



Trabalho Académico de Investigação

**Papel dos Recetores P2X7 na Diferenciação
Osteogénica das Células Mesenquimatosas do
Estroma da Medula Óssea**

**Análise Comparativa entre Mulheres em Idade Fértil e
Pós-Menopáusicas com Osteoporose**

Aluno

Elsa Marina Cerqueira Meireles

Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do ICBAS/UP e HSA/CHP

Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC)

Responsável: Prof. Doutora Margarida Lima, HSA/CHP e ICBAS/UP

Área de Investigação: Farmacologia / Ortopedia

Orientador: Prof. Doutor Paulo Correia de Sá, ICBAS/UP

Coorientador: Mestre Bernardo Noronha de Matos, ICBAS/UP

Anos letivos: 2011/2012 e 2012/2013

PREÂMBULO

Este trabalho, inserido no âmbito da Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do Curso de Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP) e do Centro Hospitalar do Porto (CHP), integra um projeto executado para fins de obtenção do grau de Mestre.

Do ponto de vista estrutural, este trabalho encontra-se organizado em duas partes: proposta do projeto de investigação e relatório de execução, executados respetivamente no ano letivo 2011/2012 e 2012/2013.

Os resultados e conclusões obtidas, ainda que preliminares, terão continuidade pela equipa de investigação envolvida.

AGRADECIMENTOS

Cumpre-me expressar a minha gratidão a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, indispensável para o crescimento do meu conhecimento científico.

Agradeço à minha supervisora, Professora Doutora Margarida Lima, pelo apoio incondicional prestado ao longo do transcorrer desta aprendizagem. Agradeço-lhe a disponibilidade e prontidão que sempre me dispensou. Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Correia de Sá, pela oportunidade, orientação, compreensão e disponibilidade. Agradeço ao meu coorientador, Mestre Bernardo Noronha de Matos, por todos os imprescindíveis ensinamentos que me facultou, bem como, a análise rigorosa, a exigência, a sabedoria e a disponibilidade demonstrada em todo o desenvolvimento desta tese.

RESUMO

Introdução: As células mesenquimatosas do estroma da medula óssea têm uma ampla capacidade proliferativa, mantendo o potencial de diferenciação em múltiplas linhagens celulares. As células estaminais hematopoiéticas parecem ser capazes de regular o microambiente medular e modular a diferenciação das células mesenquimatosas numa linhagem osteoblástica. Tanto as células mesenquimatosas como as células hematopoiéticas expressam recetores purinérgicos. Os nucleótidos extracelulares podem comandar a diferenciação osteogénica das células mesenquimatosas através da ativação de recetores purinérgicos, nomeadamente os recetores P2X7. Polimorfismos no gene que codifica este recetor estão associados a aumento do risco de fratura em mulheres pós-menopáusicas.

Objetivos: Explorar a hipótese de que o ATP, por via do recetor P2X7, possa ser um importante intermediário na comunicação entre células osteoprogenitoras (mesenquimatosas) e células hematopoiéticas precursoras da medula óssea.

Material e Métodos: As amostras de medula óssea foram obtidas de mulheres pós-menopáusicas (59-82 anos) e de mulheres em idade fértil (13-36 anos) após a obtenção do respetivo consentimento informado. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética. As células estaminais hematopoiéticas e as mesenquimatosas foram isoladas a partir da medula óssea. As células mesenquimatosas foram cultivadas durante 43 dias; durante este período foram caracterizadas quanto à viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT), atividade da fosfatase alcalina e mineralização (método de alizarina vermelha). A imunorreatividade destas células para o recetor P2X7 e as oscilações de cálcio induzidas pelo ATP foram avaliadas por microscopia confocal. Os níveis de ATP libertado constitutivamente pelas células em cultura foram avaliados por bioluminescência; os valores obtidos foram comparados entre os dois grupos etários. Paralelamente, otimizou-se a técnica de separação e cultura das células estaminais hematopoiéticas, tendo-se procedido à sua caracterização fenotípica (expressão de marcadores CD14, CD34 e CD45) por imunocitoquímica. Realizaram-se ensaios preliminares nestas células para avaliação das oscilações intracelulares de cálcio em resposta ao ATP.

Resultados: A diferenciação osteogénica, avaliada pelos níveis de fosfatase alcalina, está comprometida nas células osteoprogenitoras das mulheres pós-menopáusicas (59-76 anos) comparativamente com as do grupo controlo (13-16 anos). Nas células provenientes das mulheres jovens (grupo controlo), a expressão e atividade dos recetores P2X7, obtida pela avaliação dos níveis intracelulares de cálcio em resposta ao ATP (100 μ M), aumentaram com o tempo das células em cultura (de 7 para 21 dias); a situação oposta foi observada nas células provenientes das mulheres pós-menopáusicas. No entanto, observou-se que as células das mulheres pós-menopáusicas libertavam constitutivamente maior quantidade de ATP aos 21 dias em cultura que as do grupo controlo.

Neste trabalho isolaram-se com sucesso células estaminais hematopoiéticas a partir da medula óssea humana. A caracterização imunofenotípica destas células revelou que as mesmas apresentaram marcação positiva para os seguintes marcadores: CD14, CD34 e CD45. Os resultados preliminares obtidos neste estudo mostraram que as células estaminais hematopoiéticas reagem ao ATP (100 μ M) e ao ionóforo de cálcio, ionomicina, comprovando a sua funcionalidade e apontando para expressão de recetores P2.

Conclusões: A diminuição da expressão e da atividade dos recetores P2X7 em resposta ao ATP pode, em parte, explicar o comprometimento da diferenciação osteogénica e da mineralização óssea observada das células mesenquimatosas provenientes das mulheres pós-menopáusicas comparativamente com o que se observou nas células das mulheres jovens. O défice de ativação dos recetores P2X7 pelo ATP não foi compensado pela maior libertação constitutiva do nucleótido que foi observada nas células das mulheres pós-menopáusicas.

A otimização do isolamento das células estaminais hematopoiéticas da medula óssea humana e a manutenção da sua funcionalidade em resposta ao ATP permitirá explorar a comunicação entre estas células e as células osteoprogenitoras *in vitro*, por intermédio da ativação de recetores purinérgicos. Esse estudo poderá contribuir para um melhor conhecimento das alterações moleculares que poderão estar na génese da osteoporose. Os resultados obtidos neste trabalho mostram que o recetor P2X7 parece estar implicado na patogénese da osteoporose, podendo a sua manipulação constituir um novo alvo terapêutico a explorar futuramente.

ÍNDICE

Preâmbulo.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo	iii
PLANO CIENTÍFICO	1
1.Introdução e Estado da Arte	2
2. Problemas	5
3. Perguntas de Investigação	5
4. Hipóteses de Trabalho	5
5.Objetivos.....	6
5.1 Objetivo Geral.....	6
5.2 Objetivos Específicos	6
6. Enquadramento, Motivações e Condições de Execução.....	7
7. Implicações Futuras	7
8. Metodologia.....	7
8.1 Desenho do Estudo	7
8.2 Procedimentos.....	9
8.3 Análise Estatística dos Dados.....	12
9. Intervenientes.....	13
9.1 Instituições, Departamentos e Serviços	13
9.2 Equipa de Investigação	13
10. Cronograma de Execução	14

11. Indicadores de Produção	15
QUESTÕES ÉTICAS.....	16
PLANO FINANCEIRO	18
Orçamento e Financiamento	19
Relatório de Execução	20
1. Material e Métodos	21
1.1 Reagentes e Anticorpos	21
1.2 Culturas Celulares	21
1.3 Ensaio do MTT – Avaliação da Proliferação/Viabilidade Celular	23
1.4 Determinação das Proteínas Totais pelo Método de <i>Lowry</i> Modificado	24
1.5 Determinação da Atividade da Fosfatase Alcalina	24
1.6 Coloração de Alizarina Vermelha.....	24
1.7 Avaliação das Oscilações de Cálcio Intracelular	25
1.8 Imunofluorescência	26
1.9 Marcação de Reservas de ATP Intracelulares com Quinacrina	27
1.10 Quantificação da Libertação Constitutiva de ATP	27
1.11 Avaliação da Integridade da Membrana Plasmática	27
1.12 Análise Estatística	28
2. Resultados.....	28
1.1 Caracterização da Cultura	28
1.2 Reservatórios e Libertação Constitutiva de ATP.....	31

1.3 Expressão do Recetor P2X7 e Avaliação das Oscilações de Cálcio Intracelular em Resposta ao ATP em Células Progenitoras da Medula Óssea.....	32
1.4 Caracterização Imunofenotípica das Culturas de Células Estaminais Hematopoiéticas Isoladas da Medula Óssea Humana	34
1.5 Avaliação das Oscilações de Cálcio Intracelular em Células Estaminais Hematopoiéticas em Resposta ao ATP.....	35
3.Discussão dos Resultados	38
CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS	43
GLOSSÁRIO.....	44
Abreviaturas, Siglas e Acrónimos.....	45
Referências Bibliográficas	46
ANEXOS	48
Folha de Rosto do Estudo de Investigação	52
Pedidos de Autorização Institucional	54
Presidente do Conselho de Administração do CHP	54
Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP	54
Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP..	54
Termos de Responsabilidade.....	55
Aluno.....	55
Orientador do Projeto	55
Supervisor do Projeto / Responsável pela DIIC	55
Termos de Autorização Local.....	56
Responsáveis por Unidades e Setores.....	56

Diretores de Serviço.....	56
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamento	56

PLANO CIENTÍFICO

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

A osteoporose é uma patologia que afeta sobretudo as mulheres pós-menopáusicas e os indivíduos idosos, sendo caracterizada por diminuição da densidade óssea (T-score de 2.5 ou mais desvios) e deteriorização da microarquitetura do osso, acarretando maior risco de fratura (Oliveira e colaboradores, 2007; Tavares e colaboradores, 2007; World Health Organization, 2004).

As células mesenquimatosas (CM) são um grupo heterogéneo de células do estroma da medula óssea (MO), com grande capacidade proliferativa e de auto renovação, sendo capazes de se diferenciarem em múltiplas linhagens celulares (osteoblastos, condroblastos, adipócitos, mioblastos e neurónios) mantendo o seu potencial indiferenciado, o que as torna importantes candidatas a estratégias terapêuticas (Liao e colaboradores, 2011). Para além disso, desempenham funções de regeneração óssea e de suporte para as células estaminais hematopoiéticas (CEH), face à proximidade com que coexistem na MO (Liao e colaboradores, 2011). A interação entre as CM e as CEH ainda não está estabelecida no Homem, mas estudos em animais sugerem que as CEH intervêm na regulação do microambiente da MO, na modulação e na função das CM, contribuindo para a diferenciação osteogénica (Liao e colaboradores, 2011). Assim sendo, pensa-se que as CEH aumentam a diferenciação osteogénica das CM, através de uma interação direta e sinalização parácrina (Liao e colaboradores, 2011). O estudo aprofundado e o conhecimento dos mecanismos envolvidos, que expliquem o modo como as CEH interferem no desenvolvimento físico do processo de remodelação do osso adulto, através do contato direto com as CM (coculturas), poderá conduzir à criação de novas terapêuticas para défices do crescimento ósseo e outras doenças ortopédicas (Liao e colaboradores, 2011).

A osteogénese resulta de uma complexa cascata de acontecimentos que envolvem a proliferação de CM, a sua diferenciação em osteoblastos, formação de matriz óssea e por último a mineralização (Oliveira e colaboradores, 2007).

Os osteoblastos são CM que regulam a formação e a reabsorção da matriz orgânica e sintetizam fosfatase alcalina, necessária para o processo de mineralização, desempenhando, quando devidamente estimulados, um papel importante no desenvolvimento embrionário, crescimento, remodelação e reparação de fraturas (Batista e colaboradores, 2009; Orriss e colaboradores, 2010).

Trabalhos recentes sugerem que a sinalização purinérgica por nucleótidos de adenina, como o trifosfato de adenosina (ATP), desempenha um papel importante de regulação da diferenciação e função dos osteoblastos, promovendo a osteogénese e o desenvolvimento esquelético (Costa e colaboradores, 2011; Orriss e colaboradores, 2010). Os nucleótidos de adenina são libertados em resposta a múltiplos estímulos, nomeadamente em situações de trauma, *stress*, processo de lise, apoptose ou hipóxia celular (Panupinthu e colaboradores, 2007) e, em situações fisiológicas normais (Dixon e colaboradores, 2000). Atuam como reguladores autócrinos e/ou parácrinos ao interagirem com os recetores purinérgicos P2, expressos nos osteoblastos (Panupinthu e colaboradores, 2007; Romanello e colaboradores, 2005), entre os quais recetores ionotrópicos P2X (Subtipos P2X1-P2X7) e metabotrópicos P2Y (subtipos P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11-P2Y14) (Orriss e colaboradores, 2012). Dos recetores ionotrópicos, os recetores P2X7 parecem desempenhar um papel importante na regulação da sobrevivência dos osteoblastos e na remodelação óssea (Noronha-Matos e colaboradores, 2012), havendo estudos que sugerem que alguns polimorfismos no gene que codifica para o recetor P2X7 se associam a um fenótipo osteopénico envolvendo a diminuição da densidade mineral óssea, por diminuição da formação óssea pelos osteoblastos e aumento da reabsorção óssea pelos osteoclastos, e consequentemente risco aumentado de fratura em mulheres pós-menopáusicas (Ohlendorff e colaboradores, 2007; Panupinthu e colaboradores, 2007). Um estudo em animais em que foi deletado o gene que codifica para o recetor P2X7 reforçou o seu envolvimento na formação óssea, visto que estes animais mostravam profundas alterações a nível do desenvolvimento ósseo (Ke e colaboradores, 2003).

