65 µL de Transferrina (5 µg/mL)
- 10 µL de Dexametasona (4mg/mL) ou 20 µl de Dexametasona (20mg/mL)
- 200 µL de Insulina (100u/mL)
- Após homogeneização, filtrar em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm

Obs.: No dia de uso do meio, acrescentar ácido ascórbico (50µg/mL).

## PREPARO PBS

### PBS 1,5 Molar (10x):

Dissolver em água ULTRAPURA aquecida e com agitação:

- 80g de NaCl (cloreto de sódio).
- 2g de KCl (cloreto de potássio).
- 11,5g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (fosfato de sódio anidro).
- 2,0g de K H<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (fosfato de potássio).
- Conferir o pH que deve ser de 7,2 (acertar com NaOH sólido).
- Armazenar a 4°C.
- Completar o volume para 1 litro.
- Transferir para frasco âmbar de 1L enchendo-o no máximo com 500mL de solução.
- Armazenar a 4°C.

**IMPORTANTE:** com o tempo a solução pode apresentar a formação de cristais no fundo da garrafa. Caso isso ocorra, coloque o frasco em banho-maria até que os cristais solubilizem. Assim você pode utilizar a solução normalmente.

### PBS 0,15 Molar (1x) (para uso):

- 100 mL de PBS 1,5 molar em 900 mL de água ULTRAPURA
- Dentro do fluxo laminar, fazer a filtragem em bomba a vácuo com membrana de 0,22 µm ou colocar em frasco de 1L enchendo no máximo com 500mL de solução. Tampar com papel craft e autoclavar.
- Armazenar a 4°C.



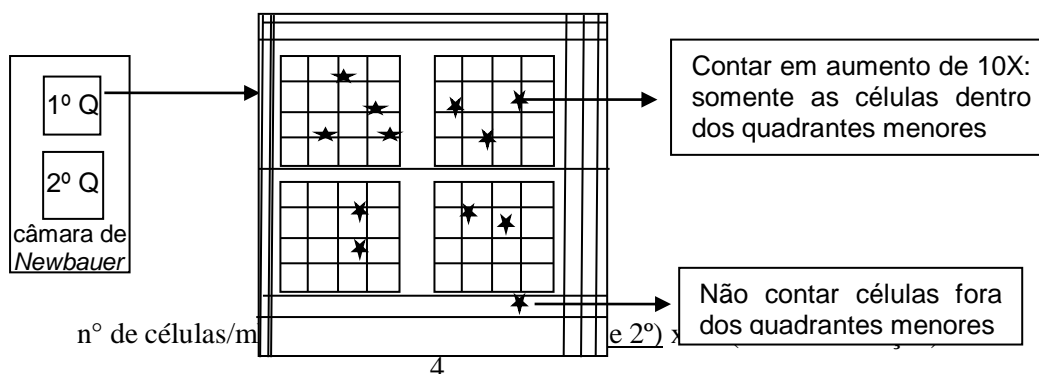
## TRIPSINIZAÇÃO PARA REPIQUE EM GARRAFAS

- Verificar a cobertura de 80 a 90% da garrafa.
- Retirar o meio, lavar com 5 mL de PBS 0,15 molar.
- Retirar o PBS e adicionar 1,5-2,0 mL de tripsina 1% na garrafa T75 e 1 mL de tripsina na garrafa T25. Incubar por 8-10 min a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>.
- Após a retirada da estufa, agitar gentilmente a garrafa para favorecer a soltura das células.
- Acrescentar 10 mL de DMEM + 10% de SFB para inativar a tripsina e transferir 5 mL para outra garrafa T75. Completar ambas as garrafas com mais 5 mL de DMEM + 10% de SFB.
- Caso a tripsinização seja de uma garrafa T25, após retirar da estufa, acrescentar 5 mL de DMEM + 10% de SFB e transferir todo o conteúdo para uma garrafa T75 completando o volume desta para 10 mL.

OBS: Quem inativa a tripsina é o DMEM acrescido de 10% de SFB.

## CONTAGEM DE CÉLULAS

- Proceder a tripsinização das células como descrito anteriormente, recolher todo o conteúdo da garrafa em tubo falcon de 50 mL (o volume do tubo não deve ultrapassar 30 mL).
- Centrifugar por 10 min a 1400g.
- Desprezar o sobrenadante e re-suspender o *pellet* com 2 mL de DMEM + 10% de SFB.
- Transferir 2 µL para um eppendorf: utilizar a solução **azul de tripan**.
  - **Azul de tripan**: acrescentar 49 µL de PBS 0,15 M + 49 µL da solução de azul de tripan
- Retirar 10 µL da nova solução e transferir para cada parte da câmara de *Newbauer*. Fazer a contagem das células dos dois quadrantes (1° e 2°).



