

**Efeito do cálcio extracelular na osteogénese através da
regulação do *calcium sensing receptor***

Leonor Cândida Fernandes Figueira de Noronha

Licenciada em Ciências Farmacêuticas

pela Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

**Dissertação submetida para satisfação parcial dos requisitos
do grau de mestre em Engenharia Biomédica**

Faculdade de Engenharia

Universidade do Porto

Dezembro 2005

Dissertação realizada sob a supervisão:

Professor Doutor Mário Adolfo Barbosa (supervisão)

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Laboratório de Biomateriais

Doutora Meriem Lamghari (co-supervisão)

INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Laboratório de Culturas Celulares

Trabalho de Investigação conduzido:

INEB - Instituto de Engenharia Biomédica, Laboratório de Culturas Celulares

IBMC – Instituto de Biologia Molecular e Celular

... em memória do meu pai

Rui César de Noronha

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professor Mário Barbosa, pela honra que me concedeu em aceitar orientar este trabalho e Doutora Meriem Lamghari pelo apoio incondicional ao longo de todo o trabalho, compreendendo a minha limitadíssima disponibilidade, e dando-me sempre força. A ambos estou profundamente grata pelo exemplo de profissionalismo e amizade.

A todo o pessoal do INEB, que me auxiliou no decurso do trabalho experimental, uma equipa excepcionalmente unida e solidária, nomeadamente Ana Paula Filipe, Manuela Brás, Cristina Barrias, Judite Barbosa, Cristina Martins (a minha companheira do turno da noite), Isabel Amaral, Susana Sousa, Pedro Granja, Marta Lima, Ana Paula Pego, Patrícia Cardoso, bem como Maria José Schuller, Susana Carrilho e Sofia Rodrigues.

Gostaria de agradecer à Professora Clara Sá de Miranda o livre acesso concedido na utilização “fora de horas” das instalações e equipamentos do IBMC, bem como ao Daniel Rodrigues, à Isabel Cardoso e à Paula Sampaio o apoio e esclarecimentos nunca negados e indispensáveis à execução de determinadas técnicas.

À Dra. Cristina Santos do Departamento de Bioestatística e Informática da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, pelo apoio prestado na análise estatística dos resultados experimentais.

À minha colega e amiga Irene pela enorme capacidade de partilha. À Isabel Rego, à Milita e à Andreia Malheiro pela ajuda fundamental no aperfeiçoamento da dissertação.

À minha mãe e ao meu irmão, por desejarem que eu alcance sempre mais e ao meu avozinho Francisco que infelizmente já não vai poder ver o trabalho finalizado.

Por fim, ao Emanuel e ao meu marido Arnaldo pelos dias e horas sem conta de companhia no INEB, mas há agradecimentos que as palavras não encerram.

Não quero no entanto terminar sem deixar de expressar a minha admiração por todos aqueles que trabalham com culturas celulares.

Resumo

O osso é um tecido activo que sofre remodelação constante através da acção concertada de osteoclastos, que degradam o osso, e de osteoblastos, que formam novo osso. A osteogénese ou formação de osso *de novo* envolve diferentes etapas da diferenciação osteoblástica, nomeadamente proliferação, maturação e mineralização. O mecanismo molecular que regula a osteogénese não é ainda totalmente conhecido. A identificação e clonagem de um receptor extracelular sensível ao cálcio, denominado por *calcium sensing receptor* ou *CaSR* demonstraram que elevadas concentrações de cálcio extracelular induzem a proliferação e a quimiotaxia dos osteoblastos, através deste receptor.

Duas partes distintas integraram o presente trabalho. A primeira parte pretendeu analisar o efeito de elevadas concentrações de cálcio extracelular na diferenciação dos osteoblastos, através do *CaSR*. Foram realizados ensaios *in vitro*, com exposição de osteoblastos MC3T3-E1 a concentrações elevadas de cálcio, a um agonista do *CaSR* (neomicina) ou a concentrações elevadas de cálcio combinadas com neomicina, por períodos de 24 horas nas diferentes etapas da diferenciação. Foram quantificados os conteúdos de DNA e de proteína total para avaliar a proliferação osteoblástica, e foram determinados marcadores fenotípicos específicos da diferenciação osteoblástica, nomeadamente a actividade enzimática da fosfatase alcalina e a produção de osteocalcina.

Outra parte do trabalho visou a avaliação do efeito apoptótico, mediado pelo *CaSR*, de elevadas concentrações de cálcio extracelular, na diferenciação osteoblástica. Submeteram-se os osteoblastos por períodos de 24 horas, nas mesmas condições utilizadas na primeira parte do trabalho e dosearam-se os níveis de actividade da caspase 3, uma enzima específica da apoptose celular.

Os resultados obtidos demonstraram o efeito positivo de elevadas concentrações de cálcio e do agonista do *CaSR* na proliferação osteoblástica, e o envolvimento do *CaSR* neste processo. A estimulação do receptor na presença de elevadas concentrações de cálcio aumentou significativamente a actividade enzimática da fosfatase alcalina e a produção de osteocalcina. Estes

factos sugerem claramente uma forte sinergia entre o mecanismo de estimulação do *CaSR* e outros mecanismos envolvidos na resposta dos osteoblastos ao cálcio, na estimulação da diferenciação osteoblástica.

Este trabalho permitiu ainda verificar que elevadas concentrações de cálcio (até 20 mM) não aumentam a actividade da caspase 3 dos osteoblastos MC3T3-E1 ao longo dos diferentes estadios de diferenciação, sugerindo que altas concentrações de cálcio não afectam a viabilidade dos osteoblastos. No que respeita à influência da estimulação do *CaSR*, foi demonstrado que não há envolvimento do receptor na apoptose osteoblástica, uma vez que não há influência da estimulação do receptor, na ausência ou na presença de elevadas concentrações de cálcio, na actividade da caspase 3.

Abstract

Bone undergoes constant remodeling through concerted action between osteoclasts which degrade bone, and osteoblasts which form new bone. Osteogenesis or de novo bone formation involves different pathways of osteoblastic differentiation. Molecular mechanisms regulating osteogenesis are not completely known. The identification and cloning of a calcium sensing receptor known as CaSR have enhanced the knowledge that elevated extracellular calcium stimulates osteoblasts proliferation and chemotaxis, occurring this stimulation via CaSR.

The present study is composed of two parts. The first part aimed to analyse the effect of high extracellular calcium through CaSR on osteoblast differentiation. In vitro assays were performed, exposing MC3T3-E1 osteoblasts, at different stages of differentiation, to high calcium concentrations, to CaSR agonist (neomycin) or to high calcium concentrations combined with neomycin for 24 hours. DNA quantification and total protein content were determined to evaluate osteoblast proliferation and osteoblast specific phenotype markers were also determined to evaluate osteoblast differentiation, namely alkaline phosphatase activity and osteocalcin content.

In the second part of this work the apoptotic effect of high calcium concentrations and the possible involvement of CaSR were determined. Osteoblasts cells were exposed for 24 hours under the same conditions used in the first part of the study. Caspase 3 activity, a specific cellular apoptosis enzyme was quantified.

A positive effect of high calcium concentrations on osteoblasts proliferation was observed. This effect was mediated by CaSR. In addition, receptor stimulation in the presence of high calcium concentrations has significantly increased alkaline phosphatase activity and osteocalcin. Altogether, these data may suggest a synergy between CaSR stimulation and other mechanisms involved in osteoblasts high calcium response, on osteoblast differentiation.

On the other hand the exposure of osteoblasts cells to high calcium concentrations (up to 20 mM) does not increase caspase 3 activity. Similar result was obtained when CaSR was stimulated by neomycin in the presence or in the absence of high calcium concentrations. These results suggest that osteoblasts can resist to elevated extracellular calcium through osteoblast differentiation and as far as the receptor stimulation is concerned no involvement of CaSR in osteoblast apoptosis process was stated.

Índice

<i>Agradecimentos</i> -----	v
<i>Resumo</i> -----	vi
<i>Abstract</i> -----	viii
<i>Índice</i> -----	x
<i>Índice de Figuras</i> -----	xiii
<i>Índice de Tabelas</i> -----	xiv
<i>I – Contexto do Trabalho</i> -----	1
<i>II – Fundamentação Teórica</i> -----	3
1 Osso -----	3
1.1 Arquitectura do Osso-----	3
1.2 Textura do Osso-----	6
1.3 Composição do Osso -----	9
1.4 Processos de Ossificação -----	13
1.5 Remodelação Óssea -----	16
2 Osteoblastos -----	18
2.1 Função-----	19
2.2 Diferenciação e Regulação -----	20
2.3 Apoptose-----	27
3 Cálcio -----	30
3.1 Homeostase do Cálcio-----	30
3.2 O Osso e o Cálcio-----	34
4 Receptor extracelular do cálcio -----	37
4.1 Clonagem do Calcium Sensing Receptor-----	37
4.2 Bioquímica do CaSR-----	38
4.3 Agonistas do CaSR -----	39
4.4 O CaSR e o Osso -----	40
<i>III – Materiais</i> -----	43
1 Linha Celular MC3T3-E1 -----	43
2 Reagentes e Kits -----	43
<i>IV – Métodos</i> -----	44

1	Culturas celulares da linha de osteoblastos MC3T3-E1-----	44
1.1	Osteoblastos MC3T3-E1-----	44
1.2	Preparação do meio de cultura completo -----	44
1.3	Iniciação das culturas de MC3T3-E1-----	45
1.4	Multiplicação do número de células-----	45
1.5	Plaqueamento das células-----	46
1.6	Preparação das soluções de cálcio e do agonista do CaSR -----	46
1.7	Tratamento das células MC3T3-E1 -----	47
1.8	Recolha e preparação das amostras-----	48
2	Efeito do cálcio na proliferação dos osteoblastos -----	49
2.1	Quantificação do DNA-----	49
2.2	Doseamento da proteína total -----	52
3	Efeito do cálcio na maturação dos osteoblastos -----	54
3.1	Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina-----	54
3.2	Doseamento da osteocalcina -----	57
4	Efeito do cálcio na mineralização dos osteoblastos -----	59
4.1	Coloração von Kossa-----	59
5	Efeito do cálcio na apoptose dos osteoblastos -----	60
5.1	Doseamento da caspase 3-----	60
6	Análise estatística -----	63
V	<i>Resultados e Discussão</i>-----	64
	Capítulo I-----	64
1	Proliferação e síntese de proteínas-----	64
1.1	Quantificação do DNA-----	65
1.2	Síntese de proteína total-----	67
1.3	Discussão -----	68
2	Maturação da matriz extracelular -----	71
2.1	Actividade Enzimática da PAL -----	71
2.2	Osteocalcina-----	75
2.3	Discussão -----	76
3	Mineralização -----	80
3.1	Coloração “von Kossa” -----	80
3.2	Discussão -----	81
	Capítulo II-----	82

1	Apoptose	82
1.1	Actividade enzimática da caspase 3	82
1.2	Discussão	86
VI	Conclusão e Perspectivas	88
VII	Referências Bibliográficas	91
VIII	Anexos	105

Índice de Figuras

Figura 1. Cortes longitudinais de uma vértebra (A) e de um fémur (B) humanos.....	4
Figura 2. Imagem de corte transversal de osso compacto	5
Figura 3. Diferentes tipos e formas de osso.....	5
Figura 4. Imagem de osso fibroso onde se observam os osteócitos dispersos ao acaso	6
Figura 6. Esquema representando as estruturas arquitectónicas	8
Figura 7: Corte histológico mostrando uma superfície óssea	12
Figura 8. Corte histológico ilustrando o processo de ossificação intramembranar.....	14
Figura 9. Ossificação intracartilaginosa ou endocondral.....	16
Figura 10. Etapas sequenciais do processo de remodelação óssea	17
Figura 11. Esquema representativo do papel central do Cbfa1 na determinação da linhagem das células osteoprogenitoras.....	22
Figura 12. Desenvolvimento osteoblástico. Expressão de proteínas ao longo do tempo.....	24
Figura 13. Esquema tridimensional da enzima fosfatase alcalina	25
Figura 14. Esquema representativo da biossíntese e metabolismo da osteocalcina.....	26
Figura 15. Cascata de activação da apoptose.....	28
Figura 16. Esquema representativo do balanço orgânico diário normal de um adulto	31
Figura 17. Esquema representando a distribuição do cálcio corporal total de um indivíduo adulto.....	32
Figura 18. Esquema representando as respostas do organismo a oscilações na concentração do cálcio plasmático.....	33
Figura 19. Esquema da estrutura topológica do CaSR	38
Figura 20. Câmara de Neubauer Improved.....	46
Figura 21: Esquema representativo do cronograma das experiências realizadas	48
Figura 22. Conteúdo de DNA (ng) das células MC3T3-E1 por poço em diferentes dias de cultura.....	65
Figura 23. Conteúdo de proteína total (µg) das células MC3T3-E1 por ml em diferentes dias de cultura.....	67
Figura 24. Actividade enzimática da PAL (nmol/min/µg DNA) das células MC3T3 em diferentes dias de cultura.....	71
Figura 25. Coloração da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 ao dia 5 de cultura.....	72
Figura 26. Coloração da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 ao dia 12 de cultura.....	73
Figura 27. Coloração da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 ao dia 19 de cultura.....	74
Figura 28. Conteúdo de osteocalcina sintetizada pelas células MC3T3-E1 expressa em ng por µg DNA em diferentes dias de cultura	75
Figura 29. Coloração dos nódulos de mineralização das células MC3T3-E1 ao dia 19 de cultura	80
Figura 30. Actividade enzimática caspase 3 (nmolAMC / h) das células MC3T3 em diferentes dias de cultura.....	83
Figura 31. Actividade enzimática caspase 3 (nmolAMC / h) das células MC3T3 em diferentes dias de cultura.....	85

Índice de Tabelas

Tabela 1. Soluções padrão stock de DNA _____	50
Tabela 2. Soluções padrão de DNA _____	50
Tabela 3. Soluções padrão de BSA _____	53
Tabela 4. Soluções padrão de p-NP _____	55
Tabela 5. Soluções padrão de AMC _____	61

I – Contexto do Trabalho

A remodelação óssea é um processo em que ocorre degradação localizada de osso seguida por deposição em igual quantidade de osso nesse mesmo local. A reabsorção do osso é efectuada por células ósseas denominadas osteoclastos e envolve a remoção dos minerais e a degradação dos constituintes orgânicos da matriz óssea. A formação de osso é realizada por células ósseas denominadas osteoblastos e compreende a produção da matriz orgânica e a sua subsequente mineralização.

Na área circundante dos osteoclastos o cálcio chega a atingir valores na ordem dos 40 mM. Deste modo o cálcio pode proporcionar um sinal aos pré-osteoblastos (células precursoras dos osteoblastos) de maneira a modular as suas respostas fisiológicas, tais como migração e proliferação. Estudos demonstraram que elevadas concentrações de cálcio induzem quimiotaxia e proliferação de osteoblastos [1].

Várias evidências têm demonstrado a existência de um receptor de superfície celular sensível ao cálcio, acoplado à proteína G (*Calcium Sensing Receptor* ou *CaSR*), em linhas celulares osteoblásticas [1,2], na cartilagem e osso de ratos, ratinhos e bovinos [3] nomeadamente em osteoblastos e osteócitos. Ao *CaSR* ligam-se vários catiões, entre os quais cálcio, gadolínio e neomicina, o que origina uma cascata de eventos intracelulares que resultam num aumento de compostos intracelulares cruciais à síntese proteica e à transcrição de genes.

A hipótese do cálcio extracelular poder funcionar como regulador fisiológico do *CaSR* tem ganho muitos adeptos, e a identificação e clonagem do *CaSR* na última década, bem como os esforços na compreensão do seu papel fisiológico representam avanços significativos no conhecimento da patogénese das alterações do metabolismo ósseo, constituindo o *CaSR* um alvo terapêutico promissor para o controlo dessas alterações.

Foi demonstrado que concentrações elevadas, mas fisiológicas, de cálcio, estimulam a quimiotaxia e a proliferação de osteoblastos através do *CaSR* [1].

Este trabalho pretende analisar o efeito de altas concentrações de cálcio nas diferentes etapas da diferenciação osteoblástica, e evidenciar o envolvimento do *CaSR* neste processo. Foram também realizados estudos preliminares, para avaliar o impacto do cálcio e do *CaSR* na apoptose dos osteoblastos.

II – Fundamentação Teórica

1 Osso

O osso é o maior componente do esqueleto adulto humano. O esqueleto humano contém 206 ossos sendo múltiplas as suas funções: sustenta o corpo na posição vertical; mantém a integridade mecânica necessária à locomoção; assegura os processos metabólicos associados à homeostase mineral; protege órgãos internos como os pulmões; encerra o cérebro e a medula óssea, onde se processa a hematopoiese, produzindo e armazenando glóbulos vermelhos, plaquetas e glóbulos brancos.

O tecido ósseo constitui o reservatório de cerca de 99% do cálcio total do organismo, um nutriente essencial por exemplo, para o coração, músculos e nervos. Para além do cálcio, os ossos contêm outros minerais essenciais como fosfatos e sódio [4].

1.1 Arquitectura do Osso

No esqueleto humano é possível reconhecer dois arranjos estruturais do tecido ósseo: osso compacto ou cortical e osso esponjoso ou trabecular (figura1). O primeiro constitui a camada densa e compacta exterior do osso e a segunda tem uma aparência esponjosa decorrente de uma rede de trabéculas no interior do osso.

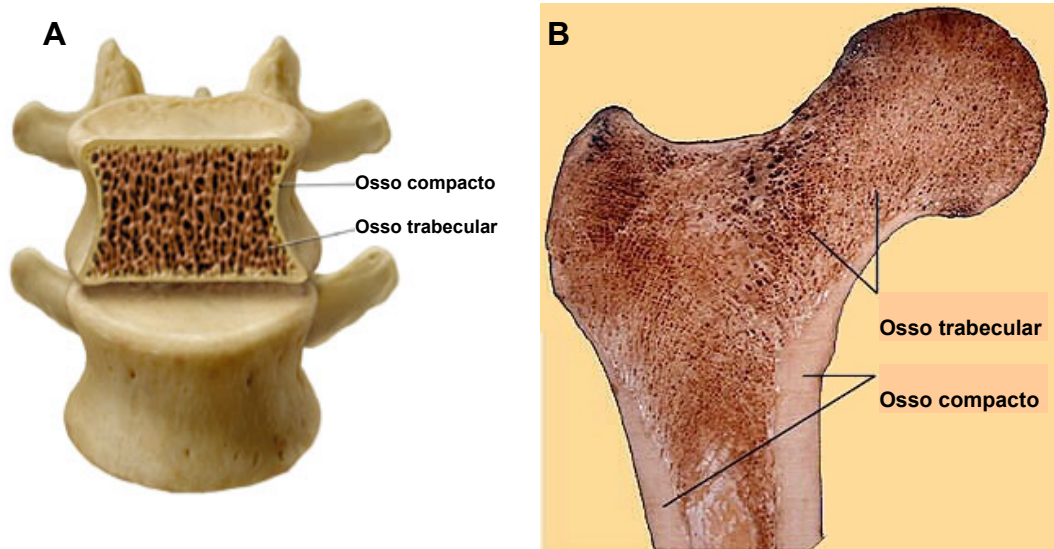


Figura 1. Cortes longitudinais de uma vértebra (A) e de um fêmur (B) humanos. As porções mais externas com uma estrutura compacta ou densa, representam osso compacto e as internas, com as estruturas esponjosas, representam osso trabecular [5].

1.1.1 Osso trabecular ou esponjoso

O osso trabecular representa 10% da massa do esqueleto. É formado por hemi-osteões, a unidade fundamental do osso trabecular [6], que agrupados originam as trabéculas (finas espículas com cerca de 150 μm de diâmetro). As trabéculas encontram-se anastomosadas, formando uma rede tridimensional. Nos espaços entre as trabéculas encontra-se a medula óssea (figura 1).

1.1.2 Osso compacto ou cortical

O esqueleto é na sua maioria, em cerca de 80%, constituído por osso compacto. Este tipo de osso é formado por osteões ou sistemas Haversianos, a unidade fundamental do osso compacto, que consiste num canal central com aproximadamente 50 μm de diâmetro chamado canal Haversiano, rodeado por lamelas concêntricas. Um canal Haversiano contém geralmente um ou dois capilares e fibras nervosas. Os vários canais Haversianos comunicam entre si através de canais perpendiculares, que tomam o nome de canais Volkmann (figuras 2 e 5).

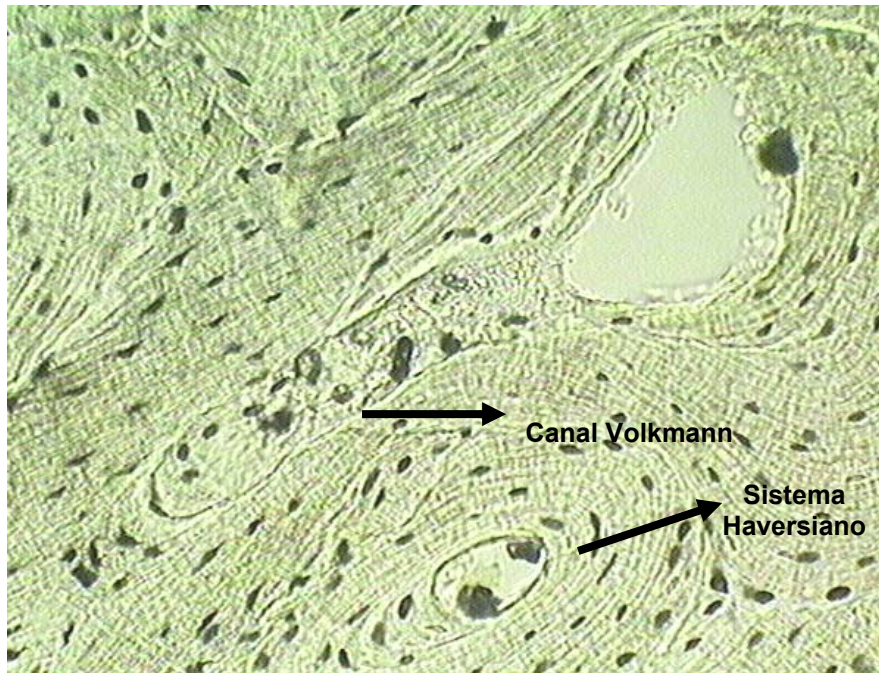


Figura 2. Imagem de corte transversal de osso compacto, onde é possível visualizar sistemas Haversianos e um canal Volkmann [7].

De acordo com a sua forma, os ossos que constituem o esqueleto podem ser longos, curtos, chatos ou irregulares (figura 3). A figura seguinte ilustra os diferentes tipos e formas de osso:

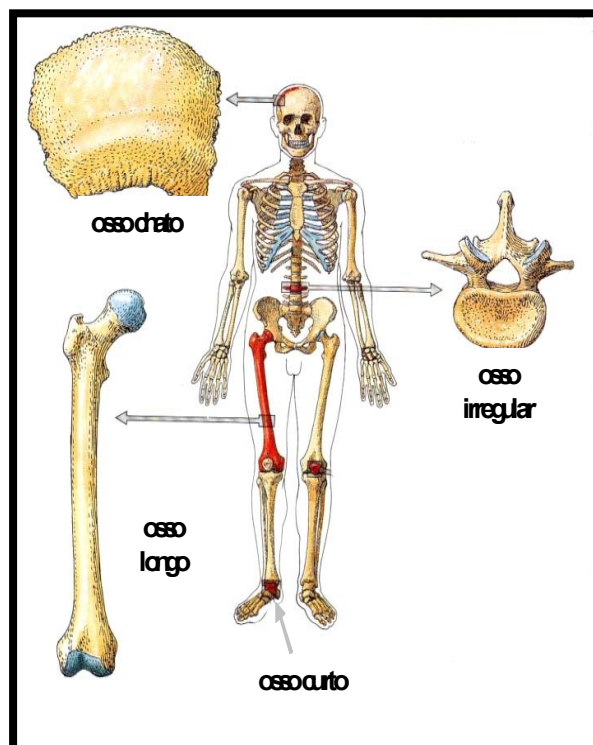


Figura 3. Diferentes tipos e formas de osso (chato: calvaria; irregular: vértebra; longo: fémur; curto: tarso)

1.2 Textura do Osso

Os constituintes base do osso são uma matriz orgânica, uma matriz inorgânica e células ósseas. A disposição e orientação destes constituintes, bem como o modo como se interrelacionam, originam dois tipos de tecido ósseo diferentes na sua textura: osso fibroso ou imaturo e osso lamelar ou maduro. Estas duas estruturas microscópicas podem ser encontradas quer no osso compacto, quer no osso trabecular.

1.2.1 Osso Fibroso ou imaturo

A maior parte do esqueleto do embrião humano é constituída por osso fibroso, também chamado *woven bone*. Este osso é considerado imaturo e caracteriza-se pela disposição entrelaçada das fibrilhas de colagénio orientadas em muitas direcções, exibindo espaços grandes interfibrilhares. A organização espacial das fibrilhas de colagénio no osso fibroso tem sido associada a uma alta taxa de formação de tecido ósseo [8]. Os osteócitos volumosos e numerosos estão presentes nas cavidades osteocitárias grandes e dispersas ao acaso na matriz, sem orientação específica [9] (figura 4).

À excepção dos ossos do ouvido médio, o osso fibroso está normalmente ausente na criança a partir dos quatro anos de idade. Surge também em situações patológicas e também quando há necessidade de reparação rápida do tecido ósseo.

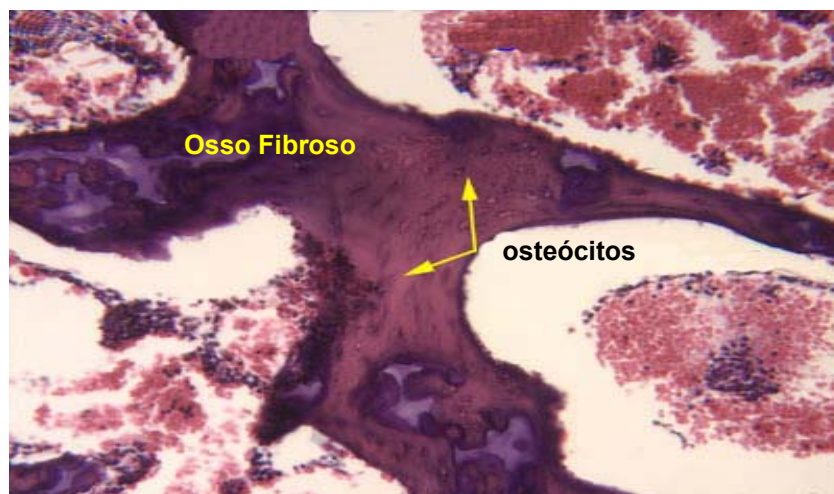


Figura 4. Imagem de osso fibroso onde se observam os osteócitos dispersos ao acaso na matriz óssea [10].

1.2.2 Osso Lamelar ou maduro

O tecido ósseo do adulto é caracterizado por uma textura lamelar. Os osteócitos estão alinhados de uma forma regular, nas cavidades osteocitárias achatadas e de pequena dimensão.

No osso lamelar as fibrilhas de colagénio estão ordenadas paralelamente em lamelas. As fibrilhas de colagénio pertencentes a lamelas adjacentes estão dispostas obliquamente. Imediatamente antes do perióstio e do endóstio encontram-se algumas lamelas, que tomam o nome de lamelas circunferenciais externas e internas (figuras 5 e 6).

Esta estrutura lamelar assegura a resistência mecânica do tecido ósseo e também a sua elasticidade. Uma vez desaparecida esta estrutura, mesmo que esteja muito mineralizado, o osso fica frágil [9].

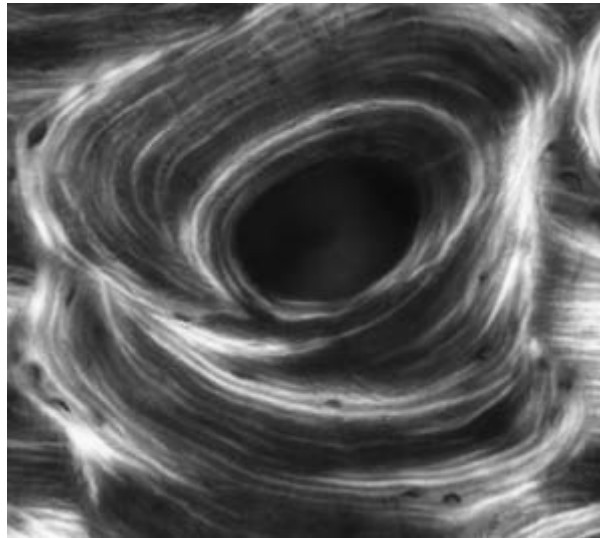


Figura 5. Imagem de osso lamelar de microscópio de luz polarizada onde é possível observar as lamelas circunferenciais organizadas em torno do sistema Haversiano [11].

