TATIANI AYAKO GOTO DONATO

**ASPECTOS MOLECULARES DO EFEITO DO FATOR DE
TRANSFORMAÇÃO DE CRESCIMENTO-BETA1 (TGF- β 1)
NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO NA BIOMINERALIZAÇÃO
*IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

São Paulo
2014

TATIANI AYAKO GOTO DONATO

**ASPECTOS MOLECULARES DO EFEITO DO FATOR DE
TRANSFORMAÇÃO DE CRESCIMENTO-BETA1 (TGF- β 1)
NAS VIAS DE SINALIZAÇÃO NA BIOMINERALIZAÇÃO
*IN VITRO***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Área de Concentração
Biologia Celular e Tecidual

Orientador
Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Donato, Tatiani Ayako Goto.

Aspectos moleculares do efeito do fator de transformação do crescimento - beta 1 (TGF- β 1) nas vias de sinalização na biomineralização in vitro / Tatiani Ayako Goto Donato. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento. Área de concentração: Biologia Celular e Tecidual. Linha de pesquisa: Biologia oral.

Versão do título para o inglês: Molecular aspects of the effect of transforming growth factor - beta 1 (TGF- β 1) in the signaling pathways in vitro biomineralization.

1. TGF- β 1 2. Neutralização de receptores de T 3. Células osteogênicas 4. Biomineralização 5. Proteínas não colágenas 6. Smad3 I. Arana-Chavez, Prof. Dr. Victor Elias II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual III. Título.

ICB/SBIB019/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Tatiani Ayako Goto Donato.

Título da Tese: Aspectos moleculares do efeito do fator de transformação do crescimento - beta 1 (TGF- β 1) nas vias de sinalização na biomineralização in vitro.

Orientador(a): Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ Aprovado(a)

☐ Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **79** nas fls. **89** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Victor Elias Arana-chavez, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Aspectos moleculares do efeito do fator de transformação de crescimento-beta 1(TGFβ1) e de glicocorticóides nas vias de sinalização na biomineralização in vitro** do qual participam o(s) alunos **Tatiani Ayako Goto Donato**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **10.08.2010, com validade de 3 anos.**

São Paulo, 10 de agosto de 2010.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária
CEUA - ICB/USP

Aos meus pais, José Maria e Nanami, pelo exemplo, presença e apoio constante em todos os momentos da minha vida; por me incentivarem a buscar de forma honesta todos os meus sonhos, sempre torcendo e vibrando comigo a cada pequena conquista.

A minha irmã Daiani, companheira e amiga, por sempre estar disposta a me ouvir, mesmo quando o assunto era o Western blotting que não funcionou.

A minha cachorra, Feiosa (Fefa), por sempre me fazer esquecer dos problemas, me enchendo de amor e carinho.

Ao meu esposo, eterno namorado e meu melhor amigo, Marcus, pelo amor, carinho, compreensão, cumplicidade, incentivo e principalmente pela paciência que te teve durante os anos de pós-graduação. Sem você eu não teria chegado até aqui. Te amo!

A vocês, amores da minha vida, que foram minha força e minha razão nesta fase tão importante da minha vida, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado durante toda esta caminhada, me abençoando e me amparando a cada momento de dificuldade e de conquista, por nunca me abandonar mesmo quando até a fé me faltou.

Em especial ao Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chaves, orientador deste trabalho, pela oportunidade, ensinamentos e principalmente pelo exemplo de determinação, dedicação, serenidade e amor à docência.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Grandini, da Universidade Estadual Paulista (UNESP - Bauru), pela oportunidade de realizar trabalhos em parcerias com o seu laboratório, e principalmente pelo incentivo à pós-graduação e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Fábio Siviero, agradeço não só os ensinamentos de Biologia Molecular e a paciência em me ensinar, mas, principalmente, a disponibilidade, amizade e confiança.

À Profa. Marinilce, coordenadora do programa Celular e do Desenvolvimento e a todos os docentes, pelos ensinamentos, carinho, amizade e por sempre disponibilizarem um lugarzinho no laboratório, para que os experimentos de Biologia Molecular pudessem ser executados.

À Profa. Dra. Alison Colquhoun, Profa. Dra. Gláucia Maria Machado-Santelli e Dra. Daniela Ogias, pelas críticas e sugestões feitas na qualificação desse trabalho.

Às minhas amigas Dra. Daniela Scarabucci Janones e Dra. Elizabeth Ferreira Martinez, pelo exemplo de determinação e dedicação às ciências, mas, principalmente, pela sinceridade, honestidade e amizade durante toda a pós-graduação.

.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Oral da Faculdade de Odontologia (FOUSP), Ana Carolina, Cláudia, Daniela, Eloiza, Edilene, Flávia, Giovanna, Lorraine, Luana, Lucas, Mariana, Natasha, Taís e Vivian pelos momentos tensos que foram divididos na mesma bancada, por cada lágrima derramada, por cada sorriso que vinha seguido de uma boa gargalhada. Muito Obrigada.

Aos docentes do departamento de Biomateriais e Biologia Oral, em especial à Profa. Dra. Alyne Simões e ao Prof. Dr. Fernando Nogueira.

À aluna de Iniciação Científica do Laboratório de Biologia Oral Giovanna de Castro Ribeiro dos Santos, pela ajuda e dedicação na execução da manutenção das culturas de células.

À minha amiga Eloiza de Rezende, por dividir comigo momentos únicos durante toda a minha pós-graduação. Obrigada por ser amiga no sentido maior que essa palavra possa ter.

A todos os meus colegas e amigos do Departamento de Biologia Celular e Tecidual, por terem embarcado comigo no sonho de realizar o I Curso de verão em Biologia Celular e do Desenvolvimento, pela dedicação e comprometimento, que resultou em uma forte e bem sucedida parceria.

Às minhas amigas de graduação que sempre se fizeram presentes mesmo longe, Alexssandra Tavechio, Carla Rodrigues Bromati e Maira Felix, e para as que estavam constantemente comigo, Renata Bueno e Mara Corrêa. Meninas, obrigada por não desistirem de mim, me apoiarem e, principalmente, por me colocarem no chão quando a razão me faltou. Vocês são muito importantes para mim.

Às minhas amigas internacionais, Letícia, Martha, Ambart, Oriana, Vanesa e Inmaculada, pela amizade de sempre.

Aos técnicos de Laboratório Leandro, Priscila, Marley, Emilia, Edilberto, Fernando, Braz, Gaspar, Edson, Cruz, Marco e em especial Fernanda Barrence, por toda ajuda, sinceridade e amizade.

Às secretárias do departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento, Ana Lúcia, Celiana e Heloísa, e em especial Regina, pela atenção e cooperação constantes. Obrigada por sempre estarem dispostas e preocupadas em auxiliar nas minhas obrigações burocráticas.

À Renaide, bioterista do Biotério Central ICB/USP, por disponibilizar os ratos *Wistar* neonatos para realização deste trabalho.

À FAPESP (2010/00352-6 e 2010/18094-3), pelo financiamento desta pesquisa.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram na realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA

*Aprender é a única coisa de que a mente nunca
se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.
(Leonardo da Vinci)*

RESUMO

DONATO, T. A. G. **Aspectos moleculares do efeito do fator de transformação de crescimento – beta 1 (TGF- β 1) nas vias de sinalização na biomineralização *in vitro***. 2014. 113 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Tecidual) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. 111 f.

O fator de transformação de crescimento – beta 1 (TGF- β 1) é um importante mediador do crescimento celular. Entretanto, resultados conflitantes têm sido relatados com relação ao seu efeito na diferenciação de células osteoblásticas. Este estudo *in vitro* teve como objetivo avaliar os efeitos moleculares do TGF- β 1, com diferentes períodos de suplementação, sobre a formação do fenótipo osteogênico da linhagem celular MC3T3-E1, comparando-os com células tratadas com ácido ascórbico (50 μ g/mL), β -glicerofosfato (10 mM) suplementados com dexametasona (10^{-7} M) e/ou TGF- β 1/Dex (5 ng/mL), sem e com a neutralização dos receptores de TGF- β 1. Esses receptores foram neutralizados com anti-TGF- β 1 (0,5 μ g/mL) a cada 3 dias, juntamente com a suplementação do meio de cultura. Após 7, 10 e 14 dias de tratamentos, foram analisados a expressão gênica do próprio TGF- β 1 e do principal elemento da sua via de sinalização, Smad3. Além disso, foi observada a capacidade de diferenciação das células osteogênicas em diversos estágios correspondentes à biomineralização, analisando a expressão gênica e proteica de algumas proteínas não colágenas, da ALP e de fatores de transcrição importantes nesse processo - Runx2 e Osx, através de RT-PCR *real time* e Western blotting. Os resultados da presente pesquisa mostraram que as células tratadas com TGF- β 1 sem neutralização de receptores apresentam efeito inibitório nos estágios mais avançados da diferenciação dos osteoblastos e da biomineralização *in vitro*. Apesar de as células tratadas com TGF- β 1 expressarem alguns marcadores importantes envolvidos na mineralização, não foi observada a formação de nódulos de mineral. No entanto, quando as células osteogênicas tiveram os receptores de TGF- β 1 neutralizados, observaram-se nódulos de minerais em todos os tratamentos. Porém, houve uma diminuição na expressão de alguns genes, sugerindo que a deposição desses nódulos de mineral não seja derivada da atividade celular. Sendo assim, os resultados confirmam a complexidade da via de sinalização do TGF- β 1, mostrando que ainda existem lacunas para que seja entendido o mecanismo dessa molécula na biologia osteoblástica.

Palavras-chave: TGF- β 1. Neutralização de receptores de TGF- β 1. Linhagem celular MC3T3-E1. Mineralização *in vitro*. Proteínas não colágenas. Smad3.

ABSTRACT

DONATO, T. A. G. **Molecular aspects of the effect of transforming growth factor - beta 1 (TGF- β 1) in the signaling pathways *in vitro* biomineralization.** 2014. 113 p. Ph D. thesis (Cell Biology and Tissue) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Transforming growth factor – beta 1 (TGF- β 1) is an important mediator of cell growth, but conflicting results have been reported regarding its effect on osteoblastic differentiation. This *in vitro* study aimed to evaluate the molecular effects of TGF- β 1, with different supplementation time periods on the establishment of osteogenic phenotype of MC3T3-E1 cells, comparing with cells treated with ascorbic acid (50 g/mL), β -glycerophosphate (10 mM) supplemented with dexamethasone (10^{-7} M) and/or TGF- β 1 (5 ng/mL), without or with neutralization of TGF- β 1 receptors. These receptors were neutralized with anti-TGF- β 1 (0.5 μ g/mL) every 3 days when they were done the supplementation of the culture medium. After 7, 10 and 14 days of treatment, the gene expression of the TGF- β 1 and the main element of its signaling pathway - Smad3 were analyzed. In addition, we have investigated the ability of the osteogenic differentiation in various stages corresponding to biomineralization, analyzing the gene and protein expression of some noncollagenous proteins, ALP and two important transcription factors - Runx2 and OSX, through real time RT-PCR and Western blotting. The present results suggest that the cells treated with TGF- β 1 without neutralization of receptors have had inhibitory effect on some important stages of osteoblast differentiation and biomineralization *in vitro*. Although the cells treated with TGF- β 1 expressed some important mineralization markers, no mineral nodules were observed. However, when the osteogenic cells had the receptors of TGF- β 1 neutralized, mineral nodules were observed in all treatments. However, there was a decrease in the expression of some important genes, suggesting that the deposition of mineral nodules was not derived from cellular activity. Thus, the results confirm the complexity of the pathway signaling of TGF- β 1, showing that there are gaps for understand the mechanisms of this molecule in the biology of osteoblasts.

Keywords: TGF- β 1. Neutralization of TGF- β 1 receptors. MC3T3-E1 cell line. *in vitro* mineralization. Noncollagenous proteins. Smad3.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Esquema do cromossomo 4.....	24
Figura 2. Esquema da estrutura da OPN.....	25
Figura 3. Progressão da diferenciação dos osteoblastos.....	31
Figura 4. Via de sinalização do TGF- β 1 na formação do osso.....	39
Figura 5. Relação da expressão proteica de pSmad3.....	45
Figura 6. Viabilidade celular.....	46
Figura 7. Atividade da ALP em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	57
Figura 8. Atividade da ALP em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	58
Figura 9. Concentração da OPN presente no meio de cultura de células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	60
Figura 10. Concentração da OPN presente no meio de cultura de células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	61
Figura 11. Imunofluorescência para OPN (verde) combinada com vermelho de alizarina em cultura de células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	63
Figura 12. Imunofluorescência para OPN (verde) combinada com vermelho de alizarina em cultura de células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	64
Figura 13. Relação da expressão gênica de ALP analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	65
Figura 14. Relação da expressão gênica de ALP analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	67

Figura 15. Relação da expressão gênica da OPN analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	68
Figura 16. Relação da expressão gênica da OPN analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	70
Figura 17. Relação da expressão gênica da OC analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	71
Figura 18. Relação da expressão gênica da OC analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	72
Figura 19. Relação da expressão gênica de Osx analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	74
Figura 20. Relação da expressão gênica de Osx analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	75
Figura 21. Relação da expressão gênica de Runx2 analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	77
Figura 22. Relação da expressão gênica de Runx2 analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	78
Figura 23. Relação da expressão gênica do TGF- β 1 analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	80
Figura 24. Relação da expressão gênica do TGF- β 1 analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	81
Figura 25. Relação da expressão gênica de Smad α 3 analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	83
Figura 26. Relação da expressão gênica de Smad3 analisada por RT-PCR <i>real time</i> em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1.....	84

Figura 27. Relação da expressão proteica de ALP, analisada através de Western blotting em células osteogênicas sem neutralização de receptores.....	86
Figura 28. Relação da expressão proteica de ALP, analisada através de Western blotting em células osteogênicas com neutralização de receptores ALP.....	87
Figura 29. Relação da expressão proteica de OPN, analisada através de Western blotting em células osteogênicas sem neutralização de receptores.....	89
Figura 30. Relação da expressão proteica de OPN, analisada através de Western blotting em células osteogênicas com neutralização de receptores.....	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 Tecido ósseo.....	22
2.2 Cultura de células osteogênicas.....	31
3 PROPOSIÇÃO.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Linhagem celular.....	43
4.2 Concentração do anti-TGF- β 1 e confirmação da neutralização.....	43
4.3 Tratamento e manutenção das células.....	44
4.4 Atividade da ALP.....	47
4.5 Concentração da OPN.....	47
4.6 Imunofluorescência combinada com vermelho de Alizarina.....	48
4.7 Expressão gênica.....	48
4.8 Expressão proteica.....	52
4.9 Análise estatística.....	54
5 RESULTADOS.....	55
5.1 Atividade da ALP.....	56
5.2 Concentração da OPN pelo método de ELISA.....	59
5.3 Imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina.....	62
5.4 Análise da expressão gênica.....	62
5.5 Análise da expressão proteica da ALP e da OPN.....	82
6 DISCUSSÃO.....	91
7 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	101

1 INTRODUÇÃO

O osso é um tecido conjuntivo especializado constituído por células e uma matriz extracelular (MEC) mineralizada. As células que formam esse tecido são os osteoblastos, que são responsáveis pela síntese e mineralização da MEC. Durante esse processo, alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz mineralizada e passam a ser designados osteócitos (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012). Os osteoclastos, diferentemente dos osteoblastos e dos osteócitos, pertencem a uma linhagem de células mononucleares derivadas do tecido hematopoiético, que se colocadas sob estímulos específicos fusionam-se – tornando-se células multinucleares – as quais chegam à superfície óssea, aderindo-se a ela, sendo responsáveis pela reabsorção desse tecido (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009; LERNER, 2000).

A MEC é formada por uma fase inorgânica (representada por 65% do peso do osso), que é constituída por fosfato de cálcio, sob forma de hidroxiapatita ($\text{HA} - \text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$), que está associada à fase orgânica (35% do peso do osso), rica em colágeno do tipo I, III e V (Col I, III e V) e várias proteínas não colágenas, como: osteonectina (ON); osteopontina (OPN); sialoproteína óssea (BSP); fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE); osteocalcina (OC); proteína de matriz dentinária (DMP1), entre outras (BELLOWS et al., 1991; OGATA, 2008; PURPURA et al., 2004; RODAN; NODA, 1991). Acredita-se que essas proteínas promovam e controlem a mineralização das fibrilas de colágeno e o crescimento dos cristais de HA na MEC (KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012; OGATA, 2008).

O osso também produz e armazena TGF- β 1, além de produzir células que são alvos para este fator de crescimento (CHEN et al., 2012; DERYNCK; AKHURST, 2007). A ativação da via de TGF- β 1 é responsável por desencadear mecanismos responsáveis pela proliferação e diferenciação das células osteogênicas ou, ainda, a inibição de estágios finais dessas células (METZ-ESTRELLA et al., 2012; YAMADA et al., 1999).

Membro da superfamília do TGF- β , o TGF- β 1 está envolvido em vários eventos celulares, podendo atuar positiva ou negativamente, dependendo do tipo celular, exercendo funções como: proliferação, diferenciação, apoptose e adesão celular, bem como produção da MEC (BREEN et al., 1994; CHEN et al., 2012; GUO; WANG, 2009; MARIE, 2012). O TGF- β 1 liga-se ao receptor do tipo II (TGF β RII), que se fosforila e ativa a ALK5 que, por sua vez, ativa e induz as cascatas de sinalização de Smad-dependentes e Smad-precursos independentes. Na via Smad-dependente, o

complexo de receptores de TGF β ativa Smad2/3, enquanto o complexo de receptores de BMP ativa Smad 1/5/8 (FENG; DERYNCK, 2005).

O sistema de cultura de células tem sido usado, rotineiramente, em estudos da formação óssea em ambientes controlados, em que é possível analisar minuciosamente eventos celulares e, também, da MEC (KARTSOGIANNIS; WAH, 2004). Além das linhagens osteoblásticas, outro sistema *in vitro* comumente usado é o da cultura de células osteogênicas primárias – derivadas de calvárias de rato (DE OLIVEIRA et al., 2003) e as *stem cells* – embrionárias ou adultas (LOBO et al., 2009; MARTINEZ et al., 2007). No entanto, nesses casos, para que o fenótipo osteoblástico aconteça, é necessária a suplementação do meio de cultura com, principalmente, ácido ascórbico (AA) – que é um co-fator da síntese de colágeno, e o fosfato orgânico – por exemplo, β -glicerofosfato (β GP), que promove a mineralização (COUSSENS et al., 2009; FRANCESCHI, 1992; MARTINEZ, et al., 2012; NEFUSSI et al., 1985).