- Fazer regra de três, para calcular o volume com células a ser utilizado em cada *well*.

Placas de 24 wells:  $1 \times 10^4$  células

Placas de 6 wells:  $3 \times 10^4$  células

Garrafas T25:  $25 \times 10^4$  células

## TESTE DE METABOLISMO CELULAR

### ✓ Ensaio de MTT (placa de 24 wells)

- Aspirar todo o meio e descartar.
- Colocar 210  $\mu\text{L}$  de meio de cultura utilizado com 10% de SFB/well. (Se o meio em questão for o indiferenciado, colocar meio indiferenciado (DEMEM), se o meio em questão for o osteogênico ou condrogênico, deve-se colocar o osteogênico ou condrogênico).
- Acrescentar 170  $\mu\text{L}$  de MTT (5 mg/mL).
- Incubar a placa 2 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ . O branco também deve ser colocado na estufa neste momento.
- Observar no microscópio a formação de cristais.
- Colocar 210  $\mu\text{L}$  de SDS – 10% de HCl.
- Incubar a placa *overnight* em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ .
- Retirar 100  $\mu\text{L}$  de cada well, transferir para placas de 96 wells e ler a 595 nm. Fazer duplicata de cada well. **Cuidado para não haver a formação de bolhas de ar! (Se formar bolhas, as mesmas devem ser estouradas com a ponta de uma agulha).**

Caso haja necessidade de fazer uma leitura mais rápida após a formação dos cristais, adicionar 170  $\mu\text{L}$  de SDS 23% a 50% de dimetilformamida. A leitura pode ser realizada imediatamente (não precisa incubar *overnight*).

### Branco:

- Em um eppendorf colocar 100  $\mu\text{L}$  de DMEM + 10% SFB + 100  $\mu\text{L}$  de MTT + 100  $\mu\text{L}$  de SDS.
- Retirar uma alíquota de 100  $\mu\text{l}$  e transferir para a placa de 96 wells.
- Fazer duplicata.

### Preparo da solução de MTT: (conferir com as instruções do fabricante)

**MTT estéril:** 5 mg/mL de MTT em PBS 0,15M.

Dissolver o pó e filtrar a solução em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$ . Manter a  $4^\circ\text{C}$ , no escuro. qual volume tem sido feito e quanto de pó? (150mg em 30 mL)

**SDS 10% - HCl:** 10 g de SDS em 100 mL de água deionizada + 333  $\mu\text{L}$  de HCl concentrado (colocar 100  $\mu\text{L}$  de HCl para cada 30 mL de solução). Manter a temperatura ambiente, colocar timerosal para evitar a contaminação.

## TESTE DA FOSFATASE ALCALINA

### ✓ Ensaio de Fosfatase Alcalina (placa de 24 wells)

#### ❖ Dosagem de fosfatase alcalina na células

OBS: Se as células tiverem soltado do poço completamente excluir essa amostra.

- Aspirar todo o meio e reservar em um tubo falco.
- Lavar a placa 2 x com PBS 0,15M estéril (500 µL).
- Colocar 200 µL da solução de BCIP/NBT (1 mL de BCIP + 1mL de NBT + 8 mL de PBS 0,15 M) (Invitrogen, CA, EUA).
- Incubar a placa 2 horas em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.
- Observar no microscópio.
- Colocar 200 µL da solução de SDS – 10% HCl.
- Incubar a placa *overnight* em estufa a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>
- Retirar 100µL de cada well, transferir para placas de 96 wells e ler a 595 nm. Fazer duplicata de cada well. **Cuidado para não haver a formação de bolhas de ar!**

•

#### *Branco para F.A. célula*

- Em um eppendorf, colocar 200 µl da solução de NBT/BCIP e mais 200 µl de SDS. Dessa mistura, pipetar 100 µl para cada poço da placa de 96 wells. Pode ser feito no momento da leitura no espectrofotômetro.