Encontra-se descrito que a ativação de recetores P2X7 promove o aumento intracelular da concentração de cálcio nos osteoblastos, a ativação de fosfolipases (como a fosfolipase A₂ e D), a produção de prostaglandinas e a ativação de cinases (Grol e colaboradores, 2009; Nakamura e colaboradores, 2000). A ativação mais prolongada deste recetor pode levar a alterações a nível da membrana celular, como a formação de bolhas, ou mesmo de poros não seletivos, permitindo a passagem de moléculas com tamanho até 900 Daltons. Tais alterações parecem estar envolvidas na diferenciação osteogénica de CM, recentemente sugeridas pelo nosso grupo (dados não publicados), assim como na literatura (Panupinthu e colaboradores, 2007).

Dada a crescente importância dos recetores P2X7 na formação óssea (Orriss e colaboradores, 2010), pretendemos estudar a influência das CEH sobre as CM na diferenciação osteogénica, bem como esclarecer os mecanismos envolvidos e a participação dos purinocetores

P2X7 em tal interação. Será comparado o papel desta interação na diferenciação osteogénica das CM em mulheres pós-menopáusicas com osteoporose e mulheres em idade fértil sem osteoporose. Os resultados deste trabalho poderão apontar para novos alvos terapêuticos úteis nas doenças ósseas, nomeadamente a osteoporose.

2. PROBLEMAS

A osteoporose é uma doença com elevada prevalência nos países ocidentais nomeadamente em Portugal, onde acomete mais de meio milhão de pessoas, sobretudo do sexo feminino (Circular informativa DGS, 2008). Desta forma, constitui um problema de saúde pública responsável por altas taxas de morbilidade e de mortalidade entre os idosos, acarretando repercussões no âmbito social, económico e na qualidade de vida (Széliga M., 2007).

Para além disto, com o envelhecimento populacional prevê-se um aumento exponencial da incidência da osteoporose (World Health Organization, 2004) e conseqüentemente dos seus efeitos.

Estes factos motivaram a elaboração do presente estudo, no qual investigaremos as bases moleculares associados à diferenciação osteogénica, de forma a compreender melhor a sua fisiopatologia e desenvolver métodos de tratamento eficazes considerando alterações da sinalização purinérgica como prováveis nas patologias que cursam com défices de massa óssea.

3. PERGUNTAS DE INVESTIGAÇÃO

Será que as células estaminais hematopoiéticas (CEH) influenciam a diferenciação osteogénica através da interação com as células mesenquimais (CM)?

Haverá envolvimento dos recetores P2X7 na potencial interação entre as CEH e as CM e, conseqüentemente, na diferenciação osteogénica?

Será que na osteoporose a expressão / atividade dos recetores P2X7 está alterada?

4. HIPÓTESES DE TRABALHO

As células estaminais hematopoiéticas (CEH) interagem com as células mesenquimatosas (CM), promovendo a diferenciação osteogénica.

Esta interação é, pelo menos em parte, mediada pelos recetores P2X7.

A osteoporose primária está relacionada com alterações da expressão / atividade dos recetores P2X7.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Como objetivo imediato pretende-se avaliar a interação entre as células estaminais hematopoiéticas (CEH) e as células mesenquimatosas (CM) na diferenciação osteogénica e o envolvimento dos recetores P2X7 neste contexto, comparando a sua funcionalidade ou potencial modificação nas mulheres pós-menopáusicas com osteoporose primária e nas mulheres idade fértil sem osteoporose.

O objetivo a longo prazo é proporcionar novos alvos moleculares para o tratamento das doenças ósseas.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Isolamento de CM e as CEH obtidas da medula óssea (MO) femoral.

b) Expansão e caracterização de CM em cultura, em condições que promovam a diferenciação osteogénica: avaliação por citometria de fluxo da expressão de marcadores de membrana específicos para as CM, CEH e osteoblastos; análise imunohistoquímica de colagénio tipo I, osteocalcina, osteopontina; quantificação da atividade da fosfatase alcalina como fator preditivo da diferenciação osteogénica.

c) Avaliação da diferenciação osteogénica de CM, na presença de concentrações crescentes de CEH e comparação dos parâmetros descritos anteriormente (ponto b) para se estabelecer relação entre as monoculturas de CM e as coculturas de CM com CEH, em termos de diferenciação osteogénica.

d) Avaliação do envolvimento dos purinocetores nas condições descritas no ponto b, submetendo as coculturas a diferentes concentrações de nucleótidos de adenina, na presença ou ausência dos antagonistas específicos dos recetores P2X7. Será também avaliada, por citometria de fluxo, a expressão dos recetores P2X7.

e) Avaliação da mineralização tardia em culturas de CM em mono-cultura ou em co-cultura com as CEH, na presença ou ausência de agonistas/antagonistas dos purinocetores P2X7.

f) Medição do cálcio intracelular em CM submetidos a diferentes concentrações de agonistas /antagonistas dos purinocetores, na presença ou ausência de CEH.

Todos os pontos anteriores serão avaliados em células provenientes de MO de mulheres pós-menopáusicas com osteoporose primária e de mulheres em idade fértil sem osteoporose.

6. Enquadramento, Motivações e Condições de execução

Este estudo insere-se no âmbito da disciplina de Iniciação à Investigação Clínica (DIIC) do 5º e 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina (MIM) do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP), onde se pretende desenvolver competências relacionadas com a investigação e contribuir para alargar a formação nesta área.

A proposta de projeto de investigação apresentada enquadra-se na linha das atividades de investigação da biologia das purinas e no estudo dos mecanismos moleculares e celulares da biomineralização do Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia (LFNB) do ICBAS/UP, do qual faz parte uma equipa de investigação diversificada e multidisciplinar com historial de publicações em revistas internacionais indexadas com exigência editorial.

7. IMPLICAÇÕES FUTURAS

O presente estudo, ao pretender clarificar a influência do recetor P2X7 e a interação entre as células estaminais hematopoiéticas (CEH) e as células mesenquimatosas (CM) na diferenciação osteogénica, de forma a esclarecer o mecanismo molecular da osteoporose, poderá contribuir para o estabelecimento de novos alvos terapêuticos para o tratamento das doenças que afetam a massa óssea.

A confirmação da estimulação das CEH sobre as CM e a modificação potencial dos recetores P2X7 na osteoporose primária, poderá implicar uma mudança na abordagem clínica desta patologia.

8. METODOLOGIA

8.1 DESENHO DO ESTUDO

TIPO DE ESTUDO

Com vista a atingir os objetivos traçados, será realizado um estudo nacional e institucional, laboratorial, observacional, analítico, transversal e de tipo caso-controlo, em que a unidade de observação compreende mulheres pós-menopáusicas com osteoporose, que serão os casos, e mulheres não-osteoporóticas em idade fértil, que serão os controlos.

UNIVERSO, POPULAÇÃO E AMOSTRA

UNIVERSO

Casos: Mulheres pós-menopáusicas com osteoporose.

Controlos: Mulheres em idade fértil sem osteoporose.

POPULAÇÃO

Casos: Mulheres pós-menopáusicas com osteoporose operadas no Serviço de Ortopedia e Traumatologia (SOT) do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho (CHVNG/E).

Controlos: Mulheres em idade fértil sem osteoporose submetidas a cirurgia ortopédica no SOT do CHVNG/E, devido a fraturas traumáticas.

AMOSTRA

A amostra será obtida por seleção não aleatória (por conveniência).

O tamanho da amostra será influenciado pelo nº de cirurgias realizadas no período de tempo estipulado para a realização do estudo, estando prevista a inclusão de 20 amostras de casos e de 15 amostras de controlos.

NOTA: O não emparelhamento das idades, entre os casos e controlos, prende-se com o facto de estudos anteriores na nossa equipa de investigação (dados não publicados) demonstrarem que não havia diferenças estatisticamente significativas no metabolismo ósseo em mulheres a partir da faixa etária dos 50 anos.

SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES

Serão selecionadas mulheres pós-menopáusicas com osteoporose e mulheres em idade fértil sem osteoporose submetidas a cirurgia ortopédica no SOT do CHVNG/E.

CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

CASOS

Crítérios de inclusão:

- ✓ Mulheres pós-menopáusicas;

- ✓ Diagnóstico de osteoporose primária;
- ✓ Consentimento informado para participar no estudo.

Critérios de exclusão:

- ✓ Osteoporose secundária;
- ✓ Patologias*, medicamentos** ou outras situações*** que interfiram com o metabolismo ósseo, aumentando o risco de osteoporose.

CONTROLOS

Critérios de inclusão:

- ✓ Mulheres em idade fértil;
- ✓ Consentimento informado para participar no estudo.

Critérios de exclusão:

- ✓ Osteoporose primária ou secundária.
- ✓ Patologias* e medicamentos** ou outras situações*** que interfiram com o metabolismo ósseo, aumentando o risco de osteoporose

*Nomeadamente hiperparatiroidismo, hiperpituitarismo, hipertiroidismo, hipercortisolismo, doença celíaca e mieloma múltiplo;
** Nomeadamente medicação prolongada com corticosteróides;
*** Nomeadamente imobilização prolongada.

8.2 PROCEDIMENTOS

COLHEITA DAS AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA

As amostras de medula óssea (MO) serão obtidas do colo do fémur nas mulheres pós-menopáusicas ou de qualquer outro local utilizado para colheita de enxerto ósseo (e.g. crista ilíaca, asa do ilíaco, tuberosidade anterior da tibia), particularmente no caso das mulheres em idade fértil.

As colheitas serão efetuadas no bloco operatório do Serviço de Ortopedia e Traumatologia (SOT) do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho (CHVNG/E), durante a cirurgia. O material biológico utilizado neste estudo não será colhido propositadamente, mas antes será

aproveitado a partir daquele, que embora colhido, seria destinado a ser eliminado após a realização do procedimento cirúrgico.

PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMATOSAS E DE CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS

Para isolar as células mesenquimatosas (CM), a suspensão da medula óssea (MO) será colocada em meio α -MEM, suplementado com 2% de soro fetal bovino (FBS), 100 IU/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 2.5 μ g/ml de anfotericina B (para descontaminação do material biológico). Esta suspensão será filtrada através de um filtro de células de 100 μ m para remover os detritos de osso, seguido de um filtro de 40 μ m. Posteriormente, a suspensão obtida será colocada em frascos de culturas de tecidos com meio α -MEM contendo 10% de FBS, 100 IU/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 2.5 μ g/ml de anfotericina B e incubada sob atmosfera humidificada (a 37°C e CO₂ a 5%). As culturas primárias serão mantidas até à confluência e posteriormente, as células aderentes serão destacadas enzimaticamente com uma solução de tripsina-EDTA a 0.04% e colagenase tipo I a 0.025%, durante 15-20 minutos (pH de 7.4). As células suspensas serão cultivadas em placas de cultura de tecidos, durante 28 dias, com um meio indutor da diferenciação osteoblástica (50 μ g/ml de ácido ascórbico, 10 mM de β -glicerofosfato e 10 nM de dexametasona), na ausência ou na presença de diferentes concentrações de CEH previamente isoladas (co-cultura).

Para isolar as células estaminais hematopoiéticas (CEH), a MO inicial será suspensa em tampão fosfato-salino (PBS), com 2% de FBS, 2 nM de EDTA e 10 mM de HEPES com adição de 100 IU/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 2.5 μ g/ml de anfotericina B e depois filtradas através de um filtro de 40 μ m.

Nas coculturas das CM e das CEH será adicionado ao meio de cultura um agonista ou antagonistas dos purinocetores.

Todas as experiências serão caracterizadas em dias, do 1º ao 28º, e avaliadas sistematicamente quanto à viabilidade/proliferação celular, à atividade da fosfatase alcalina e conteúdo de proteína total. Para as experiências de microscopia confocal serão usadas as coculturas com 7 ou 21 dias. As imagens serão adquiridas através de um microscópio confocal (*Olympus FV1000*, Japão), através do *Fluoview-Advanced-Software* (*Olympus*, Japão).

VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO CELULAR

A viabilidade/proliferação celular será avaliada pelo ensaio de MTT e pelo conteúdo em proteína total. O ensaio de MTT baseia-se na redução do sal do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) pelas células viáveis e determinação espectrofotométrica do produto formado. Nos dias selecionados para a avaliação, as culturas serão incubadas com 5 mg/ml de MTT durante 4h, a 37°C e 5% de CO₂. Durante este período, o MTT é incorporado nas células viáveis (células metabolicamente ativas) e reduzido com formação de cristais que se acumulam no citoplasma. O meio será cuidadosamente removido e após dissolução dos cristais em DMSO (dimetilsulfóxido) será determinada a absorvância (A) da solução a 600 nm. O conteúdo em proteína total será avaliado pelo método de *Lowry* que se fundamenta na reação do reagente de *Folin-Ciocalteu* com os aminoácidos aromáticos (tirosina e fenilalanina), com formação de um produto corado que é medido por espectrofotometria a 750 nm. A albumina sérica bovina será usada como padrão.

ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

A atividade da fosfatase alcalina será determinada em lisados de células (após tratamento com Triton X a 0.1%) através da hidrólise do p-nitrofenilfosfato pela fosfatase alcalina e determinação do p-nitrofenol formado por espectrofotometria a 405 nm.

FORMAÇÃO DE DEPÓSITOS MINERALIZADOS DE FOSFATO DE CÁLCIO

A formação de depósito de fosfato de cálcio será identificada mediante ensaios histoquímicos (método de Alizarina vermelha).

AVALIAÇÃO DAS OSCILAÇÕES DE CÁLCIO INTRACELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL

As células serão marcadas com uma sonda fluorescente sensível ao cálcio (Fluo-4 NW a 2.5 µM, durante 45 minutos a 37°C) e analisadas ao microscópio confocal (com um filtro de 488 nm de excitação e 516 nm de emissão). As oscilações intracelulares de cálcio serão induzidas pela aplicação de um fármaco e o sinal obtido será calibrado com um ionóforo de cálcio (ionomicina a 5µM).

IMUNOCITOQUÍMICA

A distribuição dos purinocetores P2X7 nas CM será determinada recorrendo a anticorpos primários específicos e anticorpos secundários conjugados. As CM serão cultivadas sobre lâminas

de vidro, utilizando o *VectaShield* como meio de montagem e armazenadas a 4°C, até à sua observação por microscopia confocal.

CITOMETRIA DE FLUXO

Para a análise por citometria de fluxo serão utilizadas culturas de células de MO, submetidas a condições indutoras da diferenciação osteogénica durante 28 dias. As células serão destacadas e a suspensão resultante centrifugada (a 2000 rpm durante 5 minutos). O sobrenadante resultante da centrifugação será rejeitado e as restantes células serão suspensas em 2 ml de PBS contendo 0.2% de albumina de soro bovino. Este procedimento será repetido 2 vezes. Amostras contendo $250-500 \times 10^3$ de células (em 100 μ l) serão incubadas durante 15 minutos à temperatura ambiente, na presença da concentração apropriada de anticorpos monoclonais de rato, anti-humano, conjugados com diferentes fluorocromo (em 10 μ l), dirigidos especificamente às CM, às CEH e aos osteoblastos. Os anticorpos, utilizados em diferentes combinações, serão o anti-CD14 (co-recetor para o lipopolissacarídeo bacteriano LPS) e o anti-CD29 (integrina beta 1) conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), o anti-CD34 conjugado com alofocianina (APC), o anti-CD45 (antigénio leucocitário comum) conjugado com proteína peridina clorofila (PerCP), o anti-CD105 (endoglina) e o anti-CD117 (recetor para o fator de crescimento das células estaminais, SCF-R ou c-KIT) conjugados com ficoeritrina (PE), e o anti-CD73 (ecto-5'-nucleotidase) conjugado com PE.

As amostras serão adquiridas num citómetro de fluxo *FACScanto* (*BD Bioscience, San José, CA*) no Laboratório de Citometria do Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar do Porto.

A análise dos resultados será feita no programa *Infinicyt* (*Cytognos, Salamanca, Espanha*), após importação dos ficheiros em formato FCS3.0. As CEH serão selecionadas com base na expressão de CD45 e de CD34. As CM serão selecionadas com base na ausência de expressão de CD45 e de CD34 e na positividade para CD105 e CD117. A positividade para CD45 e CD14 será usada para excluir as células da linha monocítica-macrofágica.

8.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

No caso das variáveis quantitativas contínuas, serão calculadas medidas de tendência central (média, mediana, etc.) e de dispersão (desvio-padrão, mínimo e máximo, etc.) dos dados. No caso das variáveis qualitativas, serão calculadas as frequências absolutas e relativas.

As diferenças obtidas nos diversos parâmetros avaliados nos dois grupos de estudo serão analisadas estatisticamente pelo método de análise de variância (Teste ANOVA).

As diferenças encontradas entre grupos de células controlo e células tratadas (com um ou mais fármacos) serão avaliadas usando o teste de *Bonferroni*.

9. INTERVENIENTES

9.1 INSTITUIÇÕES, DEPARTAMENTOS E SERVIÇOS

- Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto (ICBAS/UP).
 - Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia (DIFF)
 - Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia (LFN)
- Centro Hospitalar do Porto, Porto (CHP).
 - Departamento de Medicina (DM).
 - Serviço de Hematologia Clínica (SHC).
 - Laboratório de Citometria (LC).
- Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho (CHVNG/E).
 - Departamento de Cirurgia (DC).
 - Serviço de Ortopedia e Traumatologia (SOT).

9.2 EQUIPA DE INVESTIGAÇÃO

INVESTIGADORES

- (1) Elsa Meireles (estudante de Medicina), MIM, ICBAS/UP.
- (2) Mestre Bernardo Noronha Matos (MSc, Biochem), PhD student, LFN, DIFF, ICBAS/UP.
- (3) Doutora Fátima Ferreirinha (Biol, PhD), LFN, DIFF, ICBAS/UP.
- (4) Prof. Doutora Adelina Coelho Ribeiro Costa (PharmD, PhD).
- (5) Prof. Doutor Paulo Correia-de-Sá (MD, PhD), LFN, DIFF, ICBAS/UP.
- (6) Dra. Marta Gonçalves (Biochem), LC, SHC, HSA/CHP.
- (7) Prof. Doutora Margarida Lima (MD, PhD), LC, SHC, HSA/CHP.
- (8) Dr. José Marinhas (MD), SOT, DC, CHVNG/E.
- (9) Dr. Rui Rocha (MD), SOT, DC, CHVNG/E.

FUNÇÕES

- Colheita das amostras de medula óssea (MO) – (8), (9)

- Cultura de células mesenquimatosas (CM) e células estaminais hematopoiéticas (CEH) (monoculturas e coculturas), incluindo testes de viabilidade / proliferação celular, testes de avaliação da diferenciação celular e ensaios de mineralização – (1), (2)
- Avaliação de oscilações do cálcio intracelular por microscopia confocal – (1), (2), (5)
- Ensaios de imunocitoquímica – (1), (2), (3), (4)
- Ensaios de citometria de fluxo – (1), (2), (6), (7)
- Tratamento de dados, interpretação, análise – (1), (2), (3), (4), (5), (6), (7)

TEMPO DEDICADO AO PROJETO

Nome e apelido	Função	% Tempo de dedicado ao projeto	Nº de meses	Pessoas * Mês
Elsa Meireles	Aluno Investigador	10.0%	22	2.20
Bernardo Matos	Coorientador	2.5%	22	0.55
	Investigador	10.0%	22	2.20
Fátima Ferreirinha	Investigador	2.0%	11	0.22
Adelina Costa	Investigador	1.0%	11	0.11
Paulo Correia de Sá	Orientador	2.5%	22	0.55
	Investigador	1.0%	11	0.11
Margarida Lima	Supervisor	2.5%	22	0.55
	Investigador	1.0%	11	0.11
Marta Gonçalves	Investigador	2.0%	11	0.22
José Marinhos	Investigador	1.0%	8	0.08
Rui Rocha	Investigador	1.0%	8	0.08
			Total	6.98

10. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Com vista a situar num horizonte temporal as atividades que foram e serão realizadas, foi delineado o presente cronograma como instrumento de planeamento para melhor compreensão das nossas atividades.

ANO	2011			2012												2013							
Mês	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	01	02	03	04	05	06	07	
Escolha do tema e do assunto	■																						
Identificação dos problemas/questões		■																					
Revisão bibliográfica/concepção do estudo	■	■	■	■																			
Elaboração da proposta de projecto					■	■	■																
Apresentação da proposta									■														
Execução do projecto											■	■	■	■	■	■	■	■					
Análise dos resultados																			■	■	■		
Apresentação dos resultados																						■	■
Provas de dissertação do MIM																						■	■

11. INDICADORES DE PRODUÇÃO

A proposta de projeto e os respetivos resultados do projeto serão apresentados em reuniões internas dos serviços envolvidos e nas Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica (JIIC).

Quer a proposta de projeto quer o respetivo relatório de execução integrarão a dissertação de MIM da aluna.

Futuramente, pretende-se fazer a divulgação dos resultados através de publicações e apresentações em reuniões científicas, com o objetivo de contribuir para a difusão do conhecimento científico e para a obtenção de eventuais benefícios a longo prazo, decorrentes de uma melhor compreensão das bases moleculares da doença, nomeadamente no que respeita à definição de alvos terapêuticos novos e mais efetivos.

QUESTÕES ÉTICAS

O presente estudo é realizado no ICBAS/UP e está integrado num estudo mais vasto com resultados já publicados em revistas internacionais com arbitragem científica que foi previamente aprovado pela Comissão de Ética do CHVNG/E, de onde são provenientes os participantes. Estes são informados sobre o estudo e só são incluídos após terem decidido de livre e espontânea vontade, tendo em consideração o princípio da liberdade de opção, o consentimento informado e a garantia de anonimato e confidencialidade dos dados recolhidos.

Pelo que atrás foi dito, julgamos que não é aplicável a submissão do estudo à Comissão de Ética do CHP.

PLANO FINANCEIRO

ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Não serão efetuadas consultas, internamentos, exames complementares de diagnóstico no CHP, especificamente no âmbito do projeto.

As análises a realizar são análises de investigação e não constam na tabela de preços do Sistema Nacional de Saúde, pelo que se procederá à compra dos reagentes necessários.

Os estudos laboratoriais serão feitos no LFNB do ICBAS/UP.

A participação do Laboratório de Citometria do SHC do HSA/CHP consiste no apoio técnico à execução, análise e interpretação dos estudos de citometria de fluxo e não acarreta despesas para o hospital.

A maioria dos custos ao projeto será suportada por verbas disponíveis no ICBAS/UP e pelo LFNB, no seguimento de outros trabalhos, nos mesmos moldes, e que estão a ser efetuados em simultâneo.

Na tabela seguinte apresentam-se apenas os custos assumidos pelo ICBAS/UP, através da bolsa atribuída à DIIC.

	Custo estimado (€)
Consumíveis e reagentes de laboratório (e.g. anticorpos, fluorocromos, fármacos, reagentes gerais, inibidores enzimáticos, meios de cultura, kits de diagnóstico, placas de cultura, lâminas e lamelas, meios de montagem, pontas de pipetas, CO ₂)	6.500,00
Impressão de poster para apresentação de resultados	50,00
Inscrição, deslocação e estadia da aluna em congresso médico	500,00
Organização das Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica	50,00
TOTAL	7.100,00

RELATÓRIO DE EXECUÇÃO

1. MATERIAL E MÉTODOS

Nesta secção descreve-se detalhadamente a metodologia que foi efetivamente executada neste trabalho.

1.1 REAGENTES E ANTICORPOS

Os reagentes de cultura celular foram adquiridos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). A adenosina 5'-trifosfato disódio solução salina (ATP), o reagente de alizarina vermelha, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), o dihidrogenofosfato de sódio, o hidrogenofosfato de sódio, a nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), o piruvato de sódio, o *p*-nitrofenilfosfato dissódico foram obtidos da *Sigma-Aldrich* (St. Louis, MO, EUA). Todos os anticorpos primários anti-humano utilizados no presente estudo foram previamente validados: anti-P2X7 foi adquirido à *Alomone* (Jerusalém, Israel), anti-osteocalcina e anti-colagénio do tipo I foram obtidos da *AbD Serotec* (Oxford, Reino Unido), anticorpo anti CD34-APC (clone 8G12), anticorpo anti CD45-PerCP (clone 2D1) e anticorpo anti CD14-FITC (clone MYP9) foram adquiridos da *BD Biosciences* (San Jose, CA, EUA). O kit de separação *MicroBeads* CD34 foi adquirido da *Miltenyi Biotec* (Bergisch Gladbach, Alemanha). A sonda fluorescente sensível ao cálcio, Fluo-4NW e o anticorpo secundário Alexa-Fluor 488 (anti-coelho) foram fornecidos pela *Molecular Probes* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). O cloridrato de acridina (quinacrina) foi obtido pela *Fluka* (Buchs, Suíça). O hidróxido de amónio (NH₄OH), o cloreto de cálcio (CaCl₂), o dimetilsulfóxido (DMSO), o reagente de *Folin*, a glucose, o ácido clorídrico (HCl), o dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), o cloreto de magnésio (MgCl₂), o cloreto de potássio (KCl), o bicarbonato de sódio (NaHCO₃), o cloreto de sódio (NaCl) e o fosfato de sódio (NaH₂PO₄) foram obtidos pela *Merck* (Frankfurt, Alemanha). As placas de cultura de células foram adquiridas da *Corning* (Lowell, MA, EUA); as placas para microscopia confocal *Fluorodish* foram fornecidas pela *World Precision Instruments* (Hitchin, Hertfordshire, Reino Unido) e as placas (lâminas de vidro) para imunofluorescência foram obtidas pela *Nunc* (Rochester, NY, EUA).