Além do AA e do β GP, existem indutores específicos, como os glicocorticóides, a dexametasona (Dex) e alguns fatores de crescimento, tais como o fator de transformação de crescimento – beta (TGF β) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (HUGHES et al., 1995; ISHIDA; HEERSCHKE, 1997; TURKSEN; AUBIN, 1991; YAMAMOTO et al., 2002). Esses suplementos criam um ambiente artificial, induzindo a diferenciação osteoblástica da população celular, ou mimetizam a mineralização da matriz como a formação *in vivo* (COUSSENS et al., 2009).

O TGF- β 1 *in vivo* contribui para o aumento da proliferação celular e para a formação e remodelação da MEC (BECK et al., 1991; MARCELLI et al., 1990; NODA; CAMILLIERE, 1989). Por outro lado, estudos *in vitro* mostram que as células, quando tratadas com TGF- β 1, diminuem a síntese de colágeno do tipo I (COLI) reduzindo, assim, a formação da MEC e, conseqüentemente, o processo de biomineralização (BREEN et al., 1994; DONATO, 2009; LASCHINGER et al., 1991; WRANA et al., 1991). Durante o processo de biomineralização, os osteoblastos são orquestrados por vários fatores de transcrição e o desempenho da maioria deles está diretamente relacionado à formação do osso (MARIE, 2008). Sendo assim, os efeitos contraditórios, encontrados tanto em testes *in vivo*, quanto naqueles *in vitro*, podem estar relacionados aos diferentes mecanismos, resultantes da ativação e/ou inibição da via do TGF- β 1, associados aos eventos da via de sinalização da biomineralização.

Isto posto, constata-se que os efeitos do TGF- β 1 precisam ser mais bem compreendidos na biologia dos tecidos mineralizados, para que, assim, possam contribuir para o sucesso de futuros tratamentos e pesquisas na área. O presente trabalho propõe-se investigar os efeitos moleculares do TGF- β 1, neutralizando os seus receptores e estudando alguns elementos da via de sinalização, bem como a habilidade de diferenciação das células osteogênicas em diferentes estágios correspondentes à biomineralização.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Tecido ósseo

O osso exerce função mecânica, sendo suporte para os músculos na locomoção e oferecendo proteção para os órgãos internos. Ele também é reservatório de células hematopoiéticas e participa da homeostase de cálcio e fosfato no organismo (KARTSOGIANNIS; Ng, 2004; NEVES et al., 2013).

Esse tecido é metabolicamente ativo e altamente organizado, sendo ele, um tecido conjuntivo especializado constituído por uma abundante matriz e por células. A matriz é constituída por uma fase mineral, composta por cristais de hidroxiapatita (HA), constituída por fosfato de cálcio, depositados em uma matriz orgânica (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; KARTSOGIANNIS; Ng, 2004; KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012).

2.1.1 Matriz orgânica do osso

A matriz orgânica é rica em colágeno do tipo I, III e V, mas, como toda matriz colágena de tecido mineralizado, ela também contém várias proteínas não colágenas, como: proteoglicanas, glicoproteínas, Gla proteínas e lipídios, sendo um alvo de muita pesquisa na área (BONUCCI, 2012; GOLUB, 2011).

a) Colágeno

O principal tipo de colágeno presente na matriz óssea é o colágeno do tipo I, que é membro da superfamília dos colágenos e representa, aproximadamente, 90% de toda a matriz orgânica (COLEMAN et al., 2008; KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012). Ele é o primeiro marcador osteogênico a ser expresso e a proteína mais abundante sintetizada pelos osteoblastos, sendo a base para a mineralização da matriz (LIN et al., 2010; YANG; KARSENTY, 2002). A organização interna das fibrilas de colágeno tem papel importante no processo de mineralização, uma vez que elas podem induzir a nucleação do mineral, proporcionando-lhes espaços para manterem-se nessa matriz (BONUCCI, 2012).

b) Proteínas não colágenas e suas funções no osso

Elas são assim denominadas por serem distintas ao colágeno, embora esses dois grupos possam estar fortemente ligados no caso de constituírem a matriz óssea. Essas proteínas estão presentes em quantidades menores e variáveis no tecido ósseo, mas desempenham um papel fundamental na indução e regulação da mineralização (BONUCCI, 2012).

Dentre as proteínas não colágenas sintetizadas pelas células ósseas estão as proteoglicanas, as glicoproteínas – ON, também conhecidas como BM-40/SPARC (*secreted protein, acidic, rich in cysteine*), SIBLING (*Small Integrin-Binding Ligand, N-linked Glycoprotein*), que incluem a OPN, a BSP, e a DMP-1 (proteína de matriz dentinária 1) e MEPE (fosfoglicoproteína da matriz extracelular) (FISHER et al., 2001; QUIN et al., 2004) e, entre outras, a fosfatase alcalina (ALP); as Gla proteínas – como a osteocalcina (OC ou BGP) e proteína de matriz Gla (MCP); e lipídios (BONUCCI, 2012).

Devido à grande quantidade de proteínas não colágenas, serão abordadas, nesta revisão, às que foram estudadas neste trabalho, tais como as glicoproteínas da família SIBLING – mais especificamente na OPN – e ALP e a OC pertencente às Gla proteínas.

As SIBLINGS são encontradas, principalmente, nos tecidos mineralizados, os quais são constituídos pela hidroxiapatita. As proteínas dessa família são secretadas na MEC durante a formação e mineralização desses tecidos, exercendo papel direto na nucleação ou inibição dos cristais de hidroxiapatita. Elas estão localizadas no cromossomo 4q21 (Figura 1) e apresentam uma sequência arginina-glicina-aspartato (RGD) que faz a mediação da sinalização e da ligação célula-matriz. Dentre as proteínas dessa família, a OPN e a BSP são encontradas em altas concentrações no osso (HUNTER et al., 1996; STAINES et al., 2012).

A osteopontina (OPN/SPP1) foi identificada pela primeira vez por Fanzen e Heinegard em 1985 (HAYLOCK; NILSSON, 2006), tratando-se de uma glicoproteína fosforilada, de ~34 kDa, que contém 5% de ácido siálico e uma extensão de nove resíduos consecutivos de ácido aspártico, sendo rica em grupo fosfato (Figura 2). O nome *osteopontina* surgiu devido ao alto potencial dessa proteína em fazer a ligação – ponte – das células à hidroxiapatita na matriz óssea, bem como entre os componentes orgânicos (SODEK et al., 2000; QUIN et al., 2004; NANJI et al., 2004).

Figura 1: Esquema do cromossomo 4. No braço longo, entre q21-q23, estão localizadas as proteínas não colágenas da família SIBLING: OPN, BSP, DMP1 e DSPP.
Fonte: GANSS et al., 1999.

OSTEOPONTINA

Figura 2: Esquema da estrutura da osteopontina. Ela apresenta vários sítios de glicosilação (em vermelho) e fosforilação (em azul), tem afinidade com vários receptores celulares que são reconhecidos pela sequência RGD que está localizada na porção central (grifado em amarelo).

Fonte: KAZANECKI et al., 2007.

A OPN compreende, aproximadamente, 2% das proteínas não colágenas do osso (DENHARDT et al., 2001; McKEE; NANJI, 1996) e, embora seja sintetizada em grandes quantidades, também está presente em outros tecidos, células e fluidos corporais (QUIN et al., 2004; SODEK; McKEE, 2000; STANDAL et al., 2004), o que dá, a essa proteína, uma diversidade de funções em diversos eventos biológicos, tais como os processos fisiológicos e patológicos (REINHOLT et al., 1990), a angiogênese (ASOU et al., 2001), a apoptose, ou mesmo respostas inflamatórias e metástases (DENHARDT et al., 2001). Essa variedade funcional acontece porque a molécula da OPN apresenta várias formas, muitos receptores e sítios de ligação (DENHARDT; GUO, 1993).

Durante a proliferação, ela é a primeira proteína não colágena expressa, sendo que os níveis de sua expressão diminuem na sequência, mas voltam aumentar no início da mineralização. É nesse momento que ela atinge os maiores níveis de concentração (ZOHAR et al., 1998). Ela é secretada principalmente por osteoblastos, porém, osteócitos e osteoclastos também a secretam. O posterior aumento da sua expressão está associado à remodelação óssea (McKEE; NANJI, 1995; SODEK et al., 1995). A OPN tem alta afinidade pelos cristais de hidroxiapatita, o que faz com que essa proteína esteja presente em matriz calcificada, locais de modulação, de formação, e no crescimento dos cristais de mineral (HUNTER et al., 1996).

A expressão da OPN pode ser afetada por um grande número de hormônios, citocinas e fatores de crescimento. Ela é mais expressa quando há algum tipo de lesão ou doença, por exemplo, e está estritamente associada a depósitos ectópicos calcificados (BELLAHCÈNE et al., 2008; OGATA, 2008; STEITZ et al., 2002).

As Gla proteínas, por sua vez, são assim denominadas por apresentarem três resíduos do ácido gama-carboxiglutâmico (Gla), específicos de sua forma ativa, o que permite a ligação entre a proteína e o cálcio, consequentemente, a hidroxiapatita. São elas a proteína Gla óssea (BGP), mais conhecida como osteocalcina (OC), e a proteína Gla de matriz (MGP) (BONUCCI, 2012; NEVE et al., 2013).

A osteocalcina (OC) é uma proteína pequena, de ~49 aminoácidos, específica de tecidos mineralizados (BIANCO et al., 1991; HUNTER et al., 1996; MASSA et al., 2005). Ela é encontrada em células da linhagem osteoblástica e na matriz mineralizada, porém, sua função na formação e mineralização do tecido ósseo é

pouco conhecida (BONUCCI, 2012). Essa proteína se liga fortemente aos íons cálcio e, por isso, acredita-se que esteja envolvida na mineralização, sendo um marcador osteoblástico tardio, sinalizando o fim da diferenciação e o início da maturação da matriz, o que faz com que exerça um papel importante no metabolismo ósseo (KARTSOGIANNIS; Ng, 2004; LIN et al., 2010; NEVE et al., 2013).

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima glicoproteica que funciona como uma ectoenzima, que está ligada à membrana celular por um glicosilfosfatidilinositol (GPI) (FEDDE et al., 1988; LINDER et al., 2009). Ela promove a biomineralização normal do osso e da dentina, tendo papel importante como catalisador nesse processo (ANDERSON et al., 2004).

A ALP liga-se ao cálcio e está presente, não só nos domínios de membrana dos osteoblastos que estão voltados para a matriz em formação, mas, também, nas vesículas da matriz que serão formadas por eles, bem como, na matriz mineralizada do osso (BONUCCI et al., 1992; STAINES et al., 2012). Ela hidrolisa pirofosfato inorgânico (PPI), removendo o inibidor da osteogênese enquanto gera fosfato inorgânico, que será requerido para a formação da hidroxiapatita, promovendo, assim, a precipitação e o crescimento do mineral (BALCERZAK et al., 2003; COLEMAN et al., 2008; de OLIVEIRA et al., 2008; LINDER et al., 2009). Lee et al. (1992) relataram que a atividade da ALP *in vitro* é mais alta em culturas nas quais a matriz mineraliza, que em culturas em que não há mineralização da matriz, sendo mais expressa nos períodos iniciais da mineralização, o que pode ser alterado com as suplementações do meio de cultura.

Essa proteína é abundante durante o início da mineralização e seus níveis aumentam com a formação do osso (LIN et al., 2010). Esse processo é importante para a mineralização normal do tecido, uma vez que a ligação da proteína aos íons cálcio promove a formação dos primeiros cristais de fosfato dentro das vesículas de matriz (BONUCCI, 2012), como será discutido a seguir.

2.1.2 Matriz inorgânica do osso

A maioria das funções fisiológicas do osso ocorre na matriz inorgânica, como a dureza e a resistência física e mecânica desse tecido, tornando-o um suporte e uma armadura para tecidos moles. A fase mineral do osso é constituída pela hidroxiapatita, que é representada pela fórmula química $\text{Ca}_{10}[(\text{PO}_4)]_6[\text{OH}]_2$. Ela

condiz com 65% do peso do osso e está associada à fase orgânica da matriz óssea (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; KATCHIBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012).

Normalmente, a mineralização é restrita aos tecidos especializados na formação dos ossos e dentes, sendo que, neles, a biomineralização é rigorosamente controlada por vários fatores de transcrição e sinalização. As células ósseas (descritas adiante), além de sintetizar e secretar a matriz orgânica, ainda mantêm as condições iônicas na MEC através da ação das bombas de íons cálcio e fosfato, que são modulados pelas proteínas não colágenas e pelo pirofosfato inorgânico (POP) (GOLUB, 2011; SOSNOSKI; GAY, 2008).

Durante o processo de mineralização, surgem brotamentos da membrana dos osteoblastos, que são liberados em forma de pequenas vesículas de matriz (20-200 nm). Desta maneira, elas são compostas pela membrana plasmática dos osteoblastos e pelas moléculas relacionadas ao processo de mineralização, além de ALP, que aumenta a concentração de fosfato e leva à precipitação e formação da hidroxiapatita, finalizando, assim, o papel das vesículas de matriz (GOLUB, 2011; KATCHIBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012; STAINES et al., 2012). Foi em torno dessas vesículas que, em trabalhos *in vivo* e *in vitro*, encontraram-se as primeiras evidências ultraestruturais (ALI, 1976; BONUCCI, 1967, 2012; GOLUB, 2011).

2.1.3 Células ósseas

As células são responsáveis pela síntese e secreção, mas, também, pela manutenção e homeostase do tecido ósseo. Os osteoblastos são ricos em enzima de fosfatase alcalina (ALP) e sintetizam as proteínas da MEC – mencionadas anteriormente –, além de citocinas e fatores de crescimento (KARTSOGIANNIS; Ng, 2004). Além disso, eles formam vesículas que se tornam microcompartimentos privilegiados para início da mineralização (BONUCCI, 2012; GOLUB, 2011).

Durante esse processo, alguns osteoblastos ficam aprisionados na matriz mineralizada, transformando-se em osteócitos – osteoblastos latentes. Eles ficam em lacunas e, por isso, o volume do seu citoplasma diminui, reduzindo, conseqüentemente, o seu metabolismo. No entanto, eles não ficam isolados, já que, através de seus prolongamentos, percorre pelos canaliculos um fluido ósseo, formando redes que permitem a nutrição e a comunicação por difusão com outros

osteócitos, células de revestimento e osteoblastos (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012).

O osso está sujeito a pressões e trações constantemente, e esses movimentos fazem com que o fluido ósseo trafegue pelos canalículos, causando a expressão da esclerostina nos osteócitos. A esclerostina pode estimular a manutenção da massa óssea, sendo antagonista do receptor 5 para lipoproteína (LRP5), inibindo, assim, a via Wnt/ β -catenina, que é responsável pela diferenciação e ativação dos osteoblastos. (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012). Tanto os osteoblastos, quanto os osteócitos, são células de origem mesenquimal, e ambos não ficam em contato direto com a matriz mineralizada, pois há, entre eles, uma camada de matriz orgânica – osteóide (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2012; KATCHBURIAN; ARANA-CHAVEZ, 2012).

Diferentemente dos osteoblastos e dos osteócitos, os osteoclastos são células móveis, multinucleadas e formadas a partir de células mononucleares derivadas do tecido hematopoiético. As células da linhagem monocítica-macrofágica, sob estímulos específicos dos osteoblastos, proliferam-se e fusionam-se, originando células multinucleadas. Isso acontece porque elas possuem, na membrana plasmática, um receptor conhecido como RANK (receptor ativador de NF- κ B), que é ativado por RANKL – sintetizado e secretado pelos osteoblastos e pelas células da linhagem monocítica-macrofágica. Assim como RANKL, a OPG (osteoprotegerina) – uma proteína solúvel – também é expressa e secretada por essas células, sendo responsável pela regulação negativa da osteoclastogênese quando ligada a RANKL. Quando ocorre a ativação dos osteoclastos, eles aderem-se à matriz mineralizada, criando um microambiente que proporciona condições favoráveis para a dissociação dos cristais de mineral, sendo essa habilidade distinta de todas as outras células do tecido ósseo (ARANA-CHAVEZ; BRADASCHIA-CORREA, 2009; CHAMBERS; FULLER, 2011; DELAISSE et al., 2003; LERNER, 2000; MARIE, 2012). A comunicação intercelular que se dá entre osteoblastos e osteoclastos é fundamental para que haja um balanço entre os dois processos – formação e reabsorção – e o desequilíbrio pode causar perda óssea levando à osteoporose (KARTSOGIANNIS; Ng, 2004; MARIE, 2012).

2.1.4 Diferenciação dos osteoblastos

Durante a formação óssea, vários processos que são regulados envolvem inicialmente as células osteoprogenitoras, diferenciando pré-osteoblastos em osteoblastos maduros e osteócitos. Todos esses eventos são administrados por vários fatores de transcrição, que resultam na expressão do fenótipo e do genótipo osteoblástico (MARIE, 2008). O crescimento e a diferenciação dos osteoblastos podem ser divididos em quatro estágios: proliferação, maturação da matriz, mineralização e apoptose (OWEN et al., 1990; STEIN et al., 2004).

Na osteogênese, Sox9, Runx2 e osterix são os três fatores de transcrição essenciais. Eles exercem papéis importantes no processo de decisão de células, ou seja, na definição se as células mesenquimais serão condroblastos, adipócitos ou osteoblastos. Isso acontece através da ativação de genes específicos de cada tipo celular (SINHA; ZHOU, 2013; STEIN et al., 2004).

O Runx2/Cbfa (*Core binding factor alpha*) é o principal fator de transcrição envolvido na diferenciação dos osteoblastos e é responsável por controlar a expressão dos genes envolvidos. Ele está presente no início do desenvolvimento do esqueleto, mas está presente, também, nos osteoblastos durante toda sua diferenciação, embora seja mais abundante em osteoblastos maduros – Figura 3 (BANERJEE et al., 1997; BANERJEE et al., 2001; LIAN et al., 2004; LIN et al., 2010; MARIE, 2008). Apesar de ter um papel importante na diferenciação dos osteoblastos, Runx2 não é essencial para a manutenção da expressão dos principais genes das proteínas de matriz (MARIE, 2008). No entanto, subsequente ao Runx2, para que as células adquiram o fenótipo osteoblástico, é necessária a ativação de Osterix (NAKASHIMA et al., 2002; STEIN et al., 2004).