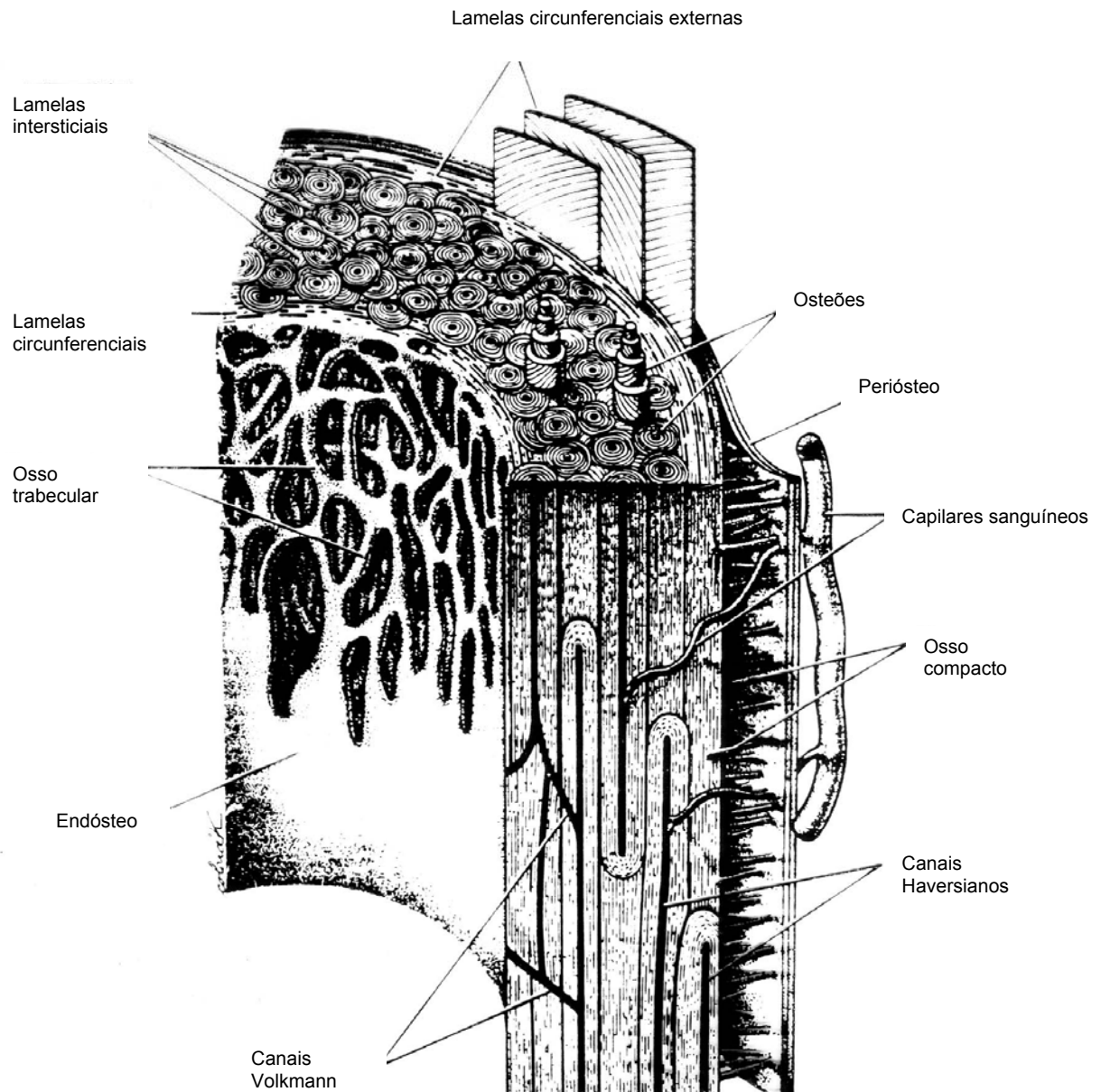


Figura 6. Esquema representando as estruturas arquitetônicas (osso trabecular e osso compacto onde se observam os canais haversianos e volkman e os capilares que o irrigam), as texturas (osso fibroso e osso lamelar) e as superfícies (lamelas circunferenciais internas e externas, lamelas intersticiais, endóstio e perióstio) presentes no osso [12].

1.3 Composição do Osso

Como já foi referido anteriormente o osso integra uma matriz inorgânica ou mineral, uma matriz orgânica, células e água.

1.3.1 Matriz Inorgânica

A matriz inorgânica do osso é constituída por uma malha cristalina de apatite lacunar, composta por fosfato de cálcio carbonado, que se assemelha a uma hidroxiapatite cristalina imperfeita $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$, uma vez que a relação molar cálcio/fósforo é inferior a 1,67 e os cristais podem conter outros constituintes, principalmente nas camadas superficiais, para além dos iões cálcio e fosfato, nomeadamente iões citrato e potássio e oligoelementos (zinco, ferro, bromo, bário,...). Os cristais minerais têm formas e dimensões variadas e associam-se às fibrilhas de colagénio, orientando-se paralelamente ao eixo das mesmas [\[13,14,15,16,17\]](#).

1.3.2 Matriz Orgânica

A matriz orgânica é formada maioritariamente por colagénio tipo I, por proteoglicanos, por proteínas não colagénicas (osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína, trombospondina e proteínas séricas) e por citoquinas (interleuquinas, factores de crescimento, prostangladinas,...).

As fibrilhas de colagénio tipo I representam cerca de 90% da matriz [\[18,19\]](#) e estão associadas a uma substância fundamental interfibrilhar. Esta substância, que representa 10% da matriz orgânica é formada por proteínas não colagénicas [\[20,21,22\]](#), nomeadamente proteoglicanos, osteocalcina, sialoproteínas e outras glicoproteínas, que foram já isolados e caracterizados [\[23\]](#).

A substância interfibrilhar integra também compostos envolvidos na regulação óssea: as citoquinas, que são sintetizadas pelos osteoblastos (células formadoras de osso) ou obtidas da circulação sanguínea; o factor de

crescimento TGF- β (transforming growth factor β); certas proteínas da mesma família que o TGF- β , as proteínas morfogenéticas do osso ou BMPs (bone morphogenetic proteins).

1.3.2.1 Células do Osso

O osso é um tecido complexo que contém dois tipos de células: os osteoblastos que são as células formadoras do osso e os osteoclastos que são as células que degradam o osso.

As células da linhagem osteoblástica compreendem as células osteoprogenitoras, os osteoblastos, os osteócitos e as células achatadas do osso ou bone lining cells. Os osteoclastos têm origem noutra linhagem celular, a dos monócitos-macrófagos.

As células osteoprogenitoras provêm das células mesenquimais pluripotentes, podendo encontrar-se no estroma medular, no perióstio (superfície externa de todos os ossos) e no endóstio (superfície interna do osso compacto). As células osteoprogenitoras diferenciam-se posteriormente em pré-osteoblastos, os precursores directos dos osteoblastos [24].

Os osteoblastos estão localizados nas superfícies ósseas (figura 7) e são as células responsáveis pela formação do osso, através da síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea ou osteóide. Para além de segregarem o osteóide, os osteoblastos actuam indirectamente na sua mineralização [25]. Após um período de intensa secreção, estima-se que cerca de 5% dos osteoblastos activos vão gradualmente ficando com uma forma achatada tornando-se *bone lining cells*, que 30% fiquem aprisionados na matriz óssea originando os osteócitos e que cerca de 65% morram por apoptose ou morte celular programada [26]. Informação mais detalhada sobre os osteoblastos será fornecida no Capítulo 2, dedicado inteiramente a este tipo de células.

Os osteócitos são as células mais numerosas no osso maduro e têm um tempo de semi-vida de aproximadamente vinte e cinco anos [27]. A transformação de osteoblasto com mobilidade, a osteócito aprisionado dura cerca de três dias, tempo durante o qual a célula produz um volume de matriz extracelular três vezes superior ao seu próprio volume celular [28]. Os

osteócitos têm uma forma estrelada [29] e ocupam lacunas da matriz calcificada (figura 7), estabelecendo conexões citoplasmáticas, tipo “gap junctions” com as células adjacentes. Estas conexões estendem-se através dos canalículos. O sistema lacunocanalicular permite, de uma forma limitada, a difusão de nutrientes e de metabolitos entre os osteócitos vizinhos, as *bone lining cells*, os osteoblastos e os vasos sanguíneos [30]. Crê-se que os osteócitos funcionem como sensores mecânicos do osso [31], e que a transmissão de sinais mecânicos possa ocorrer quer directamente através da matriz sólida, quer indirectamente através de variações de pressão no fluído do sistema lacunocanalicular [30]. Parece ser este o sistema ideal para a transferência de sinais exógenos e endógenos, através de mecanismos mecânicos, eléctricos e químicos. Os processos de libertação de segundos mensageiros, de factores de transcrição e finalmente de expressão génica, estão ainda longe de ser esclarecidos e constituem actualmente objecto de muitas investigações [32].

As *bone lining cells* encontram-se, como o nome indica, achatadas contra as superfícies ósseas em fase de repouso. Quando vistas ao microscópio electrónico exibem poucos organelos e o seu citoplasma encontra-se estendido ao longo da superfície óssea, não formando no entanto uma camada contínua, uma vez que são visíveis, muitos espaços entre elas [33]. As *bone lining cells* são células que evitaram a sua captura nas lacunas (espaços da matriz óssea onde ficam aprisionados os osteócitos) e que perderam a sua proeminente função de síntese [34], podendo dizer-se que são osteoblastos inactivos. Por outro lado e segundo alguns autores, as *bone lining cells* desempenham um papel na coordenação da reabsorção e da formação do osso, na medida em que estudos sugeriram que estas participam, juntamente com as metaloproteínas da matriz óssea, na remoção do colagénio deixado pelos osteoclastos nas lacunas de Howship [35].

Os osteoclastos são as células responsáveis pela reabsorção óssea, que constitui um processo do qual a remodelação fisiológica do esqueleto do adulto humano está estritamente dependente [36]. Os osteoclastos derivam das células hematopoiéticas da medula óssea e a sua diferenciação é comum à da linhagem dos monócitos-macrófagos. No entanto, os seus últimos passos de

diferenciação ocorrem já na superfície óssea, estando já bem definidos [37]. Ao longo da diferenciação osteoclástica, a produção de uma isoenzima tartarato resistente da fosfatase ácida (TRAP) e a presença de numerosos receptores de calcitonina, constituem os critérios de identificação do fenótipo osteoclástico. Antes dos osteoclastos poderem cumprir a sua função fisiológica, a da reabsorção óssea, os seus percursores, os pré-osteoclastos, têm que migrar para o local onde esta vai ocorrer, e aí se vão fundir, dando origem a células multinucleadas (figura 7). Os então osteoclastos maduros tornam-se funcionantes após a polarização e ligação à superfície óssea. Os osteoclastos em actividade apresentam características de uma célula polarizada, na qual o pólo basal, em contacto com a superfície óssea, apresenta uma estrutura membranar particular, chamada bordadura em escova, que consiste em prolongamentos e invaginações citoplasmáticas (figura 7). De um lado e de outro desta bordadura, o citoplasma apresenta uma zona pobre em organelos mas rica em filamentos de actina, denominada “zona clara”. A este nível a membrana plasmática está estritamente ligada à superfície óssea formando pontos de forte aderência, que delimitam o espaço de reabsorção, as lacunas de Howship.

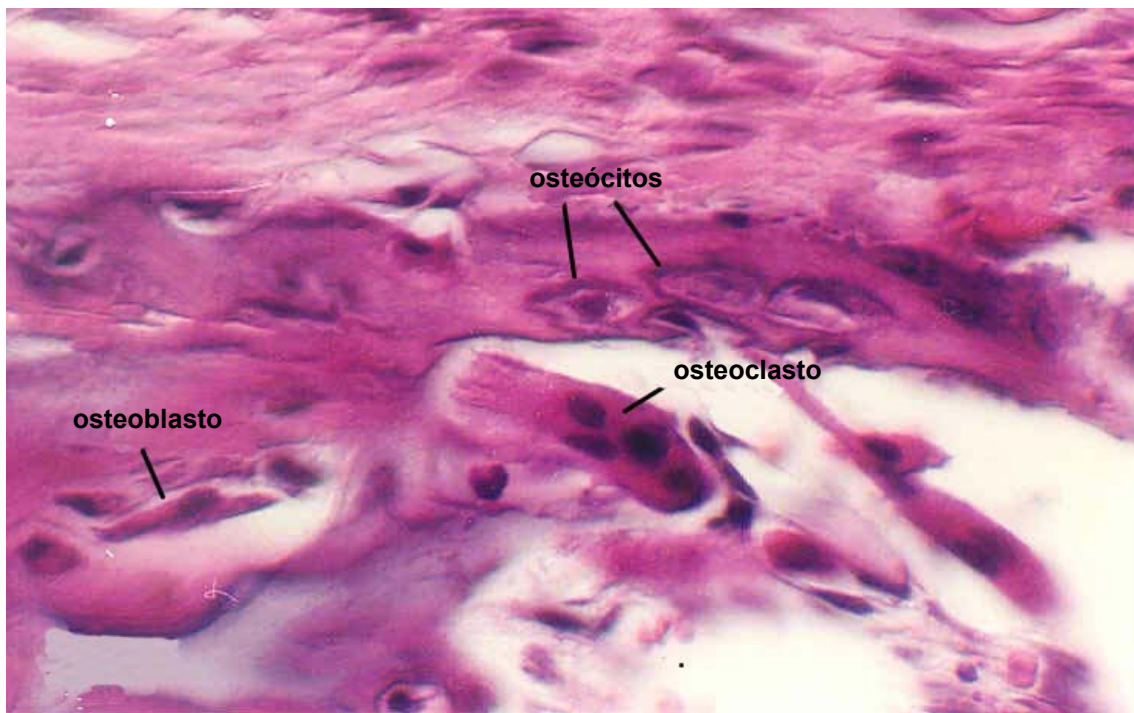


Figura 7: Corte histológico mostrando uma superfície óssea onde se visualizam diferentes tipos de células ósseas (osteoblastos, osteócitos e osteoclastos) [38].

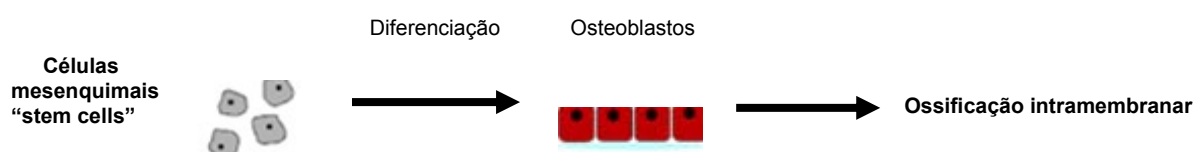
A diferenciação osteoclástica está sob o controle de vários factores. As células precursoras sofrem diferenciação quando estimuladas pelo factor de estimulação das colónias granulócitos-macrófagos (GM-CSF) e pelo RANKL (ligando activador do receptor NF- κ B). O recrutamento é inibido pelo factor de transformação do crescimento β (TGF- β) e pelos estrogénios. O osteoclasto maduro é estimulado pela hormona paratiróide (PTH) e a interacção entre esta e a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, o metabolito activo da vitamina D_3 , parece crucial para a função osteoclástica [39,40]. Os osteoblastos têm um papel importante na diferenciação e actividade osteoclásticas, através da produção de um grande número de citocinas e de factores de crescimento, nomeadamente do GM-CSF e do RANKL.

1.4 Processos de Ossificação

A formação de osso, osteogénese ou ossificação, é o mecanismo pelo qual os ossos se formam durante o desenvolvimento embrionário e pelo qual se inicia a formação de osso, por exemplo, na reparação duma fractura óssea. A ossificação pode dividir-se em dois processos distintos: o primeiro tem o nome de ossificação intramembranar ou directa, através do qual são formados os ossos chatos como a mandíbula e o calvaria, e o segundo, ossificação endocondral ou indirecta, através do qual são formados os ossos longos, as vértebras, os ossos pélvicos e os ossos da base do crânio.

1.4.1 Ossificação Intramembranar

O processo de ossificação intramembranar ocorre por diferenciação directa das células mesenquimais em osteoblastos:



Este processo inicia-se pela condensação do mesênquima que se torna altamente vascularizado. Algumas células mesenquimais diferenciam-se em osteoblastos, iniciando a formação de espículas de osso (trabéculas) com organização aleatória de colagénio (osso imaturo). A formação de osso compacto vai ocorrer por compactação das trabéculas (figura 8).

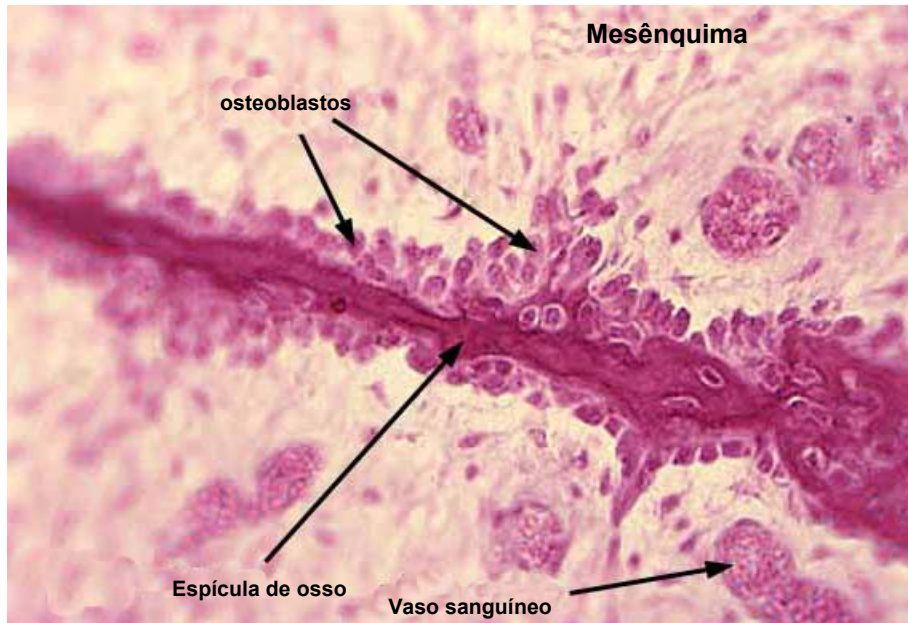
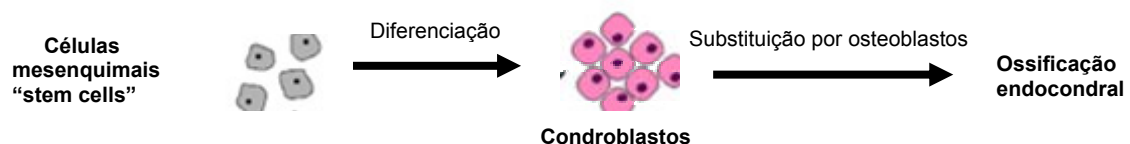


Figura 8. Corte histológico ilustrando o processo de ossificação intramembranar: algumas células mesenquimais transformam-se em osteoblastos [41].

1.4.2 Ossificação intracartilaginosa ou endocondral

A ossificação endocondral ocorre nos ossos longos, curtos e irregulares, e envolve a formação de cartilagem a partir da agregação de células mesenquimais, e a subsequente substituição do tecido cartilágneo por osso:



Este processo inicia com a indução por factores parácrinos das células do mesênquima a expressarem factores de transcrição, que se pensa actuarem na activação de genes específicos da cartilagem. As células mesenquimais condensam-se em nódulos compactos e diferenciam-se em condrócitos

(células da cartilagem). Os condrócitos proliferam rapidamente e formam um modelo de cartilagem e ao dividirem-se segregam uma matriz extracelular específica da cartilagem. Numa fase seguinte, os condrócitos cessam a proliferação, aumentando significativamente o seu volume, tornando-se condrócitos hipertróficos. Estes, vão alterar a composição da matriz que segregam, o que vai permitir a sua mineralização. De seguida, ocorre a formação de uma camada fina de osso entre o perióstio e o limite do modelo de cartilagem. Uma vez que, como consequência da mineralização da matriz extracelular, deixa de haver difusão de oxigénio, de nutrientes e de produtos resultantes da degradação celular, os condrócitos vão morrer por apoptose deixando um esqueleto de cartilagem calcificada. Vai então haver uma invasão pelo perióstio de capilares sanguíneos, que penetram na cavidade medular da camada fina de osso. Desta forma é permitida a entrada de células osteoprogenitoras e de células hematopoiéticas no modelo cartilagíneo e estas últimas vão formar medula óssea. Algumas células do perióstio transformam-se em osteoblastos e iniciam a deposição de osso trabecular [\[42\]](#) (figura 9).

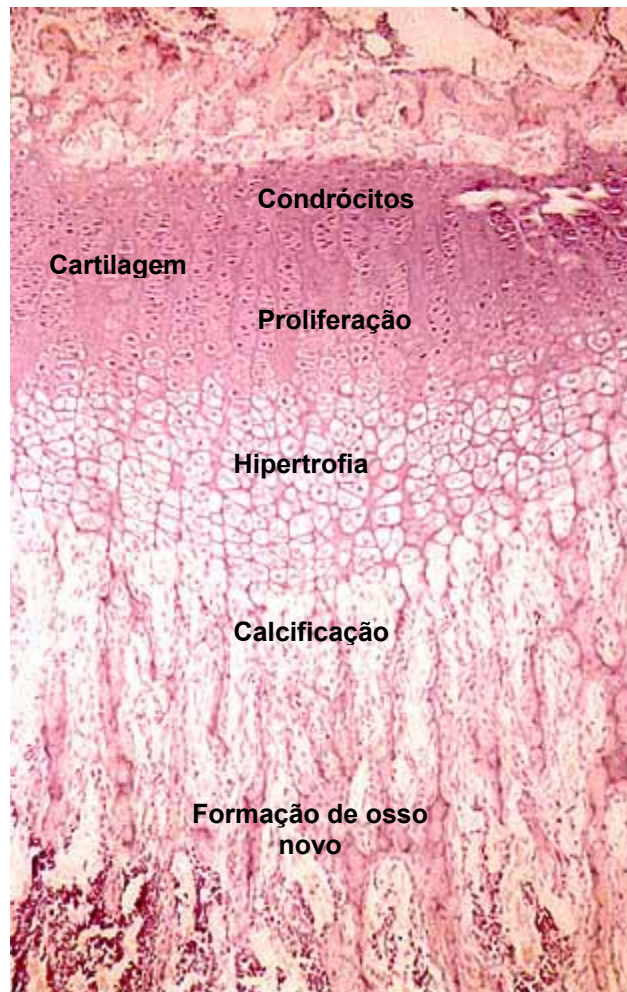


Figura 9. Ossificação intracartilaginosa ou endocondral [43].

1.5 Remodelação Óssea

Desde o trabalho pioneiro de Frost [27,44] que se tornou genericamente aceite que o tecido ósseo se vai regenerando ao longo da vida por actuação de unidades básicas multicelulares (BMUs), que são grupos de osteoclastos e osteoblastos que actuam coordenadamente para reabsorver osso e, subsequentemente preencher as lacunas deixadas com novo tecido ósseo. A remodelação óssea é um fenómeno cíclico que permite substituir osso velho por osso novo, de maneira a tornar possível a manutenção de funções mecânicas e metabólicas do osso.

As BMUs movem-se literalmente ao longo do tecido ósseo existente durante o processo de remodelação óssea, e em cujo ciclo completo se sucedem diferentes etapas [6], que se esquematizam na figura seguinte:

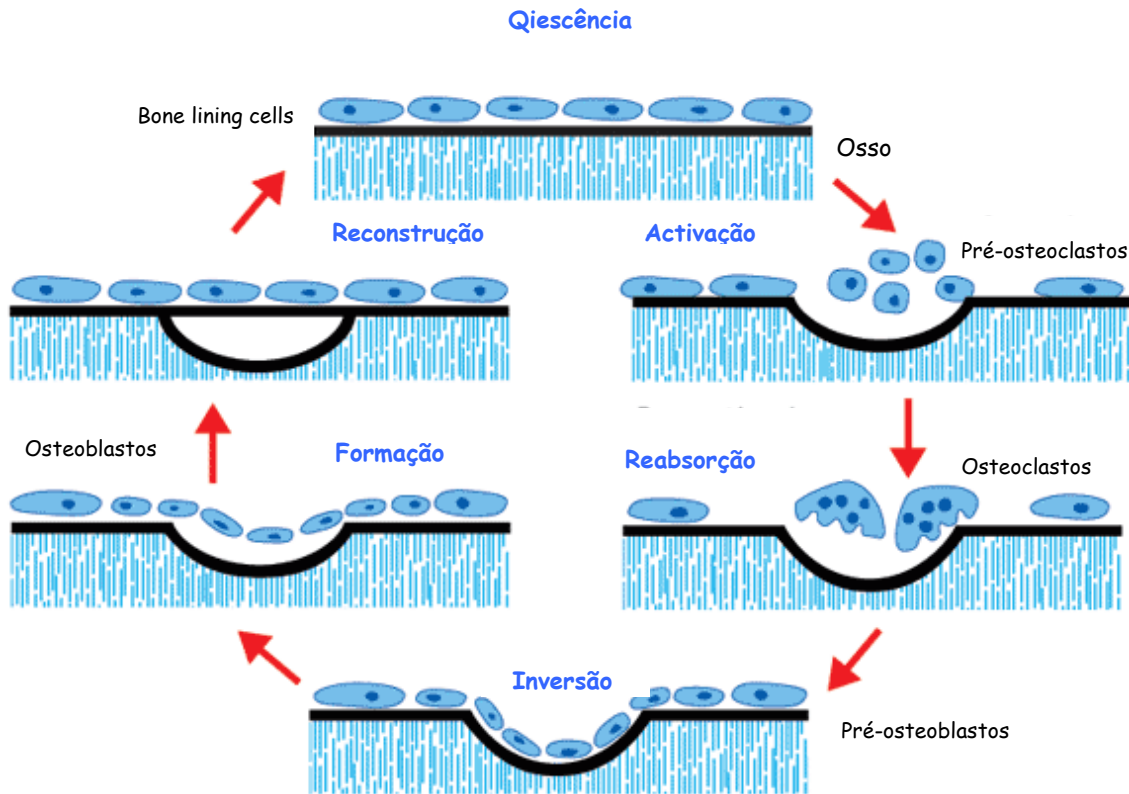


Figura 10. Etapas sequenciais do processo de remodelação óssea: quiescência, activação, reabsorção, inversão, formação e reconstrução [45].

A superfície óssea em repouso revestida pelas *bone lining cells* é activada por efeito de diversos estímulos hormonais, locais e mecânicos [46,47]. Esta fase de activação é caracterizada pela retracção das *bone lining cells* e pelo recrutamento dos pré-osteoclastos, que se fundem originando os osteoclastos. Segue-se a fase de reabsorção, na qual os osteoclastos cavam lacunas ao longo da superfície do osso trabecular. À fase de reabsorção sucede-se a fase de inversão, no decorrer da qual os pré-osteoblastos migram para as lacunas escavadas pelos osteoclastos. Os então osteoblastos numa fase seguinte de formação, vão sintetizar um conjunto de proteínas da matriz óssea, conhecido como osteóide que vai preencher as lacunas. O osteóide vai sofrer mineralização na chamada fase de reconstrução e a superfície óssea retorna ao estado de repouso ou de quiescência.

O modo como os osteoclastos e os osteoblastos, células completamente diferentes na origem e função, são capazes de colaborar para produzir os (hemi-) osteões não foi ainda decifrado, tendo sido já avançadas algumas

teorias explicativas. A teoria desenvolvida por Rodan e Martin em 1981 defende que os osteoblastos são capazes de instruir os osteoclastos, de quando e onde reabsorver osso e portanto de determinar quer a fase anabólica quer a fase catabólica da remodelação óssea. Esta teoria é baseada em dados experimentais segundo os quais os osteoblastos expressam receptores hormonais e produzem moléculas sinal, regulando a actividade osteoclástica [\[48,49,50\]](#).

Um segundo conceito, o de emparelhamento, defende que após a reabsorção estar concluída, a superfície do osso remanescente atrai osteoblastos, possivelmente pela libertação de factores de crescimento da matriz [\[51,52\]](#). Uma recente modificação deste conceito propõe que os pré-osteoblastos e os pré-osteoclastos são subsequentemente recrutados pelo endotélio do capilar da BMU em progressão [\[53\]](#).

Em condições fisiológicas normais, durante a fase de crescimento, a formação de osso é superior à reabsorção óssea. Na fase adulta, por volta dos 20 anos de idade, o balanço da remodelação ao nível das BMUs é teoricamente nulo, ou seja, a quantidade de osso formado é igual à quantidade de osso reabsorvido [\[54\]](#). Porém, pode haver um desequilíbrio neste balanço na presença de certas patologias, como na osteoporose e também com o envelhecimento, na medida em que a taxa de reabsorção vai ultrapassando a de formação óssea, resultando numa perda de densidade mineral óssea, num enfraquecimento progressivo dos ossos e conseqüentemente num risco acrescido de fracturas ósseas, nomeadamente do colo do fémur e da bacia.

2 Osteoblastos

Os osteoblastos derivam das células osteoprogenitoras existentes na medula óssea, no endóstio e no perióstio. São células cubóides com um núcleo redondo, encontrando-se habitualmente em monocamadas aderentes às superfícies ósseas, perióstio e endóstio [\[55\]](#).

2.1 Função

Os osteoblastos desempenham um papel central na criação e manutenção da arquitectura do osso, actuando em duas vertentes. São responsáveis pela deposição de matriz óssea e pela sua mineralização e regulam a diferenciação e a actividade dos osteoclastos. Adicionalmente, como resultado da sua capacidade de regular a actividade osteoclástica, desempenham de um modo indirecto um papel importante na homeostase do cálcio [56].

Uma vez que a principal função dos osteoblastos é segregar osteóide, os osteoblastos activos apresentam um complexo de Golgi e um retículo endoplasmático rugoso abundantes, estruturas intracelulares indispensáveis à produção de proteínas. O colagénio tipo I é a maior proteína produzida pelos osteoblastos representando cerca de 90% da matriz orgânica. A rede das fibrilhas de colagénio providencia a estrutura onde o osso mineral se vai depositando.

Os osteoblastos também produzem factores de crescimento e citoquinas, incluindo o factor de crescimento β ou TGF- β , os factores de crescimento insuline-like ou IGFs, os factores de crescimento dos fibroblastos ou FGFs e os factores de crescimento derivados das plaquetas ou PDGF [57]. As proteínas não colagénicas, incluindo proteoglicanos, glicoproteínas e proteínas γ -carboxiladas (Gla) são igualmente sintetizadas pelos osteoblastos [25]. Estas interagem entre si e com o colagénio tipo I para formar o osteóide.

Os osteoblastos não segregam apenas os compostos orgânicos da matriz, sendo também indirectamente responsáveis pela mineralização do osteóide. As proteínas da matriz funcionam provavelmente como núcleos de mineralização auxiliando a iniciação da formação dos cristais de hidroxiapatite. São os osteoblastos que produzem as enzimas que regulam a fosforilação, de que é exemplo a fosfatase alcalina [25].