1.2 CULTURAS CELULARES

O material biológico foi obtido em cirurgias programadas, efetuadas no Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia (CHVNG), após as respetivas autorizações do Director do Serviço de Ortopedia e Traumatologia e da Comissão de Ética do CHVNG e do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar (ICBAS). Foram seguidos os procedimentos recomendados para a manipulação de tecidos biológicos.

As amostras de medula óssea (MO) foram obtidas do colo do fémur proveniente de mulheres pós-menopáusicas com 59-82 anos ($n=7$), sujeitas a uma artroplastia da anca, como resultado de osteoporose primária. Para comparação, foram obtidas amostras de MO proveniente de mulheres com 13-36 anos ($n=8$), sujeitas a uma correcção de escoliose ou a cirurgia pós-trauma. A MO foi colhida para um meio de cultura adequado, α -Minimal Essential Medium (α -MEM), contendo 100 IU/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 2.5 μ g/mL de anfotericina B; as amostras foram conservadas a 4°C até à realização da cultura primária, no mesmo dia da cirurgia. Para obtenção de células osteoprogenitoras (células mesenquimatosas (CM)), a MO foi diluída e homogeneizada em meio de cultura fresco (Freshney, 1994). Estas culturas foram desenvolvidas em caixas de petri de 90 mm de diâmetro com α -MEM, contendo 10% de soro bovino fetal (FBS), 100 IU/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 2.5 μ g/mL de anfotericina B. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera húmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂ (estufa de incubação em atmosfera controlada de CO₂: Class II Biological Safety Cabinet, Telstar, Espanha). A primeira mudança de meio foi efetuada ao fim de cinco dias para as culturas primárias de MO e depois duas vezes por semana. As culturas foram examinadas periodicamente com um microscópio de contraste de fase (Olympus, modelo CK 2) (Freshney, 1994). Aquando da confluência, as células aderentes foram libertadas enzimaticamente (solução de tripsina a 0.04%, pH 7.4, e colagenase a 0.025% em tampão fosfato salino (PBS)), durante 15 a 20 minutos (Freshney, 1994); as células em suspensão foram contadas num hemocitómetro (Freshney, 1994), diluídas com meio de cultura e subcultivadas com uma densidade de 2×10^4 células/ml, em diferentes placas de cultura de acordo com o fim a que se destinavam. Estas células foram previamente identificadas como CM, devido à expressão de marcadores encontrados em CM multipotentes, nomeadamente CD105, CD73, CD117 e CD29 e à ausência de marcadores para células estaminais hematopoiéticas (CEH), nomeadamente CD14, CD34 e CD45 (Noronha-Matos e colaboradores, 2012). As células em subcultura foram cultivadas em condições experimentais análogas às utilizadas na cultura primária e, ainda, na presença de substâncias que, de acordo com o descrito na literatura (Aronow e colaboradores, 1990; Bellows e colaboradores, 1991; Cheng e colaboradores, 1994; Chung e colaboradores, 1992; Gotoh e colaboradores, 1990; Schmidt e Kulbe, 1993; Wong e colaboradores, 1990), favorecem o desenvolvimento de células com características osteoblásticas, nomeadamente, ácido ascórbico a 50 μ g/mL, β -glicerofosfato de sódio a 10 mM e dexametasona a 10 nM, por períodos de tempo variáveis de 1 a 43 dias. O meio de cultura foi mudado sistematicamente duas vezes por semana.

Para a obtenção de CEH (CD34+), foi utilizada MO de um homem de 83 anos, sujeito a uma artroplastia da anca. A MO inicial foi diluída em PBS, com 2% de FBS, 2 nM de EDTA e 10 mM de HEPES com adição de 100 IU/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 2.5 µg/ml de anfotericina B. Seguidamente a suspensão foi filtrada usando um filtro de 40 µm. As células foram re-suspensas em tampão A (PBS + 0.5% de BSA + 2mM de EDTA), a solução centrifugada a 1200 r.p.m. durante 10 minutos, e o *pellet* ressuspensa em 300 µL de tampão A. A seguir incubou-se a suspensão celular com 100 µL do reagente *FcR blocking* e 100 µL de *MicroBeads* CD34 durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, centrifugou-se a suspensão a 2000 r.p.m. durante 10 minutos. Rejeitou-se o sobrenadante e a suspensão celular foi novamente ressuspensa em tampão A. O isolamento das células hematopoiéticas CD34+ foi executado passando a suspensão por uma coluna (MS, Milteney Biotec) sujeita a um campo magnético proveniente do separador MACS (MidiMACS Separation System, Miltenyi Biotec, Alemanha). As CEH CD34+ retidas na coluna foram posteriormente eluídas usando 1ml de tampão A, removendo anteriormente a coluna do separador MACS. As células obtidas foram novamente centrifugadas a 2000 r.p.m. e semeadas em meio de cultura apropriado (*Hematopoietic stem cell medium*) durante 3 semanas. Foi anteriormente verificado que, nestas condições, as CEH proliferam e mantêm o seu fenótipo durante este período de tempo (cf. Delalat e colaboradores, 2009).

1.3 ENSAIO DO MTT – AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO/VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade/proliferação celular foi avaliada pelo ensaio do MTT. Este método tem como base a capacidade das células reduzirem os sais tetrazólicos (reagente MTT) com coloração amarela, por intermédio de desidrogenases mitocondriais. O aumento da coloração púrpura, resultante da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (produto de formazan) correlaciona-se com o número de células metabolicamente ativas. A dissolução destes cristais é possível com DMSO e a solução resultante é suscetível de análise e quantificação por espectrofotometria a 600nm. Adicionou-se 10 µL do sal tetrazólio MTT a cada poço contendo as células cultivadas em placas de 96 poços. Após um tempo de incubação de 4 horas na estufa (37°C, 5% CO₂), foi retirado o meio e foram adicionados 100 µL/poço de DMSO sendo avaliado por espectrofotometria num leitor de microplacas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA) a 600 nm.

1.4 DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS PELO MÉTODO DE LOWRY MODIFICADO

O conteúdo em proteína total foi avaliado pelo método de *Lowry* (*Lowry e colaboradores, 1951*). Após a remoção do meio de cultura, a camada celular foi lavada duas vezes com tampão salino-fosfato (PBS), tratada com 100 µL/poço de NaOH a 0.1 M e incubada a 37°C, durante 1 hora. A 0.2-0.3 mL da amostra adicionou-se 2 mL de uma solução alcalina de cobre e, após 10 minutos, 200 µL de reagente de *Folin-Ciocalteu* (diluído com água destilada numa proporção de 1:1). Seguidamente, as amostras foram mantidas no escuro durante 1 hora. O reagente de *Folin-Ciocalteu*, após tratamento com a solução alcalina de cobre, reage com os aminoácidos aromáticos existentes nas proteínas, originando um produto azul que é doseado espectrofotometricamente a 750 nm (*Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA*), utilizando uma reta de calibração (padrão de albumina sérica bovina a 0.05%, em NaOH a 0.1 M). Os resultados obtidos foram expressos em µg de proteína total existente na amostra por centímetro quadrado (µg/cm²).

1.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA

No fim de cada período de incubação e após remoção do meio de cultura, as camadas celulares foram lavadas duas vezes com tampão salino-fosfato (PBS) e lisadas com 100 µL/poço de triton X-100 a 0.1%. De seguida, adicionou-se a cada poço 80 µL de substrato (solução de *p*-nitrofenilfosfato a 25 mM num tampão alcalino apropriado (Solução tampão alcalino, pH 10.3) e as culturas foram incubadas a 37°C, durante 30 minutos. No final, a reação foi interrompida pela adição de 20 µL de NaOH a 5 M.

O método utilizado na determinação da fosfatase alcalina baseia-se na capacidade desta enzima para hidrolizar o *p*-nitrofenilfosfato (*p*-nitrofenilfosfato dissódico), com libertação do grupo fosfato e de *p*-nitrofenol (PNP). Este produto de cor amarela é, então, doseado espectrofotometricamente a 405 nm, num leitor de microplacas (*Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments, Winooski, Vermont, EUA*), utilizando uma reta de calibração (padrão PNP a 10 µmol/mL). A atividade da fosfatase alcalina foi expressa em nanomole de PNP formado por minuto e por centímetro quadrado (nmol/min.cm²).

1.6 COLORAÇÃO DE ALIZARINA VERMELHA

Para a coloração de cálcio, foram utilizadas culturas com 43 dias. As células fixadas foram cobertas com uma mistura contendo 1% solução alizarina vermelha e hidróxido de amónio a

0.028%, pH 6.5, durante 2 minutos e depois lavadas com água destilada e etanol ácido (etanol, 0.01% HCl). Os depósitos de cálcio (áreas mineralizadas) foram corados de vermelho e foram fotografadas usando um microscópio de epifluorescência vertical (Zeiss Axiophot, Oberkochen, Alemanha). Foi usada uma lente objetiva de 20x para observação. As imagens foram adquiridas com alta resolução e usado um *software* de aquisição de imagem digital (MetaFluor 6.3, Fotometria, Tucson, AZ, EUA). O tempo de exposição foi ajustado entre 100-250 ms. As imagens foram processadas usando *software* 1.37c Imagem J (NIH, Bethesda, MD, EUA), para a quantificação da área do nódulo. Os resultados foram expressos em área mineralizada total em μm^2 e correspondem à área de todos os nódulos ósseos quantificados em cada situação (Noronha-Matos e colaboradores, 2012).

1.7 AVALIAÇÃO DAS OSCILAÇÕES DE CÁLCIO INTRACELULAR

As células mesenquimatosas (CM) foram semeadas em placas de 35 mm a uma densidade de 2×10^4 células / mL e deixadas proliferar durante 7 dias e 21 dias, em meio suplementado com α -MEM. Relativamente às células estaminais hematopoiéticas (CEH) CD34+, estas foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células / mL (3 semanas de cultura primária) em placas de 35 mm previamente revestidas com poli-L-Lisina e deixadas aderir durante 2:30h. Seguidamente, o protocolo foi idêntico para os dois tipos celulares: as células foram lavadas duas vezes com tampão salino-fosfato (PBS) e incubadas a 37°C durante 45 minutos com a sonda Fluo-4 NW (2.5 μM), em PBS contendo 2.5% de ácido plurónico (100 μM de DMSO). Após período de incubação com a sonda de cálcio, as células foram lavadas duas vezes e foi adicionado 150 μl de PBS a cada placa de cultura. As placas de cultura foram, em seguida, montadas, no microscópio confocal (*Olympus* FV1000, Tóquio, Japão), sobre uma câmara de perfusão, com temperatura controlada, e observadas com uma objetiva de ampliação de 20x (LUCPLFL 20xPH; NA 0.45). A partir desse momento, a câmara foi perfundida continuamente (1 mL / min) com solução de *Tyrode* (pH 7.4) contendo (mM): NaCl 137, KCl 2.7, CaCl_2 1.8, MgCl_2 1.0, NaH_2PO_4 0.4, NaHCO_3 11.9 e glucose 11.2, a 37°C. Durante 6 minutos, as células foram perfundidas com solução de *Tyrode* usando um sistema de multicanal (ValveLink8.2; Digitimer, Welwyn Garden City, UK). As culturas foram seguidamente perfundidas com ATP durante 6 minutos. As oscilações de fluorescência foram detetadas em modo tempo real com o *Software FluoView* (Olympus, Tóquio, Japão). A sonda Fluo-4 NW foi excitada a 488 nm. A fluorescência emitida foi detetada a 510-560 nm, utilizando o *scanner* do microscópio confocal. As imagens de fluorescência foram obtidas em intervalos de 20s. Oscilações intracelulares de cálcio, induzidas pela perfusão de ATP foram calibradas para o

máximo de fluorescência obtido com ionomicina (5 μ M, 100% de resposta) (Noronha-Matos e colaboradores, 2012.).