Osterix (Osx – SP7) é um fator de transcrição específico dos osteoblastos e, também, o responsável por ativar uma variedade de genes durante a diferenciação de pré-osteoblastos em osteoblastos maduros e osteócitos (Figura 3), sendo, portanto, essencial para a diferenciação osteoblástica e para a formação dos ossos. Sua regulação é positivamente feita por Runx2, que está localizado *upstream* (LIN et al., 2010; MARIE, 2008; SINHA; ZHOU, 2013; ZHU et al., 2012). Isso foi apresentado por Nakashima et al. (2002), em cujo estudo se mostrou que camundongos com deficiência de Osterix em osteoblastos não formavam osso. No entanto, estudos mais recentes têm mostrado a relação de Osx na formação de dentes (CHEN et al., 2009; HIRATA et al., 2009), bem como sua eficiência na

Figura 3: Progressão da diferenciação dos osteoblastos a partir de e uma célula mesenquimal pluripotente até o estágio mais maduro - osteócito - e a atuação dos fatores de crescimentos, Runx2 e Osx, nesse processo, bem como a expressão de proteínas relacionadas com a matriz extracelular.
 Fonte: STEIN et al., 2004 modificado.

reparação de fraturas e danos ósseos, visto que esse é um processo complexo e que inclui múltiplas moléculas e sua interação com o tecido que está sendo formado (FRANCESCHI, 2005; TU et al., 2006; TU et al., 2007; XU et al., 2009).

2.2 Cultura de células osteogênicas

O sistema de cultivo celular tem sido usado, rotineiramente, em estudos que buscam o detalhamento da formação óssea, o que se dá em face da necessidade de compreensão de seus mecanismos moleculares durante todo esse processo. Essa metodologia permite controlar o ambiente em que as células ósseas se encontram, facilitando a análise minuciosa de todos os eventos celulares e da MEC (KARTSOGIANNIS; Ng, 2004; SCHÄCK et al., 2013).

Os osteoblastos e suas células precursoras, isolados através de digestões enzimáticas de calvária de ratos – fetos ou recém-nascidos – em cultura, desenvolvem-se e diferenciam-se em osteoblastos maduros, o que implica em síntese e secreção de elementos da matriz óssea *in vitro* (BELLOWS; AUBIN, 1989; de OLIVEIRA et al., 2007; MARTINEZ et al., 2012; OWEN et al., 1990).

A proliferação e a diferenciação dos osteoblastos são controladas por vários fatores de crescimento e citocinas produzidas no osso, bem como por hormônios (Lu et al., 2005). *In vitro*, todos os eventos de diferenciação devem ser mantidos, garantindo, assim, a proximidade com os dados *in vivo*. Desta forma, durante a diferenciação dos osteoblastos, devem-se manter os três estágios de desenvolvimento: proliferação, maturação da matriz e mineralização (OWEN et al., 1990). A capacidade de as células osteogênicas diferenciarem-se está relacionada à expressão de proteínas colágenas e não colágenas na MEC e na formação de mineral, como já foi dito anteriormente, e para que se obtenha o fenótipo osteoblástico *in vitro* são necessários vários cuidados, como a atenção ao local de onde as células tenham sido extraídas, o tipo de meio de cultura utilizado e se há algum tipo de suplementação para proliferação e diferenciação celular (BELOTI; ROSA, 2005).

Para que a diferenciação aconteça, são adicionados, ao meio de cultura, ácido ascórbico (AA) – um cofator na síntese de colágeno, que aumenta a produção de MEC e, conseqüentemente, a diferenciação celular (PARK, 2010; SCHÄCK et al., 2013; SHIGA et al., 2003) e fosfato inorgânico ou substratos hidrolisáveis, como, por

exemplo, o β -glicerofosfato (β GP), que facilitam a mineralização da matriz – fibrilas colágenas – produzida pelas células (CHEN, 1994; COUSSENS et al., 2009; PARK, 2010; SCHÄCK et al., 2013). Esses dois indutores, adicionados simultaneamente ao meio de cultura, condicionam as células osteogênicas a se proliferar e a se diferenciar, permitindo a formação de uma MEC rica em fibrilas de colágenos e nódulos de minerais (BELLOWS et al., 1992; COUBLE et al., 2000; KASAGAI et al., 1988; KUO et al., 1992; MARTINEZ et al., 2012; NAKASHIMA, 1991).

Além do AA e β GP, podem-se acrescentar ainda, ao meio de cultura, outros indutores que atuem mais especificamente nas células osteogênicas, como os glicocorticoides – dexametasona, outros esteroides ou, ainda, fatores de crescimento – TGF- β 1, que auxiliarão na diferenciação osteoblástica de população de células, mimetizando a mineralização da matriz como a formação óssea *in vivo* (COUSSENS et al., 2009).

2.2.1 Glicocorticoides – Dexametasona

Os glicocorticoides são análogos ao hormônio humano cortisol e estão envolvidos na regulação do estresse fisiológico. Eles apresentam os mesmos efeitos do cortisol e fazem parte de um grupo de fármacos que atua como imunossupressor e antiinflamatório, sendo a dexametasona (Dex) também membro desse grupo (PORTER et al., 2003).

As superdoses de glicocorticoides – superiores às doses de cortisol fisiológica (10^{-7} e 10^{-8} M) (ESPINA et al., 2008) – *in vivo*, utilizadas durante longos tratamentos com glicocorticoides, diminuem acentuadamente o número de osteoblastos, por apoptose, e a formação de matriz óssea, podendo, na maior parte das vezes, levar à osteoporose (ESPINA et al., 2008; WEISTEIN et al., 1998; YUN et al., 2009).

A dexametasona é utilizada em ensaios *in vitro*, principalmente para induzir a diferenciação osteogênica através da via de sinalização Wnt/ β catenina, mas, também, na diferenciação e no metabolismo celular, sendo sua participação nesses eventos dose-dependente (PORTER et al., 2003; PURPURA et al., 2004; SCHÄCK et al., 2013). Há relatos que sugerem que os osteoblastos *in vitro* respondem a concentrações fisiológicas da Dex, regulando a diferenciação dos osteoblastos positiva ou negativamente, dependendo do estágio de diferenciação das células em cultura (PURPURA et al., 2004).

Em geral, ela atua juntamente com AA e β GP, na indução de células mensenquimais, diferenciando-as em osteoblastos que sintetizam e mineralizam a matriz *in vitro* (MAEGAWA et al., 2007; PARK, 2010). Alguns trabalhos mostram que a Dex diminui a replicação das células osteoblásticas, mas pode aumentar a capacidade de elas se diferenciarem (ABU et al., 2000; SHALHOUB et al., 1992), aumentando, assim, a expressão de proteínas ósseas, tais como ALP, COLI, ON, OC e outras proteínas não colágenas encontradas no osso (WADA et al., 1998; YAMAMOTO et al., 2002), cuja expressão está relacionada à maturação e aquisição do fenótipo osteoblástico.

No entanto, em IU et al. (2005) mostra-se que a Dex pode inibir a síntese ou a ação de fatores de crescimento derivados do osso – como o TGF- β 1 (descrito adiante), diminuindo, assim, a atividade da ALP e a expressão do COLI, presumivelmente, pela supressão da atividade transcricional da Smad3, e não pela modulação da expressão da Smad3 em células ósseas. Esses fatos demonstram que o mecanismo de ação dos glicocorticoides no osso ainda é pouco compreendido e muito contraditório.

2.2.2 Fator de transformação do crescimento (TGF- β)

O TGF- β é uma proteína homodímera, com 25 kDa, que exerce várias funções no crescimento e na diferenciação celular (CANALIS et al., 1991; HERPIN et al., 2004; LEE et al., 2000); ele pertence à superfamília do TGF- β , que compreende mais de quarenta membros, tais como TGF- β s, Nodal, activina e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (CHEN et al., 2012; LEE et al., 2000; MASSAGUE, 1998). O TGF- β foi caracterizado em cinco isoformas, β 1; β 2; β 3; β 4 e β 5, mas apenas três foram detectadas em humanos e animais, sendo elas β 1, β 2 e β 3 (ROBERTS; SPORN, 1990; SHEN et al., 2001).

O TGF- β tem papel regulatório em muitos aspectos da função celular e, por isso, apresenta respostas diferentes em vários tipos de células e tecidos. Ele é responsável por vários processos celulares, como proliferação, diferenciação dos tecidos durante a embriogênese, e apoptose, além de participar de eventos patológicos (CENTRELLA et al., 1998; MASSAGUÉ et al., 2000; SHI; MASSAGUÉ et al., 2003). Em células epiteliais, o TGF- β inibe a proliferação celular (de ANDRADE

SÁ et al., 2008), mas, em células mesenquimais aumenta a proliferação e a diferenciação celular (HARADA; RODAN, 2003).

Tanto o TGF- β 1, quanto o TGF- β 2, são expressos no osso, mas as células ósseas podem responder de maneira diferente para cada isoforma, isso dependendo da afinidade de ligação ao receptor de TGF- β (DUFOUR et al., 2007; SOWA et al., 2002). *In vivo*, o TGF- β 1 tem papel de regulador multifuncional do crescimento e da diferenciação celular durante o desenvolvimento e a reparação, influenciando a produção da MEC e, conseqüentemente, a mineralização e a expressão de proteínas relacionadas, como BSP, OPN, ON e OC, bem como o COLI (BREEN et al., 1994; IBA et al., 1995; LEE et al., 2000; ROBERTS et al., 1988). Além disso, ele modula a síntese de receptores de membrana (integrinas), que constituem a principal família de moléculas que intermediam interações entre células e a MEC, influenciando, direta ou indiretamente, numerosos processos envolvidos no comportamento celular, como adesão e migração, proliferação e, também, diferenciação (de ARCANGELIS; GEORGES-LABOUESSE, 2000).

O uso do TGF- β 1, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mimetizando uma situação de inflamação óssea, em que esse fator de crescimento está aumentado, tinha como objetivo aumentar a expressão de marcadores ósseos. No entanto, o aumento de TGF- β 1 exógeno atrasou a osteogênese, não só *in vitro* (IWASAKI et al., 1993), como *in vivo*. Os tratamentos com TGF- β 1 em defeitos ósseos, *in vivo*, não apresentaram melhoras, mas um aumento de tecido fibroso no local (RAUCH et al., 2000).

In vitro, alguns autores sugerem que o TGF- β 1 esteja envolvido na proliferação, diferenciação e síntese de MEC, mas que, entretanto, ele pode estar menos envolvido ou ausente em fases mais avançadas da osteogênese, como a mineralização (BONEWALD; DALLAS, 1994; BREEN et al., 1994; IBA et al., 1995). No entanto, em estudo anterior feito por nosso grupo (DONATO, 2009), observou-se que as culturas de células osteogênicas tratadas com TGF- β 1 não apresentavam componentes da MEC, apesar delas expressarem OPN e BSP. Assim como a Dex, o TGF- β 1 apresenta efeitos contraditórios que podem estar relacionados ao tipo celular, ao estágio de maturação, às doses e, principalmente, ao fato de existirem ou não outros fatores indutores no meio de cultura (IBA et al., 1996; SHEN et al., 2001), bem como à complexidade da sua via de sinalização.

a) Receptores de TGF- β

A família desses receptores de TGF- β se subdivide em receptores do tipo I (T β RI) e receptores do tipo II (T β RII). Ambos são necessários para transdução do sinal recebido. Eles apresentam estruturas semelhantes, um domínio de serina/treonina quinase na porção intracelular e uma pequena parte extracelular rica em cisteína. Somente o T β RI apresenta uma região rica em resíduos de glicina e serina (domínio GS) transmembrana (HELDIN et al., 1997; MIYAZAWA et al., 2002). Quando o TGF- β se liga ao T β RII, ele fosforila e forma o complexo hetero-tetrâmico, recrutando o T β RI. Formado o complexo T β RI e T β RII, o T β RII transfosforila o domínio GS e o domínio quinase do T β RI, que ativam e fosforilam os substratos intracelulares (MIYAZAWA et al., 2002).

Nos mamíferos, existem cinco receptores do tipo II e sete receptores do tipo I. Os receptores do tipo II são representados por T β RII, receptor específico para TGF- β ; receptor de activina do tipo II e do tipo IIB (actRII e ACTRIIB), que servem para activinas e demais membros da família do TGF- β ; receptores de BMP do tipo II (BMPRII), receptor específico das BMPs e receptor de AMH do tipo II (AMHRII), receptor específico para AMH. Os sete tipos de receptores do tipo I (*activin receptor-like kinases* – ALKs) são ALK-1, -2, -3, -4, -5, -6 e -7, sendo que o ALK-5 é também conhecido com T β RI e é específico para TGF- β s (MIYAZAWA et al., 2002; ZHAO et al., 2008).

Schiendeler et al. (2010) mostraram em estudo *in vitro* que quando os receptores de TGF- β (ALK-4, -5 e 7) são bloqueados com SB431542, as células osteogênicas se diferenciam e aumentam a mineralização da matriz. Porém, esses dados não foram reproduzidos nos testes *in vivo*. Os bloqueios dos receptores de TGF- β têm sido uma alternativa em potencial para aplicações ortopédicas.

b) Smads

Os membros da família Smad são componentes críticos da via intracelular que transmitem os sinais do TGF- β a partir da superfície da célula até o núcleo (MASSAGUÉ; CHEN, 2000; WRANA, 2000). As Smads se dividem em três classes distintas: as Smads reguladas por receptor (R-Smads), as Smads co-mediadoras (co-Smads) e as Smads antagonistas ou inibidoras (I-Smads), sendo que cada uma

delas tem um papel diferente na via de sinalização (HELDIN et al., 1997; WRANA, 2000). As R-Smads são fosforiladas diretamente pelo receptor do tipo I e são divididas em duas subclasses: AR-Smads e BR-Smads. As AR-Smads são representadas pela Smad2 e Smad3, que são ativadas pelos receptores do tipo I (ALK-4, -5 e -7) de activina, nodal ou TGF- β . Já as BR-Smads são representadas pelas Smad1, Smad5 e Smad8 sendo ativadas pelos receptores do tipo I (ALK-3 e -6) de BMP. A co-Smad é representada apenas pela Smad4, sendo a Smad6 e a Smad7 representantes da I-Smad. A Smad 7 inibe a via de sinalização do TGF- β e da activina, enquanto a Smad6 inibe a via de sinalização da BMP (MIYAZAWA et al., 2002).

Alguns estudos sugerem que a Smad3 tenha papel independente na via de sinalização, o que poderia ser mediado por diferentes aspectos da ação do TGF- β , e que a Smad3 seja mediadora de *crosstalk* entre a vitamina D e a via de sinalização do TGF- β (LI et al., 1998; SOWA et al., 2002). Todavia, pouco se sabe a respeito de qual seja o verdadeiro papel da Smad3 na diferenciação, na expressão de proteínas de matriz e na mineralização, mas acredita-se que ela deva ser uma molécula importante na formação do osso.

c) Via de sinalização do TGF- β

Dufour et al. (2007) relataram que o TGF- β 1, no osso, diminuía a atividade apoptótica em osteoblastos e, em contraste, o aumento da sinalização do TGF- β 1 podia promover a apoptose de células osteoprogenitoras derivadas da medula óssea, indicando a complexidade da regulação do efeito de TGF- β 1 sobre as células ósseas. Isso acontece porque várias vias de sinalização podem estar envolvidas, ativando e/ou inibindo a via do TGF- β 1.

A sinalização do TGF- β 1 é ativada com a ligação de TGF- β 1 ao T β RII, que recruta e fosforila o T β RI (CHEN et al., 2012; METZ-ESTRELLA et al., 2012; SCHINDELER et al., 2010; WAGNER et al., 2010; ZHAO et al., 2008). A fosforilação do T β RI é o marcador do início da sinalização intracelular. Assim que o T β RI é fosforilado, propaga o sinal recebido por fosforilação às proteínas Smads. As Smads específicas fosforiladas – R-Smads, formam um complexo com a Smad 4 e são translocadas ao núcleo para uma resposta transcricional. (CHEN et al., 2012; YI et al., 2010; ZHAO et al., 2008). No osso, esse complexo vai regular coativadores

transcricionais importantes no osteoblasto, tais como Runx2 e Osx – ver Figura 4 (CHEN et al., 2012).

O conhecimento dessa via de sinalização, assim como as diferentes maneiras de *cross-talk* com outras vias no osso, irão permitir novas pesquisas com terapias contra patologias ósseas.

Figura 4: Via de sinalização do TGF-β1 na formação do osso. Sinalização de TGF-β1 Smad-dependente: TGF-β1 liga-se ao receptor II (R-II) e receptor (R-I) e ativa as Smads. As ativações das Smads formam um complexo com a Smad4 que será translocado para o núcleo, onde irá interagir com outros fatores de transcrição para a expressão do gene alvo.
 Fonte: CHEN et al., 2012, modificado.

3 PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O presente trabalho teve, como objetivo geral, a investigação dos efeitos moleculares do TGF- β 1, neutralizando seus receptores, sobre as células osteogênicas, estudando o principal elemento da via de sinalização do TGF- β – Smad3, bem como a habilidade de diferenciação dessas células em diferentes estágios correspondentes à biomineralização, analisando a expressão gênica e proteica de algumas proteínas não colágenas e da ALP.

Objetivos Específicos

- Neutralizar os receptores de TGF- β 1 das células osteogênicas;
- Verificar a expressão gênica do TGF- β 1 antes e depois da neutralização dos receptores de TGF- β 1;
- Analisar o comportamento da Smad3 antes e depois da neutralização dos receptores de TGF- β 1;
- Analisar a concentração e a distribuição da OPN pela técnica de ELISA e por imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina, respectivamente, e a atividade da ALP através de teste bioquímico, além de analisar, através de RT-PCR *real time* e Western blotting, a expressão gênica e proteica dessas moléculas;
- Examinar a expressão gênica da OC, bem como de dois dos principais fatores de transcrição envolvidos nos processos de diferenciação osteoblástica e de biomineralização – Runx2 e Osx.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem celular

Foi usada a linhagem celular imortalizada MC3T3-E1 (pré-osteoblastos derivados de calvária de camundongos recém-nascidos - ATTC).