Outra função essencial dos osteoblastos é a regulação da diferenciação e da actividade dos osteoclastos. Por um lado segregam factores de estimulação de colónias de macrófagos e por outro, têm uma proteína de superfície celular,

o ligando activador do receptor NF- κ B ou RANKL, que se liga ao seu receptor RANK nos pré-osteoclastos originando a sua fusão em osteoclastos [58]. A osteoprotegerina é uma proteína segregada pelos osteoblastos e que tem afinidade para o RANKL (competindo com o seu ligando e desse modo mascarando-o), inibindo assim a diferenciação osteoclástica. Certos agentes osteotrópicos como a PTH também influenciam a regulação osteoclástica ao elevarem a expressão de RANKL nos osteoblastos. A expressão do RANKL regula simultaneamente a diferenciação e a actividade osteoclásticas, pois para além de se ligar ao RANKL dos pré-osteoclastos, liga-se ao RANKL dos osteoclastos estimulando a reabsorção óssea [59].

2.2 Diferenciação e Regulação

Dada a variedade e importância dos processos biológicos em que os osteoblastos participam durante o desenvolvimento embrionário e no período pós-natal, torna-se muito importante perceber os mecanismos moleculares que regulam a sua função e diferenciação.

As células da medula óssea são altamente regenerativas, contendo células com capacidade de proliferar e de formar diferentes tecidos, entre os quais o osso. Isso deve-se à existência de células indiferenciadas mesenquimais pluripotentes ou stem cells, capazes de originar células com fenótipos diferentes, tais como fibroblastos, adipócitos, células reticulares ou células osteoprogenitoras, sobre o controle de factores de crescimento locais ou de hormonas sistémicas [60,61].

Em 1909, Alexander Maximov foi o primeiro a sugerir a existência de stem cells, morfológicamente semelhantes aos linfócitos, capazes de migrar através do sangue até micronicos que lhes permitiriam proliferar e diferenciar, de acordo com etapas específicas [62].

A diferenciação destas células mesenquimais em linhas celulares distintas ocorre durante o desenvolvimento embrionário, e depende das influências ambientais e de sinais moleculares, que iniciam uma cascata de activação de

genes, originando por fim uma célula madura, responsável pela origem dum tecido específico. Neste sentido foram já identificados master genes responsáveis pelo controle da miogénese, adipogénese e osteogénese.

A regulação da diferenciação osteoblástica é determinada pela expressão do Cbfa 1 (core binding factor $\alpha 1$). A deficiência em Cbfa 1 em ratinhos afecta osteoblastos, condrócitos e osteoclastos e provoca múltiplos defeitos na formação óssea, nomeadamente as ausências de nódulos de mineralização, de vascularização da cartilagem e de factor de diferenciação osteoclástica RANKL, que origina uma deterioração nos padrões de diferenciação dos osteoclastos [63]. O Cbfa 1, também chamado *Pebp2 α A* (polyoma enhancer binding protein) ou *Runx2* (runt-related gene 2) é um factor de transcrição que desempenha um papel muito importante na determinação da linhagem das células osteoprogenitoras, ao induzir a diferenciação osteoblástica e ao inibir a diferenciação dos adipócitos. Para além disso, controla a produção das proteínas na matriz óssea (BMPs) pelos osteoblastos, é um indutor da maturação dos condrócitos e controla a produção de BMPs pelos condrócitos hipertróficos [64] (figura 11).

O Cbfa 1 tem a capacidade de induzir marcadores de diferenciação osteoblástica, precoces e tardios, tais como fosfatase alcalina, colagénio tipo I, osteopontina, sialoproteína do osso e osteocalcina, em várias linhas celulares e em fibroblastos [64].

Nas células osteoprogenitoras o Cbfa1 tem pouca expressão, atingindo o seu máximo de expressão durante a diferenciação osteoblástica, encontrando-se porém reprimido nos osteócitos [63].

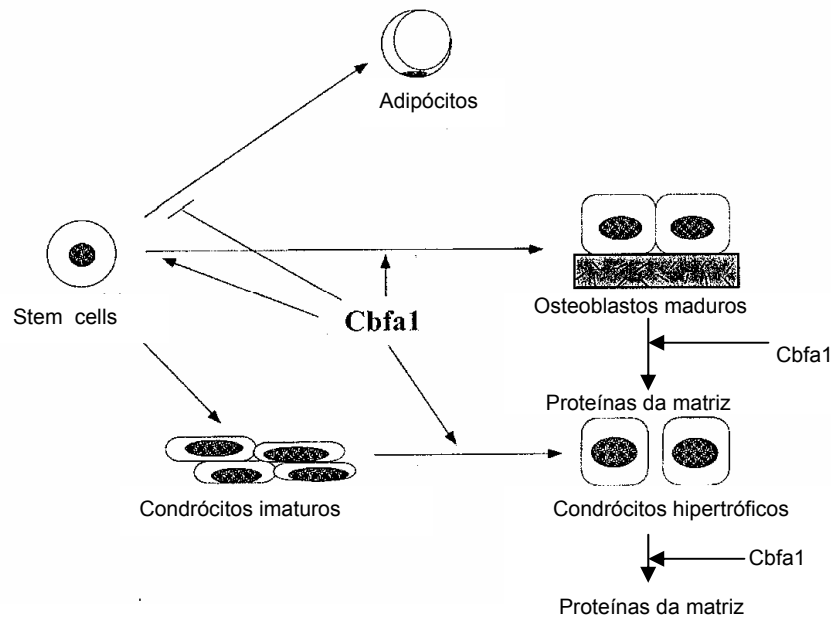


Figura 11. Esquema representativo do papel central do Cbfa1 na determinação da linhagem das células osteoprogenitoras [64].

Por acréscimo ao seu papel crítico durante a diferenciação osteoblástica, o Cbfa1 controla a formação de osso (e implícita função osteoblástica) pelos osteoblastos diferenciados. O Cbfa1 ao regular a expressão do gene Bgp (Bone Gla Protein) responsável pela expressão da osteocalcina, e que é expresso unicamente em osteoblastos em fase final de diferenciação, regula também a função dos osteoblastos [65].

O facto da formação de osso ocorrer simultaneamente em localizações várias do esqueleto é genericamente aceite como uma evidência de que é controlada localmente, através de mecanismos autócrinos e/ou parácrinos [66], facto que também é consistente com a possibilidade de que a formação de osso esteja sob controlo endócrino [65].

No que respeita à regulação endócrina, é sabido que os osteoblastos expressam receptores para várias hormonas, nomeadamente para a hormona paratiróide ou PTH, para a $1\alpha, 25$ – hidroxivitamina D_3 , para estrogénios e glucocorticóides [67], que têm sido implicadas no controlo da formação de osso, como as hormonas esteróides sexuais [66,68] e a PTH [69].

Muitos factores locais, como as próprias BMPs desempenham um papel muito importante na diferenciação dos osteoblastos. As BMPs são citocinas multifuncionais, membros da superfamília dos factores de crescimento β . Presentemente, foram já clonadas 15 diferentes BMPs e a sua capacidade osteoindutiva é tal, que têm sido exploradas as suas potencialidades clínicas em várias vertentes [70].

Presentemente, também é aceite que o TGF- β tenha actividade osteogénica, na medida em que é produzido localmente no tecido ósseo [71], é acumulado na matriz óssea [72], é libertado da matriz óssea no processo da reabsorção óssea [73], e afecta a função osteoblástica através de um modo de acção parácrino e/ou autócrino [74,75]. Baseado nestes factos, tem sido sugerido que o TGF- β medeia a informação da quantidade de osso a reabsorver aos osteoblastos, regulando a formação de osso no processo de remodelação óssea [51].

Na última década o envolvimento do cálcio como factor local de regulação da formação de osso tem ganho muitos adeptos, havendo inclusivamente evidências de que o cálcio extracelular desempenha um papel importante na proliferação osteoblástica [1].

A aplicação combinada de abordagens moleculares, bioquímicas, histoquímicas e ultraestruturais tem definido diferentes estadios no desenvolvimento do fenótipo osteoblástico. Os picos de expressão de genes que reflectem uma sequência maturativa do crescimento e diferenciação dos osteoblastos conduziram à caracterização de quatro períodos distintos: proliferação, maturação da matriz, mineralização e apoptose [76], esquematizados na seguinte figura:

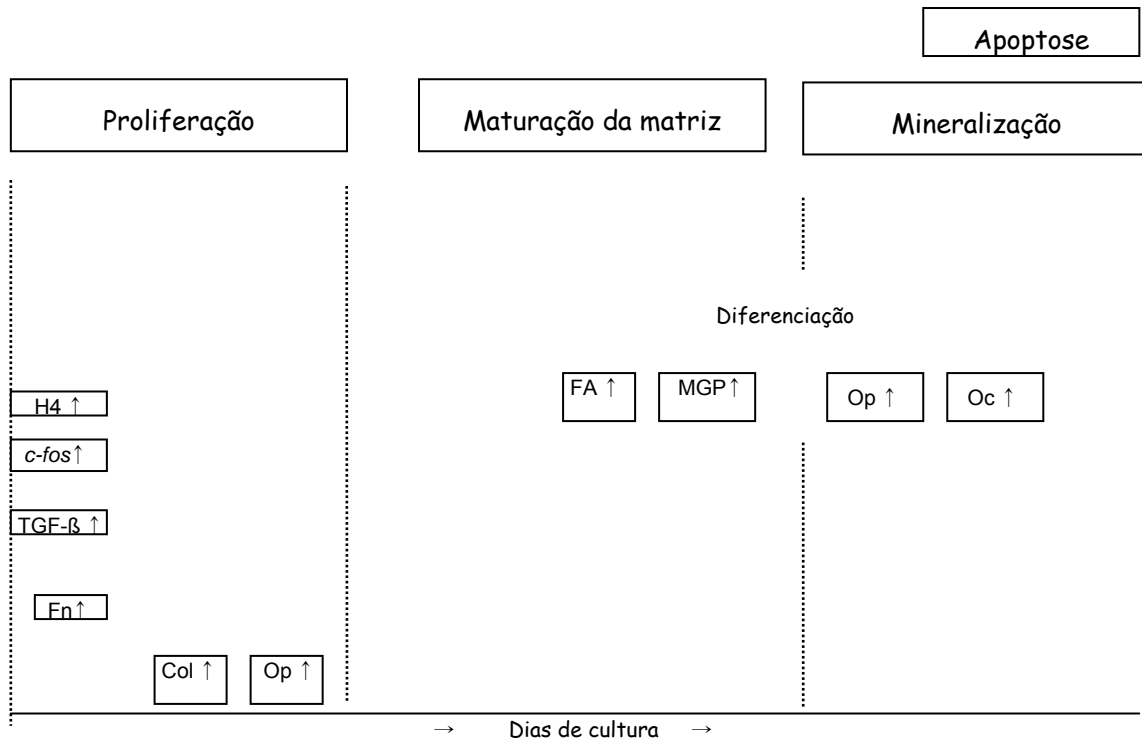


Figura 12. Desenvolvimento osteoblástico. Expressão de proteínas ao longo do tempo. H4 (histona H4), c-fos (gene c-fos), TGF-β (factor de crescimento β), Fn (fibronectina), Col (colagénio tipo I), Op (osteopontina), FA (fosfatase alcalina), MGP (proteína Gla da matriz), Oc (osteocalcina)

Na fase de **proliferação** são expressos os genes necessários à progressão do ciclo celular (histonas) e crescimento celular (c-fos). Durante este período de proliferação, fundamental ao desenvolvimento do fenótipo das células osteoblásticas, vários genes relacionados com a formação da matriz extracelular são também fortemente expressos (colagénio tipo I, TGF-β, fibronectina).

Na fase de **maturação**, os osteoblastos diferenciam-se em células maduras com funções específicas. Durante este período os osteoblastos expressam sequencialmente colagénio tipo I, fosfatase alcalina, osteocalcina e osteopontina. A expressão sequencial destas proteínas é necessária para a formação final de osso por acumulação duma matriz mineralizada extracelular [77]. Com o declínio da síntese de DNA, a expressão da fosfatase alcalina está aumentada em cerca de dez vezes e a matriz extracelular atravessa uma série de modificações na composição e organização, que a preparam para a sua mineralização. A fosfatase alcalina e a osteocalcina são os marcadores fenotípicos mais utilizados para avaliação da fase de maturação.

Fosfatase Alcalina

O termo fosfatase alcalina (PAL) é utilizado para designar a generalidade de fosfomonoesterases não específicas, cujo pH óptimo é o alcalino, e que catalisam a hidrólise de ésteres de ácido fosfórico (figura 13). Estas enzimas agregam-se em grupos de isoenzimas com pequenas diferenças estruturais entre si e encontram-se em todos os tecidos, existindo em concentrações particularmente elevadas no osso e no fígado. Evidências de que a introdução de cDNA de PAL em osteoblastos PAL-negativo lhes conferiram capacidade de mineralização *in vitro*, o facto da inibição estereoespecífica da actividade da PAL ter inibido a calcificação *in vitro* da cartilagem e de uma mutação no gene da PAL óssea ter sido associada a uma forma letal de hipofosfatásia, têm sugerido o papel fundamental que a PAL apresenta na formação óssea [78, 79, 80].

A PAL é o marcador da diferenciação dos osteoblastos mais comumente aceite [81], sendo a sua actividade enzimática necessária à mineralização dos osteoblastos [82].

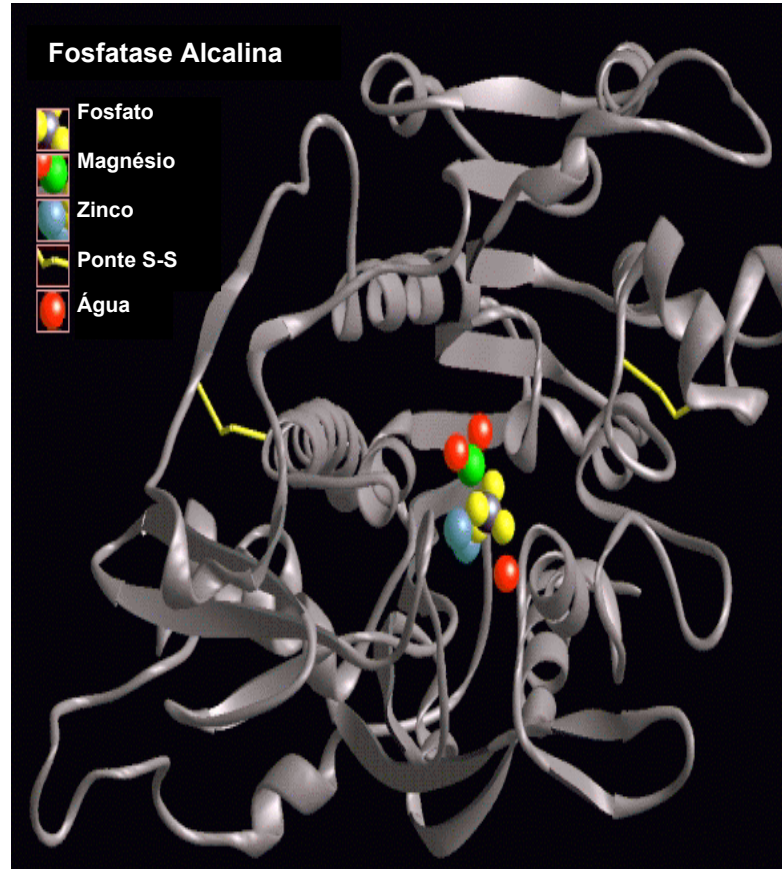


Figura 13. Esquema tridimensional da enzima fosfatase alcalina [83].

Osteocalcina

A osteocalcina é a proteína não colagénica mais abundante do esqueleto. Tem um peso molecular aproximado de 6000 Dalton e na maioria das espécies em 49 aminoácidos; no entanto, a osteocalcina de rato é constituída por 50 aminoácidos [84,85,86,87]. A osteocalcina tem a propriedade de se ligar ao cálcio graças aos seus ácidos 2-3 γ carboximetilglutâmicos, nas posições 17, 21 e 24 [88].

A síntese da osteocalcina é essencialmente específica dos osteoblastos, sendo apenas uma pequena parte produzida pelos odontoblastos. Após sintetizada é incorporada na matriz óssea, havendo uma pequena fracção que é libertada e transportada pela corrente sanguínea (figura 14). A osteocalcina circulante está associada a alterações no turnover ósseo, sendo um marcador específico da formação óssea [88]. Os níveis séricos de osteocalcina reflectem a taxa de síntese de osso novo e não a reabsorção de osso “velho”, o que reforça o facto da osteocalcina ser utilizada como um importante marcador da formação óssea.

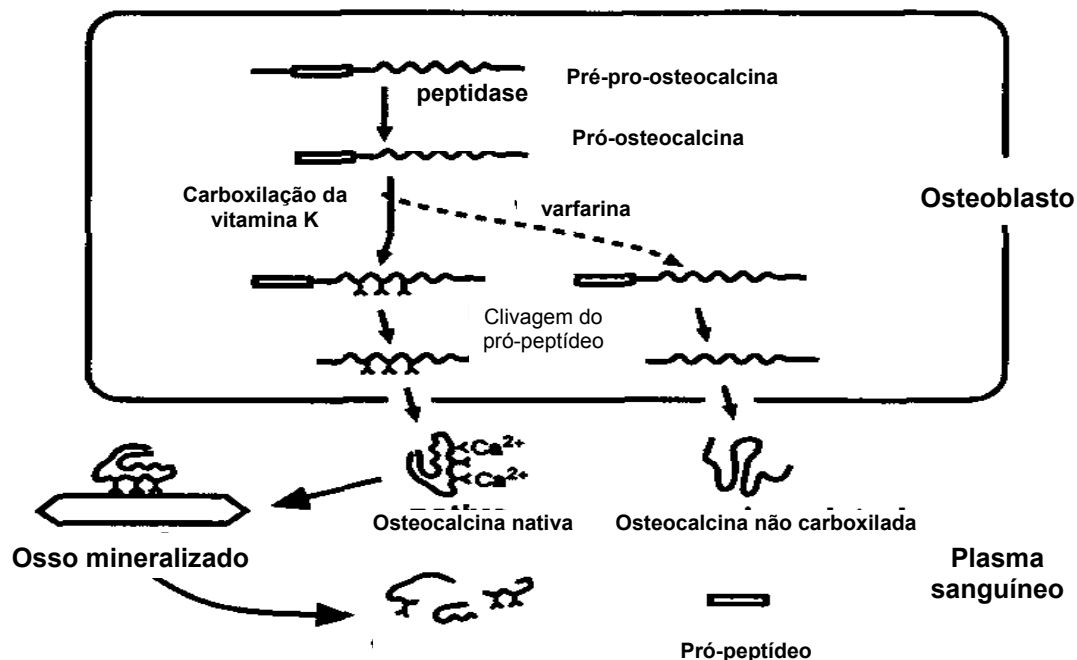


Figura 14. Esquema representativo da biossíntese e metabolismo da osteocalcina [89].

A fase de **mineralização** caracteriza-se por uma expressão acentuada dos genes associados à deposição da hidroxiapatite, atingindo a osteocalcina e a osteopontina os seus níveis máximos [90].

2.3 Apoptose

Quando os osteoblastos completam a síntese da matriz óssea, cerca de 5% tornam-se achatados transformando-se em *bone lining cells* e cerca de 30% ficam aprisionados nas lacunas transformando-se em osteócitos [91]. Os restantes 65% dos osteoblastos não segue nenhum destes destinos, havendo evidências substanciais indicando que morram por apoptose [92,93].

O termo apoptose deriva do grego e significa “queda das folhas das árvores”. É um processo selectivo de eliminação de células em vários sistemas biológicos e, à semelhança do processo de proliferação, a sua regulação é muito rigorosa, desempenhando um papel muito importante na homeostase e na regeneração tecidular. A apoptose, ou morte celular programada, é um acontecimento regulador fundamental durante a diferenciação do tecido ósseo [94].

O mecanismo celular da apoptose é formado por redes de proteínas sinal, que actuam concertadamente através de interacções proteína-proteína e de modificações de proteínas [95]. A apoptose ocorre por dois processos possíveis: um é iniciado pelos “receptores da morte”, membros da família dos receptores TNF (tumor necrosis factor) que contêm um domínio intracelular, e o outro é regulado por proteínas da família Bcl-2 e envolve a libertação de citocromo c da mitocôndria.

Ambos os processos mencionados activam uma família de proteínas proteolíticas, as **cisteína-aspartato proteases** ou caspases, que induzem alterações morfológicas características da apoptose, pela clivagem de substratos específicos [96]. Das várias caspases, destaca-se a caspase 3, responsável pela clivagem e colapso de vários componentes celulares [97].

Os “receptores da morte” incluem os receptores CD95 (Fas/APO-1) e os TNFRI (CD120a). A activação destes receptores por ligandos intracelulares específicos (FADD e TRADD) vai originar a activação de caspases iniciadoras.

Os membros da família Bcl-2 são cerca de 20 proteínas pró e anti-apoptóticas, e o rácio entre estas vai determinar a susceptibilidade das células a “sinais de morte”, tais como stress celular ou estímulos citotóxicos, alterando a permeabilidade da membrana mitocondrial. Os membros anti-apoptóticos ligam-se à membrana da mitocôndria e impedem a libertação de activadores das caspases, enquanto os pró-apoptóticos promovem um aumento na permeabilidade da membrana da mitocôndria e a libertação do citocromo c, com a consequente activação das caspases [96]. Para um melhor entendimento do complexo processo da apoptose apresenta-se o seguinte esquema:

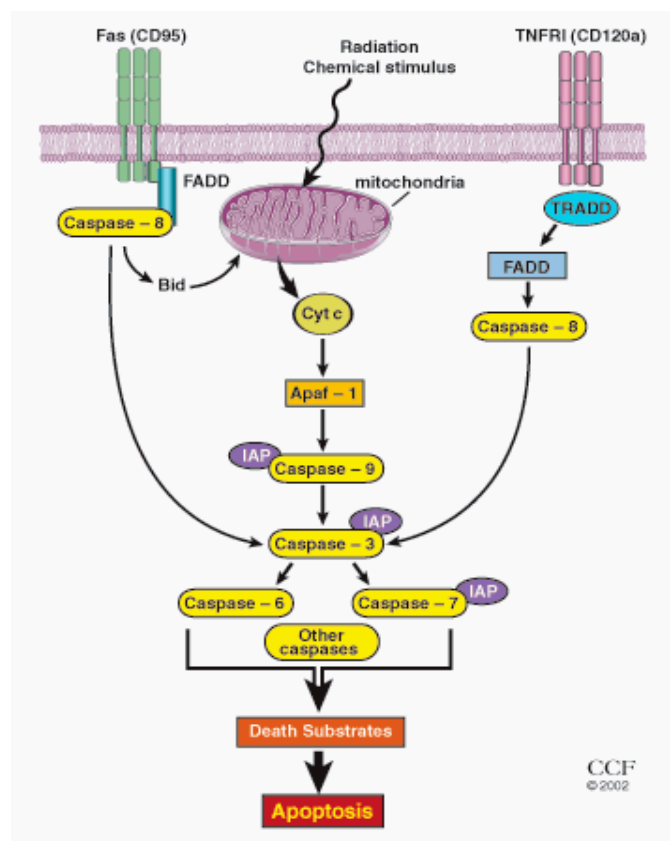


Figura 15. Cascata de activação da apoptose [98].

A maior parte dos factores de crescimento e citocinas, incluindo as IGFs, FGF, TGF β e IL-6 inibem a apoptose dos osteoblastos *in vitro*. A administração intermitente de PTH promove o aumento da massa óssea, na medida em que aumenta o número de osteoblastos e a taxa de formação óssea, e há evidências de supressão da apoptose de osteoblastos em ratos que expressam o receptor da PTH/PTHrP. As hormonas sexuais esteróides previnem a apoptose dos osteoblastos e aumentam a expressão do receptor da 1,25-dihidroxitamina 3 nos osteoblastos, que tem um efeito anti-apoptótico. Foi sugerido que os bifosfonatos e a calcitonina exercem uma acção anti-apoptótica nos osteoblastos [96].

Por outro lado, a terapia prolongada com glucocorticóides leva a uma perda da massa óssea por múltiplos mecanismos, o que em parte pode ser explicado pela diminuição do número de osteoblastos e da taxa de formação óssea, bem como pelo aumento da apoptose nos osteoblastos, que foi já reportada em osso de murino, coelho e humano. Os osteoblastos expressam, como já foi dito, receptores para o TNF que induz apoptose pela activação directa da caspase 8. Nem todos os factores de crescimento têm um efeito positivo na sobrevivência dos osteoblastos, tendo a BMP-2 um efeito pró-apoptótico nos osteoblastos, ao induzir a libertação de citocromo c pela mitocôndria e a expressão das caspases 9, 3, 6 e 7 [96].

3 Cálcio

O cálcio é um nutriente chave pelo papel que desempenha em diversos mecanismos intra e extracelulares. A nível intracelular constitui um importante segundo mensageiro e um co-factor para proteínas e enzimas regulando processos celulares chave como neurotransmissão, mobilidade, secreção hormonal ou proliferação celular. A nível extracelular funciona como co-factor na adesão de moléculas, factores de coagulação e outras proteínas, regula a excitabilidade neuronal e é uma parte essencial da fase mineral do osso [99].

Todo o cálcio intra e extracelular provém da dieta e o crescente reconhecimento da importância desta como fonte única para a miríade de funções biológicas que desempenha, levou a que o denominassem “superestrela dos nutrientes” [100].

3.1 Homeostase do Cálcio

O aporte diário recomendado de cálcio é de aproximadamente 1000 mg / dia embora alguns estados fisiológicos como gravidez, lactação e crescimento infantil requeiram aportes maiores [101]. Também nas mulheres e nos homens acima dos 65 anos a ingestão diária de cálcio recomendada sobe, para 1500 mg / dia, devido a diversos factores nomeadamente diminuição de estrogénios (na mulher pós-menopáusia), diminuição da eficácia na absorção de cálcio, diminuição de produção de 1,25-dihidroxitamina D₃ pelo rim, alterações nos marcadores do metabolismo ósseo e aumento da taxa de perda óssea.

O turnover diário do cálcio num adulto com ingestão de 1000 mg está representado na figura seguinte:

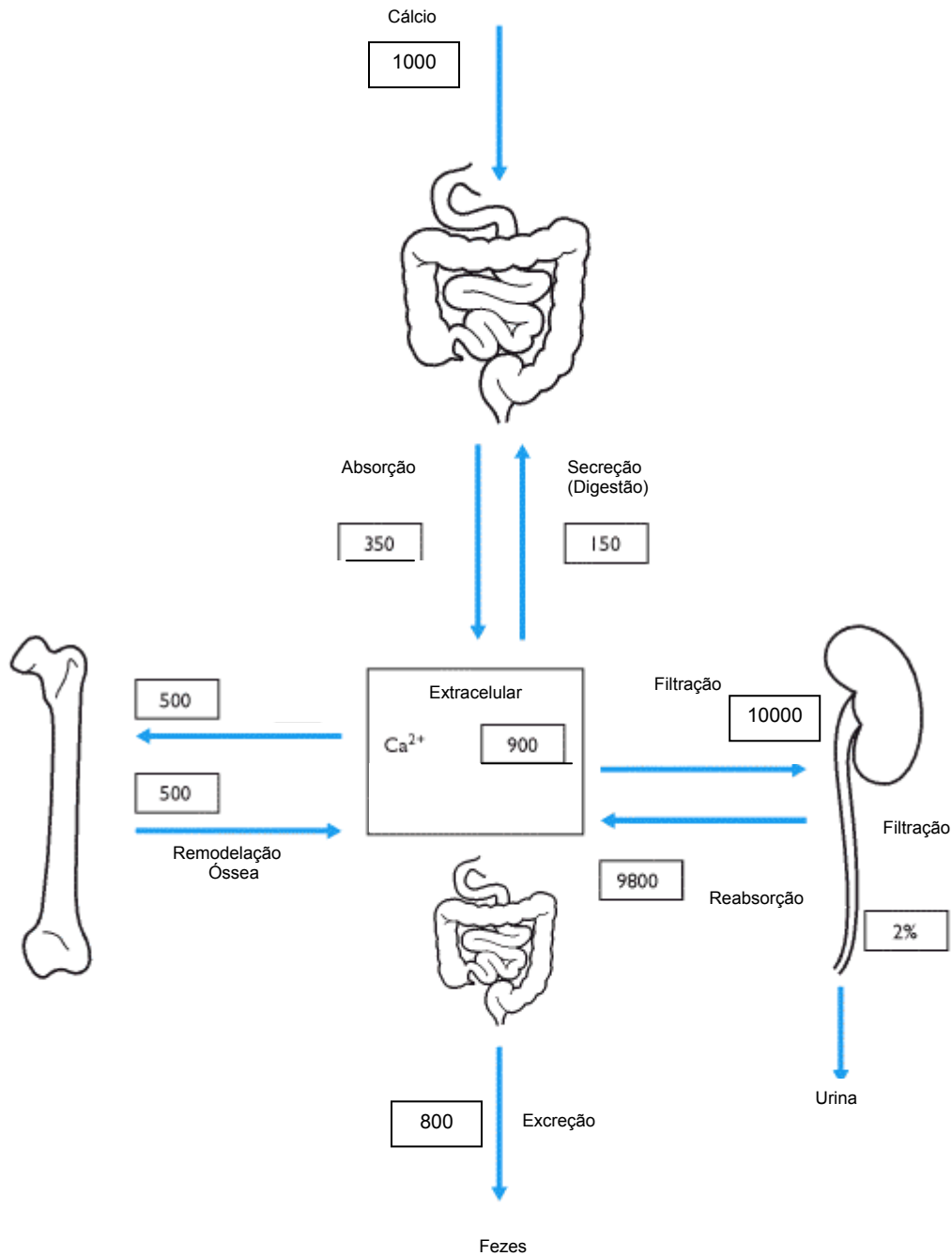


Figura 16. Esquema representativo do balanço orgânico diário normal de um adulto (considerando uma ingestão diária de 1000 mg de cálcio) [102].

Os valores de cálcio plasmático oscilam entre 2.2 a 2.6 mM, embora apenas 1 mM (45%) exista como cálcio livre ionizado (Ca^{2+}). Os restantes cerca de 55% de cálcio encontram-se complexados a proteínas séricas (maioritariamente albumina e uma fracção menor de globulina) e a iões inorgânicos como lactato, fosfato e bicarbonato, em cerca de 45% e 10%

respectivamente. Estas formas de cálcio complexado estão em equilíbrio com o Ca^{2+} e factores como a concentração de proteínas séricas, de fosfatos ou o pH afectam a concentração de Ca^{2+} plasmático (figura 17).