1.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

As células mesenquimatosas (CM) cresceram em lâminas de vidro com oito poços (*chamber slides*) durante 7 ou 21 dias. No final de cada período de teste, as células em cultura foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) em tampão salino-fosfato (PBS) durante 10 minutos, lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada) e subsequentemente incubadas com tampão de bloqueio I [10% de soro fetal bovino (FBS), 1% de albumina de soro bovino (BSA), 0.1% de Triton X, 0.05% de NaN_3] durante 1.5 h. Os anticorpos primários, diluídos em tampão de bloqueio II (5% de FBS, 1% de BSA, 0.1% de Triton X, 0.05% de NaN_3 em PBS), foram aplicados: P2X7 1:75 (coelho), osteocalcina 1:75 (coelho), colágeno tipo I 1:50 (coelho) e as lâminas colocadas no escuro durante 2 horas. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Seguidamente, foi aplicado o anticorpo secundário durante 1h: Alexa Fluor 488 (anti-coelho). No final deste período de incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Posteriormente, as lâminas de vidro foram montadas com meio *Vectashield* e armazenadas a 4°C. As observações foram feitas com um microscópio confocal (Olympus FV1000, Tóquio, Japão) (Noronha-Matos e colaboradores, 2012). Para as células estaminais hematopoiéticas (CEH), após crescimento durante 3 semanas em cultura primária, foram semeadas a uma densidade de 2×10^4 células/ml em lâminas de vidro previamente revestidas em poli-L-lisina. Após 2:30h, as células em cultura foram fixadas em paraformaldeído a 4% (PFA) em PBS durante 10 minutos, lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada) e subsequentemente incubados com tampão de bloqueio I [10% de FBS, 1% de BSA, 0.1% de Triton X, 0.05% de NaN_3] durante 1.5 h. Os anticorpos primários (conjugados), diluídos em tampão de bloqueio II (5% de FBS, 1% de BSA, 0.1% de Triton X, 0.05% de NaN_3 em PBS), foram aplicados: CD34 1:10 (rato), CD45 1:10 (rato) e CD14 1:10 (rato). As lâminas foram posteriormente incubadas no escuro durante 2 horas. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes com PBS (10 minutos cada). Seguidamente, as lâminas de vidro foram montadas com meio *Vectashield* e armazenadas a 4°C. As observações foram feitas com um microscópio confocal (Olympus FV1000, Tóquio, Japão) (Noronha-Matos e colaboradores, 2012).

1.9 MARCAÇÃO DE RESERVAS DE ATP INTRACELULARES COM QUINACRINA

As células mesenquimatosas (CM) foram semeadas em placas de 35 mm, a uma densidade de 2×10^4 células / mL e deixadas proliferar durante 7 dias em meio suplementado com α -MEM. No dia da experiência, para permitir a visualização das vesículas com ATP, as células foram lavadas duas vezes com tampão salino-fosfato (PBS), antes da incubação com quinacrina a 30 μ M durante 1h, a 37°C. Após período de incubação com sonda, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionados 150 μ L de PBS a cada placa de cultura. Seguidamente, as placas de cultura foram montadas sobre uma câmara de perfusão com temperatura controlada, no microscópio confocal. A fluorescência foi detetada em modo de tempo real com *Software FluoView*. A quinacrina foi excitada com laser a 488 nm. A fluorescência emitida foi detetada a 510-560 nm, utilizando o leitor do microscópio confocal (*Olympus FV1000*, Tóquio, Japão).

1.10 QUANTIFICAÇÃO DA LIBERTAÇÃO CONSTITUTIVA DE ATP

A libertação constitutiva de ATP a partir de culturas de células mesenquimatosas (CM) humanas da medula óssea (MO) foi avaliada nos dias 7 e 21. Antes da quantificação da libertação de ATP, o meio de cultura foi removido, as células lavadas e incubadas com solução de *Tyrode* durante 30 minutos a 37°C. Após este período de estabilização, as células foram lavadas novamente, e incubadas durante 30 minutos em solução de *Tyrode*. As amostras foram colhidas após 30 min e imediatamente congeladas em azoto líquido para posterior quantificação de ATP. A libertação de ATP foi quantificada por bioluminescência utilizando o ensaio da luciferina-luciferase (Orriss e colaboradores, 2009). Os resultados foram expressos em pmol de ATP / 30 minutos / poço.

1.11 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA PLASMÁTICA

A viabilidade celular das células mesenquimatosas (CM) em cultura foi avaliada pela quantificação da atividade da desidrogenase do lactato (LDH), uma enzima citoplasmática estável que é libertada aquando da lise celular (ver exemplo em Orriss e colaboradores, 2009). As CM humanas foram cultivadas em placas de 96 poços, a uma densidade de 2×10^4 células / mL e, avaliadas ao dia 7 e 21 de cultura. Foi preparado um tampão fosfato (pH =7.5) adicionado 16 mL do tampão A (NaH_2PO_4 a 50 mM) e 84 mL da solução B (Na_2HPO_4 a 50 mM). A esta solução tampão adicionou-se 7 mg de piruvato de sódio e acertou-se o pH para 7.5 com HCl (0.1 M). De seguida adicionou-se 3.34 mg de NADH a 20 mL de tampão fosfato, deixando-se 15 minutos à temperatura ambiente. O zero do espectrofotómetro de UV/visível (Jenway 6305, Staffordshire,

Inglaterra), a 365 nm, foi acertado com o tampão fosfato. A atividade da LDH foi determinada através da diminuição da absorvância em função do tempo (0.5; 1, 2 e 3 minutos), após adicionar 200 µL da amostra a 2.5 mL de solução de NADH em tampão fosfato.

1.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados estatisticamente pelo método ANOVA. As diferenças estatísticas observadas entre as culturas do grupo controlo e as culturas do grupo de mulheres pós-menopáusicas foram determinadas pelo teste de *Bonferroni*, em que o $P < 0.05$ foi considerado para indicar significado estatístico.

2. RESULTADOS

1.1 CARATERIZAÇÃO DA CULTURA

As células mesenquimatosas (CM) humanas foram semeadas e mantidas em meio indutor da osteogénese durante 28 dias. A viabilidade/proliferação celular e a diferenciação osteogénica foram avaliadas nos dias 1, 4, 7, 14, 21 e 28 de cultura, através dos ensaios de MTT e da quantificação da atividade da fosfatase alcalina, respetivamente. A fosfatase alcalina é sintetizada em quantidades elevadas pelas células osteoblásticas e é um marcador, *in vitro*, da diferenciação osteoblástica (Bellows e colaboradores, 1991). A formação de uma matriz mineralizada traduz a expressão completa do fenótipo osteoblástico (Weinzierl e colaboradores, 2006).

As CM proliferaram até ao 28º dia de cultura. Não foram encontradas diferenças significativas ($P > 0.05$) em relação ao perfil de proliferação celular entre os dois grupos avaliados, nomeadamente o grupo controlo (13-16 anos, $n=7$) (figura 1A) e o grupo de mulheres pós-menopáusicas (59-76 anos, $n=6$). A avaliação da diferenciação osteogénica, obtida pela quantificação da atividade da fosfatase alcalina, normalizada à proteína total, resultou em diferenças significativas ($P < 0.05$) entre os dois grupos etários (figura 1B). No grupo controlo, a atividade da fosfatase alcalina aumentou de forma gradual ao longo do tempo de cultura, atingindo um máximo aos 21 dias de cultura, diminuindo posteriormente. Por outro lado, no grupo de mulheres pós-menopáusicas, a atividade da fosfatase alcalina aumentou progressivamente, embora lentamente, até ao dia 28 de cultura.

Os osteoblastos diferenciados sintetizam e libertam por via exocítica proteínas da matriz óssea, colagénio tipo I (que constitui 85-90% da matriz orgânica) e proteínas não-colagénicas (que constituem 10-15%) na qual se inclui a osteocalcina, uma proteína que participa na ligação do cálcio durante a mineralização (Orriss e colaboradores, 2010). Assim, a marcação

imunocitoquímica das proteínas da matriz óssea permite inferir sobre a diferenciação osteogénica das CM em cultura. Como mostra a figura 1C, a imunorretividade ao colagénio tipo I e à osteocalcina foi semelhante para os dois grupos etários (13-16 anos e 59-76 anos).

A presença de depósitos de fosfatos de cálcio na matriz extracelular foi avaliada no final da cultura (dia 43) pela coloração de alizarina vermelha (figura 1D). As culturas de ambos os grupos etários apresentaram uma coloração positiva para os depósitos de cálcio e, tal como evidenciado pelas setas pretas, a coloração foi especialmente evidente nas áreas de maior densidade celular (estruturas com aparência nodular). Contudo, quando avaliada a área total mineralizada por poço, o grupo de mulheres pós-menopáusicas mostrou ter uma mineralização significativamente inferior ($P<0.05$) comparativamente com o grupo controlo (13-16 anos).

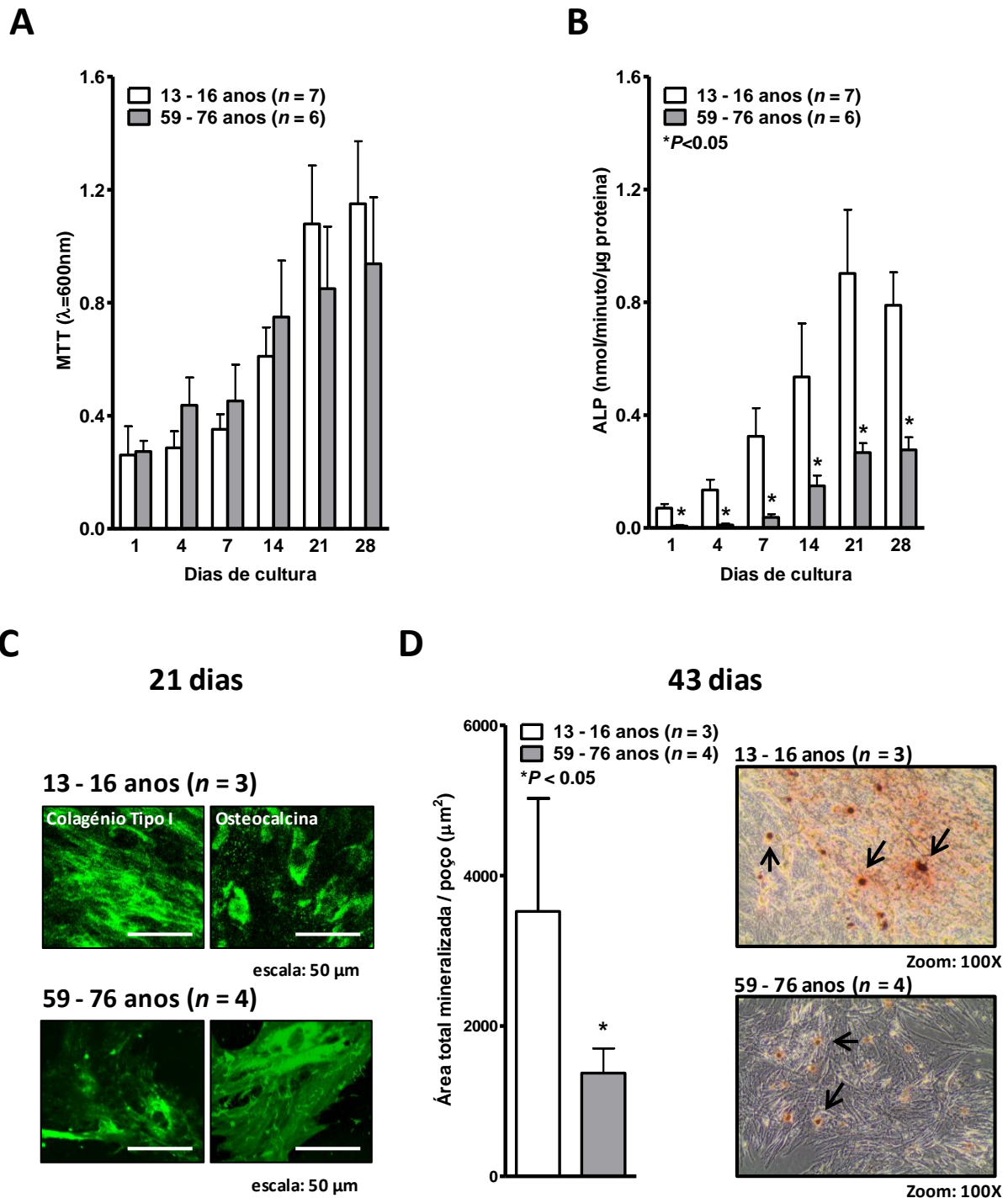


Figura 1. Proliferação, diferenciação e mineralização de culturas de células mesenquimatosas (CM) humanas isoladas de medula óssea (MO) (cultura primária) em meio indutor da osteogénese durante 43 dias. As amostras da MO foram obtidas de mulheres com idades compreendidas entre os 59-76 anos ($n=6$, representado com barras cinzentas) e 13-16 anos (grupo controlo, $n=7$, representado com barras brancas). O painel (A) representa a viabilidade/proliferação celular, avaliada por ensaios de MTT; os resultados são expressos pela determinação da absorvância a 600 nm por cm^2 , para diferentes dias de cultura. O painel (B) representa a atividade da fosfatase alcalina nas células lisadas; os resultados são expressos em nanomoles de *p*-nitrofenol produzido por min por μg de proteína total, para os diferentes dias de cultura. Cada coluna representa os dados obtidos a partir de um número n de indivíduos. As barras verticais representam o erro padrão. $*P<0.05$ representa as diferenças significativas quando comparado com o controlo (13-16 anos). O painel (C) ilustra a deteção por imunocitoquímica das proteínas da matriz óssea, colagénio tipo I e osteocalcina, nas CM no grupo controlo (13-16 anos, $n=3$) e no grupo de mulheres pós-menopáusicas (59-76 anos, $n=4$), para o dia 21 de cultura (subcultura primária, com meio indutor da linhagem osteoblástica). As imagens

são representativas de três experiências diferentes. A escala é de 50 μm . O painel (D) mostra a formação de nódulos de osso na cultura de CM humanas (subcultura primária, dia 43) de ambos os grupos etários. No final do período de cultura, foi avaliada a deposição de cálcio determinada pelo método de alizarina vermelha; os resultados expressam o total das áreas dos nódulos de osso por poço em μm^2 . Cada coluna representa os dados obtidos a partir de um número n de indivíduos. As barras verticais representam o erro padrão. * $P < 0.05$ representa as diferenças significativas quando comparado com o grupo controlo (13-16 anos). As imagens microscópicas representam culturas de CM humanas coradas para o cálcio (método de alizarina vermelha), evidenciando a formação de nódulos de osso ao dia 43 de cultura (setas pretas) para ambos os grupos etários. As imagens são representativas de três a quatro experiências independentes. Ampliação de 100X.