O cultivo das células foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular do Laboratório de Biologia Oral do Departamento de Biomateriais e Biologia Oral da Faculdade de Odontologia da USP (FO/USP). A manutenção da viabilidade celular e todos os outros procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, mantendo-se, assim, a esterilidade dos materiais e das substâncias utilizadas para o cultivo celular.

4.2 Concentração do Anti-TGF- β 1 e confirmação da neutralização

As células foram cultivadas em placas de petri, de aproximadamente 60,1 cm² e com densidade de 110 células/mm². Foram testadas as seguintes concentrações de anti-TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, EUA): 0,5; 1 e 1,5 μ g/mL, por 3 dias, sendo que se usou, como controle, um grupo sem tratamento (α MEM+10%SFB+1%AB) e, além disso, um controle em que as células foram tratadas com TGF β 1 (α MEM+10%SFB+1%AB+50 μ g/mL AA+10 mM β GP+5 ng/mL TGF- β 1). Após esse período, as células foram lisadas e o produto proteico foi quantificado com o Kit BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, EUA). O *kit* é composto por um reagente A e um reagente B, sendo usada a mistura dos dois na proporção 1:50. A reação foi feita em placas de 96 poços, que continham 200 μ L de BCA, mais 20 μ L da amostra ou das diferentes concentrações de BSA (curva padrão indicada pelo fabricante). A leitura da concentração de proteínas foi feita em Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda de 562 nm. Na sequência, foram feitas as análises de pSMAD3 por Western blotting (Figura 5). Além disso, foi feito o teste de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) para 7, 10 e 14 dias, para que fosse certificada a citotoxicidade das doses nos tempos experimentais em que seriam usadas (DONATO et al., 2009).

Para esse teste, as células foram cultivadas em placas de 96 poços, por 7, 10 e 14 dias, e a neutralização dos receptores foi feita após 24 horas do plaqueamento, repetindo-se a cada 48 horas durante todo o período. Foram usadas, como controle

de viabilidade, células sem nenhum tratamento (controle negativo de mineralização) e, como controle de citotoxicidade, uma solução de fenol a 1%. O teste foi feito em triplicata com $n=5$. Transcorridos os tempos experimentais, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS estéril. Em seguida, foram adicionados 90 μL de meio de cultura, mais 10 μL de MTT (5 mg/mL em tampão PBS estéril) em cada poço e incubados a 37 °C por 3 horas. Após esse período, essa solução foi retirada e os poços lavados com tampão PBS. Subsequentemente, adicionaram-se 200 μL de DMSO (dimetilsulfóxido), em temperatura ambiente, por 15 minutos, para solubilizar os cristais de coloração azul/violeta, formados pela clivagem dos anéis de tetrazolium pela enzima succinato-desidrogenase (SDH) das mitocôndrias ativas. Após a solubilização, efetuou-se a leitura em Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda de 590 nm (Figura 6 A-C).

4.3 Tratamento e manutenção das células

As células foram contadas em hemocitômetro e plaqueadas na densidade de 20000 células/poço (~ 110 células/ mm^2 em placas de cultura de 6, 24 e 96 poços), dependendo da análise. Elas foram mantidas em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, durante os tempos experimentais. O monitoramento do crescimento celular foi feito a cada 24 horas, utilizando-se o microscópio invertido de fase Axiovert 40 (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), sendo que as trocas dos meios ocorreram a cada 48 horas.

Nas primeiras 24 horas, as células foram cultivadas com meio essencial mínimo, modificação alfa (αMEM – Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) contendo 1% de soro fetal bovino (SFB – Cultilab, Campinas, Brasil) e 1% de gentamicina (Invitrogen). Esse meio de cultura foi utilizado durante todos os períodos experimentais como controle negativo de mineralização.

Após 24 horas do plaqueamento das células, os receptores de TGF- β 1 foram neutralizados com 1 $\mu\text{g/mL}$ anti-TGF- β 1 (R&D Systems, Minneapolis, MN 55413, EUA) e tratados com meio de cultura suplementado com 10 mM de βGP (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 50 $\mu\text{g/mL}$ AA (Sigma), que serviu como meio-base para os demais e, também, como controle positivo de mineralização. Ele foi suplementado

Figura 5: Relação da expressão proteica de pSmad3, analisada através de Western blotting em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1 – 0,5; 1,0 e 1,5 μ g/mL de anti-TGF- β 1 – durante 3 dias.

A

B

C

Figura 6: Viabilidade celular (MTT). Análise da viabilidade celular em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1 – 0,5; 1,0 e 1,5 μ g/mL de anti-TGF- β 1. A) 7 dias; B) 10 dias e C) 14 dias. Estatística comparada com CN. Não houve diferença significativa $p \geq 0,05$.

com 5 ng/mL de TGF- β 1 (PreproTech EC, London, UK), ou com 10^{-7} M Dex (Sigma), ou, ainda, com ambos simultaneamente.

4.4 Atividade da ALP

Após 7, 10 e 14 dias de cultivo, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, os componentes A e B do *kit* para fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase Blue Microwell Substrate Component A* e *alkaline phosphatase Blue Microwell Substrate Component B* – Sigma) foram misturados em volumes iguais, e 1 mL foi colocado em cada poço e incubado por 10 minutos a 37 °C. Após esse tempo, o reagente foi removido e foram adicionados, a cada poço, 100 μ L de *stop solution* (Sigma). A leitura da placa foi feita em Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda 490 nm. O teste foi feito em triplicata com n=3.

4.5 Concentração da Osteopontina

As células foram cultivadas em placas de petri de aproximadamente 60,1 cm² (~110 células/poço). Para a quantificação da OPN foi utilizado o *Osteopontin Mouse Elisa Kit* (abcam[®]) e, para isso, foi coletado o meio de cultura de cada grupo com 7, 10 e 14 dias de tratamento. Seguindo as instruções do fabricante, foram adicionados 100 μ L da curva padrão e das amostras em cada poço, em duplicata, e incubados em *overnight* a 4 °C. Transcorrido esse período, a placa foi lavada com *wash buffer* abundante e, em seguida, foram adicionados 100 μ L do anticorpo biotilado em cada poço, incubando-o por 1 hora em TA. Na sequência, foram feitas lavagens com *wash buffer* abundante e incubaram-se 100 μ L de streptavidina por 45 minutos em TA. Após a incubação, foram feitas novas lavagens com *wash buffer* abundante e adicionados 100 μ L de TMB *One-Step Substrate Reagent* (solução substrato) em cada poço, por 30 minutos e em TA. Finalmente, foram adicionados 50 μ L de *Stop Solution* em cada poço e realizou-se a leitura da placa a 450 nm em Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA). O teste foi feito em triplicata com n=3.

4.6 Imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina

As células osteogênicas foram cultivadas em lamínulas de vidro (~13 mm) em placas de 24 poços (~110 células/mm²). A reação de imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina foi feita em três períodos de cultivo: 7, 10 e 14 dias, na cultura primária. Os materiais foram lavados com tampão de Hanks e, em seguida, fixados com metanol a -20 °C. Após a fixação, eles passaram por lavagens com PBS, seguidas de água destilada e, posteriormente, foram incubados com o corante vermelho de alizarina por 15 minutos, em temperatura ambiente. Foram feitas lavagens com água destilada até a retirada do excesso de corante e, em seguida, uma lavagem de 15 minutos com PBS, seguida por lavagens com água destilada. Feita a marcação dos nódulos de mineral, as células sofreram permeabilização por intermédio de Triton X-100, a 0,5% e em PBS, seguindo-se, a isso, o bloqueio das marcações inespecíficas com leite desnatado, também a 5% e em PBS, com a incubação do anticorpo primário (OPN 1:50; Santa Cruz Biotechnology INC, Dallas, Texas, EUA) *overnight* em câmara úmida e a 4 °C. O controle negativo para a reação foi incubado com PBS, substituindo o anticorpo primário. Todos os procedimentos descritos anteriormente foram precedidos de lavagens em PBS. O anticorpo secundário foi o anti-camundongo biotinilado (Vector Laboratories Inc, Burlingame, CA, USA), em concentração de 1:100, por 1 hora. Em seguida, foi incubado com estreptavidina conjugada com fluoresceína, em temperatura ambiente e por 1 hora, protegidos da luz. As montagens das lamínulas sobre as lâminas de vidro foram realizadas utilizando-se o meio de montagem Vectashield (Vector) conjugado ao dapi para visualização dos núcleos (em azul). As observações e análise foram realizadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX60).

4.7 Expressão gênica

4.7.1 Extração de RNA

As células foram cultivadas em placas de petri de aproximadamente 60,1 cm² (~110 células/mm²) por períodos de 7, 10 e 14 dias, sem e com neutralização de receptores de TGF-β1. As placas foram lavadas duas vezes com PBS; depois,

sobre uma placa de gelo, foi adicionado 1 mL/placa de Trizol[®] (Invitrogen) e, com o auxílio de um *scraper*, as células foram coletadas.

O RNA total foi extraído com base na técnica desenvolvida por Chomczynski e Sacchi (1987), descrito sucintamente a seguir. As células coletadas com Trizol[®] (descrito anteriormente) foram homogeneizadas e, com a adição de 0,2 mL de clorofórmio, o que foi seguido de centrifugação (12.000 g, 15 minutos, 4 °C), resultou na separação das fases. O RNA foi precipitado a partir da fase aquosa com 0,5 mL de isopropanol e lavado com etanol 75%, sendo resuspenso em água DEPC (Invitrogen). Após a extração, as amostras foram quantificadas por método fluorométrico em equipamento Quibit (Life TechnologiesTM).

A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel denaturante de agarose a 1,2%. As amostras íntegras apresentaram duas subunidades ribossomais de 18S e 28S.

4.7.2 Transcrição reversa

Para gerar o DNA complementar (cDNA) foram necessários 3 µg de RNA total na presença de Oligo dT (500 µg/mL), 10 nM de deoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP mix), 10 U de inibidor de RNase, 10 mM de DTT, tampão de RT 5x e 200 U transcriptase reversa (Impron II Promega Corporation, Madison, WI, EUA), para o volume total de 20 µL. A reação de anelamento do *primer* ao RNA foi realizada a 70 °C e por 5 minutos. Transcorrido esse tempo, foi adicionada a mistura dos reagentes contendo a enzima, continuando o ciclo a 25 °C por 5 minutos, 42 °C por 60 minutos e 70 °C por 15 minutos, mantendo-se a 4 °C até a retirada das amostras do termociclador Veriti (Applied Biosystem – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

4.7.3 RT-PCR real time

A PCR *real time* é uma técnica utilizada para a avaliação da expressão gênica. A expressão é considerada *relativa* porque leva em conta também a expressão de controles endógenos, como ACT. A técnica consiste no monitoramento óptico da fluorescência emitida durante a reação da PCR, através da ligação de uma sonda específica ou de um corante na fita recém-sintetizada.

Para análise quantitativa da expressão gênica por RT-PCR *real time* (REIS et al., 2005), foram desenhados pares de *primers* específicos para amplificação dos genes, referentes à diferenciação dos osteoblastos, via de sinalização da biomineralização e via de sinalização do TGF- β 1 (ver Tabela 1), utilizando sequências depositadas no *GenBank* e com o auxílio do programa *PerlPrimer*.

As reações da *PCR real time* foram realizadas em triplicatas biológicas com $n=3$. Para cada reação, utilizaram-se 50 ng de cDNA, 12,5 μ L de SYBR[®]Green PCR Master Mix (Applied Biosystem) e *primers* em volume de 25 μ L, em equipamento RotorGene 6000 Cycler (Cobertt Life Science, Concord, NSW, Austrália).

Os valores obtidos na reação da *PCR real time* são expressos em *threshold cycle* (CT). A expressão de cada gene alvo foi determinada a partir da fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$, em que $\Delta CT = CT$ do gene alvo – CT do gene endógeno e $\Delta\Delta CT = \Delta CT$ da amostra – ΔCT da amostra controle. O $2^{-\Delta\Delta CT}$ das amostras controle é igual a 1. As análises foram realizadas no programa REST 2009 (Quiagen, Hilden, Alemanha). Em *PCR real time*, a concentração ideal de *primer* a ser utilizada deve ser a mínima suficiente para permitir a duplicação de todas as cópias do material a cada ciclo de reação. A concentração ideal foi aquela em que o gene de interesse obteve o menor valor de CT, ou seja, a concentração em que o gene foi amplificado mais precocemente, tendo, assim, a melhor eficiência.

Para analisar a eficiência dos *primers* desenhados, foi realizada uma reação da *PCR* convencional, utilizando-se 45 μ L *PCR Super Mix* (Life Technologies), 50 ng cDNA e *primers* específicos em volume final de 50 μ L. A reação ocorreu por 1 minuto, a 94 °C, seguida de 35 ciclos de 30 minutos por 94 °C, 30 segundos por 55 °C e 1 minuto por 72 °C, mantendo-se a 4 °C até que houvesse a retirada do equipamento. Dessa reação, pegaram-se 5 μ L, que foram corados com 1 μ L de BlueJuice[™] Gel Loading Buffer (Life Technologies) e aplicados em gel de agarose 0,8%, acrescidos de SYBR Safe DNA Gel Stain (Life Technologies), com concentração 1:10000 para a confirmação da amplificação do produto da *PCR*.

Após a confirmação, os 45 μ L restantes dessa reação foram precipitados em 10% de acetato de sódio a 3 M pH=5, acrescidos de 2,5x o volume de etanol 100%, incubados por cerca de 12 horas a -20 °C, seguidos de centrifugação a 14000 RPM por 10 minutos a 4 °C, tendo sido lavados, na sequência, com etanol 80% a -20 °C e centrifugados novamente nas condições anteriores.

Tabela 1 – Genes e sequencias de *primers* usados

Genes	Primer Forward	Primer Reverse	GenBank
SSP1	5'- GAGGGCTTGTTGAGC-3'	5'- CAATTCTATGGTGTGAGTTTTCC-3'	NM_001251830.1
ALP	5'- CCATCCTGTATGCAATG-3'	5'- CGCCTGGTAGTTGTTGTAG-3'	NM_000478.4
βGLA	5'-GTCTGACAAAGCTTCATGTCC-3'	5'-GTCATAGGACCACTCCAGCA-3'	NC_000069.6
SP7	5'-TTTTGCGGCAAAGGTTCA-3'	5'-TTGCTCAAGTGCCTTCT-3'	NC_000081.6
Runx2	5'-CAAGTAGCCGTCACGA-3'	5'-TCTGCTGTGCCTTTTGGT-3'	NC_000083.6
Smad3	5'-TAGAGAGCCAGTCTACCT-3'	5'-GGTTCTCATCTTCACTCAG-3'	NC_000075.6
TGF-β1	5'-AAAATTCCTGCGTTACCT-3'	5'-GGCTATCCGTTGATTTCC-3'	NC_000073.6
ACT	5'-AGATCAAGATCATTTCTCCT-3'	5'-TAAAGTCGCCTAGAAGCA-3'	NC_000071.6

Os *pellets* formados foram seco em *SpeedVac* (Thermo Scientific – Life TechnologiesTM) e ressuspensos em 20 µL de água DEPC. Em seguida, houve a quantificação por método fluorométrico em equipamento Quibit (Life TechnologiesTM), para cálculo da diluição das amostras. Como descrito anteriormente, foi realizado PCR *real time* com as amostras em diluição seriadas (até 10.000.000 vezes), criando, assim, uma curva padrão para cada gene específico, sempre considerando a concentração do *primer* e a temperatura de *melt* (TM) para uma eficiência próxima a 1 (Tabela 2).

Além da eficiência dos *primers*, foram feitos testes para a escolha do melhor gene endógeno, em que se levou em consideração a diferença não significativa entre os grupos frente à expressão gênica de ACT e GADPH. A partir desses dados, optou-se pelo uso da ACT para todos os grupos.

4.8 Expressão Proteica

4.8.1 Extração e quantificação de proteínas totais

As extrações de proteínas totais aconteceram após 7, 10 e 14 dias transcorridos à suplementação do meio de cultura. O meio foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS, a 37 °C. Em seguida, as células foram coletadas em 1 mL de PBS e 100 µL de inibidor de protease (Sigma), em tubos de microcentrífuga e centrifugadas a 2000 rpm, por 5 minutos e a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, e o pellet foi ressuspensionado em 150 µL de RIPA (tampão para lise de células – Tris-HCl 20 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 1%; deoxicolato de sódio 0,5%; EDTA 1 mM e SDS 0,1%) com 15 µL de inibidor de protease. O tubo foi mantido por 10 minutos a 4 °C e, novamente, centrifugado a 14.000 RPM, durante 5 minutos e a 4 °C.

O sobrenadante (proteínas totais) foi transferido para um novo tubo e, em seguida, foi quantificado com o Kit BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, EUA). Esse *kit* é composto por um reagente A e um reagente B, sendo usada a mistura dos dois na proporção 1:50. A reação foi feita em placas de 96 poços, que continham 200 µL de BCA, mais 20 µL da amostra ou das diferentes concentrações de BSA (curva padrão indicada pelo fabricante). A leitura da concentração de proteínas totais foi feita em Leitor de Elisa (ELX 800 – Universal Microplate Reader – Bio-Tek Instruments, ICC, USA), com comprimento de onda de 562 nm.

4.8.2 Western Blotting

A eletroforese foi feita seguindo o método SDS-PAGE, usando 150 V e 50 mA, por 3 horas, em gel de acrilamida a 15% (Tabela 3). O padrão do peso molecular utilizado foi RPN800 (*Full-range rainbow molecular weight markers*, Amersham). A transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (Hybond: Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) foi feita por eletrotransferência úmida, em aparelho Hoefer miniVE (Amersham), com tampão de transferência recomendado pelo fabricante. A transferência foi feita a 25 V e 400 mA, por 2 horas.

Tabela 2 – Temperatura de *Melt* e eficiências dos *primers*.

Genes	TM	Eficiências
SSP1	55 °C	0,91
ALP	55 °C	0,90
Col I	55 °C	0,98
βGLA	55 °C	1,0
SP7	55 °C	0,88
Runx2	57 °C	0,97
Smad3	55 °C	0,98
TGF-β1	57 °C	0,94
ACT	55 °C/57 °C	1,0/0,90

Tabela 3 – Constituição do gel 15% acrilamida com SDS.