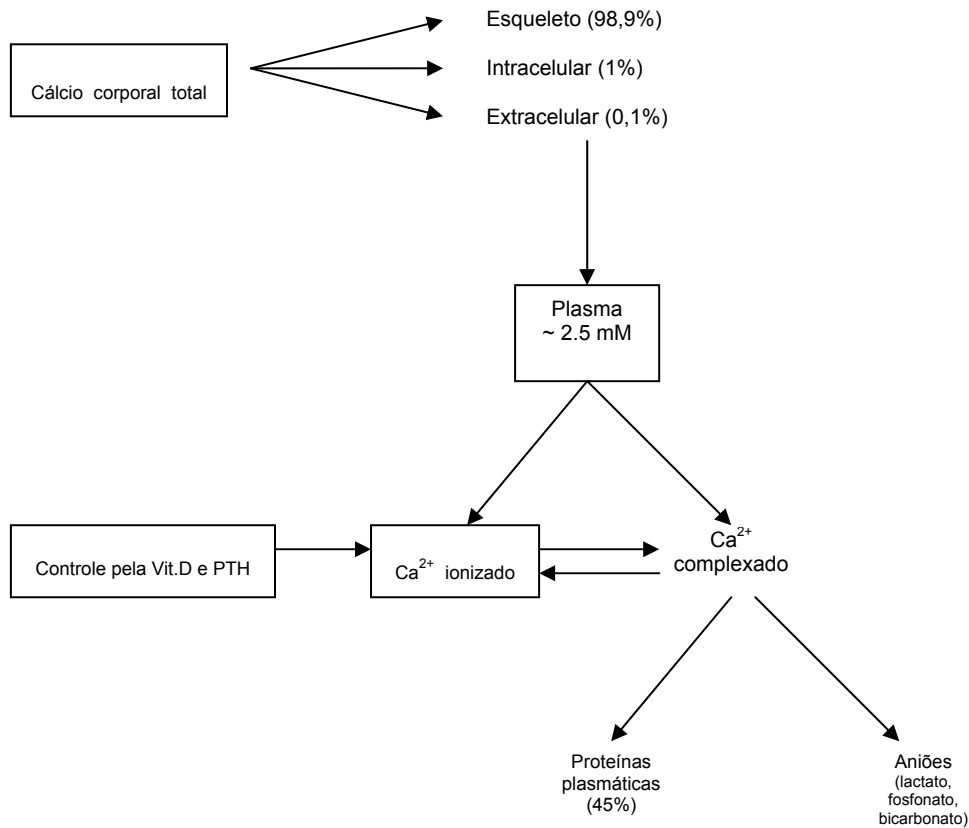


Figura 17. Esquema representando a distribuição do cálcio corporal total de um indivíduo adulto [102].

A concentração intracelular de Ca^{2+} ronda os $0.1 \mu\text{mol/l}$, embora este valor não represente a concentração total, uma vez que muito do Ca^{2+} intracelular está armazenado nos organitos intracelulares, nomeadamente retículo endoplasmático, retículo sarcoplasmático (no músculo esquelético) e mitocôndria. Em resposta a certos estímulos, a libertação de Ca^{2+} destes depósitos intracelulares ou a sua entrada na célula, aumenta rapidamente a sua concentração em 10 a 100 vezes. Este aumento súbito da concentração de Ca^{2+} intracelular funciona como um sinal para mecanismos de transdução, de que são exemplos a contracção muscular, ou a activação da secreção enzimática.

Este último mecanismo inclui a activação da calmodulina, que por sua vez, por fosforilação, activa a proteína C quinase análoga ao AMPc e ao diacilglicerol, activando outras proteínas quinase específicas. A proteína quinase C pode depois activar enzimas citosólicas ou afectar a transcrição de genes, por fosforilação de outras proteínas quinase [103].

O papel crucial do cálcio nos inúmeros processos celulares já referidos torna a regulação da concentração do Ca^{2+} numa concentração fisiológica virtual de 1.0 mM, numa enorme prioridade para os organismos terrestres. O sistema homeostático que garante a quase constância dos valores do Ca^{2+} requer a interacção concertada das hormonas calciotrópicas, como PTH e a $1\alpha,25$ -dihidroxitamina D_3 , e os órgãos efectores incluindo osso, rim e intestino. Nos mamíferos, as glândulas paratiróides desempenham um papel central na homeostase do Ca^{2+} , pela sua capacidade de modular a secreção da PTH, em resposta a pequenas variações no cálcio plasmático, como se demonstra na figura seguinte:

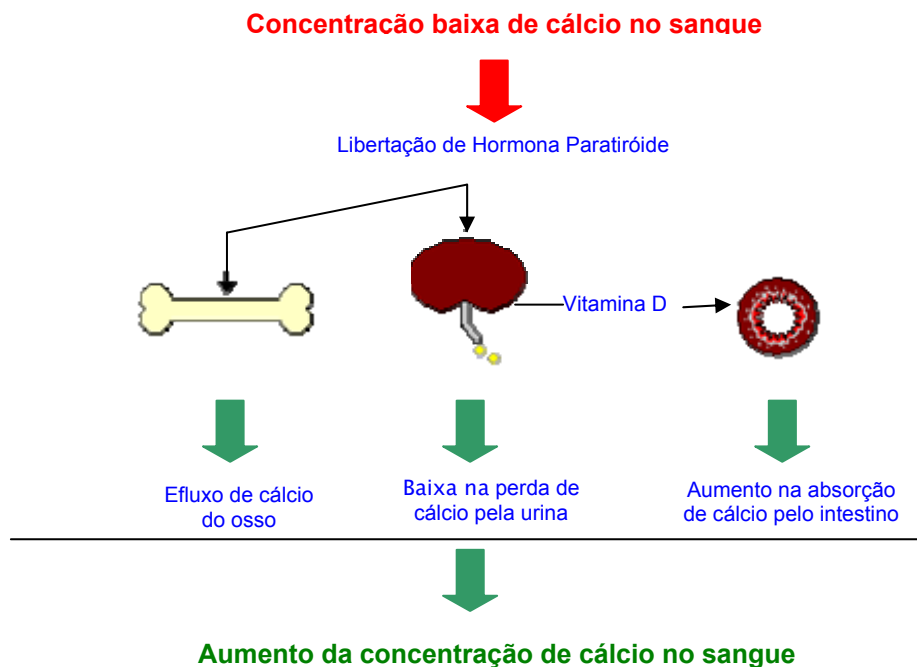


Figura 18. Esquema representando as respostas do organismo a oscilações na concentração do cálcio plasmático [102].

A PTH é um importante mediador da remodelação óssea [104]; é um polipéptido constituído por 84 aminoácidos sintetizado e excretado pelas glândulas paratiróides em resposta a sinais gerados por um receptor sensível ao cálcio, *calcium-sensing receptor* [105], que monitoriza alterações nos níveis plasmáticos de cálcio [106]. A PTH é libertada em resposta a valores baixos extracelulares de cálcio livre e os seus maiores alvos são o osso e o rim. A valores elevados de cálcio no sangue surge uma resposta das células T da glândula tiróide com produção de um polipéptido designado calcitonina. Antagonista da hormona paratiróide, a calcitonina actua directamente a nível dos osteoclastos, reduzindo a sua actividade.

3.2 O Osso e o Cálcio

Como já foi referido anteriormente, o osso é o maior reservatório de cálcio do organismo, armazenando cerca de 99% do cálcio total. No entanto, o osso não é simplesmente um reservatório passivo. O cálcio é armazenado no osso quando ocorre mineralização de novo tecido ósseo e é retirado pela reabsorção de tecido ósseo “velho”. Existe um processo de remodelação do esqueleto bidireccional (diminuição e aumento de massa óssea local) capaz de remover e de repor cálcio do osso. Num ano, a remodelação óssea que ocorre no osso cortical e no osso trabecular está estimada em respectivamente, 3 e 25%. O pico máximo de massa óssea é atingido por volta dos 30 anos, sendo claro que até esta idade a formação do osso excede a reabsorção do mesmo [103]. Pode haver no entanto, uma importante assimetria neste fluxo de cálcio bidireccional, através do ciclo de remodelação óssea. Enquanto que o osso pode ser reabsorvido essencialmente sem limite, há um tecto que impõe a quantidade de cálcio que pode ser armazenado no osso e enquanto a estrutura básica for preservada, a perda óssea pode ser totalmente reposta, mas quando as estruturas básicas são reabsorvidas, a reposição do osso torna-se difícil ou impossível [104]. Desordens no metabolismo do cálcio podem reflectir-se patologicamente no osso, sendo exemplos de consequências clínicas associadas à deficiente homeostase do cálcio, osteomas, osteogénese imperfeita e osteoporose.

O cálcio é o principal catião do osso, existindo como já mencionado anteriormente, sob a forma de uma estrutura mineral habitualmente caracterizada de hidroxiapatite imperfeita, na medida em que contém muitos outros iões para além do cálcio e do fosfato. Os cristais existem intimamente associados às fibrilhas de colagénio da matriz óssea. Apesar de existirem nos fluidos corporais, os iões cálcio e fosfato só mineralizam no osso. A criação local de núcleos de mineralização é a chave para o controlo da deposição mineral, que se depositam apenas nos locais preparados para recebê-los, ou seja, onde é necessário providenciar a rigidez conferida pelo papel estrutural do osso [104]. As proteínas não colagénicas da matriz são apontadas como tendo um papel muito importante na configuração espacial dos iões cálcio e fosfato de maneira a criar a formação da hidroxiapatite. Por outro lado, a PAL é tida como a enzima que hidroliza o pirofosfato e os ésteres fosfato inorgânicos presentes no meio proporcionando fosfato extra disponível para a formação de hidroxiapatite, e que remove os componentes que inibem o crescimento dos cristais), desempenhando deste modo um papel imprescindível na manutenção do cálcio no osso [107].

Em circunstâncias normais, a formação e a reabsorção de osso são processos coordenados que ocorrem nos osteões e que são responsáveis pela contínua remodelação óssea. Este sistema é, em parte, regulado pelos estrogénios, o que explica que o tecido ósseo seja adicionado ao esqueleto na puberdade e na gravidez quando os níveis de estrogénios se encontram elevados, e que seja retirado durante a lactação e a menopausa quando os níveis de estrogénios diminuem. O importante efeito regulador das hormonas calciotrópicas (PTH e Vit. D₃) na homeostase do cálcio e conseqüentemente na remodelação do osso foi já referido no ponto anterior [104].

As flutuações do cálcio extracelular livre ionizado acompanham a remodelação óssea e contribuem para a homeostase do cálcio [108]. Em linhas celulares de osteoblastos, elevações no cálcio extracelular induziram um aumento na quimiotaxia e na proliferação de osteoblastos [1,109] e alteraram os níveis de expressão de alguns marcadores de diferenciação [110,111].

Nestes trabalhos, a exposição a altas concentrações de cálcio durante 24 e 48 horas, por adição de CaCl_2 ao meio de cultura, aumentou significativamente a síntese de DNA e de colagénio tipo I em osteoblastos humanos e em osteoblastos de porco, respectivamente. Há estudos que demonstram que o cálcio, mesmo independentemente do efeito das hormonas calciotrópicas controla directamente a função osteoblástica, uma vez que estes respondem a pequenas elevações do cálcio extracelular aumentando a proliferação e quimiotaxia, a diferenciação e a produção de nódulos de mineralização, de um modo dependente do tempo e da concentração, na ausência de hormonas calciotrópicas [112]. Um estudo bastante recente demonstrou que concentrações de cálcio extracelular até 8 mM, podem promover condições adequadas à proliferação e diferenciação osteoblástica, quer em culturas de monocamadas, quer em culturas tridimensionais, e que consequentemente, da perspectiva da diferenciação osteoblástica, a incubação de osteoblastos numa concentração óptima de cálcio extracelular, será útil para a engenharia de tecidos ósseos [113].

A manutenção da homeostase do cálcio no sangue e nos fluidos extracelulares, bem como a sensibilidade demonstrada pelos osteoblastos a oscilações na concentração extracelular do ião cálcio pressupõe a existência de algum mecanismo de detecção especializado. Na última década, muito foi conhecido acerca do modo como determinados tipos de células, nomeadamente os osteoblastos, detectam flutuações na concentração extracelular do ião cálcio, e surgiram provas da existência de um receptor de membrana celular com sensibilidade para essas mesmas flutuações.

4 Receptor extracelular do cálcio

No início dos anos 90 tornou-se evidente que certas células nomeadamente as da glândula paratiróide, tinham capacidade de reconhecer e responder a pequenas alterações na concentração do cálcio ionizado extracelular [114], e que este processo se assemelhava ao mecanismo através do qual certos receptores celulares, acoplados à proteína G, respondiam a vários mensageiros extracelulares [115,116,117,118,119].

A estimulação da maior parte dos receptores acoplados à proteína G activa uma cadeia de eventos que alteram a concentração de uma ou mais moléculas intracelulares, também chamadas mensageiros intracelulares ou segundos mensageiros, que por sua vez passam o sinal através da alteração do comportamento de proteínas celulares seleccionadas ou mesmo activando ou reprimindo a transcrição de genes específicos.

4.1 Clonagem do *Calcium Sensing Receptor*

Em 1993, a clonagem do *CaSR* acoplado à proteína G em células da glândula paratiróide de bovino, veio confirmar que o ião cálcio funciona de facto como um primeiro mensageiro extracelular [120]. Em 1995 o *CaSR* foi localizado nos cromossomas 11 e 16 do rato e do ratinho respectivamente e obteve-se o mapa deste receptor no cromossoma 3 humano [121]. Nos bovinos localiza-se no cromossoma 1 [122]. Técnicas de hibridação de DNA levaram posteriormente à clonagem e caracterização de *CaSRs* em diferentes tecidos e em várias espécies de mamíferos (paratiróide humana e de rato, rim humano e de coelho, células C de rato, cérebro de rato), de pássaros (paratiróide de galinha) e de anfíbios (mucosa gástrica de salamandra), exibindo todos eles uma percentagem muito elevada de homologia [123,124,125,126,127,128,129,130,131].

A clonagem deste receptor tornou possível identificar a sua presença não só na glândula paratiróide mas também na maior parte, senão em todos os tecidos envolvidos na homeostase sistémica do ião cálcio [132].

4.2 Bioquímica do *CaSR*

Nos humanos o *CaSR* é constituído por 1078 aminoácidos [128]. A topologia estrutural deste receptor, representada na figura 19, é caracterizada de acordo com a sua sequência de nucleótidos por três domínios estruturais principais: um grande segmento terminal-NH₂ composto por mais de 600 aminoácidos do lado extracelular, sete sub-domínios transmembranares e um segmento terminal-COOH com cerca de 200 aminoácidos no lado intracelular [120].

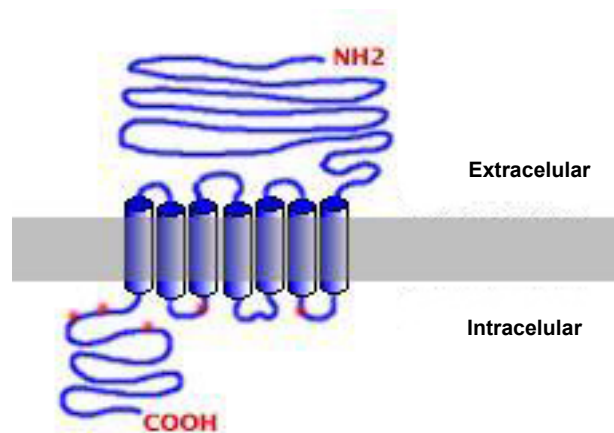


Figura 19. Esquema da estrutura topológica do *CaSR* com os seus domínios extracelular, intramembranar e intracelular [133].

Crê-se que sejam os grupos de aminoácidos da porção extracelular do *CaSR* a interagir com os iões extracelulares, modulando assim o nível de activação do receptor e o sinal de transdução [134,135,136]. No entanto, os detalhes do local específico no domínio extracelular, onde ocorre a interacção ligando-receptor, estão ainda por definir.

O domínio extracelular do *CaSR* sofre N-glicosilações em vários locais, o que vai condicionar a localização do receptor na membrana, bem como o seu nível de activação [120,123,137,138]. Os resíduos de cisteína no domínio extracelular participam na formação de dímeros do receptor, promovendo modificações na sua função [139,149,141].

A porção central do *CaSR* contém aproximadamente 250 aminoácidos. Esta região da molécula forma os sete domínios intramembranares que caracterizam os receptores acoplados à proteína G e as “voltas” intra e extracelulares que os unem [120,123]. Na segunda e na terceira volta, existem porções específicas envolvidas na fosforilação do receptor, mas desconhece-se se ocorrem interações com o domínio intracelular [142].

Estudos estruturais e funcionais demonstraram a localização no domínio intracelular de vários pontos onde ocorrem fosforilações das proteínas quinase C e A [120,123]. É sabido que a fosforilação do *CaSR* pela proteína quinase C diminui o nível de activação do receptor, mas é ainda desconhecido o papel fisiológico da fosforilação pela proteína quinase A [142].

4.3 Agonistas do *CaSR*

4.3.1 Agonistas endógenos

Embora o ião cálcio seja o ligando fisiológico *in vivo* com maior relevância, com afinidade entre 1.1 e 1.3 mM para o *CaSR*, existem outros ligandos que demonstram afinidade em concentrações micromolares para o mesmo receptor. Entre os vários ligandos encontram-se os catiões divalentes (Mg^{2+}), os aminoácidos (tirosina), as poliaminas (espermina) e os péptidos β -amilóides [120,143,144,145].

O efeito modulador demonstrado pelos agonistas endógenos é expresso na presença do ligando nativo, o ião cálcio.

4.3.2 Agonistas exógenos

À semelhança do cálcio, existe uma variedade de catiões di e trivalentes que activam o *CaSR*. Estes incluem, por ordem de potência: $La^{3+} > Gd^{3+} > Be^{2+} > Ca^{2+} = Ba^{2+} > Sr^{2+} > Mg^{2+}$ [146]. Também alguns péptidos, como a poliarginina e a polilisina parecem regular a função da paratiróide por uma via semelhante à de concentrações elevadas de extracelular, através do *CaSR* [114]. A par da poliarginina e da polilisina, os antibióticos polivalentes aminoglicosídeos,

produzem uma estimulação dose dependente do *CaSR*, apresentando a seguinte ordem de potência: neomicina > tobramicina ≥ gentamicina > canamicina [147].

4.3.3 Calcimiméticos

Vários compostos têm sido estudados na procura de activadores farmacológicos do *CaSR*. Uma vez que estes compostos mimetizam os efeitos do cálcio têm sido designados de calcimiméticos. Os calcimiméticos classificam-se em tipo I, que consistem em poliacetatos orgânicos e inorgânicos como o próprio cálcio, ou seja são agonistas do *CaSR*, e em tipo II, que são pequenas moléculas com elevada carga positiva que actuam como activadores alostéricos do *CaSR* [148]. Os calcimiméticos do tipo I actuam no domínio extracelular do receptor, enquanto os do tipo II actuam no domínio transmembranar [149].

Existe actualmente um calcimimético do tipo II comercializado, utilizado como terapêutica para o hiperparatiróidismo secundário, com o nome genérico de cinacalcet HCl.

4.4 O *CaSR* e o Osso

O *CaSR* tem emergido como um factor central na regulação no metabolismo do cálcio em particular e no controlo do metabolismo mineral e do osso em particular [150].

Mutações no gene humano do *CaSR* têm sido implicadas em várias patologias decorrentes da deficiente regulação do cálcio. Estas mutações podem conduzir a hipercalcémia hipocalciúrica familiar, a hiperparatiróidismo neonatal severo e a hipocalcémia autossómica dominante [151, 152]. A hipercalcémia hipocalciúrica familiar resulta de uma redução do número de *CaSRs* na glândula paratiróide e no rim, e habitualmente exhibe um percurso clínico benigno. No hiperparatiróidismo neonatal severo, que decorre de uma mutação que inactiva o *CaSR*, há uma hipercalcémia grave acompanhada por

uma marcada elevação dos níveis de PTH circulantes, podendo ser fatal. A mortalidade resulta duma acentuada desmineralização óssea e de múltiplas fracturas ósseas. Pelo contrário, mutações que conduzam a uma activação do *CaSR* com excesso de sensibilidade à activação pelo cálcio causam hipocalcémia autossómica dominante, semelhante ao hipoparatiroidismo, com um aumento excessivo de excreção urinária de cálcio [132]. Ho e seus colaboradores em 1995 produziram modelos animais com mutações genéticas do *CaSR*, que representam modelos animais válidos para o estudo das doenças atrás descritas [153]. Há já bastantes modelos animais disponíveis, com defeitos no esqueleto, que ocorrem de forma natural ou manipulada, mas nenhum deles é ainda particularmente útil para o estudo do mecanismo do *CaSR* no osso [154]. Trabalhos adicionais serão no entanto necessários para avaliar o papel estrutural e funcional do *CaSR* no osso, nos quais a utilização de modelos animais com supressão do gene ou o uso de fármacos agonistas e antagonistas do *CaSR* irão revelar-se certamente como mais valias indiscutíveis.

Estudos recentes reforçaram as evidências de que o *CaSR* é expresso nas células do osso e/ou nos seus precursores, podendo desempenhar um papel importante nestas células.

Yamaguchi e seus colaboradores em 1998 evidenciaram a expressão do *CaSR* em células da linha monócitos/macrófagos, já referida como sendo precursora dos osteoclastos, e em 1999, Kanatani e seus colaboradores identificaram o mesmo receptor em pré-osteoclastos de culturas celulares derivadas de baço, com capacidade de formarem células multinucleadas osteoclásticas [155,156].

Outro estudo demonstrou que o *CaSR* é expresso em osteoclastos maduros de coelho e que o aumento de cálcio no meio de cultura ou a adição de agonistas extracelulares como o gadolínio ou a neomicina inibiram a reabsorção óssea pelos mesmos osteoclastos *in vitro* [157].

Vários estudos demonstraram que o *CaSR* e que o mRNA para este receptor, são expressos em várias linhas celulares, incluindo as de ratinho MC3T3-E1, as SAOS-2 humanas e as UMR-106 de rato e que a exposição de células MC3T3-E1 a altas concentrações de cálcio (até 4.8 mM) ou a agonistas

policatiónicos, neomicina e gadolínio, estimulam a quimiotaxia e a síntese de DNA nestas células [1,2]. Nestes trabalhos foi evidenciado que a expressão do *CaSR* está patente ao longo do tempo da cultura celular (proliferação, maturação da matriz e mineralização), sugerindo que este receptor pode funcionar quer nos pré-osteoblastos quer no osteoblastos maduros. Trabalhos recentes reconfirmaram a expressão do *CaSR* em células MC3T3-E1 [158].

Tal como os osteoclastos e osteoblastos, também os osteócitos respondem a alterações dos níveis de cálcio extracelular [159,160]. Apesar de se tornarem aprisionados na matriz óssea mineralizada, continuam a participar na homeostase mineral, talvez por serem sensíveis às forças mecânicas no osso [161]. Kamiota e seus colaboradores demonstraram que a elevação nos níveis de cálcio extracelular aumenta o cálcio intracelular em osteócitos de galinha, através de um mecanismo que envolve a mobilização do cálcio dos seus depósitos intracelulares, presumivelmente por algum tipo de mecanismo sensível ao cálcio [160].

Todos os trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos no sentido de melhor conhecer o mecanismo de detecção e de resposta dos osteoblastos à concentração extracelular do cálcio, evidenciam que os osteoblastos, na presença de altas concentrações de cálcio respondem com um aumento da proliferação celular e que esta influência se exerce através do *CaSR*, uma vez que na presença de agonistas deste receptor, os osteoblastos respondem de modo semelhante. No entanto, desconhece-se ainda se altas concentrações de cálcio terão um efeito estimulador na diferenciação osteoblástica e se a existir esse efeito estimulador, haverá envolvimento do *CaSR*. Foi com base nesta hipótese que se desenvolveu o presente trabalho.

III – Materiais

1 *Linha Celular MC3T3-E1*

A linha celular MC3T3-E1 foi adquirida ao ECACC (European Collection of Cell Cultures) com a referência 99072810.

2 *Reagentes e Kits*

Os reagentes e kits utilizados são apresentados em anexo detalhadamente (Anexos A e B, respectivamente).

IV – Métodos

Todas as experiências foram realizadas *in vitro*.

1 **Culturas celulares da linha de osteoblastos MC3T3-E1**

A parte experimental do estudo foi realizada com a linha celular de osteoblastos de ratinho, MC3T3-E1. Em todos os procedimentos foi observada técnica asséptica.

1.1 **Osteoblastos MC3T3-E1**

As células MC3T3-E1 derivam do calvário de ratinhos recém-nascidos e têm capacidade de se diferenciar em osteoblastos e de produzir colagénio tipo I, fosfatase alcalina e osteocalcina. Estes osteoblastos crescem em meio de cultura alpha MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, a uma temperatura de 37°C e atmosfera com 5% de CO₂. Apresentam uma eficiência de adesão de 67%.

Os padrões de expressão das proteínas relacionadas com o tecido ósseo nestas células demonstram que esta linha celular constitui um sistema *in vitro* muito útil para o estudo do processo da diferenciação durante os diferentes estádios de desenvolvimento [162].

1.2 **Preparação do meio de cultura completo**

O meio de cultura completo é obtido por adição de 10% (v/v) de soro fetal bovino, 0.5% de gentamicina 10 mg/ml e 1% de fungizona 1%, ao meio de cultura alpha MEM. A sua esterilização foi feita por filtração (Filtertop 500 ml; 0.22 µm PES TPP 99505) podendo ser conservado a 4°C até utilização.

1.3 Iniciação das culturas de MC3T3-E1

Para a realização de cada experiência, foi necessário proceder à descongelação de uma ampola de MC3T3-E1 (6ª passagem) conservada em azoto líquido a uma temperatura de -120°C . Depois de retirar a ampola do azoto líquido, colocou-se em banho-maria a 37°C e aspirou-se o conteúdo, que se verteu gota-a-gota para um volume de 5 ml de meio α -MEM completo. De seguida, centrifugou-se 10 minutos a 1400 rpm e rejeitou-se o sobrenadante, para se retirar o DMSO (dimetilsufóxido) que constitui o veículo utilizado como conservante para a congelação das células. Ressuspendeu-se o pelet celular em 2 ml de meio α -MEM completo e cultivou-se em frasco de 75 cm^2 (Sarstedt®) com 10 ml de meio α -MEM completo. As células foram incubadas na estufa a 37°C e 5% CO_2 .

1.4 Multiplicação do número de células

A obtenção do número de células necessário à realização das experiências pressupõe a tripsinização prévia das células em cultura resultantes da descongelação da ampola inicial, após atingida a confluência. A tripsinização é um método enzimático e mecânico de desagregação de tecidos e foi utilizado por ser bastante prático e rápido, possibilitando a recolha de praticamente todas as células. Deste modo, para se tripsinizarem as células MC3T3-E1 em confluência, rejeitou-se o meio de cultura do frasco, lavaram-se as células com PBS 1x estéril, adicionaram-se 2 ml de tripsina e mantiveram-se as células na estufa (37°C e 5% CO_2) durante 3 minutos para activação da tripsina. Após este tempo, juntaram-se 4 ml de meio alpha MEM completo para neutralizar a acção da tripsina. Homogeneizou-se e dividiu-se a suspensão celular resultante, por novos frascos de 75 cm^2 (Sarstedt®). Procedeu-se deste modo, sempre que foi necessário multiplicar as células.

1.5 Plaqueamento das células

Após tripsinização das células MC3T3-E1 em confluência, a suspensão celular resultante foi cultivada em placas de cultura de 6 poços (TPP® 92006), com a concentração de 14×10^4 células/poço. A contagem das células foi efectuada em câmara de Neubauer Improved (figura 21). As células foram cultivadas em meio de cultura alpha MEM completo suplementado com activadores do fenótipo osteoblástico: ácido ascórbico 50 $\mu\text{g/ml}$, β -glicerofosfato 5 mM e $1\alpha,25$ -dihidroxi-vitamina D3 10^{-8}M .

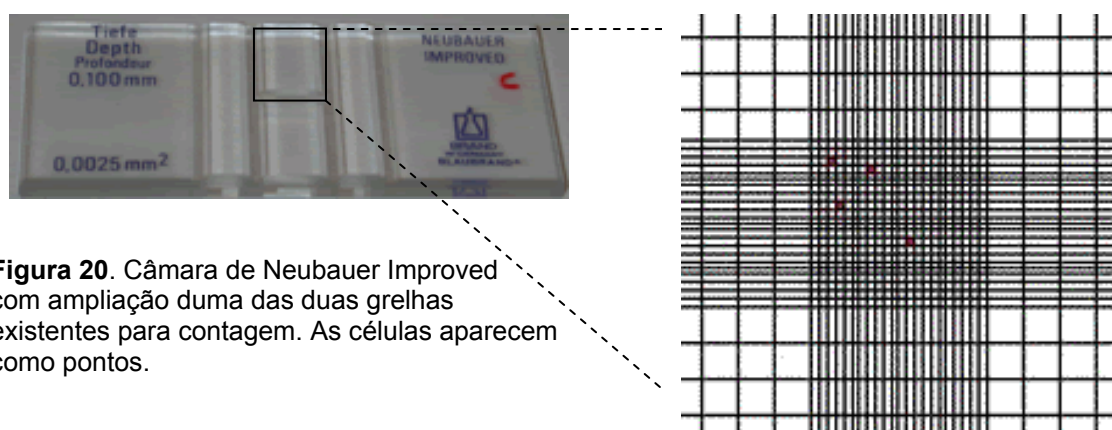


Figura 20. Câmara de Neubauer Improved com ampliação duma das duas grelhas existentes para contagem. As células aparecem como pontos.

1.6 Preparação das soluções de cálcio e do agonista do CaSR

1.6.1 Soluções de cálcio

A concentração de Ca^{2+} existente no meio de cultura Alpha MEM é **1.8** mM, tendo sido esta concentração utilizada como controlo. Para o estudo prepararam-se soluções de cloreto de cálcio (CaCl_2 granulado anidro) com diferentes concentrações, de maneira a obterem-se concentrações finais no meio de cultura de 3.3, 4.8, 20 ou 40 mM de Ca^{2+} . Todas as soluções foram esterilizadas por filtração (filtro 0.2 μm , Schleicher & Schuell® 10462200).