1.2 RESERVATÓRIOS E LIBERTAÇÃO CONSTITUTIVA DE ATP

O ATP é o nucleótido com maior espectro de atividade biológica, influenciando de maneira autócrina e parácrina, por intermédio da ativação de recetores purinérgicos, a formação óssea (Orriss e colaboradores, 2010). Estima-se que a concentração intracelular de ATP seja 2-5 mM. O ATP pode ser libertado para o meio extracelular por estimulação mecânica ou química, embora também possa ser libertado constitutivamente pelas células mesenquimatosas (CM) (Riddle e colaboradores, 2007; Romanello e colaboradores, 2001). O ATP libertado pode ativar recetores ionotrópicos (P2X) e metabotrópicos (P2Y), e, assim, influenciar a atividade de outras células vizinhas, como as células estaminais hematopoiéticas (CEH), que por sua vez também expressam recetores P2 (Casati e colaboradores, 2010).

Através da marcação com quinacrina, fluorocromo que se liga com grande afinidade aos reservatórios intracelulares de ATP, foi possível confirmar a acumulação intracelular do nucleótido pelas CM ao 7º dia de cultura. A coloração assume uma aparência granular/vesicular citoplasmática sugerindo uma acumulação vesicular do ATP (figura 2A).

A libertação constitutiva de ATP a partir das CM foi avaliada aos 7 e 21 dias de subcultura em meio indutor da osteogénese. Foram comparados os valores de ATP libertado pelas células da medula óssea (MO) dos dois grupos etários: grupo controlo (13-36 anos) e grupo de mulheres pós-menopáusicas (59-82 anos). Os resultados da figura 2B comprovam que o ATP é libertado constitutivamente a partir destas células. Nas células do grupo controlo, os níveis de ATP atingiram 0.24 ± 0.04 e 0.11 ± 0.06 pmol / 30 min / poço aos dias 7 e 21 de cultura, respetivamente ($n=3$). Já nas células das mulheres pós-menopáusicas, o ATP libertado foi de 0.26 ± 0.07 e 0.35 ± 0.06 pmol/30 min/poço aos dias 7 e 21 de cultura, respetivamente ($n=3$). Os resultados mostram que a libertação de ATP é semelhante na fase mais precoce da cultura (7 dias) entre os dois grupos etários; já nas culturas mais diferenciadas (21 dias), a libertação de ATP foi significativamente maior ($P < 0.05$) nas células de mulheres pós-menopáusicas comparativamente ao grupo controlo (Figura 2B). Foi possível verificar, através da determinação da atividade da desidrogenase do lactato (LDH), que a libertação de ATP não se deveu à perda de integridade

celular, já que não se observaram diferenças significativas na atividade desta enzima intracelular entre os dois grupos de mulheres, tanto aos 7 como aos 21 dias de cultura (Figura 2B).

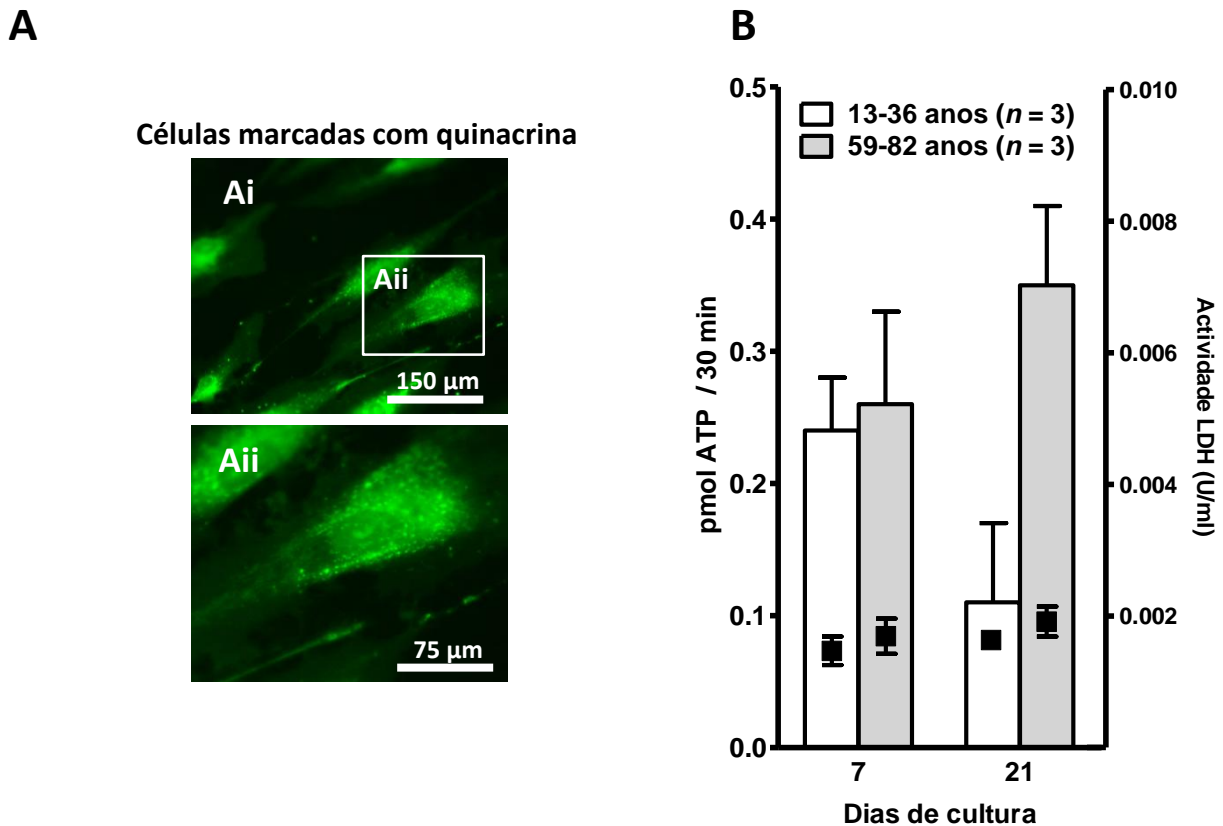


Figura 2. Reservas intracelulares e libertação constitutiva de ATP das células mesenquimatosas (CM) humanas da medula óssea (MO) (subcultura primária) em indivíduos do sexo feminino, com 59-82 anos (grupo mulheres pós-menopáusicas) e 13-36 anos (grupo controlo), em meio indutor da osteogénese. O painel (A) representa células marcadas com quinacrina, evidenciando reservas de ATP intracelular (dia 7 de cultura) (Ai, escala de 150 µm; Aii, escala de 75 µm). O painel (B) representa a acumulação de ATP em culturas de CM do grupo controlo (13-36 anos) e do grupo de mulheres pós-menopáusicas (59-82 anos) ao dia 7 e 21 de cultura. Os resultados são expressos em pmol / 30 minutos / poço. Representa-se também a atividade da desidrogenase do lactato (LDH) para os dias de cultura indicados. Os resultados da LDH são expressos em U / ml. Cada coluna representa os dados obtidos a partir de um número *n* de indivíduos. As barras verticais representam o erro padrão. * $P < 0.05$ representa as diferenças significativas quando comparado com o grupo controlo (13-36 anos).

1.3 EXPRESSÃO DO RECETOR P2X7 E AVALIAÇÃO DAS OSCILAÇÕES DE CÁLCIO INTRACELULAR EM RESPOSTA AO ATP EM CÉLULAS PROGENITORAS DA MEDULA ÓSSEA

Estudos recentes demonstraram que o recetor P2X7 é importante na diferenciação osteogénica de células da medula óssea (MO) de rato (Panupinthu e colaboradores, 2007) e humanas (Noronha-Matos e colaboradores, dados não publicados) e que estes recetores podem ser ativados por nucleótidos de adenina, como o ATP (para uma revisão, ver Orriss e colaboradores, 2010). Recentemente, também foi demonstrado que o ATP pode ser libertado por estimulação mecânica das células mesenquimatosas (CM) da MO, e que este é importante para a

proliferação destas células (Riddle e colaboradores, 2007). Desta forma, investigamos a expressão dos recetores P2X7 em células osteoprogenitoras de um grupo de mulheres pós-menopáusicas (59-76 anos) e de um grupo controlo (13- 36 anos), bem como a atividade destes recetores nas oscilações intracelulares do cálcio induzidas pelo ATP (100 μ M). A figura 3A mostra que em ambos os grupos etários, as CM exibem imunorreatividade para o recetor P2X7 nos dois momentos da cultura (dia 7 e 21). No entanto, no grupo de mulheres pós-menopáusicas parece haver diminuição da imunorreatividade para o recetor P2X7 do dia 7 para o dia 21 de cultura. O oposto foi observado para as células do grupo controlo; nesta circunstância, verificou-se um aumento da imunorreatividade com o decorrer da cultura, i.e. do dia 7 para o dia 21 (Figura 3A).

Para testarmos se estas diferenças tinham repercussões na resposta ao ATP, avaliou-se o efeito do ATP (100 μ M) na acumulação intracelular de cálcio nos dois grupos etários e nos dois momentos das culturas. Tal como mostra a figura 3B, no grupo controlo (13-36 anos) a resposta à perfusão com ATP seguiu a mesma tendência da expressão do recetores P2X7, i.e. observou-se um aumento da resposta ao nucleótido entre os 7 e os 21 dias de cultura tendo-se atingido oscilações máximas de cálcio respetivamente de $9 \pm 2\%$ (57 segundos) e de $34 \pm 3\%$ (60 segundos). Ao 7º dia em cultura das células do grupo de mulheres pós-menopáusicas, o ATP causou um influxo rápido de cálcio observando-se um sinal máximo aos 40 segundos ($50 \pm 6\%$) após a adição do nucleótido que diminuiu progressivamente no intervalo de 1-2 minutos. Contrariamente ao grupo controlo, o influxo de cálcio produzido pelo ATP diminuiu do 7º para o 21º dia de cultura (máximo de $21 \pm 1\%$ aos 40 segundos) nas células das mulheres pós-menopáusicas.