	<i>Resolving Gel 15% (mL)</i>	<i>Stacking Gel 5% (mL)</i>
H ₂ O	2,3	1,4
30% Acrilamida	5,0	0,33
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5	-
1,0 M Tris (pH 6,8)	-	0,25
10% SDS	0,1	0,02
10% Persulfato de amônio	0,1	0,02
TEMED	0,004	0,002

4.8.3 Immunoblotting

Após a transferência, a membrana foi submetida à fase de bloqueio dos sítios inespecíficos, com 5% de leite seco desnatado diluído em TTBS (10 mM Tris, 15 mM NaCl, 0,05% Tween 20; pH 7,4), por 1 hora e em temperatura ambiente, sob agitação e, em seguida, incubada em *overnight* a 4 °C, com os anticorpos primários descritos na Tabela 4. No dia seguinte, a membrana foi lavada quatro vezes com TTBS, durante 15 minutos. Logo em seguida, foi feita a incubação dos anticorpos secundários anti-*mouse* ou anti-*rabbit*, conjugada com peroxidase (1:1000; Amersham) – dependendo do primário –, durante 2 horas, sob agitação e em temperatura ambiente. Após esse período, a membrana foi lavada quatro vezes com TTBS, de 15 minutos. Para a revelação, a membrana foi incubada em ECL *plus* (Amersham) por 5 minutos no escuro (conforme orientação do fabricante) e, em seguida, foi exposta a filmes radiográficos.

As bandas foram estimadas por densitometria, utilizando-se o *software* ImageJ® (Molecular Dynamics) e, na sequência, foram normalizadas com os valores da expressão da β -actina. O valor obtido pela amostra de controle foi considerado igual a 1 e expresso em unidades arbitrárias.

Tabela 4 – Anticorpos primários.

<i>Anticorpo</i>	<i>Hospedeiro</i>	<i>Diluição</i>	<i>Procedência</i>
Anti- β -actina	<i>Mouse</i>	1:2000	Santa Cruz
Anti-OPN	<i>Rabbit</i>	1:500	Abcam
Anti-ALP	<i>Mouse</i>	1:500	Santa Cruz

4.9 Análise estatística

A análise estatística entre os grupos foi realizada utilizando-se Two-way (ANOVA), e o nível de significância foi de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade da ALP

5.1.1 *TGF- β 1 diminui a atividade da ALP, mesmo após a neutralização dos seus receptores*

As células sem neutralização de receptores de TGF- β 1 tiveram o meio de cultura suplementado com TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, por 7, 10 e 14 dias. A atividade da ALP em células tratadas com TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, no primeiro período estudado - 7 dias, foi significativamente inferior ao CP - controle positivo de mineralização ($p < 0,05$ - Figura 7 A). No 10º dia de tratamento, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex, bem como o CN - controle negativo, tiveram um aumento significativo da atividade da ALP ($p < 0,001$) comparado ao CP (Figura 7 B). No entanto, as células tratadas com TGF- β 1 mantiveram sua atividade baixa, apresentando diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao grupo CP - Figura 7 B. As células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex mantiveram a atividade da ALP significativamente maior que a do CP ($p < 0,001$), assim como que a do CN. Já as células tratadas com TGF- β 1 não apresentaram diferença significativa em relação ao CP ($p \geq 0,05$) - Figura 7 C.

Quando as células osteogênicas tiveram os receptores de TGF- β 1 neutralizados, a atividade da ALP das células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex foi reduzida. No entanto, aquelas tratadas com TGF- β 1 mantiveram-se com a atividade de ALP inferior ao CP, assim como as células que não tiveram os receptores bloqueados. Com 7 dias de tratamento, nenhum dos grupos estudados, incluindo o CN, apresentou diferença significativa em relação ao CP ($p < 0,01$) - Figura 8 A. No entanto, no 10º dia de tratamento, as células tratadas com TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, assim como o CN, tiveram a atividade da ALP inferior ao CP, sendo a diferença significativa (Figura 8 B). Já no 14º dia de tratamento, apenas as células do grupo CN tiveram um discreto aumento ($p < 0,05$) na atividade da ALP. Nos demais grupos - TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, ela continuou inferior ao CP (Figura 8 C).

A

B

C

Figura 7: Atividade da ALP em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF-β1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 8: Atividade da ALP em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus CP.

5.2 Concentração da OPN pelo método de ELISA

5.2.1 *TGF- β 1 não altera a concentração de OPN, mesmo com a neutralização de seus receptores*

A concentração da OPN foi medida utilizando-se o meio de cultura das células. Sendo assim, foi avaliada a quantidade de proteína secretada. No grupo sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, no 7º dia de tratamento, somente as células tratadas com TGF- β 1 apresentaram um aumento significativo na concentração de OPN quando comparadas ao CP ($p < 0,001$). No entanto, quando foi usado associado à Dex não foi observada diferença significativa em relação ao CP, assim como Dex e CN ($p \geq 0,05$) - Figura 9 A. No 10º dia de tratamento, as células tratadas com TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex tiveram uma diminuição significativa na concentração da OPN em relação ao CP ($p < 0,001$), assim como o CN. Já as células tratadas com Dex apresentaram aumento significativo ($p < 0,001$) - Figura 9 B. As células do grupo CN apresentaram um aumento significativo na concentração de OPN no 14º dia ($p < 0,05$), enquanto as células tratadas com TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex mantiveram os níveis de OPN com o mesmo perfil do 10º dia de tratamento - Figura 9 C.

Após a neutralização dos receptores, as células osteogênicas do grupo CN tiveram a concentração de OPN significativamente menor que o CP ($p < 0,001$), enquanto as tratadas com TGF- β 1+Dex apresentaram aumento significativo na concentração de OPN ($p < 0,001$). Todavia, quando usados separados – TGF- β 1 e Dex – não apresentaram diferença significativa em relação ao CP ($p \geq 0,05$) - Figura 10 A. Após 10 dias de tratamentos, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex tiveram um aumento significativo na concentração de OPN ($p < 0,001$). Entretanto, as células tratadas com TGF- β 1 não apresentaram diferença significativa ($p \geq 0,05$), assim como o CN (Figura 10 B). Aos 14 dias, todos os tratamentos - TGF- β 1, Dex e TGF- β 1, bem como o CN, aumentaram significativamente a concentração de OPN no meio de cultura (Figura 10 C).

A

B

C

Figura 9: Concentração da OPN presente no meio de cultura de células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 10: Concentração da OPN presente no meio de cultura de células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

5.3 Imunofluorescência combinada com vermelho de Alizarina

5.3.1 A neutralização dos receptores de TGF- β 1 permitiu a formação de nódulos de mineral em células tratadas com TGF- β 1.

A imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina teve, como objetivo, analisar a presença da OPN, bem como a formação de nódulos de mineral, nas células osteogênicas cultivadas durante 7, 10 e 14 dias, tratadas com Dex, TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex, e os controles CN e CP, sem e com neutralização dos receptores de TGF- β 1.

Todos os grupos, e também os controles, sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, imunoexpressaram OPN em todos os períodos - 7, 10 e 14 dias. No entanto, somente as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex, a partir do 10º dia de tratamento, formaram nódulos de mineral, assim como o CP - controle positivo de mineralização. As células tratadas apenas com TGF- β 1, apesar de expressarem a OPN, não formaram nódulos de mineral em nenhum dos períodos estudados, como o CN - controle negativo de mineralização (Figura 11).

Quando os receptores de TGF- β 1 foram neutralizados, todos os grupos expressaram a OPN. Além disso, assim como o grupo CP, todos os grupos - TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, incluindo o CN, formaram nódulos de minerais em todos os períodos estudados (Figura 12).

5.4 Análise da expressão gênica

5.4.1 A neutralização dos receptores TGF- β 1 alteram a expressão de ALP em células osteogênicas tratadas com TGF- β 1

A expressão gênica da ALP foi analisada com 7, 10 e 14 dias, sem e com a neutralização de receptores de TGF- β 1.

No 7º dia de tratamento, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex continuaram suprarregulando a expressão de ALP, mas, quando tratadas apenas com TGF- β 1, infrarregularam ($p < 0,01$), assim como o CN ($p < 0,001$) - Figura 13 A. Aos 10 dias de tratamento, as células osteogênicas, que não tiveram os seus receptores neutralizados, suprarregularam significativamente a expressão gênica da

Figura 11: Imunofluorescência para OPN (verde) combinada com vermelho de alizarina em cultura de células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1. As pontas das setas estão indicando nódulos de mineral. CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. Bar=100 μ m

Figura 12: Imunofluorescência para OPN (verde) combinada com vermelho de alizarina em cultura de células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. As pontas das setas estão indicando nódulos de mineral. CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. Bar=100 μ m

A

B

C

Figura 13: Relação da expressão gênica de ALP analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

ALP em todos os tratamentos - Dex, TGF- β 1, TGF- β 1+Dex, e, também, o CN ($p<0,001$) - Figura 13 B. Já com 14 dias, todos os tratamentos tiveram uma significativa suprarregulação da expressão gênica de ALP (Figura 13 C).

Quando os receptores de TGF- β 1 foram neutralizados, aos 7 dias após o tratamento, as células submetidas a TGF- β 1 e Dex, separados, suprarregularam a expressão gênica de ALP ($p<0,001$). Porém, quando usados associadamente, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP ($p\geq 0,05$) - Figura 14 A. No 10º dia de tratamento, o TGF- β 1 inibirregulou a expressão de ALP ($p<0,001$), mas suprarregulou a expressão de ALP quando combinado com Dex (TGF- β 1+Dex - $p<0,01$). Já no tratamento em que se utilizou somente a Dex, continuou a suprarregulação, e o CN inibirregulando a expressão de ALP (Figura 14 B). Após o 14º dia de tratamento, o TGF- β 1 não apresentou diferença significativa se comparado ao CP, e os demais grupos - Dex, TGF- β 1+Dex, incluindo o CN, mantiveram o mesmo comportamento observado nos demais períodos (Figura 14 C).

Apesar dos níveis de expressão gênica de ALP terem aumentado ao longo dos períodos estudados, nas células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1, as células tratadas com esse elemento diminuíram sua expressão quando comparadas com o CP. Isso foi visto apenas no 10º dia de tratamento, precisamente nas células sem neutralização de receptores.

5.4.2 A neutralização dos receptores de TGF- β 1 não alterou a expressão de OPN em células osteogênicas tratadas com TGF- β 1

As células osteogênicas sem neutralização de receptores, ao 7º dia de tratamento, inibirregularam a expressão de OPN em todos os tratamentos estudados - Dex ($p<0,01$), TGF- β 1 ($p<0,001$) e TGF- β 1+Dex($p<0,01$) - e no CN ($p<0,001$) - Figura 15 A. No 10º dia, as células tratadas com TGF- β 1 e Dex, isoladamente, continuaram inibirregulando a expressão de OPN, como o CN ($p<0,001$). Já as tratadas com os dois em conjunto (TGF- β 1+Dex) não apresentaram diferença significativa ($p\geq 0,05$) - ver Figura 15 B. Após 14 dias de tratamento, apenas as células tratadas com Dex inibirregularam a expressão de OPN ($p<0,05$), sendo que os demais grupos - TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex, assim como o CN, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP ($p\geq 0,05$) - Figura 15 C.

A

B

C

Figura 14: Relação da expressão gênica de ALP analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 15: Relação da expressão gênica de OPN analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

Após a neutralização dos receptores de TGF- β 1, as células tratadas com TGF- β 1 ($p < 0,01$) e Dex ($p < 0,001$) separadamente, durante 7 dias, infrarregularam a expressão de OPN como o CN ($p < 0,01$). As células tratadas com TGF- β 1+Dex, por sua vez, não apresentaram diferença significativa quando comparadas com o CP ($p \geq 0,05$) - Figura 16 A. Após 10 dias de tratamentos, todos os grupos - TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, bem como o CN, infrarregularam a expressão gênica de OPN ($p < 0,001$). No entanto, no 14º dia, apenas as células tratadas com TGF- β 1+Dex infrarregularam a expressão de OPN ($p < 0,001$), ao passo que os demais grupos não apresentaram diferença significativa em relação ao CP (Figura 16 C)

A neutralização dos receptores de TGF- β 1 não afetou a resposta de TGF- β 1 na expressão de OPN, que apresentou um perfil muito semelhante àqueles observados nas células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.

5.4.3 A neutralização dos receptores de TGF- β 1 regulou a expressão gênica de OC negativamente em células tratadas com TGF- β 1

As células sem neutralização de receptores de TGF- β 1, transcorridos 7 dias, tratadas com TGF- β 1, infrarregularam a expressão de OC. No CN ($p < 0,001$), no mesmo período, as células tratadas com Dex ($p < 0,001$) suprarregularam a expressão desse gene, mas quando foram associadas ao TGF- β 1 - TGF- β 1+Dex - não apresentaram diferença significativa na expressão gênica de OC em relação ao CP (Figura 17 A). No 10º dia, todos os tratamentos estudados - TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, incluindo o CN, passaram a suprarregular a expressão de OC ($p < 0,001$) - Figura 17 B. Já no 14º dia de tratamento, apenas as células tratadas com TGF- β 1 continuaram a suprarregular a expressão de OC, como o CN ($p < 0,001$). Os demais tratamentos - Dex e TGF- β 1+Dex - não apresentaram diferença significativa (Figura 17 C).

Com a neutralização dos receptores de TGF- β 1, nos 7 primeiros dias de tratamento, as células tratadas com TGF- β 1 infrarregularam a expressão de OC, assim como as células tratadas com Dex, mas somente quando usadas ao mesmo tempo - TGF- β 1+Dex -, as células suprarregularam a expressão desse gene, como o CN ($p < 0,001$) - Figura 18 A. Passados 10 dias, todos os tratamentos levaram à infrarregulação da expressão gênica de OC, diferenciando apenas do CN ($p < 0,001$) - Figura 18 B. Depois de 14 dias de tratamento, somente as células tratadas com

A

B

C

Figura 16: Relação da expressão gênica de OPN analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento.. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 17: Relação da expressão gênica de OC analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 18: Relação da expressão gênica de OC analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

TGF- β 1 continuaram a infrarregular a expressão de OC ($p<0,001$). Os demais tratamentos – Dex e TGF- β 1+Dex – não apresentaram diferença significativa em relação ao CP, já o CN continuou a suprarregular a expressão desse gene ($p<0,001$) - Figura 18 C.

A neutralização dos receptores de TGF- β 1 impediu que o tratamento com TGF- β 1 atuasse no aumento da expressão gênica de OC, como foi observado nas células osteogênicas que não tiveram os receptores de TGF- β 1 neutralizados.

5.4.4 A neutralização dos receptores de TGF- β 1 influenciou na expressão de *Osx* em células osteogênicas tratadas com Dex

Nos primeiros 7 dias de tratamento, em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, apenas as células tratadas com TGF- β 1+Dex infrarregularam a expressão gênica de *Osx* ($p<0,001$), assim como o CN ($p<0,01$). Os demais tratamentos – TGF- β 1 e Dex –, quando usados em separado, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP (Figura 19 A). No 10º dia de tratamento, tanto as células tratadas com TGF- β 1, como o CN, suprarregularam a expressão de *Osx* ($p<0,001$), enquanto que Dex e TGF- β 1+Dex não apresentaram diferença significativa (Figura 19 B). Após o 14º dia, as células tratadas apenas com TGF- β 1 ($p<0,01$) e o CN ($p<0,001$) continuaram a suprarregular a expressão de *Osx*, sendo que os demais tratamentos – Dex ($p<0,01$) e TGF- β 1+Dex ($p<0,001$) – infrarregularam sua expressão (Figura 19 C).

Após a neutralização dos receptores de TGF- β 1, com 7 dias de tratamento, as células tratadas com TGF- β 1 e Dex, isoladamente, suprarregularam a expressão de *Osx* ($p<0,001$), diferentemente de quando houve associação – TGF- β 1+Dex –, situação em que não apresentaram diferença significativa em relação ao CP (Figura 20 A). No entanto, no 10º dia, as células tratadas com TGF- β 1+Dex suprarregularam a expressão de *Osx*, como os demais tratamentos - TGF- β 1 e Dex ($p<0,001$), não havendo diferença significativa entre o CN e o CP (Figura 20 B). No 14º dia, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex continuaram a suprarregular a expressão de *Osx* ($p<0,001$). Já as células tratadas com TGF- β 1, bem como o CN, não apresentaram diferença significativa (Figura 20 C).

A

B

C

Figura 19: Relação da expressão gênica de *Osx* analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 20: Relação da expressão gênica de *Osx* analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A neutralização dos receptores de TGF- β 1 influenciou positivamente as células tratadas com Dex, que passaram a suprarregular a expressão de Osx, o que não aconteceu quando elas estavam sem neutralização.

5.4.5 A neutralização dos receptores de TGF- β 1 influenciou a suprarregulação da expressão gênica de Runx2 em células tratadas com TGF- β 1 em estágios avançados da mineralização

As células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, após 7 dias, tratadas com TGF- β 1+Dex, infrarregularam a expressão gênica de Runx2 ($p<0,01$) (Figura 21 A). Após 7 dias, os demais tratamentos – TGF- β 1 e Dex –, no mesmo período, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP. No 10º dia de tratamento, as células do CN infrarregularam a expressão de Runx2 ($p<0,01$), sendo mantido o perfil observado no 7º dia para os outros tratamentos estudados (Figura 21 B). Após 14 dias, tanto as células tratadas com TGF- β 1+Dex, como as tratadas com Dex somente, infrarregularam a expressão de Runx2 ($p<0,001$), sendo insignificante a diferença dos demais grupos se comparados ao CP (Figura 21 C). Todos os tratamentos - TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex, após a neutralização de receptores de TGF- β 1, nos primeiros 7 dias, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP. No entanto, as células do CN infrarregularam a expressão de Runx2 (Figura 22 A). Após 10 dias, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex infrarregularam a expressão de Runx2, assim como o CN ($p<0,001$), sendo que aquelas tratadas apenas com TGF- β 1 não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao CP (Figura 22 B). No 14º dia de tratamento, as células do CN continuaram a infrarregular a expressão de Runx2, e as células tratadas com TGF- β 1 e Dex, isolados, passaram a suprarregular. Porém, quando usadas simultaneamente – TGF- β 1+Dex –, não se apresentou diferença significativa (Figura 22 C).