Assim, para se obter a concentração final de **4.8** mM de Ca^{2+} no meio de cultura, pesaram-se 0.1365 g de CaCl_2 e diluíram-se em 10 ml de H_2O

destilada e desionizada (solução mãe I). Ao adicionar 50 µl da solução mãe I por poço de cultura (2 ml) obteve-se uma concentração de Ca^{2+} total de 4.8 mM. Diluindo a solução mãe I na proporção de 1:2 com H_2O destilada e desionizada e adicionando-se 50 µl da solução resultante por poço de cultura, obteve-se uma concentração de Ca^{2+} total de **3.3** mM.

Para se obter a concentração **40** mM de Ca^{2+} no meio de cultura, pesaram-se 1.7383 g de CaCl_2 e diluíram-se em 10 ml de H_2O destilada e desionizada (solução mãe II). Ao adicionar 50 µl da solução mãe II por poço de cultura, obteve-se uma concentração de Ca^{2+} total de 40 mM. Diluindo a solução mãe II na proporção de 1:2 com H_2O destilada e desionizada e adicionando-se 50 µl da solução resultante por poço de cultura, obteve-se uma concentração de Ca^{2+} total de **20** mM.

1.6.2 Solução de neomicina

A concentração de neomicina utilizada foi 300 µM, que se obteve por inoculação directa das células com 38 µl da Solução neomicina 10 mg/ml em NaCl 0,9%.

1.7 Tratamento das células MC3T3-E1

As células MC3T3-E1 foram tratadas com as diferentes soluções de cálcio, com solução de neomicina (agonista do CaSR) ou com as soluções de cálcio combinadas com neomicina, nas suas 3 fases de diferenciação, durante 24 horas, conforme esquema apresentado na figura seguinte:

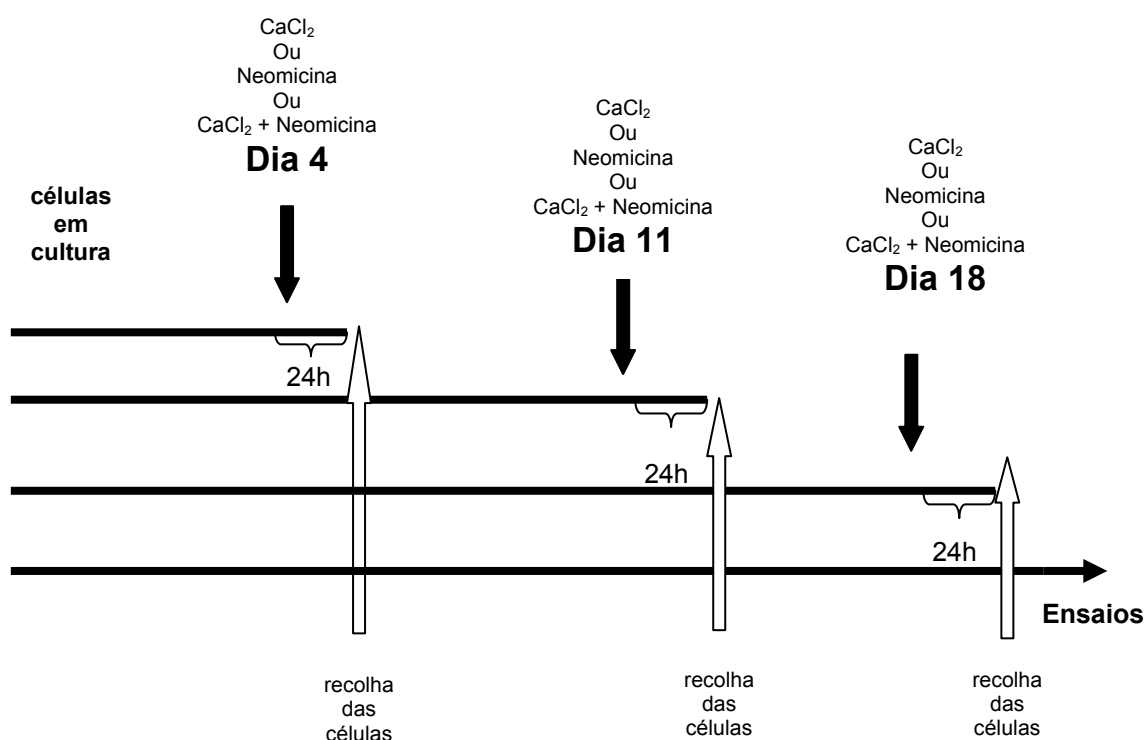


Figura 21: Esquema representativo do cronograma das experiências realizadas. As setas preenchidas representam os momentos de tratamento e as setas sem preenchimento representam os momentos de recolha das células (após 24 horas de tratamento).

1.8 Recolha e preparação das amostras

Após os tratamentos de 24 horas, com as soluções de cálcio, neomicina ou cálcio combinado com neomicina, nos dias 5, 12 e 19, o meio de cultura foi recolhido para tubos ependorfs e guardado a -20°C . As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e removidas por tripsinização. Recolheram-se as suspensões celulares resultantes para tubos ependorfs e centrifugaram-se durante 10 minutos a 2000 rpm. Removeu-se o sobrenadante e lavaram-se os pelets celulares resultantes com 1 ml de PBS 1x. Centrifugaram-se novamente as células, aspirou-se o sobrenadante e guardaram-se os pelets celulares a -20°C , até realização dos ensaios.

Para a determinação do conteúdo de DNA, Proteína total e actividade enzimática da Fosfatase Alcalina as células foram homogeneizadas em TritonX-100 1% e lisadas por sonicagem durante 1 minuto. Os lisados celulares constituíram as amostras para estes ensaios.

A produção de osteocalcina foi determinada no meio de cultura recolhido.

Para os ensaios histoquímicos (coloração da Fosfatase Alcalina e Von Kossa), aspirou-se o meio de cultura dos poços, lavaram-se as células duas vezes com PBS 1x e adicionou-se a cada poço solução de formaldeído 4% durante 15 minutos a 4°C, de modo a fixar as células. Retirou-se a solução de formaldeído e lavaram-se as células duas vezes com água bidestilada e desionizada, deixando a água em contacto com as células 10 minutos para assegurar a remoção completa do formaldeído. Guardaram-se as placas a 4°C até realização dos ensaios.

Todas as experiências foram realizadas em triplicado e repetidas quatro vezes.

2 Efeito do cálcio na proliferação dos osteoblastos

A avaliação do efeito do cálcio na proliferação dos osteoblastos foi realizada através da quantificação do DNA e da Proteína Total após exposição das células, às concentrações de cálcio, à neomicina e às concentrações de cálcio combinadas com neomicina.

A quantificação do DNA permite avaliar o grau de proliferação celular, uma vez que durante esta fase as células duplicam a um ritmo acelerado o seu material genético. A quantificação da proteína total permite avaliar de uma maneira indirecta a actividade celular.

2.1 Quantificação do DNA

A quantificação do DNA foi realizada com o DNA QUANTIFICATION KIT Fluorescence Assay® Sigma. Neste ensaio, a bisBenzimida que é um composto fluorescente, liga-se às sequências AT do DNA de cadeia dupla, traduzindo assim a elevada sensibilidade deste ensaio.

2.1.1 Preparação dos reagentes

A solução de BisBenzimida 1mg/ml obteve-se a partir da diluição da solução 10 mg/ml em água destilada, desionizada e estéril.

O Tampão fluorescente 10 x foi obtido por adição de 3.94 g Tris HCL 0.1 mM, 29.22 g NaCl 2M e 0.9305 g EDTA 10mM a 250 ml de água estéril. Acertou-se o pH para 7.4.

A partir da solução padrão inicial de DNA 1 mg/ml prepararam-se duas soluções padrão de 10 e 100 µg/ml, de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 1. Soluções padrão stock de DNA

	Padrão 10 µg/ml	Padrão 100 µg/ml
Solução DNA 1 mg/ml	10 µl	100 µl
10X Tampão fluorescente	100 µl	100 µl
Água estéril	890 µl	800 µl
Volume final	1 ml	1 ml

O volume total de solução BisBenzimida 0.1 µg/ml necessário para o ensaio obteve-se por adição de 0.01% de solução BisBenzimida 1mg/ml e 10% de Tampão fluorescente 10x a água destilada, desionizada e estéril, tendo sido preparado através da fórmula,

$$\text{Volume} = 2 \times [(n^\circ \text{ réplica} \times n^\circ \text{ padrões}) + (n^\circ \text{ réplica} \times n^\circ \text{ amostras})]$$

Preparou-se a solução imediatamente antes do ensaio e protegeu-se da luz.

2.1.2 Procedimento

A preparação das soluções padrão de DNA para a elaboração da curva de calibração, foi realizada a partir das soluções padrão stock e baseou-se na tabela 2, tendo sido preparadas 3 réplicas de cada padrão de DNA e do branco, em tubos de ensaio (Sarstedt® 55478).

Tabela 2. Soluções padrão de DNA

Diluição Padrão	Padrão 10µg/ml	Padrão 100µg/ml	Bisbenzimida 0.1 µg/ml	DNA em 2ml	DNA (ng/ml)

DNA	(μ l)	(μ l)	(ml)	(ng)	
branco	0	0	2	0	0
1	2	-	2	20	10
2	5	-	2	50	25
3	10	-	2	100	50
4	-	2	2	200	100
5	-	5	2	500	250
6	-	10	2	1000	500

Mediram-se 20 μ l das amostras igualmente para tubos de ensaio (Sarstedt® 55478), tendo sido preparadas 2 réplicas de cada amostra. Calibrou-se o fluorímetro (VARIAN Cary Eclipse) para os comprimentos de onda de excitação 360 nm e de emissão 460 nm, e equilibraram-se as leituras para valores aproximados de zero com água destilada. Adicionaram-se 2 ml da solução BisBenzimida 0.1 μ g/ml aos tubos, homogeneizando-se no vortéx e procedeu-se imediatamente às leituras do branco, dos padrões e finalmente das amostras.

2.1.3 Apresentação dos resultados

O valor médio das unidades relativas de fluorescência (URF) da solução BisBenzimida 0.1 μ g/ml (branco) foi subtraído aos valores médios das URF das amostras e dos padrões, obtendo-se os valores corrigidos. A construção da curva padrão foi efectuada com os valores corrigidos dos URF dos padrões vs concentração em ng/ml DNA. A partir desta curva obtiveram-se as concentrações de DNA das amostras.

2.2 Doseamento da proteína total

A determinação da proteína total foi realizada com o kit BCA Protein Assay, (BCA – bicinchoninic acid) Pierce™. O ensaio baseia-se no princípio da redução do ião Cu^{2+} em Cu^{1+} pelas proteínas, em meio alcalino (reação do biureto), com a detecção colorimétrica altamente sensível e selectiva do ião Cu^{1+} por um reagente contendo BCA. A quelatação de 2 moléculas de BCA com um ião Cu^{1+} produz um complexo de cor púrpura, que exhibe forte absorvância a 562 nm e é linear com o aumento da concentração de proteína, numa escala de 125 – 2000 $\mu\text{g/ml}$. O processo pode ser representado pelo esquema seguinte:

2.2.1 Preparação dos reagentes

O volume de reagente BCA/CuSO_4 necessário para o ensaio foi calculado através da fórmula:

$$\text{Volume} = [(\text{n}^\circ \text{ padrões} \times \text{n}^\circ \text{ réplicas}) + (\text{n}^\circ \text{ amostras} \times \text{n}^\circ \text{ réplicas})] \times 200 \mu\text{l}$$

Este reagente resultou da adição de 50 volumes de solução de carbonato de sódio/bicarbonato de sódio/ácido bicinchonínico/tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0.1 M, a 1 volume de CuSO_4 4%.

O Padrão de BSA preparou-se por diluição de 25 mg de BSA em 2.5 ml de Triton X-100 0.1%, obtendo-se deste modo a concentração de 10 mg/ml. A partir deste padrão, foram preparados padrões para a elaboração da curva de calibração, de acordo com a seguinte tabela:

Tabela 3. Soluções padrão de BSA

Padrão	Água destilada (µl)	Fonte e volume de BSA	Volume final (µl)	BSA final (µg/µl)	BSA /poço (µg)
Branco	200	-	200	-	-
1	100	100 µl (Padrão 10 mg/ml)	200	5	50
2	100	100 µl Padrão 1	200	2.5	25
3	100	100 µl Padrão 2	200	1.25	12.5
4	100	100 µl Padrão 3	200	0.625	6.25
5	100	100 µl Padrão 4	200	0.3125	3.125
6	100	100 µl Padrão 5	200	0.1563	1.563

2.2.2 Procedimento

A 10 µl das amostras, dos padrões e dos respectivos brancos (TritonX-100 1% e água destilada) adicionaram-se 190 µl do reagente BCA/CuSO₄ em cada poço, de placas de 96 poços (Sarsted® 82.1581). Homogeneizou-se num plate shaker durante 30 segundos e incubou-se 60 minutos a 37°C. Por fim, retiraram-se as placas da estufa para normalização da temperatura e efectuaram-se as leituras das absorvâncias no espectrofotómetro a 540 nm (SLT Spectra reader).

2.1.3 Apresentação dos resultados

O valor médio da absorvância dos brancos (Triton X-100 1% e água destilada) foi subtraído aos valores médios das absorvâncias das amostras e dos padrões respectivamente, obtendo-se os valores corrigidos. A construção da curva padrão foi feita com os valores corrigidos dos padrões vs concentração em µg/ml. A partir da curva padrão obtiveram-se as concentrações de proteína para as amostras.

3 Efeito do cálcio na maturação dos osteoblastos

3.1 Determinação da actividade enzimática da fosfatase alcalina

A Fosfatase Alcalina (PAL) é uma enzima da membrana celular, estando o aumento da sua actividade associado ao fenótipo das células ósseas e à maturação da matriz extracelular antes da sua mineralização.

3.1.1 Quantificação da actividade enzimática da PAL

A quantificação da PAL foi realizada com o kit Phosphatases, Alkaline, Acid, Prostatic Acid (Sigma Diagnostics®), que consiste num ensaio colorimétrico para quantificação do produto p-nitrofenol (pNP). Este produto resulta da hidrólise do p-nitrofenilfosfato (p-NPP) pela PAL, libertando-se p-nitrofenol e fosfato inorgânico. O p-nitrofenol em meio alcalino, converte-se num complexo amarelo que exhibe absorvância entre 400 e 420 nm sendo a intensidade da cor proporcional à actividade da enzima.

3.1.1.1 Preparação dos reagentes

O substrato da PAL obteve-se por adição de tampão bicarbonato de sódio, 15 mg de substrato pNPP, 20 µl de triton X-100 puro e 80.2 µl de MgCl₂. O tampão bicarbonato foi previamente preparado por diluição de 2.75 ml de Na₂CO₃ 0.2 M e 2.25 ml de NaHCO₃ 0.2M em 15 ml de água destilada e desionizada, tendo sido o pH acertado para 10.

A partir do Padrão pNP 10 µmol/ml prepararam-se soluções padrão para a elaboração da curva de calibração, de acordo com a tabela 4.

Tabela 4. Soluções padrão de p-NP

Padrão	NaOH 0.02M (µl)	Fonte e volume de p-NP	p-NP / poço (nmol)
Branco	200	-	-
1	2000	25 µl (Padrão 10 µmol/ml)	25
2	750	750 µl Padrão 1	12.5
3	750	750 µl Padrão 2	6.25
4	750	750 µl Padrão 3	3.125

3.1.1.2 Procedimento

Para placas de 96 poços (Sarsted® 82.1581) pipetaram-se 2 réplicas de 10 µl das amostras e 3 réplicas de 200 µl do branco das amostras (substrato da fosfatase alcalina). De seguida, adicionaram-se 190 µl do substrato da fosfatase alcalina às amostras, homogeneizaram-se num plate shaker durante 30 segundos, e incubaram-se 60 minutos a 37°C. Para parar a reacção adicionaram-se 10 µl de NaOH 0.02M a cada poço.

Para a elaboração da curva de calibração, pipetaram-se 3 réplicas de 200 µl de cada padrão e de NaOH 0.02M (branco dos padrões).

Por fim, efectuaram-se as leituras das absorvâncias no espectrofotómetro a 405 nm (SLT Spectra reader).

3.1.1.3 Apresentação dos resultados

O valor médio das absorvâncias dos brancos (NaOH 0.02M e substrato da PAL) foi subtraído aos valores médios das absorvâncias dos padrões e das amostras respectivamente, obtendo-se deste modo os valores corrigidos. A construção da curva padrão foi feita com os valores corrigidos dos padrões vs concentração em nmol pNP. A partir desta curva obtiveram-se as concentrações em nmol pNP das amostras. A actividade enzimática específica da PAL foi expressa em nmol de pNP, por tempo de incubação e por µg DNA, quantificada previamente para cada amostra (nmol pNP/min/µg DNA).

3.1.2 Ensaio histoquímico da actividade enzimática da PAL

O protocolo utilizado, através da coloração histoquímica de uma população de células aderentes, permitiu determinar a área de células que produziram a enzima PAL, uma vez que estas áreas após coloração exibem cor rosa ou avermelhada.

3.1.2.1 Preparação dos reagentes

A solução Fast Violet obteve-se por dissolução de 12 mg de Fast Violet Salt em água bidestilada e desionizada. Da adição de 80 µl de naftol a 2 ml de solução Fast Violet resultou a solução AP, que foi preparada imediatamente antes do ensaio.

3.1.2.2 Procedimento

Retiraram-se as placas de 6 poços, contendo as células fixadas, dos 4°C e normalizou-se a temperatura. Adicionou-se solução AP às células fixadas, protegeram-se as placas da luz e incubaram-se 45 minutos à temperatura ambiente. Por último, lavaram-se as células duas vezes com água destilada e desionizada.

3.1.2.3 Apresentação dos resultados

Para visualização das áreas de células que produziram a enzima PAL (coloração rosa ou avermelhada), recolheram-se imagens fotográficas (Olympus C-35AD-4) das células observadas com lupa (Olympus SZX9).

3.2 Doseamento da osteocalcina

A determinação quantitativa da Osteocalcina foi realizada com o kit Osteometer BioTech Rat-MID Osteocalcin ELISA® (enzyme-linked immunosorbent assay). O ensaio baseia-se na ligação competitiva de um anticorpo monoclonal à osteocalcina solúvel ou à osteocalcina imobilizada. O anticorpo monoclonal é específico para a osteocalcina humana, reconhecendo parte desta proteína, nomeadamente os aminoácidos 21 ao 29 [163]. Para a calibração foram utilizadas soluções de osteocalcina purificada humana sintética.

3.2.1 Preparação dos reagentes

Reconstituiu-se o liofilizado contendo a solução tampão PBS 1 x com estabilizante e conservante de proteína, com 5 ml de água destilada. Reconstituíram-se os Padrões de osteocalcina sintética humana e a solução de osteocalcina sintética humana, com 0.5 ml de água destilada. Os Padrões utilizados apresentaram as seguintes concentrações em ng/ml: 0; 137.5; 281.4; 686.3; 1204.4; 1606.9. A solução de lavagem obteve-se por diluição em água destilada, da solução contendo detergentes e conservantes, na proporção de 1:50. Os restantes reagentes, nomeadamente osteocalcina sintética humana biotinilada, tampão de incubação primária, anticorpo secundário, tetrametilbenzidina (substrato) e ácido sulfúrico 0.18M já se encontravam sob a forma de soluções prontas a usar.

3.2.2 Procedimento

Este ensaio caracterizou-se por sucessivas incubações. A pré-incubação consistiu na adição de 100 µl de osteocalcina biotinilada a cada poço das placas de 96 poços revestidos com estreptavidina, que se cobriram com

película adesiva e incubaram 30 minutos à temperatura ambiente, num prato agitador (300 rpm). Após a incubação lavaram-se 5 vezes os poços com a solução de lavagem. Seguiu-se a Incubação primária na qual se diluiu a solução do anticorpo primário com o tampão da incubação primária, na proporção de 1:100. Pipetaram-se 20 µl dos diferentes padrões de osteocalcina sintética humana, do controlo e das amostras para os poços apropriados (3 réplicas/padrão, 3 réplicas/controlo e 2 réplicas/amostra), seguidos de 150 µl da mistura do anticorpo primário com o tampão da incubação primária. Cobriram-se os poços com película adesiva e incubaram-se 1 hora à temperatura ambiente, no prato agitador. Finda a incubação primária lavaram-se 5 vezes os poços com a solução de lavagem. Na Incubação secundária adicionaram-se 100 µl do anticorpo secundário a cada poço, cobriram-se com película adesiva, incubaram-se 1 hora à temperatura ambiente, no prato agitador e tornou a lavar-se 5 vezes os poços com a solução de lavagem. A última incubação, de 15 minutos à temperatura ambiente, no prato agitador e no escuro, foi feita com a solução de tetrametilbenzidina (100 µl da solução em cada poço). Finalizado o tempo de incubação, a reacção colorimétrica foi parada por adição de 100 µl da solução de ácido sulfúrico 0.18M a cada poço, e a leitura das absorvâncias foi feita num tempo máximo de 2 horas (espectrofotómetro: comprimento de onda 450 nm).

3.2.3 Apresentação dos resultados

A curva padrão é uma curva logarítmica, elaborada com os valores das absorvâncias dos padrões vs concentração em ng/ml de osteocalcina. A partir desta curva obtiveram-se as concentrações em ng/ml de osteocalcina das amostras de valor desconhecido. A quantidade de osteocalcina foi expressa em ng osteocalcina por µg DNA, quantificado previamente para cada amostra.

4 Efeito do cálcio na mineralização dos osteoblastos

4.1 Coloração von Kossa

A coloração von Kossa é uma técnica que permite identificar os depósitos de cálcio que compõem os nódulos de mineralização óssea. Neste método, as células são tratadas com uma solução contendo prata que vai substituir o cálcio e depositar-se, conferindo uma cor metalizada.

4.1.1 Preparação dos reagentes

As soluções de nitrato de prata 2.5% e tiosulfato de sódio 5% obtiveram-se por dissolução completa de, respectivamente, 2.5 g de nitrato de prata e 5 g de tiosulfato de sódio em água destilada e desionizada.

4.1.2 Procedimento

Cobriram-se as células fixadas em placas de cultura de 6 poços com a solução de nitrato de prata 2.5% e colocaram-se as placas destapadas sob luzes U.V. durante 30 minutos. Lavaram-se as células com água destilada e desionizada, cobriram-se os poços com a solução tiosulfato de sódio 5% durante 2 a 3 minutos e lavaram-se novamente as células com água destilada e desionizada.

4.1.3 Apresentação dos resultados

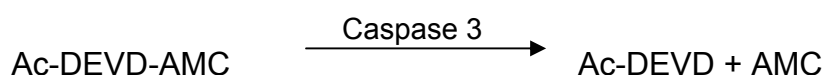
Para visualização dos nódulos de mineralização (cor negra ou castanha escura) recolheram-se imagens fotográficas (Olympus C-35AD-4) das células observadas com lupa (Olympus SZX9).

5 ***Efeito do cálcio na apoptose dos osteoblastos***

A caspase 3, também denominada por CPP32, Yama e apopain, é uma enzima crítica da apoptose. Esta enzima tem capacidade de processar as proenzimas das caspases 2, 6, 7 e 9 e clivar a maior parte das proteínas envolvidas na regulação da apoptose. Esta clivagem é parte do mecanismo que leva à morte celular, mecanismo esse que inclui condensação da cromatina e fragmentação do DNA [164].

5.1 **Doseamento da caspase 3**

O ensaio fluorimétrico para determinação da caspase 3 foi realizado com o Kit Caspase 3 Fluorimetric Assay Sigma®, e baseou-se na hidrólise do péptido acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amino-4-metilcumarina (Ac-DEVD-AMC) pela caspase 3, resultando um composto fluorescente 7-amino-4-metilcumarina (AMC):



5.1.1 **Preparação dos reagentes**

Procedeu-se à diluição do controlo positivo (caspase 3) com 50 µl de água destilada e desionizada e desta solução fizeram-se alíquotas que se guardaram a 70°C. Para o ensaio diluiu-se uma alíquota do controlo positivo com a solução tampão 1x na proporção de 1:200. O substrato Ac-DEVD-AMC foi dissolvido em DMSO e para o ensaio foram utilizados 5 µl adicionados de 3 ml da solução tampão 1x.

Para obtenção das soluções AMC padrão procedeu-se à diluição da solução Padrão de 10 mM para 10 µM com a solução tampão 1x e seguiu-se a seguinte tabela:

Tabela 5. Soluções padrão de AMC

Padrão AMC	nmol AMC / 200 µl	Solução AMC 10 µM	Solução tampão 1x
Branco	-	-	200 µl
6 µM	1.2	396 µl	264 µl
4 µM	0.8	264 µl	396 µl
2 µM	0.4	132 µl	528 µl
1 µM	0.2	66 µl	572 µl
500 nM	0.1	33 µl	627 µl
100 nM	0.02	6.6 µl	653.4 µl

5.1.2 Procedimento

Em placas de 96 poços (Costar® 3603) colocaram-se 5 µl das amostras, do controlo positivo da caspase e da solução tampão 1x. Das amostras pipetaram-se 2 réplicas, do controlo positivo e do branco, 3 réplicas. De seguida, adicionaram-se 200 µl da mistura de reacção contendo o substrato Ac-DEVD-AMC a cada poço, agitando suavemente, de modo a evitar a formação de bolhas. Cobriram-se as placas e incubaram-se 1 hora e meia no escuro à temperatura ambiente.

Para a elaboração da curva de calibração colocaram-se 3 réplicas de 200 µl de cada padrão e da solução tampão 1x numa placa de 96 poços (Costar® 3603).

Por fim, determinou-se a fluorescência das amostras no fluorímetro (SPECTRA Max Gemini XS), para os comprimentos de onda de excitação 360 nm e de emissão 460 nm.

5.1.3 Apresentação dos resultados

O valor médio da fluorescência da solução tampão 1x (branco) foi subtraído às fluorescências das amostras e dos padrões, obtendo-se os valores corrigidos.

Elaborou-se a curva de calibração dos valores de fluorescência vs concentração das soluções padrão em nmol caspase3, obtendo-se a partir desta curva as concentrações de caspase3 para as amostras. A actividade da caspase3 foi expressa em nmol libertadas por minuto e por ml de amostra ou do controlo positivo, usando a fórmula:

$$\text{Actividade (nmol AMC/min/ml)} = \frac{\text{nmol AMC} \times d}{t \times v}$$

onde: v – volume da amostra em ml, d – factor de diluição e t – tempo de reacção em minutos

6 *Análise estatística*

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os valores expressos pela média \pm desvio padrão. Foi utilizada como avaliação estatística a análise de múltiplos valores ANOVA. O valor $P < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

V – Resultados e Discussão

Capítulo I

Para determinar o efeito de altas concentrações de cálcio e o possível envolvimento do *CaSR* nos diferentes estádios da diferenciação dos osteoblastos, designadamente proliferação, maturação e mineralização, as células osteoblásticas MC3T3-E1 foram tratadas, durante 24 horas, com diferentes concentrações de cálcio (CaCl_2), com um agonista do *CaSR*, a neomicina, e simultaneamente com cálcio e neomicina, nas diferentes fases da diferenciação. Vários marcadores característicos destas fases foram determinados: conteúdo de DNA e de proteína total (proliferação e actividade celular); determinação quantitativa e qualitativa da actividade da fosfatase alcalina e produção de osteocalcina (maturação); coloração “von Kossa” (mineralização).

Foram também realizados estudos preliminares para avaliar o efeito de altas concentrações de cálcio e o possível envolvimento do *CaSR* na apoptose dos osteoblastos, através da determinação da enzima caspase 3, um marcador crítico do processo de apoptose celular.

1 Proliferação e síntese de proteínas

A quantificação do DNA e da proteína total sintetizada permitem avaliar os graus de proliferação e de actividade celulares.

Para avaliar o efeito de altas concentrações de cálcio na proliferação e síntese de proteínas através do *CaSR*, as células foram tratadas com as concentrações de cálcio 3.3 e 4.8 mM, com neomicina 300 μM (N) e com cálcio combinado com neomicina 300 μM (3.3mM+N e 4.8mM+N), aos dias 4, 11 e 18 de cultura.

As células foram recolhidas após 24 horas de tratamento, e foram

determinados o conteúdo de DNA e a quantidade de proteína sintetizada de acordo com os métodos descritos detalhadamente no capítulo “Materiais e Métodos”.

1.1 Quantificação do DNA

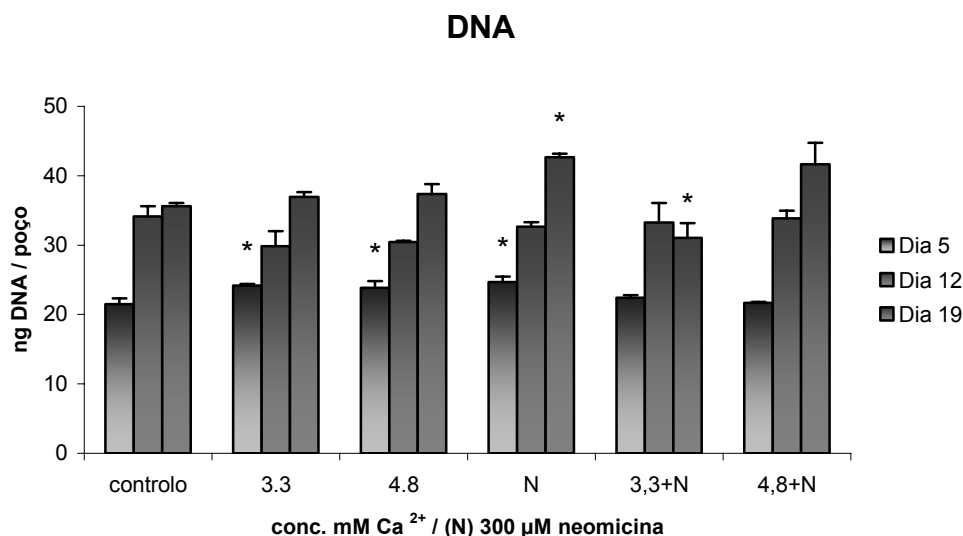


Figura 22. Conteúdo de DNA (ng) das células MC3T3-E1 por poço em diferentes dias de cultura (5^o, 12^o e 19^o dias) após tratamento com cálcio (3.3mM, 4.8 mM), com neomicina 300 μM (N) ou simultaneamente com cálcio e neomicina 300 μM (3.3mM+N, 4.8mM+N), durante 24 horas. O significado estatístico vs. controlo (1.8 mM cálcio) é considerado para valores de P ≤ 0.05.