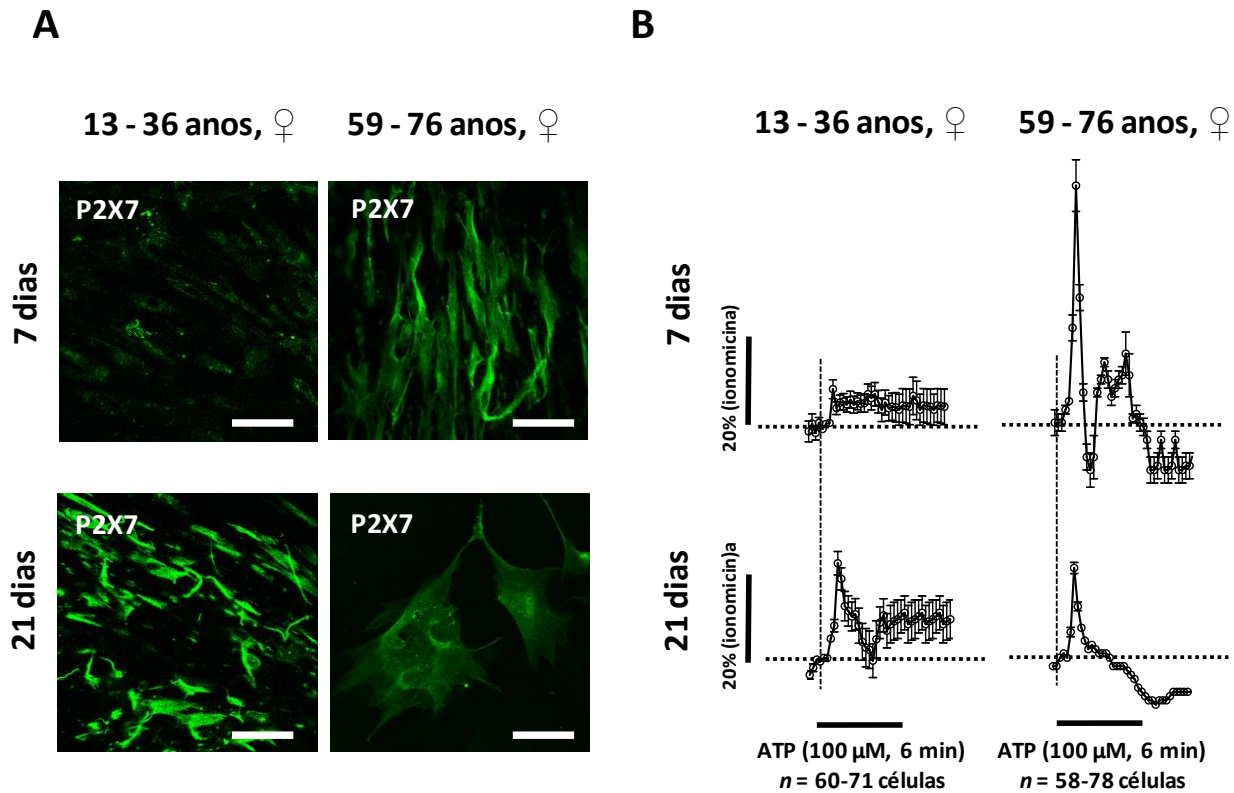


Figura 3. Detecção imunocitoquímica de recetores P2X7 e efeito do ATP na oscilação de cálcio intracelular, de células mesenquimatosas (CM) da medula óssea (MO) (subcultura primária) de indivíduos do sexo feminino com 13-36 anos (grupo controlo, $n=3$) e 59-76 anos (grupo mulheres pós-menopáusicas, $n=5-6$). O painel (A) mostra a imunorreatividade ao anticorpo anti-P2X7 detetada por microscopia confocal, de CM humanas mantidas em cultura durante 7 e 21 dias, em meio de crescimento indutor da osteogénese. As células cresceram em câmaras de vidro com oito poços, foram processadas para imunocitoquímica e visualizadas por microscopia confocal (Olympus FV1000, Tóquio, Japão), mantendo inalteradas as configurações do microscópio confocal durante todo o procedimento. As imagens são representativas de três experiências independentes. A escala é de 150 μm . O painel (B) ilustra os efeitos do ATP (100 μM) sobre a acumulação intracelular de cálcio de CM mantidas em cultura durante 7 e 21 dias nas mesmas condições indicadas em (A). No final do período de cultura, as células foram marcadas com uma sonda fluorescente sensível ao cálcio (Fluo-4 NW) e foram monitorizadas no microscópio confocal, em modo tempo real, com captações de 20 em 20 segundos. As células foram continuamente perfundidas com ATP (100 μM) durante 6 minutos, após estabelecerem o equilíbrio na solução *Tyrode*. O transiente de cálcio intracelular foi calibrado para a marcação máxima de cálcio induzida pela ionomicina (5 μM , resposta de 100%). As barras pretas na parte inferior de cada gráfico indicam o período de exposição ao fármaco. Cada ponto nos gráficos representa os dados obtidos a partir de 3 (grupo controlo) e 5-6 (grupo mulheres pós-menopáusicas) indivíduos diferentes para um total de n células. As barras verticais representam erro padrão.

1.4 CARATERIZAÇÃO IMUNOFENOTÍPICA DAS CULTURAS DE CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS ISOLADAS DA MEDULA ÓSSEA HUMANA

Existem evidências que as células mesenquimatosas (CM) e as células estaminais hematopoiéticas (CEH) interagem entre si no chamado nicho(s) celular(es) da medula óssea (MO) (para uma revisão, ver Isern e Méndez-Ferrer 2011). Sabe-se que as CM libertam fatores (como o M-CSF, G-CSF) que modulam a diferenciação das CEH e estes são também importantes na sua sobrevivência e proliferação (para uma revisão, ver Taichman, 2005). Contudo, a influência que as CEH exercem sobre as CM permanece por esclarecer, nomeadamente que mecanismo celular

explica o favorecimento da diferenciação osteogénica das CM por parte das CEH (Liao e colaboradores, 2011). Sabendo que, (1) os dois grupos de células interagem na MO (Taichman, 2005), (2) que as CM e CEH expressam recetores P2 (entre os quais, o P2X7) e (3) que as CM (presente trabalho) e as CEH (Casati e colaboradores, 2010) libertam constitutivamente ATP, colocámos a hipótese de que o ATP possa ser um importante intermediário na interação entre os dois grupos de células, regulando os mecanismos de diferenciação/proliferação celular.

Para testar a nossa hipótese, foi primeiro necessário isolar CEH da MO humana. Usou-se o critério de que estas células expressam um importante fator de adesão, o CD34. Utilizou-se um anticorpo anti-CD34 e isolou-se estas células utilizando um separador imunomagnético MACS (ver Materiais e Métodos para detalhes). Após a sua separação, estas foram semeadas em meio apropriado durante 3 semanas, de forma a permitir a obtenção de um maior número de células para os ensaios funcionais. Ao fim desse período, foi analisada a imunorreatividade a marcadores específicos de CEH, nomeadamente o CD14, o CD34 e o CD45, utilizando anticorpos contra estes marcadores de superfície (Figura 4). O CD34 é uma glicoproteína que funciona como fator de adesão à matriz extracelular da MO; o CD14 é uma glicoproteína que permite a deteção do LPS bacteriano, expressa também em CEH, e o CD45 é uma tirosina fosfatase, marcador global de CEH precursoras e em diferenciação. Na figura 4 verifica-se que as CEH isoladas de MO humana expressam os marcadores CD14, CD34 e CD45, imunorreatividade essa que co-localiza com a marcação nuclear evidenciada pelo marcador DAPI. Estas imagens demonstram que a técnica utilizada para o isolamento das CEH foi realizada com sucesso.

1.5 AVALIAÇÃO DAS OSCILAÇÕES DE CÁLCIO INTRACELULAR EM CÉLULAS ESTAMINAIS HEMATOPOIÉTICAS EM RESPOSTA AO ATP

A funcionalidade das células estaminais hematopoiéticas (CEH) isoladas foi verificada através da reatividade ao ATP através da análise das oscilações intracelulares do cálcio. As CEH foram perfundidas com ATP (100 μ M) durante 6 minutos e o transiente de cálcio intracelular foi calibrado para a resposta máxima de cálcio produzida pela ionomicina (5 μ M, resposta de 100%). A figura 5A mostra CEH marcadas com a sonda fluorescente de cálcio, Fluo4-NW, utilizando um código pseudocolorido, onde as cores mais “quentes” (amarelo-vermelho) refletem maiores concentrações de cálcio, cuja intensidade pode ser avaliada através da análise de regiões de interesse (ROI). Como o núcleo destas células ocupa grande parte da sua dimensão, as oscilações do cálcio intracelulares em resposta ao ATP são apenas visíveis numa região citoplasmática restrita junto à membrana celular. Às 3 semanas em cultura, a perfusão das CEH com ATP causou um

aumento rápido dos níveis intracelulares de cálcio, observável 30 segundos após a adição do nucleótido, que se manteve sustentado durante 1.5 minutos, voltando de seguida à linha de base; o valor máximo de $35 \pm 4 \%$ foi atingido aos 50 segundos (figura 5B). A figura 5C mostra o perfil citosólico de cálcio das CEH em resposta à estimulação pelo ATP (100 μM) comparativamente com a ionomicina (5 μM) na mesma experiência. Estes resultados comprovam a funcionalidade das CEH isoladas através do procedimento experimental realizado neste trabalho. A resposta destas células ao ATP sugere que as CEH expressam recetores P2 sensíveis ao ATP, confirmando o que tem sido sugerido na literatura (ver exemplo Casati e colaboradores, 2010).

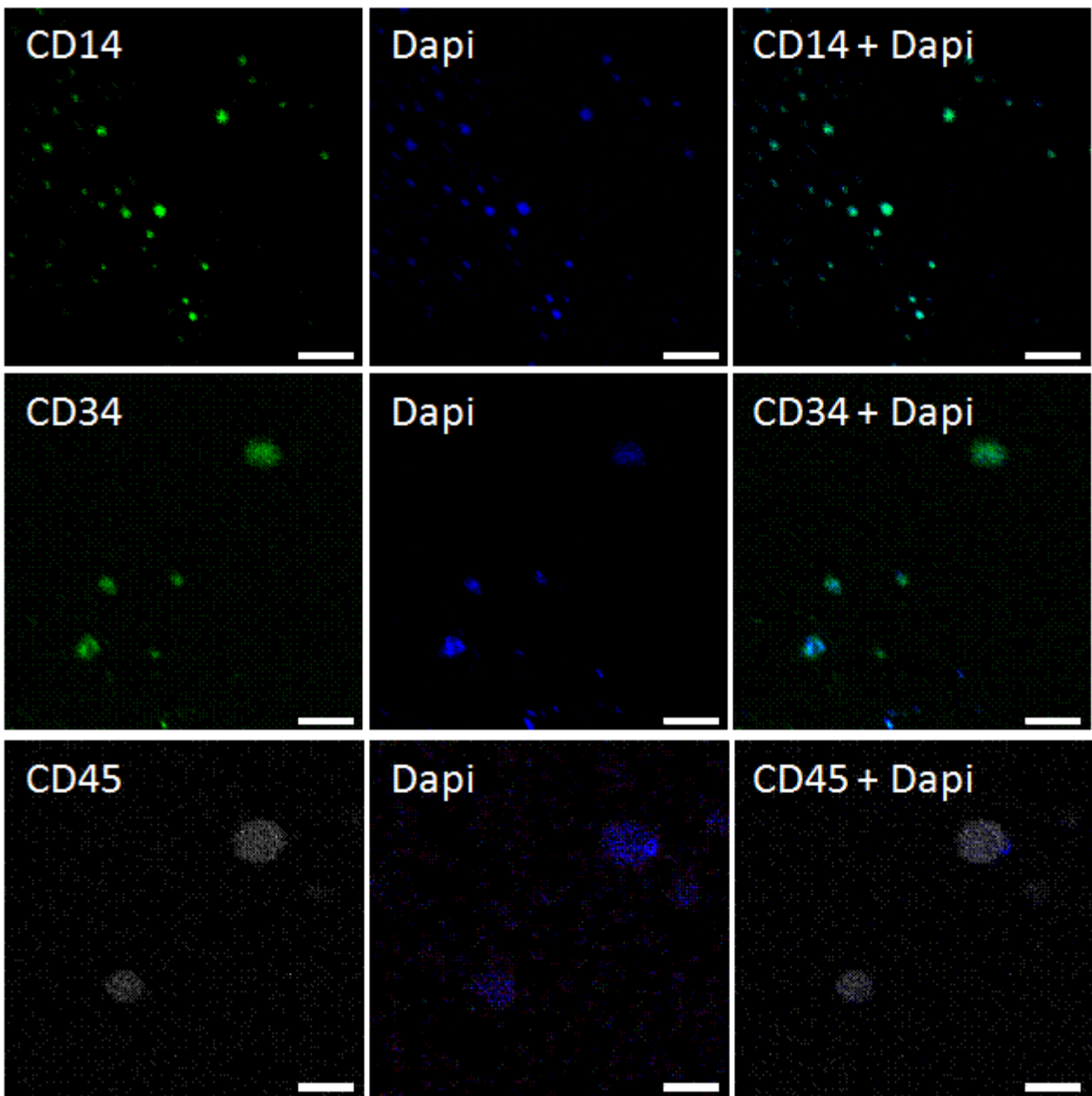


Figura 4. Detecção imunocitoquímica das células estaminais hematopoiéticas (CEH) de medula óssea (MO) humana (cultura primária de 3 semanas) através de marcadores de superfície (CD14, CD34 e CD45). As CEH foram obtidas de um indivíduo do sexo masculino, 83 anos, mantidas em cultura durante 3 semanas em meio específico das CEH. As CEH foram colocadas em câmaras de vidro com oito poços e incubadas com anticorpo anti-CD14-FITC (rato, clone

M6P9), anticorpo anti-CD34-APC (rato, clone 8G12), anticorpo anti-CD45-PerCP (rato, clone MYP9) e visualizadas por microscopia confocal (Olympus FV1000, Tóquio, Japão). Do lado esquerdo, representa-se a marcação específica para o CD14, CD34 e CD45. As figuras centrais representam a marcação DAPI, ou seja, marcação seletiva nuclear (a azul). Nas imagens da direita, representa-se a sobreposição das duas imagens anteriores. A escala é de 10 μm .