#### Preparo da solução de NBT/BCIP: (conferir com as instruções do fabricante)

**BCIP / NBT: 4 µL de NBT + 3,3 µL de BCIP + 1 mL de tampão da fosfatase alcalina.  
Preparar na hora do uso e manter no escuro.**

## PREPARO DA AMOSTRA PARA CITOMETRIA DE FLUXO

- Retirar o meio do poço ou da garrafa.
- Lavar uma vez com PBS 0,15 molar.
- Retirar o PBS e acrescentar 0,5 mL de tripsina 1x /well ou 1mL para garrafas T25.
- Incubar 10 min na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> (olhar se todas as células se soltaram).
- Acrescentar 500 µL de PBS 0,15 molar.
- Retirar toda a solução e transferir para um eppendorf.
- Centrifugar por 10 min a 1400g.
- Descartar o sobrenadante.
- Re-suspender o *pellet* com 200 µL de formaldeído a 2%.
- Transferir para os tubos do citômetro e fazer a leitura.

## VIABILIDADE PELO MÉTODO DE AZUL DE TRIPAN

- Retirar o meio transferindo-o para o eppendorf (1).
- Adicionar 0,5 mL de tripsina a 1 x./well
- Colocar 10 min na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>
- Adicionar 0,5 mL de meio.
- Recolher e colocar em eppendorf (2).
- Centrifugar eppendorfs 1 e 2 a 1400g por 10 min.
- Re-suspender o *pellet* do eppendorf 1 em 100 µL de meio transferindo imediatamente para re-suspender o eppendorf 2.
- Adicionar 100µL de azul de tripan e esperar 10 min.
- Ler em câmara de *Newbauer* contando o número total de células e o número de células marcadas em azul.
- Fazer a proporção; ou seja, a % de células viáveis. Células azuis são inviáveis.

## VON KOSSA

### ❖ Fixação:

Paraformaldeído 4% (preparar no Maximo no dia anterior e deixar na geladeira)

### ❖ Solução de nitrato de prata:

Nitrato de prata – 5 g em 100mL de água destilada

### ❖ Solução Tiosulfato de sódio:

Tiosulfato de sódio – 5 g.

Água destilada – 100 mL.

### ✓ PROCEDIMENTO:

- Lavar a lamínula em água corrente, e depois em água destilada.
- Colocar em solução de nitrato de prata 5% por 2h sob luz (lâmpada de 100 watts).
- Passar por 2x em água destilada.
- Colocar em solução de tiosulfato de sódio 5% por 5 min.
- Lavar em água corrente por 2 x.
- Contra corar com eosina por 40 segundos.
- Lavar em água corrente por 2 x.
- Passar em álcool absoluto.
- Passar em xilol.
- Montar com bálsamo do Canadá.

## DOSAGEM DE COLÁGENO (método colorimétrico)

### ❖ Na célula:

- Lavar as células 1 vez com PBS e colocar 1 mL de Bouin / well (placas de 24 wells) e 4 mL de Bouin/well (placas de 6 wells).

- Incubar por 1 hora a 37°C sob agitação. Caso faça no dia seguinte não será necessário agitação. Deixar por 2 horas na estufa. O branco também deve ser colocado na estufa neste momento (Se quiser continuar no dia seguinte, após este procedimento, colocar na geladeira, pode ficar estocado por no máx 5 dias).
- Lavar as placas por 15 min: imergir as placas em 3 mL de água de torneira e deixar em água corrente.
- Secar as placas e adicionar de Sirius Red (na placa de 6 wells colocar 2 mL).
- Incubar por 30 min em temperatura ambiente.
- Remover o corante.
- Lavar as células 2 x com 0,01N de HCl para remover todo corante não ligado.
- Adicionar 300 µL de NaOH 0,5M.
- Incubar por 30 min.
- Retirar 100 µL em duplicata e ler a 540 nm (O parametro abaixo no aparelho fica sem valor).
- Branco amostras: NaOH 0,5M em duplicata.

**Soluções:**

**Sircol Red:** dissolver 1 mg/mL de Sircol Red em solução aquosa saturada de ácido pícrico. Preparar no momento do uso.

**NaOH 0,5M:** 2 g em 100 mL de água deionizada.

Ácido acético 0,5M: 2,86 mL de ácido acético glacial em 100 mL de água.

**Bouin:** 15 mL de ácido pícrico + 5mL de formaldeído 35% + 1 mL de ácido acético glacial.

**COLORAÇÕES PARA CONDRÓCITOS:**

- Fixar a lamínula em paraformaldeído..
  - Solução de paraformaldeído 4%
    - Adicionar 4 g de paraformaldeído em 100 mL de PBS 1X.
    - Colocar a mistura em agitador magnético e aquecer. A mistura deve tornar-se incolor.
    - Após esfriar, colocar sob refrigeração para a utilização.
    - Preparar no máximo no dia anterior e deixar na geladeira.