A figura 22 representa os resultados da quantificação de DNA das células MC3T3-E1 após exposições de 24 horas a concentrações elevadas de cálcio (3.3 e 4.8 mM), à neomicina (N) e à combinação de elevadas concentrações de cálcio com neomicina (3.3mM+N, 4.8mM+N), em diferentes tempos da diferenciação osteoblástica (dias 4, 11 e 18).

No dia 5 de cultura, observou-se um aumento significativo no conteúdo de DNA das células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) em relação ao grupo controlo (1.8 mM).

O tratamento das células com neomicina (N) produziu um efeito semelhante ao tratamento com altas concentrações de cálcio, com aumento

significativo do conteúdo de DNA. Nas células tratadas com altas concentrações de cálcio combinadas com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N) não se observou diferença significativa no conteúdo de DNA relativamente ao grupo controlo (1.8 mM).

No dia 12 de cultura, as células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) apresentam uma tendência de diminuição do conteúdo de DNA em relação ao grupo controlo (1.8 mM). Em presença de neomicina (N) não se observou diferença significativa comparativamente com o grupo controlo (1.8 mM). O mesmo resultado foi observado para o tratamento das células com altas concentrações de cálcio combinadas com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N).

No dia 19 de cultura, observou-se ausência de diferença significativa entre os conteúdos de DNA das células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) e o grupo controlo (1.8 mM). Por outro lado, o tratamento das células com neomicina (N) resultou num aumento significativo no conteúdo de DNA em relação ao grupo controlo (1.8 mM). Quando as células foram tratadas com cálcio 3.3 mM combinado com neomicina (3.3mM+N) observou-se uma diminuição do conteúdo de DNA relativamente quer aos grupos de células tratadas com altas doses de cálcio, quer às células tratadas com neomicina. Este efeito não se verificou no grupo de osteoblastos tratados com cálcio 4.8 mM combinado com neomicina (4.8mM+N). Embora se observe uma tendência de aumento do conteúdo de DNA neste grupo de osteoblastos comparativamente com o grupo controlo, este aumento não é significativo.

1.2 Síntese de proteína total

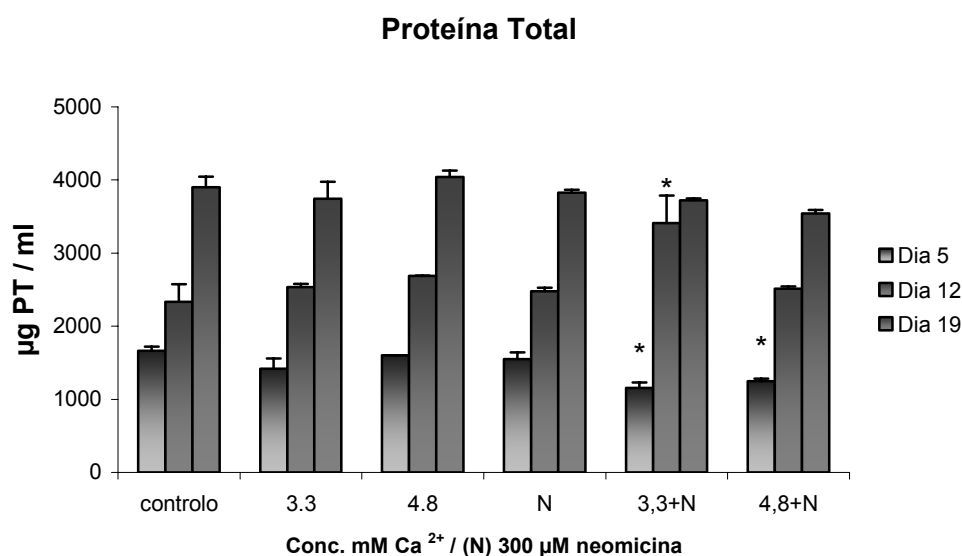


Figura 23. Conteúdo de proteína total (µg) das células MC3T3-E1 por ml em diferentes dias de cultura (5^o, 12^o e 19^o dias) após tratamento com cálcio (3.3mM, 4.8 mM), com neomicina 300 µM (N) ou simultaneamente com cálcio e neomicina 300 µM (3.3mM+N, 4.8mM+N), durante 24 horas. O significado estatístico vs. controlo (1.8 mM cálcio) é considerado para valores de $P \leq 0.05$.

A figura 23 representa os resultados da quantificação de proteína total sintetizada pelas células MC3T3-E1 após exposições de 24 horas a concentrações elevadas de cálcio (3.3 e 4.8 mM), à neomicina (N) e à combinação de elevadas concentrações de cálcio com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), em diferentes tempos de cultura (dias 4, 11 e 18).

No dia 5 de cultura, não se observou diferença significativa entre a quantidade de proteína total das células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) e o grupo controlo (1.8 mM). O mesmo se verificou nas células que foram expostas à neomicina (N). Nas células tratadas com altas concentrações de cálcio combinadas com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), observou-se uma diminuição significativa da proteína sintetizada relativamente ao grupo controlo (1.8 mM).

No dia 12 de cultura, os resultados demonstraram ausência de efeito do tratamento dos osteoblastos MC3T3-E1 com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) na síntese da proteína total. Embora se observe uma tendência de aumento da proteína total nestes grupos, este aumento não é significativo.

O mesmo resultado foi obtido quando se trataram as células com a neomicina (N), sem qualquer diferença significativa relativamente ao grupo controlo (1.8 mM). No entanto, quando se trataram as células com a concentração de cálcio 3.3mM combinada com neomicina (3.3mM+N), verificou-se um aumento significativo na quantidade de proteína total, em relação quer ao grupo controlo, quer aos restantes grupos. Este efeito não se verificou no grupo de osteoblastos tratados com cálcio 4.8 mM combinado com neomicina (4.8mM+N).

No dia 19 de cultura, não se observou diferença significativa entre a quantidade de proteína sintetizada pelas células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio e o grupo controlo (1.8 mM). O mesmo resultado foi obtido quando se trataram os osteoblastos com a neomicina (N), sem qualquer diferença significativa relativamente ao grupo controlo (1.8 mM). Do mesmo modo, o tratamento combinado das células com altas concentrações de cálcio e neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N) não produziu qualquer efeito na síntese de proteína total, relativamente ao grupo controlo e aos restantes grupos, não se observando diferença significativa.

1.3 Discussão

Vários trabalhos têm sido desenvolvidos desde a última década para se estudar o efeito do cálcio na proliferação de osteoblastos. Em 1993, estudos evidenciaram a sensibilidade dos osteoblastos MC3T3-E1 a altas concentrações de cálcio, uma vez que na sua presença exibiram quimiotaxia [165]. Foi também demonstrado em osteoblastos humanos um efeito de estimulação da proliferação em presença de altas concentrações de cálcio [111]. Os resultados obtidos no presente trabalho estão de acordo com os trabalhos referidos, na medida em que se verifica um aumento significativo da síntese de DNA quando as células são expostas a altas concentrações de cálcio em relação ao grupo controlo com concentração fisiológica de cálcio (1.8 mM), o que sugere uma estimulação da proliferação dos osteoblastos em presença de altas concentrações de cálcio.

De realçar que este efeito positivo foi observado unicamente no dia 5 de cultura e após 24 horas de tratamento.

Mais estudos realizados neste âmbito, utilizando osteoblastos MC3T3-E1 [1] e células osteogénicas de murinos ST2 [2] sugerem que o efeito positivo de altas concentrações de cálcio passa através do *CaSR*. Em ambos os tipos de células, quer o tratamento com altas concentrações de cálcio, quer com agonistas do *CaSR*, nomeadamente neomicina e gadolínio, resultaram no aumento da síntese de DNA e na quimiotaxia das células osteoblásticas e osteogénicas. É importante verificar que nestes estudos os tempos de cultura descritos se reportam à fase inicial da diferenciação osteoblástica, nunca ultrapassando os 4 dias de cultura.

Os resultados obtidos no presente trabalho, apontam fortemente para um efeito positivo na fase inicial da diferenciação mediado pelo *CaSR*, uma vez que no dia 5, a estimulação do *CaSR* pela neomicina, agonista policatiónico com alta afinidade para este receptor, resultou num aumento significativo do conteúdo de DNA relativamente ao grupo controlo. Este efeito é semelhante ao obtido com o tratamento com altas concentrações de cálcio, o que confirma o envolvimento do *CaSR* na proliferação dos osteoblastos.

Segundo Choy, ao dia 12 de cultura as células MC3T3-E1 encontram-se na fase final da proliferação e no início da formação ou maturação da matriz [162]. No presente estudo observa-se um aumento em todos os grupos de células do conteúdo do DNA de dia 5 para dia 12, o que é consistente com uma divisão celular plena característica deste período. No entanto, nesta fase (dia 12), 24 horas de tratamento com altas concentrações de cálcio ou com o agonista do *CaSR*, não resultaram em qualquer alteração na síntese de DNA.

Surpreendentemente, no dia 19 assiste-se a um ligeiro aumento do conteúdo de DNA dos osteoblastos MC3T3-E1 em presença da neomicina, relativamente quer ao grupo controlo quer aos grupos tratados com altas concentrações de cálcio. O tratamento dos osteoblastos com a concentração 3.3 mM combinada com neomicina apresenta uma diminuição significativa do conteúdo de DNA, quer em relação ao grupo controlo, quer em relação aos restantes grupos. Este resultado sugere que as células possam já ter cessado a divisão celular e que se encontrem na fase de maturação.

Efectivamente, e de acordo com Stein e seus colaboradores, a cessação da proliferação osteoblástica é necessária à iniciação da expressão de genes associados à fase de maturação [166].

A quantificação da proteína total sintetizada pelos osteoblastos é um indicador indirecto da actividade celular. Não constitui um marcador específico de uma determinada fase do ciclo celular, mas é sim um indicador do regular funcionamento da célula.

Os resultados obtidos no actual estudo demonstram um aumento da síntese de proteínas e implícito aumento da actividade celular ao longo da diferenciação osteoblástica, em todos os grupos de células.

O resultado mais relevante na análise da produção de proteína total foi o aumento significativo da proteína sintetizada pelas células expostas à concentração de cálcio 3.3 mM combinada com neomicina, no dia 12 de cultura. É importante verificar que a estimulação das células com elevadas concentrações de cálcio ou a estimulação do receptor isoladamente, não resultaram, deste tempo de cultura, no aumento da produção de proteína total. Como é sabido, as células possuem para além do *CaSR*, canais de cálcio que permitem a entrada de cálcio nas células. As células respondem ao cálcio por vários mecanismos, que incluem o *CaSR*, bem como canais de cálcio [167,168,169]. O efeito positivo da presença do cálcio em elevada concentração e do agonista do *CaSR* em simultâneo, pode sugerir a existência duma hipotética sinergia entre a estimulação do *CaSR* e a entrada de cálcio nos osteoblastos, por outro mecanismo, que pode incluir canais de cálcio. Serão necessários mais estudos para confirmar esta hipótese.

2 *Maturação da matriz extracelular*

Para avaliar o efeito de altas concentrações de cálcio na maturação da matriz extracelular através do *CaSR*, as células foram tratadas com as concentrações de cálcio 3.3 e 4.8 mM, com neomicina 300 μ M e com cálcio combinado com neomicina 300 μ M (3.3mM+N e 4.8mM+N), aos dias 4, 11 e 18 de cultura. As células foram recolhidas após 24 horas de tratamento, e foram avaliadas a actividade da fosfatase alcalina (PAL) e a osteocalcina produzida pelos osteoblastos, de acordo com os métodos descritos detalhadamente no capítulo “Materiais e Métodos”.

2.1 *Actividade Enzimática da PAL*

A actividade enzimática da PAL foi avaliada quantitativamente e qualitativamente, através de ensaios bioquímicos e histoquímicos, respectivamente.

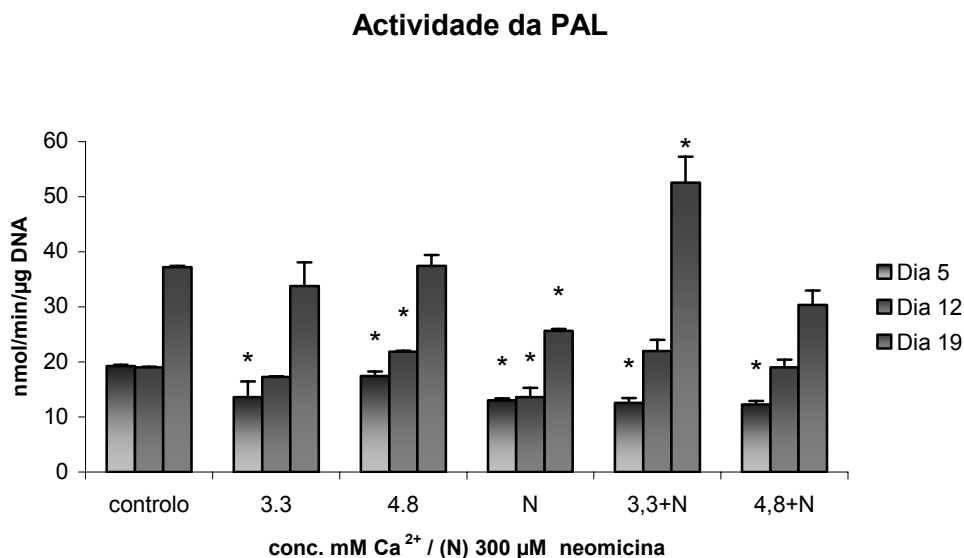


Figura 24. Actividade enzimática da PAL (nmol/min/μg DNA) das células MC3T3 em diferentes dias de cultura (5^o, 12^o e 19^o dias) após tratamento com cálcio (3.3mM, 4.8 mM), com neomicina 300 μ M (N) ou simultaneamente com cálcio e neomicina 300 μ M (3.3mM+N, 4.8mM+N), durante 24 horas. O significado estatístico vs. controlo (1.8 mM cálcio) é considerado para valores de $P \leq 0.05$.

A figura 24 representa os resultados da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 após exposições de 24 horas a concentrações elevadas de cálcio (3.3 e 4.8 mM), à neomicina (N) e à combinação de elevadas concentrações de cálcio com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), em diferentes tempos da diferenciação osteoblástica (dias 4, 11 e 18).

No dia 5 de cultura, observou-se uma diminuição significativa da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio em comparação com o grupo controlo (1.8 mM). Esta diminuição foi mais acentuada em presença da concentração 3.3 mM de cálcio. Do mesmo modo, observou-se uma diminuição significativa da actividade enzimática da PAL, quando os osteoblastos foram expostos à neomicina (N). Nas células tratadas com altas concentrações de cálcio combinadas com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), verificou-se igualmente uma diminuição da actividade enzimática da PAL relativamente ao grupo controlo (1.8 mM). Como se pode observar na figura 25, as localizações citoenzimáticas da PAL demonstram no grupo controlo (1.8 mM cálcio) uma actividade mais elevada desta enzima, quando comparada com os grupos tratados com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM), com o grupo tratado com neomicina (N) e com os osteoblastos na presença de cálcio combinado com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N). No grupo controlo as colónias da PAL positivas à coloração apresentam maior diâmetro e são mais evidentes.

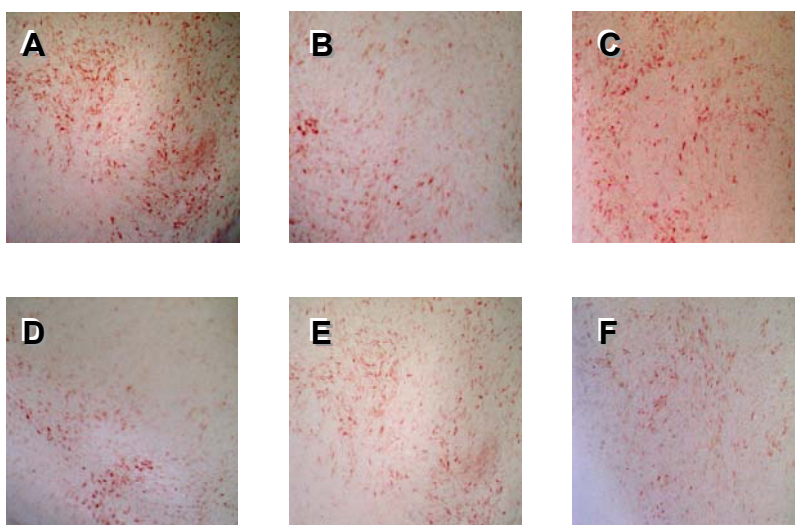


Figura 25. Coloração da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 ao dia 5 de cultura, após tratamento de 24 horas com: (B) cálcio 3.3 mM; (C) cálcio 4.8 mM; (D) neomicina 300 μ M; (E) cálcio 3.3 mM combinado com neomicina 300 μ M e (F) cálcio 4.8 mM combinado com neomicina 300 μ M. A PAL exibe uma coloração vermelha cuja intensidade é comparada com o grupo controlo com cálcio 1.8 mM (A).

No dia 12 de cultura (figura 24), os resultados demonstram um aumento significativo na actividade enzimática da ALP, quando as células MC3T3-E1 foram tratadas com a concentração 4.8 mM de cálcio, em relação ao grupo controlo (1.8 mM). No entanto, quando se trataram os osteoblastos com a neomicina (N), obteve-se uma diminuição significativa da actividade enzimática da PAL relativamente ao grupo controlo (1.8 mM). Esta diminuição é visível pela observação das colónias de PAL positivas à coloração, exibidas na figura 26. Por outro lado, em presença do cálcio, o efeito inibidor da neomicina foi revertido. De facto, o nível da actividade da PAL dos grupos sujeitos às concentrações 3.3 e 4.8 mM de cálcio combinado com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), é significativamente mais elevado quando comparado com o grupo de osteoblastos tratado apenas com neomicina, pese embora este aumento não seja significativo em relação ao grupo controlo (1.8 mM).

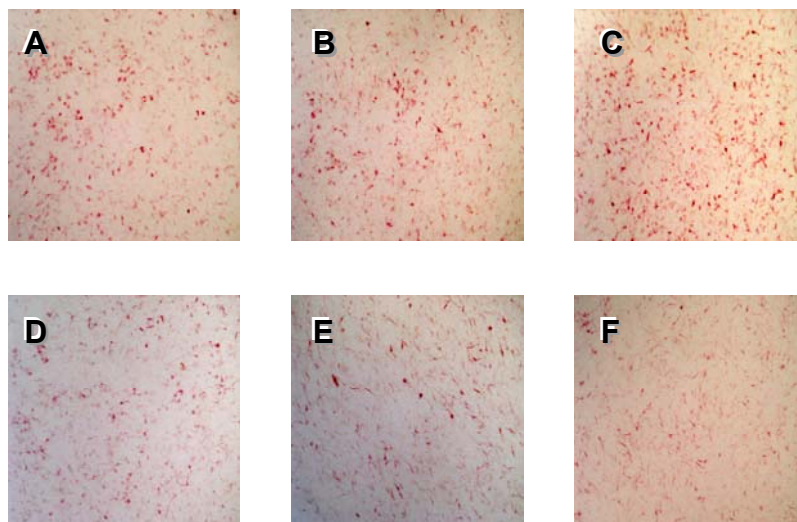


Figura 26. Coloração da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 ao dia 12 de cultura, após tratamento de 24 horas com: (B) cálcio 3.3 mM; (C) cálcio 4.8 mM; (D) neomicina 300 µM; (E) cálcio 3.3 mM combinado com neomicina 300 µM e (F) cálcio 4.8 mM combinado com neomicina 300 µM. A PAL exibe uma coloração vermelha cuja intensidade é comparada com o grupo controlo com cálcio 1.8 mM (A).

No dia 19 de cultura (figura 24) os resultados evidenciam a ausência de diferença significativa entre a actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 tratadas com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) e o grupo controlo (1.8 mM). Como se pode observar pela localização citoenzimática da PAL, parece não existir diferença na intensidade da coloração entre os grupos de osteoblastos tratados com doses elevadas de

cálcio e o grupo controlo (figura 27: B, C e A). Contudo, em presença da neomicina (N), verificou-se uma diminuição significativa da actividade enzimática da PAL relativamente ao grupo controlo (1.8 mM), que se pode confirmar pela detecção colorimétrica da actividade enzimática da PAL, que apresenta uma coloração menos intensa neste grupo (N) que o grupo controlo (figura 27: D e A). O tratamento das células com cálcio 3.3 mM combinado com neomicina (3.3mM+N) resultou num aumento significativo muito expressivo na actividade enzimática da PAL relativamente ao grupo controlo, ao grupo tratado com neomicina (N) e aos grupos tratados com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM). Na figura 27, as localizações citoenzimáticas da PAL demonstram uma actividade elevada da enzima nas células tratadas com cálcio 3.3 mM e neomicina em simultâneo (3.3mM+N). Este efeito não se verificou em presença do cálcio 4.8 mM combinado com neomicina (4.8mM+N).

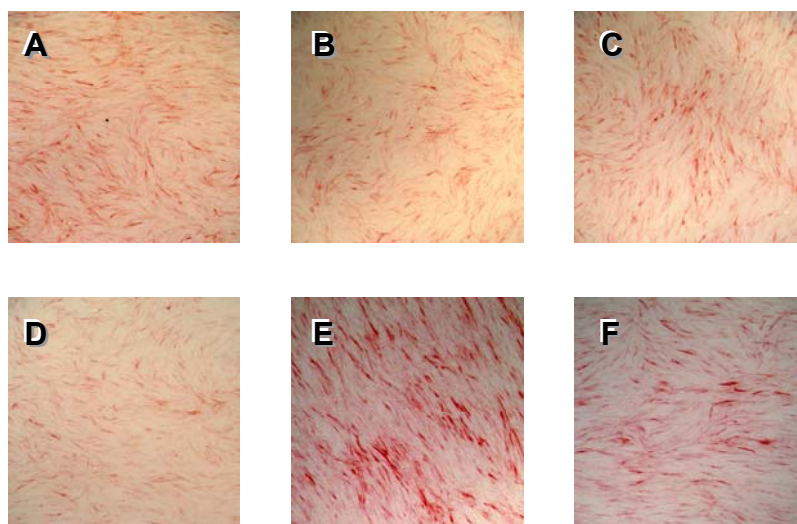


Figura 27. Coloração da actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1 ao dia 19 de cultura, após tratamento de 24 horas com: (B) cálcio 3.3 mM; (C) cálcio 4.8 mM; (D) neomicina 300 μM; (E) cálcio 3.3 mM combinado com neomicina 300 μM e (F) cálcio 4.8 mM combinado com neomicina 300 μM. A PAL exibe uma coloração vermelha cuja intensidade é comparada com o grupo controlo com cálcio 1.8 mM (A).

2.2 Osteocalcina

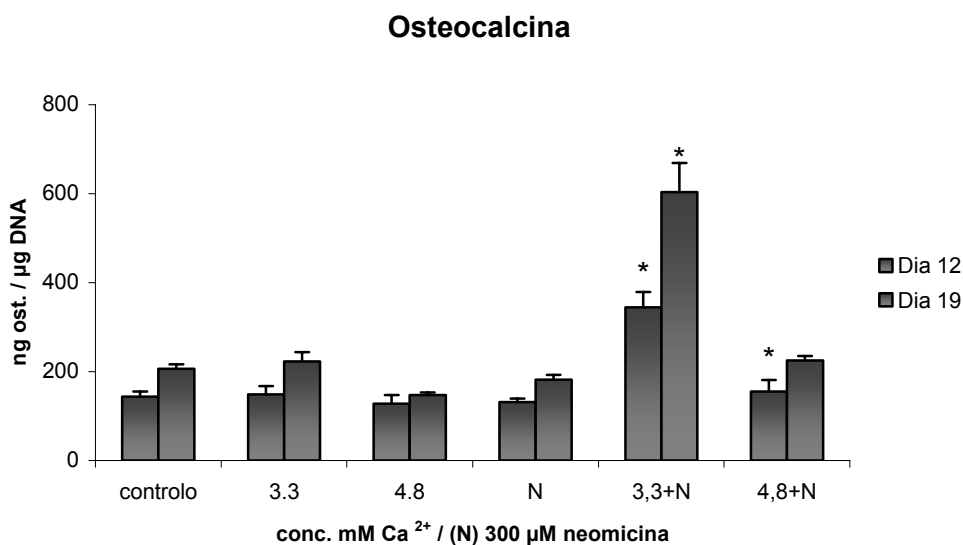


Figura 28. Conteúdo de osteocalcina sintetizada pelas células MC3T3-E1 expressa em ng por µg DNA em diferentes dias de cultura (12^o e 19^o dias) após tratamento com cálcio (3.3mM, 4.8 mM), com neomicina 300 µM (N) ou simultaneamente com cálcio e neomicina 300 µM (3.3mM+N, 4.8mM+N), durante 24 horas. O significado estatístico vs. controlo (1.8 mM cálcio) é considerado para valores de $P \leq 0.05$.

Na figura 28 estão representados os resultados da osteocalcina sintetizada pelas células MC3T3-E1 após exposições de 24 horas a concentrações elevadas de cálcio (3.3 e 4.8 mM), à neomicina (N) e à combinação de elevadas concentrações de cálcio com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), em diferentes tempos da diferenciação osteoblástica (dias 11 e 18).

Nos resultados do doseamento da osteocalcina referentes ao dia 12 de cultura, não se observa diferença significativa entre os grupos de osteoblastos tratados com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) e o grupo controlo (1.8 mM). Da mesma forma a osteocalcina determinada no grupo de células MC3T3-E1 tratado com neomicina (N), não apresenta diferença em relação ao grupo controlo (1.8 mM). No entanto quando os osteoblastos foram tratados com altas concentrações de cálcio combinadas com neomicina (3.3mM+N e 4.8mM+N), a osteocalcina produzida apresentou um aumento bastante significativo, relativamente ao grupo controlo e aos restantes grupos, principalmente com a concentração de cálcio 3,3 mM (3.3mM+N).

No dia 19 de cultura os resultados obtidos evidenciam a ausência de diferença significativa entre os grupos de células MC3T3-E1 tratados com altas concentrações de cálcio (3.3 e 4.8 mM) e o grupo controlo (1.8 mM), apresentando a concentração de 4,8 mM, inclusivamente uma diminuição no conteúdo de osteocalcina. O tratamento dos osteoblastos com neomicina (N) não altera significativamente a osteocalcina produzida, relativamente ao grupo controlo (1.8 mM). Um aumento muito significativo é observado particularmente quando as células são tratadas com cálcio 3,3 mM combinado com neomicina (3.3mM+N). Este efeito não foi observado em presença de cálcio 4,8 mM combinado com neomicina (4.8mM+N).

2.3 Discussão

A PAL é uma enzima da membrana celular, que actua como agente de nucleação nas primeiras fases da mineralização do osso [170]. A expressão desta proteína está associada ao fenótipo das células ósseas e com a maturação da matriz extracelular antes da deposição de minerais. A PAL é a primeira proteína associada ao fenótipo das células ósseas a ser detectada imediatamente após o declínio da proliferação [170]. Esta enzima é essencial para a mineralização da matriz óssea, como foi demonstrado pelos efeitos da sua deficiência na doença genética hipofosfatásica [107]. É portanto um marcador indicador da formação da matriz óssea e que anuncia a sua subsequente mineralização.

De acordo com os resultados do presente trabalho, a influência do cálcio na actividade da PAL parece depender da etapa de diferenciação em que se encontram os osteoblastos MC3T3-E1. Na fase inicial da diferenciação osteoblástica, dia 5, elevadas concentrações de cálcio induzem uma diminuição da actividade enzimática da PAL. A partir do dia 12 de cultura observa-se um aumento generalizado na actividade enzimática da PAL em todos os grupos de osteoblastos. No entanto, este aumento é ainda mais significativo quando as células são tratadas com 4.8 mM de cálcio, sugerindo que altas concentrações de cálcio poderão ter um efeito positivo na maturação dos osteoblastos. No dia 19 de cultura, elevadas concentrações de cálcio

parecem não alterar a actividade enzimática da PAL das células MC3T3-E1.

No que respeita ao efeito da estimulação do CaSR na actividade da PAL verifica-se neste estudo que, em todas as fases da diferenciação osteoblástica se obteve o mesmo resultado, ao contrário do que sucedeu quando se utilizaram concentrações elevadas de cálcio. Nos dias 5, 12 e 19 de cultura, a estimulação do CaSR resultou numa diminuição da actividade enzimática da PAL relativamente ao grupo controlo e aos grupos tratados com altas concentrações de cálcio. Um trabalho publicado recentemente demonstrou que a abolição da função do CaSR provocou uma diminuição da actividade enzimática da PAL, sugerindo que o CaSR pudesse estar envolvido na diferenciação osteoblástica [158]. No entanto, e uma vez que a actividade enzimática da PAL diminuiu mas não foi totalmente inibida (menos de 50% de inibição), os resultados de Yamauchi poderão não ser conclusivos, tanto mais que outras investigações nesta área deixaram em aberto a hipótese da existência de processos compensatórios para a ablação do CaSR em ratos [171,172]. No actual estudo, a estimulação do CaSR em presença de cálcio na concentração fisiológica (1.8 mM) parece não contribuir positivamente para a actividade da PAL e conseqüentemente para a diferenciação dos osteoblastos MC3T3-E1, em qualquer das fases da diferenciação osteoblástica (dias 5, 12 e 19 de cultura).