A neutralização dos receptores de TGF- β 1 pode ter influenciado o aumento na expressão gênica de Runx2 em células tratadas com TGF- β 1 e Dex, durante 14 dias, uma vez que os mesmos tratamentos, feitos por igual período, em células sem a neutralização dos receptores TGF- β 1, não apresentaram diferença significativa ou infrarregularam a expressão de Runx2. É nesse período, precisamente, que as

A

B

C

Figura 21: Relação da expressão gênica de Runx2 analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF-β1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 22: Relação da expressão gênica de Runx2 analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

células osteogênicas demonstram um estágio avançado de maturação da matriz extracelular e da mineralização *in vitro*.

5.4.6 O tratamento com TGF- β 1 não regulou a expressão gênica de TGF- β 1 após a neutralização de seus receptores em células osteogênicas

As células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1, infrarregularam a expressão de TGF- β 1, assim como o CN ($p < 0,001$), com 7 dias de tratamento. Já as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex, no mesmo período, suprarregularam a expressão desse gene ($p < 0,001$) - Figura 23 A. No 10º dia, as células tratadas com TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex mantiveram o perfil visto com 7 dias de tratamento ($p < 0,001$), infra e suprarregulando, respectivamente. A Dex, assim como o CN, não apresentaram diferença significativa (Figura 23 B). O TGF- β 1 continuou a infrarregular a expressão de TGF- β 1 ($p < 0,01$), no 14º dia, e os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa nesse período (Figura 23 C).

Quando os receptores de TGF- β 1 foram neutralizados, com 7 dias, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex ($p < 0,001$) infrarregularam a expressão de TGF- β 1, bem como o CN ($p < 0,05$). Já as células tratadas com TGF- β 1 não apresentaram diferença significativa (Figura 24 A). Aos 10 dias, as células tratadas com TGF- β 1+Dex continuaram a infrarregular a expressão de TGF- β 1 ($p < 0,001$), sendo que os demais tratamentos – TGF- β 1 e Dex –, usados separadamente, não apresentaram diferença significativa. Já o CN, a partir desse período, passou a suprarregular a expressão desse gene ($p < 0,05$) - Figura 24 B. No 14º dia, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex suprarregulam a expressão de TGF- β 1, da mesma forma que o CN ($p < 0,001$), e as células tratadas com TGF- β 1 continuaram sem apresentar diferença significativa, como nos demais períodos de estudos (Figura 24 C).

Após a neutralização dos receptores de TGF- β 1, as células tratadas com TGF- β 1 deixaram de infrarregular a expressão de TGF- β 1, como foi observado em células sem neutralização, igualando-se ao CP.

A

B

C

Figura 23: Relação da expressão gênica de TGF-β1 analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF-β1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 24: Relação da expressão gênica de TGF-β1 analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF-β1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamentos. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

5.4.7 A neutralização dos receptores de TGF- β 1 interferiu na regulação positiva da expressão da Smad3 em células tratadas com TGF- β 1 em estágios avançados da mineralização

Após 7 dias de tratamentos, as células sem neutralização de receptores, tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex, infrarregularam a expressão de Smad3 ($P < 0,001$), como o CN ($p < 0,05$). Aquelas tratadas com TGF- β 1 não apresentaram diferença significativa (Figura 25 A). No 10º dia de tratamento, tanto as células tratadas com TGF- β 1, como as tratadas com TGF- β 1+Dex, infrarregularam a expressão de Smad3 ($P < 0,001$). Já as células tratadas apenas com Dex não apresentaram diferença significativa, enquanto que o CN, a partir desse momento, passou a suprarregular a expressão desse gene ($p < 0,05$) - Figura 25 B. Com 14 dias, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex suprarregularam a expressão de Smad3 como CN ($P < 0,001$), e as tratadas apenas com TGF- β , por sua vez, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP (Figura 25 C).

Após a neutralização dos receptores de TGF- β 1, nos primeiros 7 dias, todos os tratamentos estudados – Dex, TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex – não apresentaram diferença significativa quando comparados com o CP e o CN. No entanto, infrarregulou-se a expressão da Smad3 ($p < 0,001$) - Figura 26 A. Já no 10º dia, todos os tratamentos infrarregularam a expressão da Smad3, como o CN (Figura 26 B). As células tratadas com TGF- β 1, após 14 dias de tratamentos, passaram a suprarregular a expressão de Smad3 ($p < 0,001$), sendo que os demais tratamentos, nesse período, continuaram a infrarregular esse gene, assim como o CN (Figura 26 C).

A neutralização dos receptores de TGF- β 1 permitiu que a expressão da Smad3, membro da via de sinalização, fosse regulada positivamente no período avançado da mineralização *in vitro*, o que não foi observado nas células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1.

5.5 Análise da expressão proteica da ALP e da OPN

A análise da expressão proteica da ALP e da OPN, em células sem e com neutralização de receptores, foi feita com 7, 10 e 14 dias de tratamento. A quantificação foi feita em relação à expressão da β -actina, e todos os tratamentos foram normalizados com o CP (controle positivo).

A

B

C

Figura 25: Relação da expressão gênica de Smad $\alpha 3$ analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- $\beta 1$. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- $\beta 1$ (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- $\beta 1$ +Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

A

B

C

Figura 26: Relação da expressão gênica de Smad3 analisada por RT-PCR *real time* em células osteogênicas com neutralização dos receptores de TGF- β 1. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

5.5.1 O perfil da expressão proteica de ALP é mantido depois da neutralização dos receptores de TGF- β 1

As células sem neutralização de receptores de TGF- β 1, com 7 dias de tratamento, com Dex ($p < 0,05$) e TGF- β 1+Dex ($p < 0,001$), expressaram uma menor quantidade de ALP se comparadas ao CP, assim como ao CN ($p < 0,01$). Já as células tratadas com TGF- β 1 não apresentaram diferença significativa (Figura 27 A). No 10º dia de tratamento, as células tratadas com TGF- β 1 aumentaram a expressão de ALP, assim como o CN que, a partir desse período, manteve a expressão de ALP acima do CP ($p < 0,001$). Aquelas tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex ($p < 0,001$) mantiveram seus níveis de expressão proteica abaixo do CP (Figura 27 B). Depois de 14 dias, as células tratadas com TGF- β 1 tiveram uma diminuição significativa na expressão de ALP, já os demais tratamentos continuaram com seus níveis abaixo do CP ($p < 0,001$) - Figura 27 C.

Quando os receptores de TGF- β 1 foram neutralizados, as células tratada com TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex expressaram quantidades inferiores às do CP, como o CN ($p < 0,001$), no 7º dia de tratamento. Já as células tratadas apenas com Dex apresentaram níveis elevados de ALP nesse período ($p < 0,001$) - Figura 28 A. No 10º dia, o TGF- β 1 tem um aumento na expressão de ALP, assim como o CN ($p < 0,001$), que a partir desse momento teve a expressão de ALP significativamente maior que a dos tratamentos estudados e que a do CP (Figura 28 B). Foi observada também, nesse período, a diminuição significativa dos níveis de ALP nas células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex, quando comparadas ao CP ($p < 0,001$) - Figura 28 B. Apesar dos níveis de ALP serem os maiores em relação a todos os períodos estudados, as células tratadas com TGF- β 1 reduziram a expressão de ALP ($p < 0,001$), no 14º dia de tratamento, sendo a expressão da ALP inexistente nos demais grupos – Dex e TGF- β 1+Dex ($p < 0,001$) – Figura 28 C.

Figura 27: Relação da expressão proteica de ALP, analisada através de Western blotting em células osteogênicas sem neutralização de receptores. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

Figura 28: Relação da expressão proteica de ALP, analisada através de Western blotting em células osteogênicas com neutralização de receptores ALP. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

5.5.2 A expressão proteica de OPN é diminuída com a neutralização dos receptores de TGF- β 1 em células osteogênicas tratadas com TGF- β 1

No 7º de tratamento, as células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1 isoladamente, não apresentaram diferença significativa em relação ao CP. No entanto, as células tratadas com Dex apresentaram uma redução nos níveis de OPN ($p < 0,001$). Ainda assim, quando associadas a TGF- β 1 - TGF- β 1+Dex, os níveis de OPN aumentaram significativamente ($p < 0,05$) - Figura 29 A. Com 10 dias, as células tratadas com Dex mantiveram a expressão de OPN baixa ($p < 0,05$) e o CN, a partir desse período, passou a aumentar a expressão dessa proteína. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa quando comparados ao CP ($p < 0,001$) - Figura 29 B. No último período estudado, de 14 dias, notou-se o aumento significativo na expressão de OPN nas células tratadas simultaneamente com TGF- β 1 e Dex - TGF- β 1+Dex, assim como no CN ($p < 0,05$). Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa (Figura 29C).

Após a neutralização dos receptores de TGF- β 1, com 7 dias, todos os tratamentos – TGF- β 1, Dex e TGF- β 1+Dex –, incluindo o CN, tiveram a expressão de OPN diminuída significativamente em relação ao controle CP (Figura 30 A). No 10º dia, as células tratadas com TGF- β 1 e TGF- β 1+Dex mantiveram-se abaixo do CP, assim como do CN ($p < 0,001$), e as células tratadas com Dex não apresentaram diferença significativa (Figura 30 B). Após 14 dias, todos os tratamentos – TGF- β 1, Dex e TGF- β 1 –, bem como o CN, apresentaram a expressão proteica de OPN inferior à apresentada pelo CP (Figura 30 C).

Figura 29: Relação da expressão proteica de OPN, analisada através de Western blotting em células osteogênicas sem neutralização de receptores. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+ β GP); TGF- β 1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF- β 1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

Figura 30: Relação da expressão proteica de OPN, analisada através de Western blotting em células osteogênicas com neutralização de receptores. A) 7 dias de tratamento; B) 10 dias de tratamento; C) 14 dias de tratamento. CN: Controle Negativo de mineralização e CN: Controle Negativo de mineralização; CP: Controle Positivo de mineralização (AA+βGP); TGF-β1 (5 ng/mL); Dex (10^{-7} M); TGF-β1+Dex. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ versus CP.

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo *in vitro* sugerem que as células tratadas com TGF- β 1 sem neutralização de receptores apresentam efeito inibitório nos estágios mais avançados da diferenciação dos osteoblastos, isto é, naqueles em que ocorre a biomineralização. Apesar de as células tratadas com TGF- β 1 expressarem alguns marcadores importantes envolvidos na mineralização, não foi observada a formação de nódulos de mineral, marcador inequívoco da maturação dos osteoblastos *in vitro*. No entanto, quando as células osteogênicas tiveram os receptores de TGF- β 1 neutralizados, observaram-se nódulos de minerais em todos os tratamentos, porém, com a menor expressão de alguns genes, sugerindo que a deposição desses nódulos de mineral não seja derivada da atividade celular, mas devida à nucleação espontânea.

O TGF- β 1 é um dos fatores de crescimento mais estudados nos últimos anos, tanto *in vivo* como *in vitro*, possivelmente pela sua complexidade e multifuncionalidade. De fato, a grande rede de *crosstalk* feita pela via de sinalização do TGF- β 1 com outras vias de sinalização torna o seu estudo um desafio. Estudos *in vitro* revelam que o TGF- β 1 pode ter efeito dose e tempo dependente, o que faz com que apresente efeitos paradoxais na diferenciação de células osteogênicas, podendo inibir ou estimular a diferenciação osteoblástica. Eles sugerem, ainda, que o TGF- β 1 promova a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos nos estágios iniciais, mas que em estágios mais avançados, como a nucleação e mineralização da matriz, ele tenha efeito inibitório (EHNERT et al., 2010; LIEB et al., 2004; LIU et al., 2013). Por sua vez, a ALP é uma enzima glicoproteica que está presente na membrana dos osteoblastos e das vesículas da matriz e que, durante a mineralização *in vivo*, tem atividade e expressão abundantes nos inícios dessa mineralização, justamente por promover, dentro das vesículas, a nucleação dos primeiros cristais de hidroxiapatita (BONUCCI, 2012; COLEMAN et al., 2008; LIN et al., 2010).

A ALP está envolvida diretamente no processo bioquímico da mineralização, o que torna possível quantificar sua atividade durante esse processo, através de testes bioquímicos. A atividade da ALP tem sido correlacionada ao desenvolvimento do fenótipo osteogênico, tanto *in vitro* como *in vivo*, sendo mais expressa no início da mineralização (de OLIVEIRA et al., 2008; LIN et al., 2010). A atividade da ALP, nas células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1, foi

inferior ao CP nos períodos iniciais – 7 e 10 dias de tratamento. Isso, no entanto, não foi observado nos demais tratamentos. Wennberg et al. (2000) demonstraram que a redução nos níveis da atividade da ALP, mesmo que insignificante, pode ser suficiente para interferir no processo de mineralização. Assim, pelas pesquisas realizadas, sugere-se que as células tratadas com TGF- β 1 não estavam formando mineral e/ou estavam em estágios muito precoces desse processo, diferenciando-se dos demais tratamentos.

A expressão gênica de ALP, nas células sem neutralização de receptores de TGF- β 1, porém tratadas com TGF- β 1, foi menos expressa no 7º dia de tratamento, aumentando sua expressão nos demais períodos. Diferentemente, os demais tratamentos foram superiores ao CP em todos os períodos. No entanto, os resultados sugerem que esse gene ou não foi traduzido ou, ainda, houve atraso entre a replicação do gene e a produção da proteína, já que a expressão proteica de ALP nas células tratadas com TGF- β 1 mostrou-se superior ao CP em um único período – com 10 dias de tratamento, apresentando níveis inferiores nos demais tratamentos e em todos os outros períodos. Casos semelhantes, mostrando esse efeito inibitório do TGF- β 1 em células osteogênicas, foram descritos em estudos prévios (de OLIVEIRA et al., 2008; EHNERT et al., 2010; PALITO et al., 2011; SCHINDELER et al., 2010; SOWA et al., 2002).

A neutralização dos receptores de TGF- β 1 permitiu que células tratadas com TGF- β 1 apresentassem a atividade da ALP semelhante ao CP e aos demais tratamentos, o que foi sugerido pelo reflexo do aumento da expressão gênica depois dos primeiros dias de tratamento. No entanto, a expressão proteica, analisada por Western blotting, não apresentou o mesmo comportamento, expressando níveis proteicos inferiores ao CP nesse mesmo período. Schindeler et al. (2010) avaliaram a ALP em células osteogênicas com bloqueio dos receptores de TGF- β 1, e mostraram que ALP era reprimida, mesmo quando havia o co-tratamento com a BMP-2.

Além da ALP, o início da mineralização necessita da participação de proteínas não colágenas. Sabe-se que a OPN é expressa em diferentes períodos e níveis durante o processo de mineralização (ZOHAR et al., 1998). Isso foi observado na análise da concentração de OPN, pelo método de Elisa, nas células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1. A OPN oscilou seus níveis durante os períodos estudados, comportamento que também foi observado

nos demais tratamentos. Entretanto, na análise da imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina, a OPN foi imunoexpressa em todos os tratamentos, não apresentando diferença na intensidade quando comparada ao CP. Como era esperado, nas células tratadas com TGF- β 1 não se observou a formação de nódulos de mineral, assim como no CN. Dados semelhantes foram descritos, utilizando-se linhagens e culturas primárias, tratadas com TGF- β 1. Elas apresentaram efeito inibitório à maturação dos osteoblastos, impedindo, assim, a formação de nódulos de minerais (DONATO, 2009; SCHINDELER et al., 2010). Palito et al. (2011) mostraram que, apesar do TGF- β 1 inibir a formação de nódulos de mineral, a imunoexpressão de OPN não era alterada com esse tratamento em cultura de células de osso alveolar humano.

A expressão gênica da OPN, nas células sem neutralização dos receptores, foi inferior ao CP na maioria dos tratamentos e períodos estudados, isto é, não houve nenhum grupo suprarregulando esse gene. No entanto, na expressão proteica, a OPN não apresentou diferença significativa em relação ao CP, isso em todos os períodos. Esses dados mostram que a OPN é expressa por células osteoblásticas, independente da formação de nódulos de mineral, fato que pode aumentar os níveis de sua expressão (McKEE; NANJI, 1995; HUNTER et al., 1998), como foi o caso das células tratadas com TGF- β 1+Dex.

Depois de neutralizados os receptores de TGF- β 1, a concentração da OPN foi inferior ao CP apenas nas células tratadas com TGF- β 1, após 14 dias. Nos demais tratamentos e períodos, a concentração de OPN foi semelhante ou superior ao CP. Já a imunoexpressão da OPN nas células com neutralização de receptores, analisada por imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina, assim como nas células sem neutralização, teve distribuição similar e intensa em todos os tratamentos, mas diferenciou-se pela presença de nódulos de mineral, nas células tratadas com TGF- β 1 e no CN. Schindeler et al. (2010) mostraram que células osteogênicas que tinham os receptores de TGF- β 1 bloqueados com SB431542 conseguiam passar da fase de proliferação e diferenciação para a fase de maturação, ou seja, assim como foi observado em nosso estudo, as células com bloqueio dos receptores de TGF- β 1 formavam nódulos de mineral, mesmo quando eram tratadas com TGF- β 1. Entretanto, quando se avaliou a expressão gênica da OPN dessas células, nenhum dos tratamentos suprarregulou a expressão desse gene, com a expressão proteica sendo inferior ao CP em todos os períodos.

Alguns estudos *in vitro* sugerem que a OPN é o principal nucleador da hidroxiapatita durante a mineralização (BIANCO et al., 1993; KAZANECKI et al., 2007). Porém, estudos recentes têm demonstrado que altos níveis de OPN podem ter efeitos inibitórios no processo da mineralização da matriz (ADDISON et al., 2010; BOSKEY et al., 2012; STAINES et al., 2012). Isso leva à inferência que os níveis elevados de OPN, nas células osteogênicas sem neutralização dos receptores de TGF- β 1 tratadas com TGF- β 1, tiveram um efeito inibitório no processo de formação dos nódulos de mineral, o que não foi observado nas células com neutralização de receptores de TGF- β 1 que não ficaram expostas ao efeito de TGF- β 1, passando a regular negativamente a expressão da OPN, diminuindo, assim, tanto a expressão gênica como a proteica, mas permitindo a mineralização *in vitro*, ou, ainda, significando que os nódulos de mineral observados seriam resultantes de nucleação espontânea.