❖ **Coloração HE:**

- Retirar a solução de paraformaldeído
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Corar pela hematoxilina por 3 min
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Corar pela eosina por 3 min
- Lavar 1 vez com água destilada.
- Passar no álcool absoluto por 1 min.
- Mergulhar 3 vezes no xilol e montar com bálsamo.

❖ **Coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS)**

- Cobrir a lamínula com ácido periódico por 30 min (reaproveitar)

- Lavar duas vezes com água destilada.
- Cobrir a lâmina com Reativo de Schiff por 50 min
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Corar pela hematoxilina por 3 min
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Passar no álcool absoluto por 1 min.
- Mergulhar 3 vezes no xilol e montar com bálsamo.

OBS: O reativo de Schiff deve ser transparente. Se estiver rosado é recomendado fazer um teste para avaliar a coloração. Caso não marque, o ideal é descartar, pois pode ter ocorrido contaminação.

#### ❖ Coloração de Safranina

- Solução de Safranina 0,1%  
→ 0,05 g de safranina O em 50 mL de água destilada.
- Solução de Fast Green 0,1%  
→ 0,05 g de Fast Green em 50 mL de água destilada.
- Solução de ácido acético 1%  
→ 1 mL de ácido acético em 99 mL de água destilada.
- Retirar a solução de paraformaldeído
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Corar pelo Fast Green por 10 min
- Colocar em solução de ácido acético por 2 min
- Corar pelo Safranina O por 30 seg
- Mergulhar rapidamente em álcool absoluto I
- Mergulhar 3 vezes no xilol e montar com bálsamo.

#### ❖ Coloração de Alcian Blue (PH 2,5)

- Solução de ácido acético 3%  
→ 3 mL de ácido acético em 97 mL de água destilada.
- Retirar a solução de paraformaldeído.
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Deixar em solução de ácido acético por 3 min.
- Deixar em solução de Alcian Blue por 40 min.
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Corar pela eosina por 3 min
- Lavar 5 vezes com água destilada.
- Mergulhar rapidamente em álcool absoluto I
- Mergulhar 3 vezes no xilol e montar com bálsamo.

## EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL (CÉLULAS)

- retirar o meio das garrafas T-25 cm<sup>2</sup> e lavar 1x com PBS 0,15M.
- colocar 1mL de trizol por garrafa T-25 cm<sup>2</sup> e incubar por 5 minutos em temperatura ambiente.
- transferir o conteúdo (células + trizol) para eppendorfes de 1,5mL.
- Adicionar, em cada eppendorf, 0,2mL de clorofórmio. Agitar vigorosamente, incubar por 3 minutos em temperatura ambiente.
- centrifugar por 15 minutos a 12000g (4°C).
- transferir a fase aquosa para outro eppendorfe.
- adicionar 500µL de isopropanol e incubar por 30 minutos no freezer à -80°C.
- centrifugar por 10 minutos a 12000g (4°C).
- retirar o sobrenadante.
- lavar o *pellet* com 1mL de etanol 75%.
- centrifugar por cinco minutos a 10500g (4°C).
- secar o *pellet* por cinco minutos.
- dissolver o *pellet* em água DEPC (20µL por eppendorfe).
- incubar por 10 minutos a 55°C
- dosar o RNA em espectrofotômetro. Antes de dosar fazer uma diluição de 1:50. - estocar o RNA a -80°C.

### Diluição para dosar:

- Utilizar o eppendorfe de 600 µL.
- Colocar 98 µl de água DEPC + 2 µl do RNA

### Leitura no espectrofotômetro:

- Liga o aparelho no botão atrás do mesmo (espera 30 minutos para iniciar)
- RNA
- DILUIÇÃO
- BLANK→ 100µl água DEPC
- SAMPLE→ 100µl do RNA diluído 1:49 = 2:98

## SÍNTESE DE cDNA

→ **Kit utilizado: Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green (cat. n. 11735-032).**

Obs. 1: Antes de sintetizar o cDNA, fazer a dosagem do RNA em espectrofotômetro e calcular a quantidade de RNA que será necessária para fazer o MIX.

Obs. 2: Concentração de RNA - 1 µg de RNA total.

Ex.: a dosagem de um determinado RNA foi: 500 µg/1000 µl

400 µg \_\_\_\_\_ 1000 µl

1 µg \_\_\_\_\_ x

x = 2,5 µl de RNA

Assim colocar 2,5 µl de RNA + 5,5 µl de água DEPC, pois o volume total (RNA + água) é de 8 µl.