Há no entanto um facto que se destaca no presente trabalho: o agonista do CaSR, na presença de cálcio em concentração elevada provoca uma exacerbação da actividade enzimática da ALP. O efeito negativo da estimulação do CaSR pela neomicina na presença de cálcio 1.8 mM é revertido quando em presença de cálcio na concentração 3.3 mM. A combinação do agonista do CaSR e do cálcio em concentração elevada (3.3 mM) parece promover o aumento da actividade enzimática da ALP na diferenciação deste modelo de osteoblastos. Tal como sugerido na síntese de proteína, é possível a existência duma eventual sinergia entre a estimulação do CaSR e a promoção da entrada de cálcio nos osteoblastos, provavelmente por canais de cálcio.

Investigações prévias utilizando osteoblastos de porco demonstraram que o efeito de elevadas concentrações de cálcio (5mM), de curto e longo termo,

inibiu irreversivelmente a actividade enzimática da PAL, não por toxicidade mas sim por prováveis alterações na sua transcrição, para as quais curtas incubações seriam suficientes [110]. Provavelmente, e procurando uma explicação plausível para o que acontece quando se adiciona à neomicina 4.8 mM de cálcio, será provavelmente uma estimulação da entrada de cálcio nos osteoblastos em concentração tal, que altere a transcrição da PAL, verificando-se por isso uma diminuição da actividade desta enzima, nas células MC3T3-E1, nestas condições. Assim sendo, o possível envolvimento do CaSR na diferenciação dos osteoblastos estará ligado a um mecanismo ainda não identificado, e a associação de um agonista do CaSR e de cálcio em concentrações “óptimas” (que rondam os 3.3 mM) parece apresentar vantagens na estimulação da diferenciação osteoblástica.

A osteocalcina é a mais abundante das proteínas não colagénicas do osso [173]. É uma proteína com 5.7 KD e é caracterizada pelo elevado conteúdo de resíduos ácido 3 γ -carboxiglutâmico (Gla), que se ligam intimamente à hidroxiapatite, sendo por isso uma BGP (Bone Gla Protein). A sua expressão é máxima quando ocorre a mineralização da matriz extracelular quer *in vivo* [174] quer *in vitro* [175]. É somente expressa no período pós-proliferação quando tem início a mineralização, constituindo assim um excelente marcador dos osteoblastos maduros [90]. A osteocalcina por norma não é detectada antes do dia 12 de cultura, e não atinge uma expressão significativa antes dos dias 16-20, quando a sua expressão aumenta coordenadamente com a acumulação mineral total [176].

No presente trabalho, no dia 12 de cultura, os níveis de osteocalcina são semelhantes nos grupos de osteoblastos tratados com altas concentrações de cálcio e no grupo controlo, o que sugere que o aumento da concentração de cálcio não apresenta um efeito na produção da osteocalcina. Na fase mais tardia da diferenciação osteoblástica, no dia 19 de cultura, a concentração 3.3 mM cálcio parece não interferir na produção desta proteína; com a concentração de cálcio 4.8 mM assiste-se a uma diminuição no conteúdo de osteocalcina, sugerindo que, nesta linha celular, uma curta exposição a altas concentrações de cálcio não tenham um efeito positivo na diferenciação. À semelhança de alterações na transcrição da PAL provocadas por curtas

exposições a altas concentrações de cálcio [110], não está posta de lado a possibilidade do mesmo acontecer em relação à osteocalcina. Não há no entanto, até à data, estudos que fundamentem esta possibilidade.

Os resultados da análise do possível envolvimento do CaSR na produção da osteocalcina, apontam para o facto da estimulação por si só do receptor por um curto período de tempo, não produzir nenhum efeito na diferenciação dos osteoblastos, o que está em desacordo com um trabalho recentemente publicado. Segundo Yamauchi et al, no estudo já referido a propósito do envolvimento do CaSR na diferenciação dos osteoblastos, a expressão da osteocalcina em células MC3T3-E1 foi significativamente reduzida, após inactivação e ablação do CaSR [158]. Os autores colocaram a hipótese do CaSR desempenhar um papel activo na diferenciação osteoblástica. Tal como a actividade enzimática da PAL, houve diminuição mas não eliminação da expressão da osteocalcina, o que continua a levantar questões acerca do papel activo do CaSR na diferenciação osteoblástica.

No presente trabalho, quando se adicionou ao agonista do CaSR, cálcio em altas concentrações, a osteocalcina teve um enorme incremento, quer no dia 12, quer no dia 19 de cultura, atingindo o seu máximo para a utilização do cálcio 3.3 mM combinado com neomicina. De facto, a subida do conteúdo de osteocalcina foi significativo, tendo quase triplicado o valor obtido pelos osteoblastos expostos às diferentes concentrações de cálcio (controlo 1.8 mM, 3.3 e 4.8 mM) e à neomicina na presença de cálcio em concentração fisiológica 1.8 mM. Este efeito positivo da associação de cálcio 3.3 mM e neomicina, na diferenciação dos osteoblastos, verificou-se quer na actividade enzimática da PAL, quer na produção de osteocalcina.

Este fenómeno sugere uma forte sinergia entre o CaSR e a concentração de cálcio de 3.3 mM, sinergia que parece ter um efeito indiscutível na estimulação da diferenciação dos osteoblastos. Será necessário desenvolver mais estudos no sentido de confirmar esta sinergia.

3 Mineralização

Para avaliar o efeito de altas concentrações de cálcio na formação de nódulos de mineralização na matriz extracelular através do CaSR, as células foram tratadas com as concentrações de cálcio 3.3 e 4.8 mM, com neomicina 300 μ M e com cálcio combinado com neomicina 300 μ M (3.3mM+N e 4.8mM+N), ao dia 18 de cultura. Após 24 horas de tratamento, meio de cultura foi removido e as células foram lavadas, e procedeu-se à técnica de coloração “von Kossa”, descrita detalhadamente no capítulo “Materiais e Métodos”.

3.1 Coloração “von Kossa”

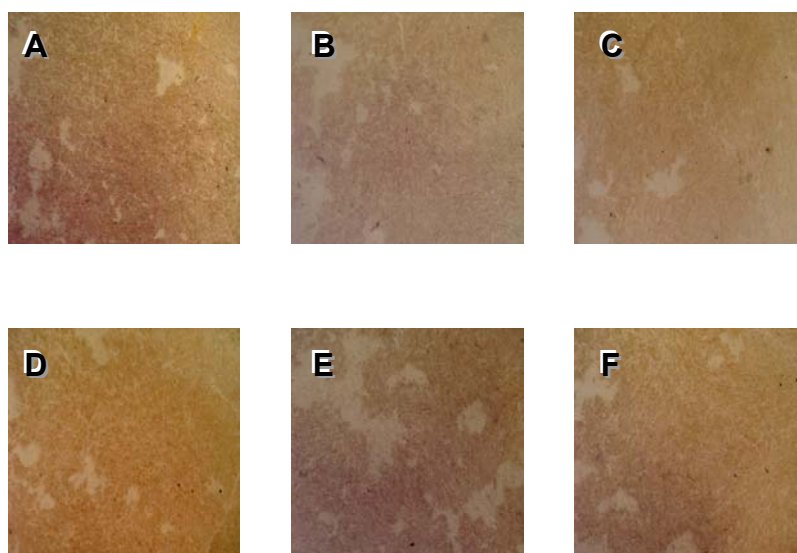


Figura 29. Coloração dos nódulos de mineralização das células MC3T3-E1 ao dia 19 de cultura, após tratamento de 24 horas com: (B) cálcio 3.3 mM; (C) cálcio 4.8 mM; (D) neomicina 300 μ M; (E) cálcio 3.3 mM combinado com neomicina 300 μ M e (F) cálcio 4.8 mM combinado com neomicina 300 μ M. Os nódulos de mineralização exibem uma coloração negra cuja intensidade é comparada com o grupo controlo com cálcio 1.8 mM (A).

As imagens obtidas após coloração “von Kossa”, representadas na figura 29, demonstram a presença de cálcio na matriz extracelular, não se observando no entanto, nódulos de mineralização em nenhum dos grupos de osteoblastos submetidos aos diferentes tratamentos, ao dia 19 de cultura.

3.2 Discussão

A coloração “von Kossa” permite demonstrar a presença de cálcio na matriz extracelular, sob a forma ionizada ou sob a forma de depósitos. Nesta técnica, a prata (da solução de nitrato de prata) vai substituir o cálcio reduzido pela forte intensidade luminosa (UV). A prata deposita-se, apresentando uma coloração escura metalizada. De facto, neste trabalho, em todos os grupos de osteoblastos é visível a presença de cálcio na matriz extracelular.

No entanto, apesar da detecção de cálcio na matriz extracelular, não foram observados nódulos de mineralização em nenhum dos grupos de osteoblastos. A ausência de coloração dos nódulos de mineralização pode sugerir a eventual possibilidade da mineralização ocorrer mais tardiamente neste clone de osteoblastos.

Capítulo II

1 Apoptose

A apoptose, ou morte celular programada, é um processo selectivo de eliminação de células em vários sistemas biológicos, desempenhando um papel muito importante na homeostase e na regeneração tecidual. A apoptose é caracterizada por uma série de alterações morfológicas, que incluem a activação de proteases específicas, as caspases “**Cisteína-Aspartato protease**”, destacando-se a caspase 3, responsável pela clivagem e colapso de vários componentes celulares [97].

No processo de remodelação óssea, a degradação óssea pelos osteoclastos envolve a remoção de minerais e a degradação dos constituintes orgânicos da matriz. A reabsorção do osso induz aumentos localizados de cálcio extracelular, que chega a atingir concentrações de 40 mM [176]. É sabido que concentrações elevadas de cálcio têm um efeito de estimulação na proliferação dos osteoblastos, mas desconhece-se o seu efeito na apoptose dos osteoblastos, nas diferentes fases da diferenciação celular. Deste modo, no presente trabalho, foi realizado um estudo preliminar do efeito de altas concentrações de cálcio e o possível envolvimento do CaSR na activação da caspase 3, como marcador da apoptose.

1.1 Actividade enzimática da caspase 3

De maneira a estabelecer se o cálcio terá influência na actividade da caspase 3, e conseqüentemente no processo de apoptose dos osteoblastos, trataram-se as células MC3T3-E1 com várias concentrações de cálcio (3.3mM, 4.8 mM, 20 mM e 40 mM) durante 24 horas. Após o tratamento foi determinada a actividade da referida enzima.

Para determinar se o CaSR será necessário para o cálcio exercer o seu efeito na apoptose osteoblástica, as células MC3T3-E1 foram também tratadas com o agonista do CaSR, a neomicina 300 µM e com as várias concentrações

de cálcio combinado com a neomicina. As determinações da actividade enzimática da caspase 3, realizaram-se em diferentes tempos de cultura, nos dias 4, 11 e 18, de acordo com o método descrito detalhadamente no capítulo “Materiais e Métodos”.

Para investigar o papel da caspase 3 na apoptose dos osteoblastos induzida por altas concentrações de cálcio, foi avaliado o efeito do inibidor da caspase 3, o Ac-DEVD-CHO, em todos os grupos. Como controlo positivo foi utilizada uma solução de caspase 3, tendo também sido avaliada a sua actividade na ausência e na presença do referido inibidor.

1.1.1 Ausência do inibidor da caspase 3

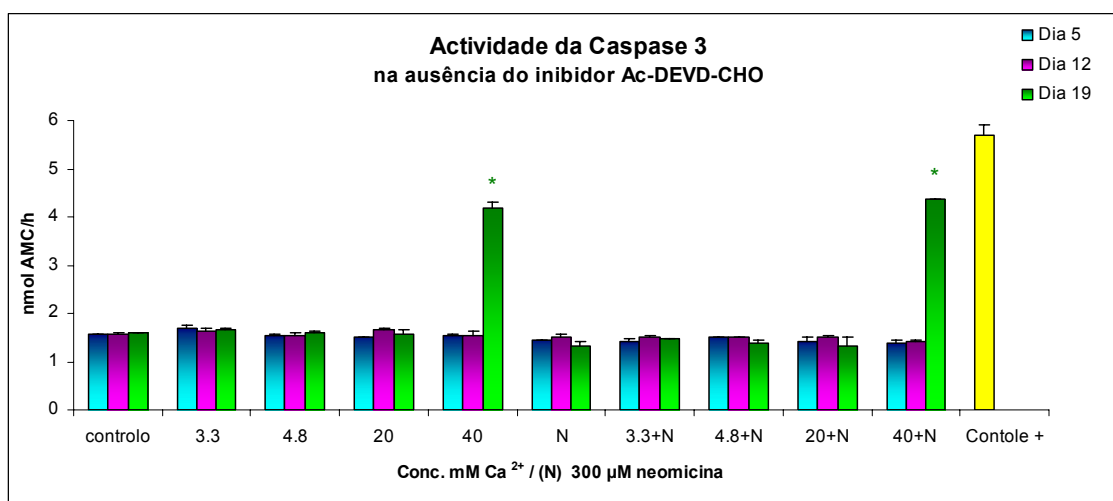


Figura 30. Actividade enzimática caspase 3 (nmolAMC / h) das células MC3T3 em diferentes dias de cultura (5º, 12º e 19º dias), na ausência do inibidor da caspase 3, após tratamento com cálcio (3.3mM, 4.8 mM, 20 mM e 40 mM), com neomicina 300 μM (N) ou simultaneamente com cálcio e neomicina 300 μM (3.3mM+N, 4.8mM+N, 20mM+N, 40mM+N), durante 24 horas. Como controlo positivo foi utilizada solução de caspase 3 (100μg/ml). O significado estatístico vs. controlo (1.8 mM cálcio) é considerado para valores de $P \leq 0.05$.

A figura 30 representa os resultados da actividade enzimática da caspase 3 das células MC3T3-E1 após exposições de 24 horas a concentrações elevadas de cálcio (3.3, 4.8, 20 e 40 mM), à neomicina (N) e à combinação de elevadas concentrações de cálcio com neomicina (3.3mM+N, 4.8mM+N, 20mM+N e 40mM+N), em diferentes tempos da diferenciação osteoblástica (dias 4, 11 e 18), na ausência do inibidor da caspase 3.

No dia 5 é possível verificar que o tratamento dos osteoblastos com altas concentrações de cálcio, em comparação com o grupo controlo, não resultou num aumento da actividade enzimática da caspase 3. Do mesmo modo, quando o receptor foi estimulado pela neomicina, e por altas concentrações de cálcio combinado com neomicina, também não foi observado qualquer efeito na actividade da caspase 3, relativamente ao grupo controlo.

No dia 12 de cultura, tal como no dia 5, não se verificou nos osteoblastos MC3T3-E1 diferença significativa entre a actividade enzimática da caspase 3 nos grupos tratados com altas concentrações de cálcio e o grupo controlo. Da mesma forma, não houve diferença significativa relativamente ao grupo controlo, quando o receptor foi estimulado pela neomicina, nem quando se trataram os osteoblastos com altas concentrações de cálcio combinado com neomicina.

No dia 19 de cultura o panorama apresentado, em termos de actividade da caspase 3, é diferente dos dias anteriores, nos osteoblastos tratados com altas concentrações de cálcio, na medida em que se assistiu a um aumento significativo da actividade enzimática da caspase 3, comparativamente quer com o grupo controlo, quer com os restantes grupos, quando tratados com 40 mM. A estimulação do receptor com neomicina não conduziu a uma diferença significativa em relação ao grupo controlo, bem como o tratamento com altas concentrações de cálcio combinado com neomicina. A excepção verifica-se para o grupo tratado com concentrações de cálcio 40 mM combinada com neomicina, que resultou num aumento significativo bastante acentuado da actividade enzimática da caspase 3.

1.1.2 Presença do inibidor da caspase 3

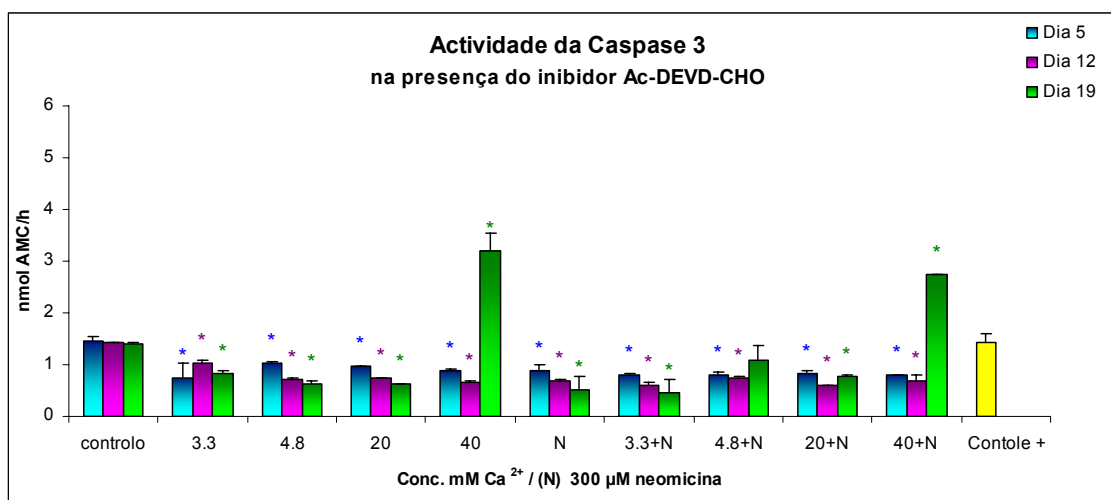


Figura 31. Actividade enzimática caspase 3 (nmolAMC / h) das células MC3T3 em diferentes dias de cultura (5º, 12º e 19º dias), na ausência do inibidor da caspase 3, após tratamento com cálcio (3.3mM, 4.8 mM, 20 mM e 40 mM), com neomicina 300 µM (N) ou simultaneamente com cálcio e neomicina 300 µM (3.3mM+N, 4.8mM+N, 20mM+N, 40mM+N), durante 24 horas. Como controlo positivo foi utilizada solução de caspase 3 (100µg/ml). O significado estatístico vs. controlo (1.8 mM cálcio) é considerado para valores de $P \leq 0.05$.

A figura 31 representa os resultados da actividade enzimática da caspase 3 das células MC3T3-E1 após exposições de 24 horas a concentrações elevadas de cálcio (3.3, 4.8, 20 e 40 mM), à neomicina (N) e à combinação de elevadas concentrações de cálcio com neomicina (3.3mM+N, 4.8mM+N, 20mM+N e 40mM+N), em diferentes tempos da diferenciação osteoblástica (dias 4, 11 e 18), na presença do inibidor da caspase 3.

Nos dias 5 e 12 de cultura, a actividade da enzima caspase 3 exibida pelos osteoblastos previamente tratados com o inibidor, foi em todos os grupos de células MC3T3-E1, significativamente mais baixa, que no grupo controlo (1.8 mM).

No dia 19, o tratamento prévio dos osteoblastos com o inibidor da caspase 3, resultou numa diminuição significativa da actividade da caspase 3 nos osteoblastos tratados com altas concentrações de cálcio, excepto para a concentração 40 mM, para a qual se observou um aumento muito significativo, relativamente quer ao grupo controlo, quer aos restantes grupos.

A estimulação do receptor, bem como o tratamento com altas concentrações de cálcio resultaram igualmente numa diminuição da actividade enzimática da caspase 3, com excepção novamente para o grupo tratado com 40 mM de cálcio, no qual se observou um aumento muito significativo, comparativamente com o grupo controlo.

1.2 Discussão

A apoptose é um mecanismo essencial que o organismo utiliza para remover células indesejáveis de modo a obter o controlo preciso do desenvolvimento e função de um órgão [96]. A definição de apoptose, que a distingue de outras formas de morte celular, é a de “processo de morte celular associado à activação das caspases” ou “morte celular mediada por caspases” [177]. A apoptose é controlada por dois mecanismos distintos, um iniciado por receptores de morte celular, membros da família do receptor TNF (tumor necrosis factor), e outro regulado pela família das proteínas Bcl-2, que envolve a libertação de citocromo c pela mitocôndria. Ambos os processos activam as caspases que induzem alterações morfológicas características da apoptose [96]. O aumento do cálcio citosólico e a sua entrada na mitocôndria, conduz ao colapso do potencial de membrana, à abertura da permeabilidade de canais na membrana da mitocôndria e à libertação de factores pró-apoptóticos, tais como o citocromo c referido anteriormente.

Comparada com outros tecidos a taxa de turnover celular no osso é baixa. No entanto, como seria de esperar, nos locais onde ocorre remodelação óssea há um número elevado de células apoptóticas [178].

Há evidências de que o fosfato inorgânico (P_i), um dos produtos libertados em maior quantidade durante a degradação óssea, pode estar relacionado com os níveis elevados de apoptose osteoblástica, verificados nos locais de reabsorção óssea [179].

Como já foi anteriormente demonstrado, nas imediações dos osteoclastos aquando da degradação do osso, a concentração de cálcio pode atingir 40 mM [176]. Deste modo, torna-se importante verificar se, à semelhança do que

acontece com o P_i , também o cálcio poderá induzir o processo de apoptose nos osteoblastos. No presente trabalho, os resultados obtidos permitiram verificar que os osteoblastos conseguem “resistir” a concentrações até 20 mM de cálcio, nos diferentes estadios da sua diferenciação, e que só a concentração mais elevada (40 mM) no último tempo de cultura celular (dia 19) conduziu a níveis elevados de actividade da caspase 3, ao contrário do efeito demonstrado pelo P_i nos estudos de Meleti et al, que induziu uma diminuição da viabilidade de células de osso humano, dependente quer da dose quer do tempo [179].

A presença do inibidor da actividade enzimática da caspase 3, demonstrou que em todos os tratamentos (com as diferentes concentrações de cálcio, com o agonista do *CaSR* e nos tratamentos combinados de cálcio com o agonista do *CaSR*), nos diferentes tempos de cultura, principalmente quando se atingiram os níveis de actividade da caspase 3 mais elevados (concentração 40 mM no dia 19), houve uma atenuação da actividade da caspase 3.

Lin Kuo-I et al utilizaram linhas celulares de rim humano, HEK 293 e HEK-WT (com e sem expressão do *CaSR*, respectivamente) e obtiveram resultados demonstrativos de que elevadas concentrações de cálcio actuam juntamente com o *CaSR* de modo a prevenir a apoptose induzida pelo vírus SV [180]. Os resultados do presente trabalho apontam para a ausência de influência da estimulação do *CaSR* na presença de altas concentrações de cálcio, na apoptose dos osteoblastos MC3T3-E1.

VI – Conclusão e Perspectivas

A osteogénese é um processo complexo através do qual as células progenitoras existentes na medula óssea e nas superfícies ósseas (endóstio e perióstio) vão sucessivamente passando por vários estádios de desenvolvimento, com a finalidade de formar o osso. Como tal, é o processo pelo qual os ossos são formados durante o desenvolvimento embrionário e como é formado inicialmente o osso no local de uma lesão.

A remodelação óssea é um mecanismo que permite a manutenção do equilíbrio do osso, e que compreende a degradação de osso pelos osteoclastos, seguida da substituição do osso removido, pelos osteoblastos. Da degradação do osso resulta a libertação de cálcio em elevadas concentrações que se pensa poder funcionar como factor local na regulação do processo da remodelação óssea. O cálcio pode deste modo, transmitir um sinal aos pré-osteoblastos, modulando a sua subsequente resposta fisiológica.

O presente estudo pretendeu clarificar a resposta dos osteoblastos MC3T3-E1 a várias concentrações elevadas de cálcio e o papel do *CaSR* no efeito do cálcio, durante as fases de diferenciação (proliferação, maturação e mineralização da matriz óssea). Pretendeu também avaliar preliminarmente, o impacto das condições referidas na actividade da caspase 3 dos osteoblastos MC3T3-E1, como marcador da apoptose.

Os resultados obtidos confirmam a estimulação da proliferação dos osteoblastos MC3T3-E1 por altas concentrações de cálcio mediada pelo *CaSR*, já avançada por estudos anteriores.

Os marcadores específicos da diferenciação dos osteoblastos determinados no presente estudo, demonstraram uma ausência de estimulação da maturação dos osteoblastos, face a altas concentrações de cálcio e face à estimulação do *CaSR* pelo agonista deste receptor. No entanto, houve uma estimulação da diferenciação dos osteoblastos com a associação de cálcio 3.3 mM ao agonista do *CaSR* (neomicina 300 µM), demonstrado quer pelo incremento da actividade enzimática da PAL, quer pelo aumento da produção

de osteocalcina. Estes resultados sugerem claramente uma forte sinergia entre o mecanismo de estimulação do CaSR e outros mecanismos envolvidos na resposta dos osteoblastos ao cálcio, tais como canais de cálcio, particularmente na concentração 3.3 mM. Esta sinergia parece ter um efeito indiscutível na estimulação da diferenciação dos osteoblastos. Futuras investigações serão necessárias para confirmar esta hipótese. Como tal, seria importante explorar este efeito sinérgico, utilizando por exemplo, bloqueadores dos canais de cálcio e antagonistas do CaSR.

No que refere à fase de mineralização da matriz óssea, e uma vez que os resultados obtidos não demonstraram presença de nódulos de mineralização, seria importante analisar tempos de diferenciação mais tardios das culturas de osteoblastos MC3T3-E1, para além dos 19 dias.

As células MC3T3-E1 apresentaram neste trabalho uma elevada “resistência”, no que diz respeito à estimulação da actividade enzimática da caspase 3 (marcador apoptótico) pelas elevadas concentrações de cálcio (até 20 mM), nas diferentes fases de diferenciação osteoblástica.

A estimulação do receptor, bem como a estimulação do receptor em presença de elevadas concentrações de cálcio (até 20 mM), não resultaram num aumento da actividade desta enzima. Além disso, esta “resistência” das células observou-se mesmo para a concentração de cálcio 40 mM nas fases iniciais da diferenciação, e o efeito desta concentração só resultou numa elevação da actividade da caspase 3, na fase mais tardia (dia 19 de cultura). No que respeita ao envolvimento do CaSR na actividade da caspase 3, foi demonstrado que a estimulação do CaSR com a neomicina (300 μ M) não induz um aumento desta actividade, uma vez que o cálcio na concentração 40 mM e a estimulação do receptor com o agonista na presença de 40 mM de cálcio, apresentaram sensivelmente o mesmo nível de actividade da caspase 3.

Para confirmar os resultados obtidos, seria importante realizar outros estudos complementares de avaliação do estado apoptótico dos osteoblastos e comparar com outros tipos de células que não estejam naturalmente em ambientes de concentrações elevadas de cálcio.

Desta forma adquirir-se-ão mais conhecimentos deste fenómeno de “resistência” dos osteoblastos a elevadas concentrações de cálcio.

Por último fica a sugestão de realizar estes ensaios em células primárias de osso humano, para uma maior aproximação das condições fisiológicas.

VII – Referências Bibliográficas

1. **Yamaguchi T**, Chattopadhyay N, Kifor O, et al. Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res.* 1998; 13:1530-38.
2. **Yamaguchi T**, Kifor O, Chattopadhyay N, Brown EM. Expression of extracellular calcium sensing receptor in the clonal osteoblast-like cell lines, UMR-106 and SAOS-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; 243: 753-757.
3. **Chang W**, Tu C, Chen TH *et al.* Expression and signal transduction of calcium-sensing receptors in cartilage and bone. *Endocrinology.* 1999; 140: 5883-93.
4. **Heany RP**. Calcium. *Principles of Bone Biology.* 1996; 72: 1007-1010.
5. Imagem adaptada de www.ama-cmeonline.com
6. **Parfitt AM**. Osteonal and hemi-osteonal remodelling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* 1994; 55 (3): 273-286.
7. Imagem adaptada de casweb.cabou.edu/pbell
8. **Nanci A**, Content and Distribution of Noncollagenous Matrix Proteins in Bone and Cementum: Relationship to Speed of Formation and Collagen Packing Density. *J Struc Biol.* 1999; 126: 256-269.
9. **De Ricqlès A**, Meunier FJ, Castanet J, Francillon-Vieillot H. Comparative microstructure of bone. *Bone Matrix and Bone Specific Products.* Hall BK (Ed.) CRC Press, Boca Raton, FL. 1991; 1-78.
10. Imagem adaptada de w3.ouhsc.edu/histology
11. Imagem adaptada de neurobio.mcphu.edu/Goldmanweb
12. Imagem adaptada de academic.brooklyn.cuny.edu
13. **Traub W**, Arad T, Weiner S. Origin of mineral crystal growth in collagen fibrils. *Matrix.* 1992; 12(4): 251-255.
14. **Glimcher MJ**. The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. In: *Disorders of bone and mineral metabolism.* (Ed. Coe FL & Favus MJ). Raven Press, New York. 1992; 256-286.
15. **Green J**. The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular

elements. *Miner Electolyte Metab.* 1994; 20(1-2): 7-15.

16. Rey C, Kim HM, Gerstenfeld L, Glimcher MJ. Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium-phosphate crystals formed during the calcification of the organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture. *J Bone Miner Res.* 1995; 10(10): 1577-88.

17. Kim HM, Rey C, Glimcher MJ. Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous method at low temperature. *J Bone Miner Res.* 1995; 10(10): 1589-601.

18. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, et al. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol.* 1983; 96(1): 191-8.

19. Quarles ID, Yohay DA, Lever LW, et al. Distinct proliferative and differentiated stages of murine MC3T3-E1 cells in culture: an in vitro model of osteoblast development. *J Bone Miner Res.* 1992; 7: 683-692.

20. Gehron-Robey P. The Biochemistry of Bone. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 1989; 18: 859-902.

21. Sodek J, Zang Q, Goldberg HA, et al. Non-collagenous bone proteins and their role in substrate-induced bioactivity. In: Davies JJE, Ed. *The bone-biomaterial interface.* 1991; Toronto: university of Toronto press 97-110.

22. Delmas PD, Malaval L. The proteins of bone. In: Mundy GR and Martin TJ, Eds. The handbook of experimental pharmacology. *Physiology and Pharmacology of Bone.* 1993; vol.107. Berlin: springer; 673-724.

23. Sodek KL, Tupy JH, Sodek J, Grynpas MD. Relationship between bone protein and mineral in developing porcine long bone and calvaria. *Bone.* 2000; (26) 2: 189-198.

24. Nijweide PJ, Burger EH, Klein-Nulend J, Van der Plas A. The osteocyte. In: Principles of bone biology. (Ed Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA). American Press, New York. 1996; 115-126.