Além da ALP e da OPN, foi analisada a expressão gênica da OC, outra proteína não colágena considerada um marcador osteoblástico muito importante. As células sem neutralização dos receptores de TGF- β 1 tiveram a OC regulada positivamente a partir do 10º dia de tratamento, em células tratadas com TGF- β 1, não sendo infrarregulada em nenhum dos tratamentos, confirmando a maturação dos osteoblastos nesse grupo. Em trabalho anterior do nosso grupo, foram observados, através de microscopia eletrônica de transmissão, nódulos de mineral nas culturas de células osteogênicas tratadas com Dex, bem como a ausência de matriz orgânica e nódulos de mineral quando as células foram tratadas com TGF- β 1 (DONATO, 2009), o qual foi visto, também, na análise da imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina. Com base nesses dados, pode-se inferir que, apesar da alta expressão gênica de OC, esse gene não foi traduzido em proteína, pois a OC é uma proteína que está envolvida em eventos tardios do processo de diferenciação, sendo um marcador das fases finais da diferenciação dos osteoblastos, quando a maturação da matriz se inicia, estando associada fortemente ao cálcio da hidroxiapatita (LIN et al., 2010; NEVE et al., 2013).

Por outro lado, as células com neutralização dos receptores de TGF- β 1 infrarregularam a expressão gênica da OC nas células tratadas com esse fator, assim como nos demais tratamentos. Esses achados são contraditórios à presença de nódulos de mineral observados na imunofluorescência combinada com vermelho de alizarina, sugerindo que os nódulos encontrados possam ser resultado de

nucleação espontânea. Eles foram contraditórios, também, a outros estudos com bloqueio de receptores de TGF- β 1 – usando-se SB431542 em células osteogênicas – que mostraram que as células tratadas com TGF- β 1, além de formarem nódulos de mineral, aumentavam a expressão de genes importantes no processo de mineralização como OC, ON, COLI e ALP (EHNERT et al., 2010; SCHINDELER et al., 2010). No entanto, assim como neste estudo, a marcação obtida pelo vermelho de alizarina não foi confirmada por outra técnica. Além disso, como não foi feita a análise proteica para OC, restam dúvidas a respeito da eficiência do bloqueio escolhido.

Todos esses eventos são orquestrados por fatores de transcrição, que definem o fenótipo e o genótipo dos osteoblastos, que podem ser divididos em proliferação, diferenciação, maturação e apoptose (STEIN et al., 2004). Para avaliar esses aspectos, foram feitas análises da expressão gênica de dois fatores de crescimento envolvidos nessa diferenciação: *Osx* e *Runx2*.

O *Osx* é um fator de transcrição específico dos osteoblastos, responsável por ativar a expressão de vários genes durante a diferenciação (MARIE, 2008; SINHA; ZHOU, 2013). As células osteogênicas sem neutralização de receptores, tratadas com TGF- β 1, regularam positivamente a expressão de *Osx*, a partir do 10º dia. Nos demais tratamentos, a expressão desse gene variou durante os períodos estudados, mas em nenhum momento foi observado o aumento da expressão de *Osx* em relação ao CP. Após a neutralização dos receptores, as células tratadas com TGF- β 1 suprarregularam a expressão de *Osx* nos primeiros períodos – 7 e 10 dias – e não apresentaram diferença significativa aos 14 dias. As células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex, diferentemente do que se observou nas células sem neutralização de receptores, foram superiores ao CP.

Como o *Osx* é regulado pelo *Runx2*, foram feitas as análises da expressão gênica para esse fator de transcrição, também *sem* e *com* neutralização dos receptores. No entanto, as células sem neutralização de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1, não apresentaram diferença na expressão em relação ao CP em todos os períodos e mantiveram-se assim após as neutralização dos receptores, sendo superiores apenas aos 14 dias. Esses dados são importantes para que se entenda a expressão de *Osx*, uma vez que o *Runx2* está localizado *upstream* a *Osx*. Com a neutralização dos receptores de TGF- β 1, a expressão dos genes de transcrição, *Osx* e *Runx2*, não foi alterada. No entanto, eles foram mais expressos que alguns dos

genes codificados, sugerindo que possam estar sendo ativados por diferentes vias de sinalização. Uma das vias que pode interferir diretamente nesses genes de transcrição é a via do TGF- β 1. Na sinalização de TGF- β 1, é o complexo de R-Smads que é translocado para o núcleo, onde se regulam Osx e Runx2 (CHEN et al., 2012; YI et al., 2010). Sendo assim, analisaram-se a expressão gênica de TGF- β 1 e da Smad3.

As células osteoblásticas sintetizam e secretam TGF- β 1 (LIU, 2013). A adição de TGF- β 1 exógeno a essas células, sem a neutralização dos receptores de TGF- β 1, fez com que a expressão de TGF- β 1 fosse regulada negativamente, como foi observado em todos os períodos estudados. Nos demais tratamentos, os níveis da expressão gênica de TGF- β 1 oscilaram durante os períodos. Todavia, em nenhum momento foi observada a regulação negativa desse gene. Com a neutralização dos receptores, as células tratadas com TGF- β 1 só infrarregularam a expressão de TGF- β 1 no 10º dia de tratamento, mantendo níveis semelhantes ao CP nos demais períodos. Os tratamentos com Dex e TGF- β 1+Dex, assim como com TGF- β 1 usado isoladamente, apresentaram os níveis de TGF- β 1 inferiores aos do CP.

A Smad3, membro da família das Smads, é componente essencial na via de sinalização do TGF- β 1, sendo mediadora do *crosstalk* entre as outras vias. A expressão da Smad3, nas células osteogênicas sem neutralização dos receptores, tratadas com TGF- β 1, foi menor que no CP apenas com 10 dias de tratamento, assim como nos demais tratamentos, sem apresentar, entretanto, diferença significativa nos outros períodos. As células com a neutralização dos receptores de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1, infrarregularam a expressão da Smad3 no 10º dia, bem como a Dex e o TGF- β 1+Dex. No entanto, as células tratadas com Dex e TGF- β 1+Dex continuaram expressando níveis inferiores de Smad3 com 14 dias de tratamento, diferentemente das células tratadas apenas com TGF- β 1, que nesse momento suprarregularam a expressão da Smad3. Esses dados sugerem que a Smad3 foi regulada por uma via de sinalização independente da via de TGF- β 1, visto que sua expressão manteve-se inferior ao CP, após a neutralização dos receptores de TGF- β 1.

Apesar de as células sem neutralização de receptores de TGF- β 1 regularem negativamente a expressão de TGF- β 1, especificamente quando tratadas com TGF- β 1 exógeno, a expressão da Smad3, principal componente da via de sinalização de TGF- β 1, só foi inferior ao CP no 10º dia de tratamento. No entanto, as células que

tiveram a neutralização dos receptores de TGF- β 1, tratadas com TGF- β 1, mantiveram a expressão de TGF- β 1 e Smad3 semelhantes durante os períodos estudados. Esses dados reforçam a ideia de alguns autores sobre a independência da Smad3 na via de sinalização do TGF- β 1 (KAJI et al., 2008; LI et al., 1998; SOWA et al., 2002). Contudo, pouco se sabe a respeito de qual seja o verdadeiro papel a Smad3 neste modelo específico de mineralização óssea *in vitro*.

Sendo assim, os resultados confirmam a complexidade da via de sinalização do TGF- β 1, além de trazerem novos questionamentos. Eles mostraram que o efeito inibitório do TGF- β 1 pode ter sido mascarado pela neutralização dos receptores, feita com anti-TGF- β 1, o que levou ao questionamento da eficiência do bloqueio feito com SB431542. No entanto, é necessário um estudo mais aprofundado da MEC formada pelas células osteogênicas, principalmente analisando sua ultraestrutura, seja com neutralização (Anti-TGF- β 1), ou bloqueio (SB431542) dos receptores, para que, dessa maneira, possam ser esclarecidas algumas dúvidas que ainda ficaram pendentes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo *in vitro* permitem concluir que:

- O TGF- β 1 não interferiu no início da diferenciação dos osteoblastos com a neutralização dos receptores de TGF- β 1; porém, não permitiu que eles continuassem o processo e chegassem à fase de maturação, que é marcada pela formação de nódulos de mineral;
- O TGF- β 1 não alterou a expressão gênica dos fatores de transcrição Osx e Runx2 nas células com neutralização de receptores, porém alguns dos genes codificados, tais como ALP, OPN e OC, foram menos expressos;
- O TGF- β 1 diminuiu a expressão de TGF- β 1 em células sem neutralização de receptores, não afetando, no entanto, a expressão de Smad3, mostrando-se independente da via do TGF- β 1.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ABU, E. O.; HOMER, A.; KUSEC, V.; TRIFFITT, J. T.; COMPSTON, J. E. The localization of the functional glucocorticoid receptor alpha in human bone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 85, p. 883-889, 2000.
- ADDISON, W. N.; AZARI, F.; SORENSEN, E. S.; KAARTINEN, M. T.; McKEE, M. D. Pyrophosphate inhibits mineralization of osteoblast cultures by binding to mineral, up-regulating osteopontin, and inhibiting alkaline phosphatase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 15872-15883, 2007.
- ALI, S. Y. Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. **FedProc**, v. 35, p. 135-142, 1976.
- ANDERSSON, O.; REISSMANN, E.; IBÁÑEZ, C. F. Growth differentiation factor 11 signals through the transforming growth factor-beta receptor ALK5 to regionalize the anterior-posterior axis. **EMBO Rep.**, v. 7, p. 831-837, 2006.
- ARANA-CHAVEZ, V. E.; BRADASCHIA-CORREA, V. **Biologia Celular e Tecidual para odontologia – moléculas, células e tecidos**. São Paulo: Elsevier, 2012.
- ARANA-CHAVEZ, V. E.; BRADASCHIA-CORREA, V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, v. 41, p. 446-450, 2009.
- ASOU, Y.; RIRRLING, S. R.; YOSHITAKE, H.; TSUJI, K.; SHINOMIVA, K.; NIFUJI, A.; DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin facilitates angiogenesis, accumulation of osteoclasts, and resorption in ectopic bone. **Endocrinology**, v. 142, p. 1325-1332, 2001.
- BALCERZAK, M.; HAMADE, E.; ZHANG, L.; PIKULA, S.; AZZAR, G.; RADISSON, J.; BANDOROWICZ-PIKULA, J.; BUCHET, R. The roles of annexins and alkaline phosphatase in mineralization process. **Acta Biochem. Pol.**, v. 50, p.1019-1038, 2003.
- BECK, L. S.; DEGUZMAN, L.; LEE, W. P.; XU, Y.; McFATRIDGE, L. A.; GILLET, N. A.; AMENTO, E. P. TGF-beta 1 induces bone closure of skull defects. **J. Bone Min. Res.**, v. 6, p. 1257-1265, 1991.
- BELLAHCÈNE, A.; CASTRONOVO, V.; OGBUREKE, K. U.; FISHER, L. W.; FEDARKO, N. S. Small integrin-binding ligand N-linked glycoproteins (SIBLINGs): multifunctional proteins in cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 212-226, 2008.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BELLOWS, C. G.; AUBIN, J. E. Determination of numbers of osteoprogenitors present in isolated fetal rat calvaria cells *in vitro*. **Developmental Biology**, v. 133, p. 8-13, 1989.

BELLOWS, C. G.; AUBIN, J. E.; HEERCHE, J. N. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed *in vitro*: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. **Bone Miner.**, v. 14, p. 27-40, 1991.

BELOTI, M. M.; 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.

BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; SILVESTRINI, G.; BONUCCI, E.; TERMINE, J. D.; FISHER, L. W.; ROBEY, P. G. Localization of bone sialoprotein (BSP) to golgi and post-Golgi secretory structures in osteoblasts and to discrete sites in early bone matrix. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 41, p.193-203, 1993.

BONUCCI, E. Bone mineralization. **Front. Biosci.**, v. 17, p. 100-118, 2012.

BONUCCI, E. Fine structure of early cartilage calcification. **J. Ultrastruct Res.**, v. 20, p. 33-50, 1967.

BONUCCI, E.; SILVESTRINI, G.; BIANCO, P. Extracellular alkaline phosphatase activity in mineralizing matrices of cartilage and bone: ultrastructural localization using a cerium-based method. **Histochemistry**, v. 97, p. 323-327, 1992.

BOSKEY, A. L.; CHRISTENSEN, B.; TALEB, H.; SORENSEN, E. S. Post-translational modification of osteopontin: effects on *in vitro* hydroxyapatite formation and growth. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 419, p. 333-338, 2012.

BREEN, E. C.; IGNOTZ, R. A.; McCABE, L.; STEIN, J. L.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B. TGF- β alters growth and differentiation related gene expression in proliferating osteoblasts *in vitro*, preventing development of mature bone phenotype. **J. Cell Physiol.**, v. 160, p. 323-335, 1994.

CHAMBERS, T. J.; FULLER, K. How are osteoclasts induced to resorb bone? **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1240, p. 1-6, 2011.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. **Int. J. Biol. Sci.**, v. 8, p. 272-288, 2012.

CHEN, S.; GLUHAK-HEINRICH, J.; WANG, Y. H.; WU, Y. M.; CHUANG, H. H.; CHEN, L.; YUAN, G. H.; DONG, J.; GAY, I.; MacDOUGALL, M. Runx2, osx, and dspp in tooth development. **J. Dent. Res.**, v. 88, p. 904-909, 2009.

CHENG, S. L. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**, v. 134, p. 277-286, 1994.

COLEMAN, R.; BROWN, J.; TERPOS, E.; LIPTON, A.; SMITH, M. R.; COOK, R.; MAJOR, P. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: Clinical evidence and future directions. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, p. 629-639, 2008.

COUBLE, M.-L.; FARGES, J. C.; BLEICHER, F.; PERRAT-MABILLON, B.; BOUDELLE, M.; MAGLOIRE, H. Odontoblast differentiation of human dental pulp cells in explant cultures. **Calcif. Tissue Int.**, 66:129-138, 2000.

COUSSENS, A. K.; HUGHES, I. P.; MORRIS, C. P.; POWELL, B. C.; ANDERSON, P. J. *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.

de ANDRADE SÁ, E. R.; BITENCOURT, B.; ALVARES, E. P.; GAMA, P. In vivo effects of TGFbeta1 on the growth of gastric epithelium in suckling rats. **Regul. Pept.**, v. 1-3, p. 293-302, 2008.

de OLIVEIRA, P. T.; OLIVA, M. A.; MAXIMIANO, W. M. A.; SEBASTIÃO, K. E. V.; CRIPPA, G. E.; CIANCAGLINI, P.; BELOTI, M. M.; NANJI, A.; ROSA, A. L. Effects of a mixture of growth factors and proteins on the development of the osteogenic phenotype in human alveolar bone cell cultures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 56, p. 629-638, 2008.

de OLIVEIRA, P. T.; ZALZAL, S. F.; IRIE, K.; NANJI, A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 51, p. 633-641, 2003.

de OLIVEIRA, P. T.; ZALZAL, S.F.; BELOTI, M. M.; ROSA, A. L.; NANJI, A. Enhancement of *in vitro* osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography. **J. Biomed. Mater. Res. A.**, v. 80, p. 554-564, 2007.

DELAISSE, J. M.; ANDERSEN, T. L.; ENGSIG, M. T.; HENRIKSEN, K.; TROEN, T.; BLAVIER, L. Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoblastic activities. **Microsc. Res. Tech.**, v. 61, p. 504-513, 2003.

DELANY, A. M.; HANKENSON, K. D. Thrombospondin-2 and SPARC/osteonectin are critical regulators of bone remodeling. **J. Cell Commun. Signal.**, v. 3-4, p. 227-238, 2009.

DENHARDT, D. T.; GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **FASEB J.**, v. 7, p. 1475-1482, 1993.

DENHARDT, D. T.; NODA, M.; O'REGAN, A. W.; PAVLIN, D.; BERMAN, J. S. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation tissue remodeling, and cell survival. **J. Clin. Invest.**, v. 107, p. 1055-1061, 2001.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J. Differentiation plasticity regulated by TGF-beta family proteins in development and disease. **Nat. Cell Biol.**, v. 9, p.1000-1004, 2007.

DONATO, T. A. G. **Estudo da influência do fator de transformação de crescimento - beta 1 (TGF- β 1) em cultura de células osteogênicas induzidas com fatores mineralizantes.** 2009. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

DONATO, T. A. G.; ALMEIDA, L. H.; NOGUEIRA, R. A.; NIEMEYER, T. C.; GRANDINI, C. R.; CARAM, R.; SCHNEIDER, S. G.; SANTOS JUNIOR, A. R. Cytotoxicity study of some ti alloys used as biomaterial. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 29, p.1365-1369, 2009.

DUFOUR, C.; HOLY, X.; MARIE, P. J. Transforming growth factor- β prevents osteoblast apoptosis induced by skeletal unloading via PI3K/Akt, Bcl-2, and phosphor-Bad signaling. **Am. J. Physiol. Endocrinol Metab.**, v. 294, p.794-801, 2008.

EHNERT, S.; BAUR, J.; SCHMITT, A.; NEUMAIER, M.; LUCKE, M.; DOOLEY, S.; VESTER, H.; WILDEMAN, B.; STÖCKLE, U.; NUSSLER, A. K. TGF- β 1 as possible link between loss of bone mineral density and chronic inflammation. **PLoS One**, v. 5, p. e14073, 2010.

ESPINA, B.; LIANG, M.; RUSSELL, R. G.; HULLEY, P. A. Regulation of bim in glucocorticoid mediated osteoblast apoptosis. **J. Cell Physiol.**, v. 215, p. 488-96, 2008.

FEDDE, K. N.; LANE, C. C.; WHYTE, M. P. Alkaline phosphatase is an ectoenzyme that acts on micromolar concentrations of natural substrates at physiologic pH in human osteosarcoma (SAOS-2) cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 264, p. 400-409, 1988.

FENG, X. H.; DERYNCK, R. Specificity and versatility in TGF-beta signaling through Smads. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 21, p. 659-693, 2005.

FISHER, L. W.; FEDARKO, N. S. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. **Connect. Tissue Res.**, v. 44, p. 33-40, 2003.

FISHER, L. W.; TORCHIA, D. A.; FOHR, B.; YOUNG, M. F.; FEDARKO, N. S. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein and osteopontin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 280, p. 460-465, 2001.

FRANCESCHI, R. T. Review biological approaches to bone regeneration by gene therapy. **J. Dent. Res.**, v. 84, p. 1093-1103, 2005.