- Preparar o Master MIX (qRT-PCR):

Master MIX	1x	Ex.: 5x
2x RT reaction MIX	10 µl	50 µl
RT enzyme MIX	2 µl	10 µl
RNA (1 µg)	2 µl	-----
Água DEPC qsp 20 µl	6 µl	-----

Obs.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase free. Pipetar 12 µl de MIX em cada tudo e acrescentar 8 µl de RNA + água DEPEC (um por amostra).

- Fazer um spin nos tubos e colocá-los na máquina de PCR programada da seguinte forma:

- **programação A:**

25°C por 10 minutos

42°C por 50 minutos

85°C por cinco minutos

- colocar no gelo e adicionar 1 µl de RNase H por tubo

- **programação B:**

37°C por 20 minutos

- Estocar o cDNA a -20°C.



### Protocolo para diluição de primers

- Para as reações de qPCR, o recomendado pelo kit (Kit Super Script III platinum two step qRT - PCR with SYBR Green [cat. n. 11735-032]) é o uso de 1 µl de primer a 10 µM, ou seja, 10 pmol por reação de 50 µl. No entanto, como faremos apenas 25 µl de reação, utilizaremos 1 µl de primer a 5 pmol.

Ex.: Osteopontina Forward (F) - 5'ATC TCA CCA TTC CGA TGA ATC T3'

OD260 = 6,1 = 29,70 nmoles = 0,20 mg

Estoque: 100 pmol / µl

$100 \times 10^{-12} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{1 \text{ µl}}$

$29,70 \times 10^{-9} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{x}$

$x = 297 \text{ µl de água DEPC}$

Uso: 5 pmol / µl

$5 \text{ pmol} \frac{\text{_____}}{1 \text{ µl}}$

$x \frac{\text{_____}}{50 \text{ µl}}$

$x = 250 \text{ pmol}$

$100 \times 10^{-12} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{1 \text{ µl}}$  (estoque)

$250 \times 10^{-12} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{x}$

$x = 2,5 \text{ µl da solução estoque} + 47,5 \text{ µl de água DEPC}$

Ex.: Osteopontina Reverse (R) - 5'TCA GTC CAT AAG CCA AGC TAT CA3'

OD260 = 6,6 = 28,90 nmoles = 0,20 mg

Estoque: 100 pmol / µl

$100 \times 10^{-12} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{1 \text{ µl}}$

$28,90 \times 10^{-9} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{x}$

$x = 298 \text{ µl de água DEPC}$

Uso: 5 pmol / µl

$5 \text{ pmol} \frac{\text{_____}}{1 \text{ µl}}$

$x \frac{\text{_____}}{50 \text{ µl}}$

$x = 250 \text{ pmol}$

$100 \times 10^{-12} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{1 \text{ µl}}$  (estoque)

$250 \times 10^{-12} \text{ mol} \frac{\text{_____}}{x}$

$x = 2,5 \text{ µl da solução estoque} + 47,5 \text{ µl de água DEPC}$

Obs.: Os primers chegam liofilizados e são armazenados a 4°C. Após a diluição, como demonstrado anteriormente, ficam armazenados a -20°C.

### TÉCNICA DE RT-PCR TEMPO REAL (qRT-PCR)

- Kit utilizado: Kit Super Script III platinum two step qRT-PCR with SYBR Green (cat. n. 11735-032).
- Aparelho utilizado: SmartCycler System
- Tubos para aparelho de PCR: SmartCycler® Tube-25µL
- Recomendação do kit: volume final de reação de 50 µl, porém faz-se 25 µl de volume final, ou seja, 2,0 µl de cDNA para 25 µl de reação.
- Reações:

MIX	1x	Ex.: 6x
<i>SYBR Green</i>	12,5 µl	75 µl
<i>Primer foward</i>	1 µl	6 µl
<i>Primer reverse</i>	1 µl	6 µl
cDNA	2,0 µl	-----
Água DEPC qsp 25 µl	8,5 µl	51 µl

Obs 1.: Preparar o MIX em tubos DNase e RNase free. Pipetar 23 µl de MIX em cada tubo e acrescentar 2,0 µl de cDNA (um por amostra) ou 2,0 µl de água DEPC (controle negativo).

Obs. 2: Preparar um MIX para cada primer, sendo que se coloca primeiro a água DEPC, segundo o SYBR Green e terceiro os primers foward e reverse.