25. Gehron-Robey P. Bone matrix proteoglycans and glycoproteins. In JP Bilezikian, Raisz LG, Rodan GA (Eds.). *Principles of bone biology.* San Diego: Academic Press. 2002; 1: 225-237.

26. Weinstein RS, Manolagas SC. Apoptosis and osteoporosis. *Am J Med.* 2000; 108(2): 153-64.

27. Frost HM. Bone remodeling dynamics. Springfield: Thomas Publishers.

1963.

28. **Palumbo C.** A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chicks embryos. *Cell Tissue Res.* 1986; 246: 125-131.
29. **Aarden EM**, Burger EH, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone. *J Cell Bioch.* 1994; 55: 287-299.
30. **Knothe Tate ML.** Whither flows the fluid in bone? An osteocyte's perspective. *J Biomech.* 2003; 36(10): 1409-24.
31. **Burger EH & Klein-Nulend J.** Mechanotransduction in bone – role of the lacuno-canalicular network. *Faseb J.* 1999; 13 Suppl: S101-12.
32. **Sorkin AM**, Dee KC, Knothe Tate ML. “Culture Shock” from the bone cell's perspective: emulating physiological conditions for mechanobiological investigations. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004; 287: 1527-1536.
33. **Miller Sc**, Bowman BM, Smith JM, Jee WS. Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec.* 1980; 198(2): 163-73.
34. **Gartland A**, Buckley KA, Dillon JP, et al. Isolation and culture of human osteoblasts. *Methods Mol Med.* 2004; 107: 29-54.
35. **Everts V**, Delaissé JM, Korper W, et al. The bone lining cells: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 2002; 17: 77-90.
36. **Vänäänen HK**, Yin-kun L, Lehenkari P, Uemara T. How do osteoclasts resorb bone? *Materials Science and Engineering C.* 1998; 205-209.
37. **Suda T**, Udagawa N, Nakamura I, et al. Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone.* 1995; 17(2 suppl): 87-91.
38. Imagem adaptada de www.cytochemistry.net
39. **Takahashi N**, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256(3): 449-55.
40. **Yasuda H**, Shima N, Nakagawa N, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone.* 1999; 25(1): 109-13.
41. Imagem adaptada de www.siumed.edu
42. **Gilbert SF.** Osteogenesis: The development of bones. In: *Developmental Biology* (6th Ed). 2000; Part 3.

43. Imagem adaptada de www.bioscience.org
44. **Frost HM**. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res* 3. 1969; 3: 211-237.
45. Imagem adaptada de www.prn.org
46. **Mori S**, Burr DB. Increased intracortical remodeling following fatigue damage. *Bone*. 1993; 14(2): 103-9.
47. **Weryha G**, Leclere J. Paracrine regulation of bone remodeling. *Horm Res*. 1995; 43(1-3): 69-75.
48. **Rodan GA**, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption – a hypothesis. *Calcif Tissue Int*. 1981; 33(4): 349-51.
49. **Takahashi N**, Akatsu T, Udagawa N, et al. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*. 1988; 123(5): 2600-2.
50. **Suda T**, Udagawa N, Takahashi N. Role of 1 alpha, 25-dihydroxyvitamine D₃. In: *Principles of bone biology*. (Ed Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA). Academic Press, New York. 1996; 87-102.
51. **Bonewald LF**, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop Relat Res*. 1990; 250: 261-76.
52. **Parfitt AM**, Mundy GR, Roodman GD, et al. A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphonates. *J Bone Miner Res*. 1996; 11(2): 150-9.
53. **Parfitt AM**. The mechanism of coupling: a role for the vasculature. *Bone*. 2000; 26(4): 319-23.
54. **Frost HM**. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res*. 1989; 248: 283-93.
55. **Marks SC**, Odgren PR. Structure and development of the skeleton. In: *Principles of bone biology*. Academic Press San Diego (Eds). 2002; 1: 3-15.
56. **Mackie EJ**. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. *Int J Biochem Cell Biol*. 2003; 35 (9): 1301-5.
57. **Marie PJ**, de Vernejoul MC. Facteurs systémiques et locaux du remodelage osseux. In: *Maladies métaboliques osseuses de l'adulte*. Ed Kuntz D. Médecine-Sciences, Flammarion, Paris. 1996; 49-86.
58. **Yasuda H**; Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:3597-3602.

59. **Udagawa N**, Takahashi N, Jimi E *et al.* Osteoblasts/Stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor: Receptor activator of NF-kappa B ligand. *Bone*. 1999; 25: 517-523.
60. **Aubin JE**, Liu F. The osteoblast lineage. In: *Principles of bone biology*. (Eds) Academic Press New York. 1996; 51-68.
61. **Triffitt JT**. The stem cell of the osteoblast. In: *Principles of Bone Biology*. (Eds) Academic Press New York. 1996; 39-50.
62. **Maximov A**. Der lymphozyt als gemeinsame stammzelle der verschiedenen blutelement in der embryonalen entwicklung und im postfetalen säugetiere. *Folia Haematologica VIII*. 1909; 8:125-134.
63. **Hoshi K**, Komori T, Ozawa H. Morphological characterization of skeletal cells in cbfa1-deficient mice. *Bone*. 1999; 25 (6):639-651.
64. **Komori T**. A fundamental transcription factor for bone and cartilage. *Bioch Bioph Res Com*. 2000; 276:813-816.
65. **Ducy P**, Schinke T, Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science*. 2000; 289: 1501-1505.
66. **Mundy GR**, Boyce BF, Yoneda T, *et al.* *Osteoporosis*. (Eds) Academic Press San Diego. 1996; 301-313.
67. **Yamaguchi A**, Komori T, Suda T. Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs and Cbfa1. *Endoc reviews*. 2000; 21(4): 393-411.
68. **Pacifici R**. Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis – the second decade. *Endocrinology*. 1998; 139(6): 2659-61.
69. **Aubin JE**, Triffitt JT. Mesenchymal stem cells and osteoblast differentiation. In Bilezikian JP, Raizis LG, Rodan GA (Eds.). *Principles of bone biology*. San Diego: Academic Press. 2002; 1: 59-81.
70. **Kirker-Head CA**. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins. *Adv Drug Deliv Rev*. 2000; 15, 43(1): 65-92.
71. **Robey PG**, Yang MF, Flanders KC. Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta in vitro. *J Cell Bio*. 1987; 105: 457-463.
72. **Seyedin SM**, Thompson AY, Bentz H, *et al* Cartilage inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J Biol Chem*. 1986; 261(13): 5693-5.

73. **Pfeilschifter J**, Mundy JR. Modulation of type beta transforming growth factor activity in bone cultures by osteotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84(7): 2024-28.
74. **Noda M**, Camiliere JJ. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor beta. *Endocrinology*. 1989; 124(6): 2991-94.
75. **Sakai R**, Eto Y. Involvement of activin in the regulation of bone metabolism. *Molec Cell Endocrin*. 2001; 180: 183-188.
76. **Lian JB**, Stein GS. Development of the osteoblast phenotype: molecular mechanism mediating growth and differentiation. *Iowa Orthop J*. 1995. 15: 118-40.
77. **Nishiya Y**, Nosaka N, Uchii M, Sugimoto S. A potent 1,4-dihydropyridine l-type calcium channel blocker, benidipine, promotes osteoblast differentiation. *Calcif Tissue Int*. 2001; 70: 30-39.
78. **Yoon K**, Golub E, Rodan GA. Alkaline phosphatase cDNA transfected cells promote calcium and phosphorous deposition. *Connect Tissue Res*. 1989; 22: 17-25.
79. **Fallon MD**, Whyte MP, Teitelbaum SL. Stereospecific inhibition of alkaline phosphatase by L-tatramisole prevents in vitro cartilage calcification. *Lab Invest*. 1980; 43: 489-94.
80. **Weiss MV**, Cole DEC, Ray K, *et al*. A missense mutation in the human liver/bone/kidney alkaline phosphatase gene causing a lethal form of hypophosphatasia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85: 7666-69.
81. **Aubin JA**, Carlton G, Bellows CG, Turksen K, Liu F, Heersche JNM. Analysis of osteoblast lineage and regulation of differentiation. In: Slavkin H, Price P (eds) *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Elsevier science, the Netherlands. 1992; 267.
82. **Sugawara Y**, Suzuki K, Koshikawa M, *et al*. Necessity of enzymatic activity of alkaline phosphatase for mineralization of osteoblastic cells. *Jap J Phar*. 2002; 88: 262-269.
83. Imagem adaptada de www.vet.uga.edu
84. **Hauschka PV**, Lian JB, Gallop PM. Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975; 72: 3925-9.
85. **Price PA**, Otsuka AA, Poser JW, *et al*. Characterization of a gamma-

carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1976; 73: 1447-51.

86. Gallop PM, Lian JB, Hauschka PV. Carboxylated calcium-binding proteins and vitamin k. *N Engl J Med*. 1980; 302:1460-6.

87. Hauschka PV, Lian JB, Cole DE, Gundberg CM. Osteocalcin and matrix gla protein: vitamin k – dependent proteins in bone. *Physiol Rev*. 1989; 69:990-1047.

88. Poser JW, Esch FS, Ling NC, Price PA. Isolation and sequence of the vitamin k – dependent protein from human bone. Undercarboxylation of the first glutamic acid residue. *J Biol Chem*. 1980; 255: 8685-91.

89. Imagem adaptada de www.enu.edu

90. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive and development of the osteoblast phenotype. *Endoc Rev*. 1993; 14 (4): 424-442.

91. Parfitt AM. Bone-forming cells in clinical conditions. The Osteoblast and Osteocyte. In: Hall BK, ed. *Bone*. Boca Raton: CRC Press. 1992; 351-429.

92. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, *et al*. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factor and cytokines. *J Bone Miner Res*. 1998; 13: 793-802.

93. Weinstein RS, Jilka RM, Parfitt AM, Manolagas SC. Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblast and osteocyte by glucocorticoids: potencial mechanism of deleterious effect on bone. *J Clin Invest*. 1998; 102: 274-282.

94. Varga F, Luegmayer E, Fratzi-Zelman, *et al*. Tri-iodothyronine inhibits multilayer formation of the osteoblastic cell line, MC3T3-E1, by promoting apoptosis. *J Endocrinology*. 1999; 160: 57-65.

95. Kutuk O, Pedrech A, Harrison P, Basaga H. Pramnicin induces apoptosis I Jurkat leukemia cells: A role for JNK, p38 and caspase activation. *Apoptosis*. 2005; 10: 597-609.

96. Xing L, Boyce BF. Regulation of apoptosis in osteoclasts and osteoblastic cells. *Bioch Bioph Res Com*. 2004; 328: 709-720.

97. Kothakota S. Caspase 3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science*. 1997; 278:294-298.

98. Imagem disponível em ccforum.com

99. **Brown EM.** The extracellular Ca^{2+} -sensing receptor: Central mediator of systemic calcium homeostasis. *Ann Rev Nutr.* 2000; 20: 507-533.
100. **Brody JE.** Calcium takes its place as a superstar of nutrients. *NY Times Oct. 13.* 1998.
101. **Flynn A.** The role of dietary calcium in bone health. *Proced Nutrit Socie.* 2003; 62: 851-858.
102. Esquema adaptado de: Nussey SS, Whithead. *Endocrinology – An Integrated Approach.* 1999; BIOS Scientific Publishers Ltd.
103. **Nussey SS, Whithead.** *Endocrinology – An Integrated Approach.* 1999; BIOS Scientific Publishers Ltd.
104. **Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, et al.** Parathyroid hormonelike protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 1987; 80(6): 1803-7.
105. **Brown EM.** Mechanisms underlying the regulation of parathyroid hormone secretion in vivo and in vitro. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 1993; 2(4): 541-51.
106. **Habener JF, Rosenblatt M, Potts JT Jr.** Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action, and metabolism. *Physiol Rev.* 1984; 64(3): 985-1053.
107. **Whyte MP.** Alkaline phosphatase: physiological role explored in hypophosphatasia. In: Peck WA (ed) *Bone Min Res.* 1989: 175-218.
108. **Parfitt AM, Kleerekoper M, Villanueva AR.** Increased bone age: mechanisms and consequences. In Christiansen C, Joansen C, Riis BJ (Eds.). *Osteoporosis.* Copenhagen: Osteopress ApS. 1987; 301-308.
109. **Godwin SL, Soltoff SP.** Extracellular calcium and platelet-derived growth factor promote receptor mediated chemotaxis in osteoblasts through different signalling pathways. *J Biol Chem.* 1997; 72: 11307-12.
110. **Eklou-Kalonji E, Denis I, Lieberherr M, Pointillart A.** Effects of extracellular calcium on the proliferation and differentiation of porcine osteoblasts in vitro. *Cell Tissue Res.* 1998; 292:163-171.
111. **Nakade O, Takahashi K, Takuma T, et al.** Effect of extracellular calcium on the gene expression of bone morphogenetic proteins -2 and -4 of normal human bone cells. *J Bone Miner Metab.* 2001; 19:13-19.
112. **Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, et al.** Physiological changes in

extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *PNAS*. 2004; 101(14): 5140-45.

113. Maeno S, Niki Y, Matsumoto H, *et al.* The effect of calcium concentration on osteoblast viability, proliferation and differentiation in monolayer and 3D cultura. *Biomater*. 2005; 26: 4847-4855.

114. Brown EM. Extracellular Ca^{2+} sensing, regulation of parathyroid cell function, and role of Ca^{2+} and other ions as extracellular (first) messengers. *Physiol Rev*. 1991; 71:371-411.

115. Brown EM, Enyedi P, Leboff M, *et al.* High extracellular Ca^{2+} and Mg^{2+} stimulate accumulation of inositol phosphates in bovine parathyroid cells. *FEBS Lett*. 1987; 218:113-118.

116. Juhlin C, Holmdahl R, Johansson H, *et al.* Monoclonal antibodies with exclusive reactivity against parathyroid cells and tubule cells of the kidney. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:2990-2994.

117. Nemeth EF, Scarpa A. Rapid mobilization of cellular Ca^{2+} in bovine parathyroid cells by external divalent cations. *J Biol Chem*. 1987; 262: 5188-5196.

118. Chen C, Barnett J, Congo D, Brown E. Divalent cations suppress 3', 5' - adenosine monophosphate accumulation by stimulating a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein in cultured bovine parathyroid cells. *Endocrinology*. 1989; 124:233-239.

119. Shoback DM, Chen TH. Effects of protein kinase C activation on inositol phosphate generation and intracellular Ca^{2+} mobilization in bovine parathyroid cell. *Endocrinology*. 1990; 127: 141-148.

120. Brown EM, Gamba G, Riccardi D, *et al.* Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*. 1993; 366: 575-580.

121. Janicic N, Soliman E, Pausova Z, *et al.* Mapping of the calcium-sensing receptor gene (CaSR) to human chromosome 3q13.3-21 by fluorescence in situ hybridization, and localization to rat chromosome 11 and mouse chromosome 16. *Mamm Genome*. 1995; 6:789-801.

122. Neiberghs HL, Womack JE, Reinhardt TA. Rapid communication: bovine calcium-sensing receptor gene resides on bovine chromosome 1. *J Anim Sci*. 1996; 74: 2555.

- 123. Garrett JE**, Capuano IV, Hammerland LG, et al. Molecular cloning and functional expression of human parathyroid calcium receptor cdnas. *J Biol Chem*. 1995; 270:12919-12925.
- 124. Riccardi D**, Park J, Lee WS, et al. Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 131-135.
- 125. Aida K**, Koishi S, Tawata M, Anaya T. Molecular cloning of a putative Ca^{2+} -sensing receptor cDNA from human kidney. *Biochem Biophys Res Commun*. 1995; 214:524-529.
- 126. Butters RR jr**, Chattopadhyay N, Nielsen P, et al. Cloning and characterization of a calcium-sensing receptor from the hypercalcemic New Zealand white rabbit reveals unaltered responsiveness to extracellular calcium. *J Bone Miner Res*. 1997; 12:568-579.
- 127. Freichel M**, Zink-Lorenz A, Holloschi A, Expression of a calcium-sensing receptor in a human medullary thyroid carcinoma cell line and its contribution to calcitonin secretion. *Endocrinology*. 1996; 137:3842-3848.
- 128. Garrett JE**, Tamir H, Kifor O, et al. Calcitonin-secreting cells of the thyroid express an extracellular calcium receptor gene. *Endocrinology*. 1995; 136:5202-5211.
- 129. Ruat M**, Molliver ME, Snowman AM, Snyder SH. Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 3161-3165.
- 130. Diaz R**, Hurwitz S, Chattopadhyay N, et al. Cloning, expression, and tissue localization of the calcium-sensing receptor in chicken (*Gallus domesticus*). *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1997; 273:r1008-r1016.
- 131. Cima RR**, Cheng I, Klingersmith ME, et al. Identification and functional assay of an extracellular calcium-sensing receptor in necturus gastric mucosa. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1997; 273: g1051-g1060.
- 132. Chattopadhyay N**. Biochemistry, physiology and pathophysiology of the extracellular calcium sensing receptor. *J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 789-804.
- 133.** Imagem adaptada de Arbl.cumbs.colostate.edu
- 134. Nemeth EF**. Calcium receptors as novel drug targets. *In Principles of bone biology*. Bilezikian JP, Raisz LG, Rodan GA (Eds). 1996; 1019-35.

- 135. Hammerland LG**, Krapcho KJ, Garrett JE, *et al.* Domains determining ligand specificity for Ca²⁺ receptors pharmacology. *Molecular Pharmacology*. 1999; 55: 642-648.
- 136. Brauner-Osborne H**, Jensen AA, Shepperd PO, *et al.* The agonist binding domain of the calcium-sensing receptor is located at amino-terminal domain. *J Bio Chem*. 1999; 274: 18382-86.
- 137. Fan G**, Goldsmith PK, Collins R, *et al.* N-linked glycosylation of the human Ca²⁺ receptor is essential for its expression at the cell surface. *Endocrinology*. 1997; 138: 1916-22.
- 138. Ray K**, Clapp P, Goldsmith PP, Spiegel AM. Identification of the sites of N-linked glycosylation on the human calcium receptor and assessment of their role in the cell surface expression and signal transduction. *J Bio Chem*. 1998; 272: 34558-67.
- 139. Bai M**, Trivedi S, Brown EM. Dimerization of the extracellular calcium-sensing receptor on the cell surface of CaR transfected HEK 293 cells. *J Biol Chem*. 1998; 273: 23605-10.
- 140. Bai M**, Trivedi S, Kifor O, Quinn SJ, Brown EM. Intermolecular interactions between dimeric calcium-sensing receptor monomers are important for its normal function. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999; 96: 2834-39.
- 141. Pace AJ**, Gama L, Breitwieser GE. Dimerization of the calcium receptor occurs within the extracellular domain and is eliminated by Cys-Ser mutations at Cys 101 and Cys 236. *J Biol Chem*. 1999; 274: 11629-34.
- 142. Chang W**, Chen TH, Pratt S, *et al.* Aminoacids in the second and third intracellular loops of the parathyroid Ca²⁺ sensing receptor mediate efficient coupling to phospholipase C. *J Biol Chem*. 2000; 275: 19955-63.
- 143. Conigrave AD**, Quinn SJ, Brown EM. Calcium-dependent activation of the calcium sensing receptor by aromatic aminoacids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000 Impress.
- 144. Quinn SJ**, Ye CP, Diaz R, *et al.* The Ca²⁺ sensing receptor: a target for polyamines. *Am J Physiol Cell Physiol*. 1997; 263: c1315-c1323.
- 145. Ye C**, Ho-Pao CL, Kanazirska M, *et al.* Amyloid beta proteins activates calcium²⁺ permeable channels through calcium sensing receptors. *J Neurosci Res*. 1997; 47: 547-554.
- 146. Nemeth EF**. Regulation of cytosolic calcium by extracellular divalent

- cations in C-cells and parathyroid cells. *Cell Calcium*. 1990; 11: 323-327.
- 147. Mc Larnon SJ**, Riccardi D. Physiological and pharmacological agonist of the extracellular Ca^{2+} sensing receptor. *Eur J Pharmacol*. 2002; 447: 271-278.
- 148. Goodman WG**. Recent development in the management of secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int*. 2001; 59: 1187-1201.
- 149. Nemeth EF**, Fox J. Calcimimetic compounds: a direct approach to controlling plasma levels of parathyroid hormone in hyperparathyroidism. *Trends Endocr Metab*. 1999; 10: 66-71.
- 150. Goodman WG**. Calcium sensing receptors. *Seminars in Nephrology*. 2004; 24 (1).
- 151. Pollak MR**, Brown EM, Chou Y, *et al*. Mutation in the Ca^{2+} sensing receptor gene cause familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Cell*. 1993; 75:1297-1303.
- 152. Pollak MR**, Brown EM, Estep HL, *et al*. Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca^{2+} - sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*. 1994; 8: 303-307.
- 153. Ho C**, Conner DA, Pollak MR, *et al*. A mouse model of human familial hypocalciuric hypercalcemia and neonatal severe hyperparathyroidism. *Nat Genet*. 1995; 11: 389-394.
- 154. Purroy J**, Spurr NK. Molecular genetics of calcium sensing in bone cells. *Human Mol Genet*. 2002; 11: 2377-84.
- 155. Yamaguchi T**, Kifor O, Chattopadhyay N, *et al*. Expression of extracellular calcium (Ca^{2+}_o)-sensing receptor in a mouse monocyte-macrophage cell line J774: potencial mediator of the actions of Ca^{2+}_o on the function of J774 cells. *J Bone Miner Res*. 1998; 13: 1390-97.
- 156. Kanatani M**, Sugimoto T, Kanzawa M, *et al*. High extracellular calcium inhibits osteoclast-like cell formation by directly acting on the calcium-sensing receptor existing in osteoclasts precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 261: 144-148.
- 157. Kameda T**, Mano H, Yamada Y, *et al*. Calcium-sensing receptor in mature osteoclasts wich are bone resorbing cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 245: 419-422.
- 158. Yamauchi M**, Yamaguchi T, Hiroshi K, *et al*. Involvement of calcium-sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. *AJP*

Endoc Metab. 2005; 288: 608-616.

159. Kamioka H, Sumitani K, Tagami K, *et al.* Divalent cations elevate cytosolic calcium of chick osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 204: 519-24.

160. Kamioka H, Miki Y, Sumitani K, *et al.* Extracellular calcium causes the release of calcium from intracellular stores in chick osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995; 212: 692-696.

161. Stewart AF, Broadus AE. Mineral Metabolism. *Endocrinology Metab.* (Eds) Mc Graw-Hill. 1987; 1317-1463.

162. Choi JY, Lee BH, Song KB, *et al.* Expression patterns of bone-related proteins during osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *J Cell Biochem.* 1996; 15; 61(4):609-18.

163. Rosenquist C, Qvist P, Bjarnason N, Christiansen C. Measurement of a more stable region of osteocalcin in serum by elisa with two monoclonal antibodies. *Clin Chem.* 1995; 41: 1439-45.

164. Porter AG, Janicke RU. Emerging role of caspase-3 in apoptosis (review). *Cell Death Differ.* 1999; 6: 99-104.

165. Sugimoto T, Katanami M, Kano J, *et al.* Effects of high calcium concentration on the functions and interactions of osteoblastic cells and monocytes and on the formation of osteoclast-like cells. *J Bone Miner Res.* 1993; 8:1445-1452.

166. Stein GS, Lian JB, Owen TA. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *The FASEB J.* 1990; 4:3111-3123.

167. Bindels RJM. Ca²⁺ handling by the mammalian kidney. *J Exp Biol.* 1993; 184: 89-104.

168. Friedman PA, Gesek FA. Stimulation of Ca²⁺ transport by amiloride in mouse distal convoluted tubule cells. *Kidney Int.* 1995; 1427-1434.

169. Peng JB, Brown EM, Hediger MA. Apical entry channels in Ca²⁺ transporting epithelia. *New Physiol Sci.* 2003; 18: 158-163.

170. Weinreb M, Shinar D, Rodan GA. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridation. *J Bone Miner Res.* 1990; 5: 831-42.

171. Kos CH, Karaplis AC, Peng JB, *et al.* The calcium-sensing receptor is

required for normal calcium homeostasis independent of parathyroid hormone. *J Clin Invest.* 2003; 111: 1021-1028.

172. Tu Q, Pi M, Karsenty G, *et al.* Rescue of the skeletal phenotype in CaSR-deficient mice by transfer onto the Gcm2 null background. *J Biol Invest.* 2003; 111: 1029-1037.

173. Mariani R, Altares S, Berard E. osteocalcin or bone GLA-protein. *Ann Pediatr.* 1989; 36(4): 225-7.

174. Hauschka PV, Lian JB, Cole DEC, Gunberg CM. Osteoclastin and matrix Gla protein: vitamin k-dependent proteins in bone. *Physiol Rev.* 1989; 69: 990-1047.

175. Owen TA, Aronow M, Shalhoub V, *et al.* Progressive development of the rat osteoblast phenotype *in vitro*: reciprocal relationship in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol.* 1990; 143: 420-430.

176. Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ. Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cells Res.* 1988; 175: 266-276.

177. Hock LM, Krishnan V, Onyia JE, *et al.* Osteoblast apoptosis and bone turnover. *J Bone Miner Res.* 2001; 16: 975-984.

178. Noble NB. Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone.* 1997; 20: 273-282.

179. Meleti Z, Chapiro IM, Adams CS. Inorganic phosphate induces apoptosis of osteoblast-like cells in culture. *Bone.* 2000; 27(3): 359-366.

180. Kuo-I L, Chatopadhyay N, Bai M, *et al.* Elevated extracellular calcium can prevent apoptosis via the calcium sensing receptor. *Bioch Biophys Res Com.* 1998; 249: 325-331.

VIII – Anexos

Anexo A

Descrição / Composição	Referência
Meio de cultura Alpha MEM completo	
Meio α MEM	Gibco Cat.Nº. 22561-021
Soro fetal de bovino (SFB)	Gibco Cat.Nº. 10270-106
Fungizona 1%	Gibco Cat.Nº. 15290-026
Gentamicina 10 mg/ml, sol. aquosa	Gibco Cat.Nº. 15710-049
Suplementos utilizados no meio de cultura	
Ácido ascórbico ou vitamina C	Sigma A-4034
β -glicerofosfato, $C_3H_7O_6PNa_2$	Sigma G-9891
1 α ,25-dihidroxicálciferol (1 α ,25-dihidroxi-vitamina D3; calcitriol) $C_{27}H_{44}O_3$, 10 μ g	Sigma D-1530
Solução de tripsina	
α -D (+) Glucose (100 mg)	Sigma 6152
EDTA (250 mg)	Sigma 255
Tripsina (50 mg)	Sigma 4799
Tampão Fosfato (PBS) (100 ml)	Sigma P3813
Cloreto cálcio granulado anidro, M ($CaCl_2$) = 110.99 g/mol	Merck LAB $CaCl_2$
Solução de neomicina 10 mg / ml em NaCl 0.9%	Sigma N1142
Tampão Fosfato 7.4 (PBS) (10X)	70011-036 Gibco/Invitrogen
Formaldeído 10% (s/metanol)	Polysciences Inc.; 04018
Naftol 0.25% AS-MX	Sigma cat. nº. 85-5
Violeta (Fast) Sal B	Sigma cat. nº. 85-1
Nitrato de prata ($AgNO_3$)	Sigma S-6506
Tiosulfato de sódio ($Na_2S_2O_3$)	Sigma S-1648

Anexo B

Designação	Referência
------------	------------

Determinação da Proteína Total	Referência
Carbonato de sódio / bicarbonato de sódio / ácido bicinchonínico / tartarato de sódio em hidróxido de sódio 0.1 M	Pierce 23228
Sulfato cúprico (CuSO ₄) 4%	Pierce 1859078
Triton X-100: Solução triton 100%	Sigma T8787
BSA (bovine serum albumine, pó)	Merck 112018
PBS 10x	70011-036 Gibco

Quantificação de DNA	Referência
Bisbenzimidazida 10mg/ml Hoechst 33258	Sigma B2883
Padrão DNA 1mg/ml	Sigma D4810
Tris - HCl	Sigma T5941
EDTA	Sigma ED2SS
NaCl	106404.1000 Merck

Determinação da actividade enzimática da PAL	Referência
Padrão pNPP: solução padrão p-nitrofenol, 10 µmol/ml	Sigma 104-1
Substrato da PAL (PNPP): p-nitrofenilfosfato em pó, cápsulas de 40 mg	Sigma 104
Solução de Na ₂ CO ₃ 0.2 M	Sigma S2127
Solução de NaHCO ₃ 0.2M	Sigma S5761
Solução de MgCl ₂ 4mM	Merck 116102
Solução NaOH 0.02M	Merck 106498
Triton X-100: Solução triton 100%	Sigma T8787

Designação	Referência
------------	------------

Quantificação da Osteocalcina	Referência
	Rat-MID osteoclastin ELISA Osteometer BioTech A/S Denmark
Tiras de micropoços revestidos com estreptavidina	
Película adesiva para cobrir as tiras durante as incubações	
Solução tampão PBS com estabilizante e conservante de proteína	
5 Padrões de osteocalcina sintética humana	
Solução de osteocalcina sintética humana (controlo)	
Osteocalcina sintética humana biotinilada	
Anticorpo primário monoclonal específico para os a.a. 21-29 da osteocalcina	
Tampão de incubação primária para diluir o anticorpo primário	
Anticorpo secundário específico para a IgG de rato, conjugado com peroxidase	
Solução de substrato tetrametilbenzidina (cromogénica)	
Solução de paragem (ácido sulfúrico 0.18 M)	
Solução de lavagem (solução com detergentes e conservantes)	

Determinação da caspase 3	Referência
	Kit Caspase 3 Fluorimetric Assay Sigma®
H ₂ O desionizada (17 megohm) 125 ml	
Tampão de lise 5 x	
Solução tampão 10 x	
Controlo positivo 5µg (caspase 3)	
Substrato Ac-DEVD-AMC 2.5 mg (10mM em DMSO)	
Inibidor da caspase 3 (Ac-DEVD-CHO) 0.5 mg (2 mM em DMSO)	
Padrão 1 mg (7-amino-4-metilcumarina)	
DMSO (dimetilsufóxido)	Sigma D8418
Placas pretas de 96 poços para fluorímetro	Costar 3603