FRANCESCHI, R. T. The role of ascorbic acid in mesenchymal differentiation. **Nutr. Rev.**, v. 50, p. 65-70, 1992.

FRANZÉN, A.; HEINERGÅRD, D. Isolation and characterization of two sialoproteins present only in bone calcified matrix. **Biochem. J.**, v. 232, p. 715-724, 1985.

GANSS, B.; KIM, R. H.; SODEK, J. Bone sialoprotein. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 10; p. 79-98, 1999.

GOLUB, E. E. Biomineralization and matrix vesicles in biology and pathology. **Semin. Immunopathol.**, v. 33, p. 409-17, 2011.

GUNDBERG, C. M. Biology, physiology, and clinical chemistry of osteocalcin. **J. Clin. Ligand Assay**, v. 21, p. 128-138, 1998.

GUO, X.; WANG, X. F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and others pathways. **Cell Res.**, v. 19, p. 71-88, 2009.

HAUSCHKA, P. V.; CARR, S. A. Calcium-dependent alpha-helical structure in osteocalcin. **Biochemistry**, v. 21, p. 2538-2547, 1982.

HAYLOCK, D. N.; NILSSON, S. K. Osteopontin: a bridge between bone and blood. **Br. J. Haematol.**, v. 134, p. 467-474, 2006.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; ten DIJKE, P. TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, p. 465-471, 1997.

HIRATA, A.; SUGAHARA, T.; NAKAMURA, H. Localization of runx2, osterix and osteopontin in tooth root formation in rat molars. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 57, p. 397-403, 2009.

HUGHES, F. J.; COLLYER, J.; STAINFIELD, M.; GOODMAN, S. A. The effects of bone morphogenetic protein-2, -4 and -6 on differentiation of rat osteoblast cells *in vitro*. **Endocrinology**, v. 136, p. 2671-2677, 1995.

HUNTER, G. K.; GOLDBERG, H. A. Modulation of crystal formation by bone phosphoproteins: role of glutamic acid-rich sequences in the nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. **Biochem. J.**, v. 15, p. 175-179, 1994.

ISHIDA, Y.; HEERSCHE, J. N. Progesterone stimulates proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone cell populations derived from adult female but not from adult male rats. **Bone**, v. 20, p. 17-25, 1997.

KAJI, H.; NAITO, J.; INOUE, Y.; SOWA, H.; SUGIMOTO, T.; CHIHARA, K. Stain suppresses apoptosis in osteoblastic cells: role of transforming growth factor-beta-Smad3 pathway. **Horm. Metab. Res.**, v. 40, p. 746-751, 2008.

KARTSOGIANNIS, V.; Ng, K. W. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. **Mol. Cell End.**, v. 228, p. 79-102, 2004.

KASUGAI, S.; ADACHI, M.; OGURA, H. Establishment and characterization of a clonal cell line (RPC-C2A) from dental pulp of the rat incisor. **Arch. Oral Biol.**, New York, v. 33, p. 887-91, 1988.

KATCHBURIAN, E.; ARANA-CHAVEZ, V.E. **Histologia e Embriologia Oral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan-Panamericana, 2012.

KAZANECKI, C. C.; UZWIAK, D. J.; DENHARDT, D. T. Control of osteopontin signaling and function by post-translational phosphorylation and protein folding. **J. Cell Biochem.**, v. 102, p. 912-924, 2007.

KUO, M. Y.; LAN, W. H.; LIN, S. K.; TSAI, K. S.; HAHN, L. J. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. **Arch. Oral Biol.**, New York, v. 37, n. 11, p. 945-952, 1992.

LASCHINGER, C. A.; BELLOWS, C. G.; WASI, S. Modulation of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors by TGF-beta, IL-1 alpha and EGF in fetal rat calvaria cells at different times of culture. **Bone Miner.**, v. 13, p. 23-34, 1991.

LEE, K. L.; AUBIN, J. E.; HEERSCHKE, J. N. beta-glycerophosphate-induced mineralization of osteoid does not alter expression of extracellular matrix components in fetal rat calvarial cell cultures. **J. Bone Miner. Res.**, v. 7, p. 1211-1219, 1992.

LENER, U. H. Osteoclast formation and resorption. **Matrix Biol.**, v. 19, p. 107-120, 2000.

LI, J.; TSUJI, K.; KOMORI, T.; MIYAZONO, K.; WRANA, J. L.; ITO, Y.; NIFUJI, A.; NODA, M. Smad2 overexpression enhances Smad4 gene expression and suppresses CBFA1 gene expression in osteoblastic osteosarcoma ROS17/2.8 cells and primary rat calvaria cells. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 31009-31015, 1998.

LIAN, J. B.; JAVED, A.; ZAIDI, S. K.; LENGNER, C.; MONTECINO, M.; van WIJNEN, A. J.; STEIN, G. S. Regulatory controls for osteoblast growth and differentiation: role of Runx/Cbfa/AML factors. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 14, p. 1-41, 2004.

LIEB, E.; VOGEL, T.; MILZ, S.; DAUNER, M.; SCHULZ, M. B. Effects of transforming growth factor β 1 on bonelike tissue formation in three-dimensional cell culture. II. Osteoblastic differentiation. **Tissue Eng.**, v. 10, p. 1414-1425, 2004.

LIN, L.; DAI, S. D.; FAN, G. Y. Glucocorticoid-induced differentiation of primary cultured bone marrow mesenchymal cells into adipocytes is antagonized by exogenous Runx2. **APMIS**, v. 118, p. 595-605, 2010.

LINDER, C. H.; NARISAWA, S.; MILLÁN, J. L.; MAGNUSSON, P. Glycosylation differences contribute to distinct catalytic properties among bone alkaline phosphatase isoforms. **Bone**, v. 45, p. 987-993, 2009.

LIU, D. D.; ZHANG, J. C.; ZHANG, Q. WANG, S. X.; YANG, M. S. TGF- β /BMP signaling pathway is involved in cerium-promoted osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **J. Cell Biochem.**, v. 114, p. 1105-1114, 2013.

LOBO, S.E.; WYKROTA, F. H.; OLIVEIRA, A. C.; KERKIS, I.; MAHECHA, G. B.; ALVES, H. J. Quantification of bone mass gain in response to the application of biphasic bioceramic and platelet concentrate in critical – size bone defects. **J. Mater. Sci. Mater. Med.**, v. 20, p. 1137-47, 2009.

MARCELLI, C.; YATES, A. J.; MUNDY, G. R. In vivo effects of human recombinant transforming growth factor β on bone turnover in normal mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 5, p. 1087-1096, 1990.

MARIE, P. J. Transcription factors controlling osteoblastogenesis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 473, p. 98-105, 2008.

MARIE, P. J. Signaling pathway affecting skeletal health. **Curr. Osteoporos. Rep.**, v. 10, p. 190-198, 2012.

MARTINEZ, E. F.; ARAUJO, V. C; SOUSA, S. O. M.; ARANA-CHAVEZ, V. E. TGF-beta1 enhances the expression of alpha-smooth muscle actin in cultured human pupal fibroblasts: immunochemical and ultrastructural analyses. **J. Endod.**, v. 33, p. 1313-1318, 2007.

MARTINEZ, E. F.; DONATO, T. A.; ARANA-CHAVEZ, V. E. In vitro effects of ascorbic acid and β -glycerophosphate on human gingival fibroblast cells. **Tissue Cell**, v. 10, p. 190-198, 2012.

MASSA, L. F.; ARANA-CHAVEZ, V. E. Ultrastructural preservation of rat embryonic dental tissues after rapid fixation and dehydration under microwave irradiation. **Eur. J. Oral. Sci.**, v. 108, p. 74-77, 2001.

MASSAGUÉ, J. How cells read TGF-beta signals. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 169-178, 2000.

MASSAGUÉ, J. TGF-beta signal transduction. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 67, p. 753-791, 1998.

McKEE, M. D.; NANJI, A. Osteopontin and the bone remodeling sequence. Colloidal-gold immunocytochemistry of an interfacial extracellular matrix protein. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 760, p. 177-189, 1996.

METZ-ESTRELLA, D.; JONASON, J. H.; SHEU, T.; MROCZEK-JOHNSTON, R. M.; PUZAS, J. E. TRIP-1: A regulator of osteoblast function. **J. Bone Miner. Res.**, v. 27, p. 1576-1584, 2012.

MIYAZAWA, K.; SHINZAKI, M.; HARA, T.; FURUYA, T.; MIYAZONO, K. Two major Smad pathways in TGF-beta superfamily signaling. **Genes Cells**, v. 12, p. 1191-1204, 2002.

NAKASHIMA, M. Establishment of primary cultures of pulp cells from bovine permanent incisors. **Arch. Oral Biol.**, New York, v. 36, n. 9, p. 655-663, 1991.

NANJI, A.; WAZEN, R. M.; ZALZAL, S. F.; FORTIN, M.; GOLDBERG, H. A.; HUNTER, G. K.; GHITESCU, D-L. A tracer study with systemically and locally administered dinitrophenylated osteopontin. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 52, p. 1591-1600, 2004.

NEFUSSI, J. R.; BOY-LEFEVRE, M. L.; BOULEKBACHE, H.; FOREST N. Mineralization *in vitro* of matrix formed by osteoblasts isolated by collagenase digestion. **Differentiation**, v. 29, p. 160-168, 1985.

NEVE, A.; CORRADO, A.; CANTATORE, F. P. Osteocalcin: skeletal and extra-skeletal effects. **J. Cell Physiol.**, v. 228, p. 1149-1153, 2013.

NODA, M. **Cellular and molecular biology of bone**. San Diego: Academic Press, 1993.

NODA, M.; CAMILLIERE, J.J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth-beta. **Endocrinology**, v. 124, p. 2291-2294, 1989.

OGATA, Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. **J. Periodont. Rev.**, v.43, p. 127-135, 2008.

OWEN, T. A.; ARONOW, M.; SHALHOUB, V.; BARONE, L. M.; WILMING, L.; TASSINARI, M. S. et al. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. **J. Cell Physiol.**, v. 143, p. 420-430, 1990.

PALIOTO, D. B.; RODRIGUES, T. L.; MARCHESAN, J. T.; BELOTI, M. M.; de OLIVEIRA, P. T.; ROSA, A. L. Effects of enamel matrix derivative and transforming growth factor- β 1 on human osteoblast cells. **Head Face Med.**, v. 7, p. 7-13, 2011.

PORTER, R. M.; HUCKLE W. R.; GOLDSTEIN, A. S. Effect of Dexamethasone withdrawal on osteoblastic differentiation of bone marrow stromal cells. **J. Cell Biochem.**, v. 90, p. 13-22, 2003.

POUNDARIK, A. A.; DIAB, T.; SROGA, G. E.; URAL, A.; BOSKEY, A. L.; GUNDBERG, C. M.; VASHISHTH, D. Dilatational band formation in bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, p. 19178-19183, 2012.

PURPURA, K. A.; AUBIN, J. E.; ZANDSTRA, P. W. Sustained in vitro expansion of bone progenitors is cell density dependent. **Stem Cells**, v. 22, p. 39-50, 2004.

QUIN, C.; BABA, O.; BUTLER, W. T. Post-translational modifications of SIBLING proteins and their roles in osteogenesis and dentinogenesis. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 15, p. 126-136, 2004.

REINHOLT, F. P.; HULTENBY, K.; OLDBERG, A.; HEINEGARD, D. Osteopontin – a possible anchor of osteoclasts to bone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 4473-4475, 1990.

RODAN, G. A.; NODA, M. Gene expression in osteoblast cells. **Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.**, v. 1, p. 85-98, 1991.

SACHÄCK, L. M.; NOACK, S.; WINKLER, R.; WINßMANN, G.; BEHRENS, P.; WELLMANN, M.; JAGODZINSKI, M.; KRETTEK, C.; HOFFMANN, A. The phosphate

source influences gene expression and quality of mineralization during *in vitro* osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. **PLoS One**, v. 18, e65943, 2013.

SCHINDELER, A.; MORSE, A.; PEACOCK, L.; MIKULEC, K.; YU, N. Y.; LIU, R.; KIJUMNUAYPORN, S.; McDONALD, M. M.; BALDOCK, P. A.; RUYS, A. J.; LITTLE, D. G. Rapid cell culture and pre-clinical screening of a transforming growth factor-beta (TGF-beta) inhibitor for orthopaedics. **BMC Musculoskelet. Disord.**, v. 11, p. 1-9, 2010.

SHALHOUB, V.; CONLON, D.; TASSIARI, M.; QUINN, C.; PARTRIGE, N.; STEIN, G. S.; LIAN, J. B. Glucocorticoids promote development of the osteoblast phenotype by selectively modulating expression of cell growth and differentiation associated genes. **J. Cell Biochem.**, v. 50, p. 425-440, 1992.

SINHA, K. M.; ZHOU X. Genetic and molecular control of osteoblast formation. **J. Cell Biochem.**, v. 114, p. 975-984, 2013.

SODEK, J.; CHEN, J.; NAGATA, T.; KASUGAI, S.; TODESCAN, R. Jr. et al. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 760, p. 223-241, 1995.

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

SODEK, J.; McKEE, M. D. Molecular and cellular biology of alveolar bone. **Periodontol.** 2000, v. 24, p. 99-126, 2000.

SOSNOSKI, D. M.; GAY, C. V. NCX3 is a major functional isoform of the sodium-calcium exchanger in osteoblasts. **J. Cell Biochem.**, v. 103, p. 1101-1110, 2008.

SOWA, H.; KAJI, H.; YAMAGUCHI, T.; SUGIMOTO, T.; CHIHARA, K. Smad3 promotes alkaline phosphatase activity and mineralization of osteoblastic MC3T3-E1 cells. **J. Bone Miner. Res.**, v. 17, 1190-1199, 2002.

STAINES, K. A.; MacRae, V. E.; FARGUHARSON, C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralization and bone remodeling. **J. Endocrinol.**, v. 14, p. 241-255, 2012.

STANDAL, T.; BORSET, M.; SUDAN, A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell, survival and bone remodeling. **Exp. Oncol.**, v. 26, p. 179-184, 2004.

STEIN, G. S.; LIAN, J. B.; van WIJNEN A. J.; STEIN, J. L.; MONTECINO, M.; JAVED, A.; ZAIDI, S. K.; YOUNG, D. W.; CHOI, J. Y.; POCKWINSE, S. M. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. **Oncogene**, v. 23, p. 4315-4329, 2004.

STEITZ, S. A.; SPEER, M. Y., McKEE, M. D., LIAW, L.; ALMEIDA, M.; YANG, H.; GIACHELLI, C. M. Osteopontin inhibits mineral deposition and promotes regression of ectopic calcification. **Am. J. Pathol.**, v. 161, p. 2035-2046, 2002.

TU, Q.; VALVERDE, P.; ZHANG, J.; YANG, P.; CHEN, J. Osterix overexpression in mesenchymal stem cells stimulates healing of critical-sized defects in murine calvarial bone. **Tissue Eng.**, v.13, p. 2431-2440, 2007.

TURKSEN, K.; AUBIN, J. E. Positive and negative immunoselection for enrichment of two classes of osteoprogenitor cells. **J. Cell Biol.**, v. 114, p. 373-384, 1991.

WADA, Y.; KATAOKA, H.; YOKOSE, S.; ISHIZUYA, T.; MIYAZONO, K.; GAO, Y.-H.; SHIBASAKI, Y.; YAMAGUCHI, A. Changes in osteoblast phenotype during differentiation of enzymatically isolated rat calvaria cells. **Bone**, v. 22, p. 479-485, 1998.

WEINSTEIN, S. P.; WILSON, C. M.; PRITSKER, A.; CUSHMAN, S. W. Dexamethasone inhibits insulin-stimulated recruitment of Glut4 to the cell surface in rat skeletal muscle. **Metabolism**, v. 47, p. 3-6, 1998.

WENNBORG, C.; HESSLE, L.; LUNDBERG, P.; MAURO, S.; NARISAWA, S.; LEMER, U. H.; MILLÁN, J. L. Functional characterization of osteoblasts and osteoclasts from alkaline phosphatase knockout mice. **J. Bone Miner. Res.**, v. 15, p. 1879-1888, 2000.

WRANA, J. L. Crossing Smads. **Sci STKE**, v. 23, p. 1-9, 2000.

WRANA, J. L.; KUBOTA, T.; ZHANG, Q.; OVERALL, C. M.; AUBIN, J. E. Regulation of transformation-sensitive secreted phosphoprotein (SPPI/osteopontin) expression by transforming growth factor- β . **Biochem. J.**, v. 273, p. 523-531, 1991.

XU, B.; ZHANG, J.; BREWER, E.; TU, Q.; YU, L.; TANG, J.; KREBSBACH, P.; WIELAND, M.; CHEN, J. Osterix enhances BMSC-associated osseointegration of implants. **J. Dent. Res.**, v. 88, p. 1003-1007, 2009.

YAMADA, T.; KAMIYA, N.; HARADA, D.; TAKAGI, M. Effects of transforming growth factor-beta 1 on the gene expression of decorin, biglycan, and alkaline phosphatase in osteoblast precursor cells and more differentiated osteoblast cells. **Histochem J.**, v. 31, p. 687-694, 1999.

YAMAMOTO, N.; KAZUYUKI F.; HANADA K. Progressive development of the osteoblast phenotype during differentiation of osteoprogenitor cells derived from fetal rat calvaria: model for *in vitro* bone formation. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, p. 509-515, 2002.

YANG, X.; KARSENTY, G. Transcription factors in bone: developmental and pathological aspects. **Trends Mol. Med.**, v. 8, p. 340-345, 2002.

YUN, S. I.; YOON, H. Y.; JEONG, S. Y.; CHUNG, Y. S. Glucocorticoid induces apoptosis of osteoblast cells through the activation of glycogen synthase kinase 3 beta. **J. Bone. Miner. Metab.**, v. 27, p. 140-148, 2009.

ZHAO , H.; OKA, K.; BRINGAS, P. KAARTINEN, V.; CHAI, Y. TGF- β type I receptor Alk5 regulates tooth initiation and mandible patterning in a type II receptor-independent manner. **Dev. Biol.**, v. 320, p. 19-29, 2008.

ZHU, F.; FREIEDMAN, M. S.; LUO, W.; WOOLF, P.; HANKENSON, K. D. the transcription factor osterix (SP7) regulates BMP6-induced human osteoblast differentiation. **J. Cell Physiol.**, v. 227, p. 2677-2685, 2012.

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