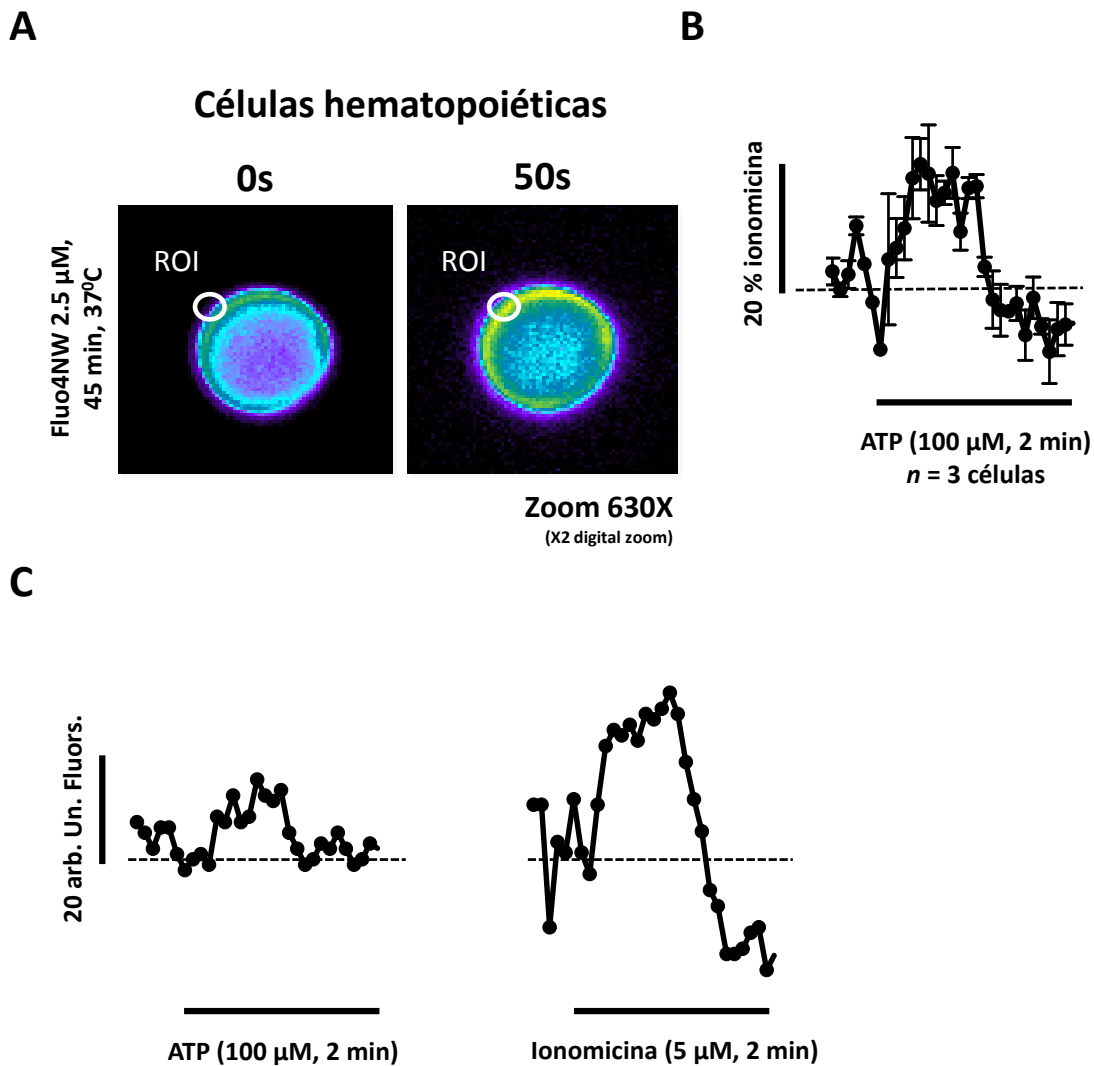


Figura 5. Efeito do ATP na oscilação de cálcio intracelular de células estaminais hematopoiéticas (CEH, cultura primária, 3 semanas) de um indivíduo do sexo masculino com 83 anos. As CEH foram mantidas em cultura durante 3 semanas. Ao fim desse tempo, foram marcadas com uma sonda fluorescente sensível ao cálcio (Fluo-4 NW) e monitorizadas em tempo real com captações de 20 em 20 segundos no microscópio confocal (Olympus FV1000, Tóquio, Japão). O Painel (A) mostra uma CEH marcada com a sonda fluorescente de cálcio, Fluo4-NW, utilizando um código pseudocolorido, onde as cores mais “quentes” (amarelo-vermelho) reflectem maiores concentrações de cálcio, cuja intensidade pode ser avaliação através da análise de regiões de interesse (ROI). Como o núcleo destas células ocupa grande parte da sua dimensão, as oscilações do cálcio intracelulares em resposta ao ATP são apenas visíveis numa região citoplasmática restrita junto à membrana celular. O painel (B) representa o efeito do ATP (100 μM) sobre a acumulação intracelular de cálcio nas CEH durante os primeiros 2 minutos, após obtenção de equilíbrio na solução de *Tyrode*. O transiente de cálcio intracelular foi calibrado para a marcação máxima de cálcio produzida pela ionomicina (5 μM , resposta de 100%). A barra preta na parte inferior do gráfico indica o período de exposição ao fármaco. O gráfico representa os dados obtidos para um total de 3 células. As barras verticais representam o erro padrão. O painel (C) mostra a oscilação do cálcio intracelular em resposta à perfusão do ATP (100 μM , primeiros 2 minutos) e da ionomicina (5 μM , primeiros 2 minutos) isoladamente, na mesma experiência (em unidades arbitrárias de fluorescência). A barra preta na parte inferior do gráfico indica o período de exposição ao fármaco. Os gráficos representam os dados obtidos para uma célula individual (exemplo).

3. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Este trabalho teve como objectivo genérico contribuir para o melhor conhecimento da função dos nucleótidos extracelulares como potenciais moduladores da proliferação e diferenciação osteogénica de células mesenquimatosas (CM) e avaliar a possível colaboração das células estaminais hematopoiéticas (CEH) neste processo. Trabalhos anteriores mostraram que a presença de densidades crescentes de CEH favorecia a diferenciação osteogénica de CM (Liao e colaboradores, 2011). Para além do objectivo genérico referido, pretendemos ainda saber o papel dos nucleótidos de adenina, nomeadamente do ATP, nas interações intercelulares entre CM e CEH, no sentido de avaliar novas estratégias terapêuticas para doenças caracterizadas por alteração da arquitetura e da massa óssea (como a osteoporose e a artrite reumatoide).

Neste estudo foram usados dois grupos de indivíduos, um grupo controlo constituído por mulheres em idade fértil e um grupo de mulheres pós-menopáusicas. Procedeu-se, então, à cultura de CM (osteoprogenitoras) que foram avaliadas quanto a parâmetros de viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) e atividade funcional osteoblástica, nomeadamente atividade da fosfatase alcalina e capacidade de formação de uma matriz extracelular mineralizada. As culturas das CM do grupo de mulheres pós-menopáusicas mostraram reduzida diferenciação osteogénica e capacidade de mineralização (formação de nódulos de osso) comparativamente com as do grupo controlo, embora não se tenham encontrado diferenças significativas na capacidade de proliferação celular entre os dois grupos (cf. Noronha-Matos e colaboradores, 2012). Os mecanismos moleculares que justificam as diferenças encontradas permanecem por esclarecer. Uma das hipóteses avançadas com este estudo é a de que os recetores P2X7 e a alteração dos níveis do seu ligando (ATP) poderão estar implicados nas diferenças na diferenciação osteogénica encontradas entre as mulheres pós-menopáusicas e as mulheres em idade fértil.

Neste estudo verificámos que as CM libertam constitutivamente ATP e que o padrão de libertação depende da idade do indivíduo e da diferenciação das células em cultura. Verificámos que a libertação de ATP pelas CM do grupo de mulheres pós-menopáusicas aumentou com o estadio de diferenciação das células do dia 7 para o dia 21 em cultura, comparativamente com o que foi observado no grupo controlo (figura 2B). Mais ainda, observamos que as células diferenciadas (aos 21 dias em cultura) provenientes das mulheres pós-menopáusicas libertam mais ATP que as das mulheres jovens. Segundo a literatura, os osteoblastos podem libertar ATP através de junções estreitadas ou hemicanais, transportadores de membrana (*ATP binding cassette*, ABC) e exocitose vesicular aquando da estimulação mecânica ou química dessas células

(Orriss e colaboradores, 2010). Para além disso, o ATP pode ser libertado em grandes quantidades após lise ou morte celular (Hoebertz e colaboradores, 2003; Riddle e colaboradores, 2007). Verificamos neste trabalho que esta libertação não era devida à perda de viabilidade celular, visto que a atividade da desidrogenase do lactato (LDH) medida nas mesmas amostras não sofreu alterações significativas. É importante salientar que o ATP, uma vez libertado, se encontra sujeito à atividade de ecto-enzimas (ecto-NTPDases, pirofosfatases, fosfatase alcalina, ecto 5'-nucleotidases) que o hidrolisam em diferentes metabolitos, nomeadamente em ADP, AMP e adenosina. A maior libertação de ATP aos 21 dias por parte das CM de mulheres pós-menopáusicas, comparativamente com o grupo controlo, foi verificada apesar do nosso grupo ter comprovado que a atividade ecto-NTPDásica é superior no primeiro grupo (dados não publicados). O facto de haver estas diferenças entre os dois grupos carece ainda de explicação, mas poderá ser uma consequência da diminuída diferenciação osteogénica em indivíduos mais velhos, ou então resultar de um qualquer mecanismo compensatório ainda não esclarecido. Existem também dados na literatura mostrando que as células indiferenciadas (Riddle e colaboradores, 2007), assim como os osteoblastos diferenciados (Orriss e colaboradores, 2009; Brandao-Burch e colaboradores, 2012), libertam ATP em situação de hipóxia (Orriss e colaboradores, 2009) ou após estimulação mecânica (Brandao-Burch e colaboradores, 2012). Diversos autores têm sugerido que o recetor P2X7 tem um papel importante na regulação da diferenciação osteogénica e que o próprio recetor pode ser uma via para libertação de ATP. A ativação prolongada deste recetor leva à formação de homodímeros e, conseqüentemente, à formação de poros membranares não seletivos permeáveis à passagem de moléculas com tamanho até 900 Daltons. Este mecanismo conduz ao aumento dos níveis de cálcio intracelular, à ativação de fosfolipases, à produção de prostaglandinas e ao aumento da plasticidade membranares (formação de bolhas), podendo resultar no aumento da diferenciação osteogénica de CM (Grol e colaboradores, 2009; Panupinthu e colaboradores, 2007; Noronha-Matos e colaboradores, dados não publicados). De facto, este recetor tem sido apontado como potencial alvo terapêutico em doenças inflamatórias e do foro osteoarticular. Estudos recentes mostraram que diferentes polimorfismos no gene que codifica para o recetor P2X7 estão associados a uma reduzida densidade óssea e conseqüente aumento do risco de fractura em mulheres pós-menopáusicas (Ohlendorff e colaboradores, 2007). Ratinhos *Knock out* para este gene apresentam reduzida densidade de osso cortical, reforçando a importância deste recetor na remodelação óssea (Ke e colaboradores, 2003).

O ATP atua através da ativação de recetores P2, incluindo os recetores P2X7. A ativação deste recetor favorece a entrada de catiões, como o cálcio. Neste estudo verificamos que nas CM

do grupo de mulheres pós-menopáusicas, o ATP promove a acumulação intracelular de cálcio embora essa acumulação diminua nas células mais diferenciadas (dia 7 > 21 de cultura) (figura 3B). Estas observações correlacionam-se com a diminuição da imunorreatividade para o recetor P2X7 (figura 3A). Por outro lado, verificamos que a expressão do recetor P2X7 e sua atividade, avaliada pela medição das oscilações dos níveis intracelulares de cálcio, crescem em função do grau de diferenciação osteoblástica das CM das mulheres jovens. Trabalhos paralelos do grupo mostraram que o BzATP, um análogo mais estável do ATP com atividade preferencial sobre recetores P2X7, causou o aumento da diferenciação osteogénica e da mineralização através de um mecanismo dependente da ativação da Rho-Kinase. Como seria de esperar, a mineralização (formação de nódulos de osso) das culturas das mulheres mais jovens foi significativamente mais exuberante que as do grupo de mulheres pós-menopáusicas. Estes resultados sugerem que a redução da expressão e da atividade dos recetores P2X7 nas mulheres pós-menopáusicas pode estar na génese da diminuição da diferenciação osteogénica e da mineralização verificada nas CM deste grupo etário, que poderá ser explorado clinicamente. Considerando que as culturas de CM provenientes das mulheres pós-menopáusicas acumulam mais ATP que as do grupo controlo e que esta situação se verifica apesar do catabolismo extracelular do ATP, por via das ecto-NTPDases, ser mais rápido nas mulheres pós-menopáusicas do que mulheres jovens (Noronha-Matos e colaboradores, dados não publicados), é possível que os valores de ATP apresentados tenham sido avaliados por defeito. Existe, assim, um grande potencial para o desenvolvimento farmacológico de agentes que modulem a atividade do recetor P2X7 no tecido ósseo, para atuarem como agentes anti-reabsortivos e/ou promotores do ganho da massa óssea em substituição dos compostos atualmente usados, como o caso dos bifosfonatos (Dixon e colaboradores, 2000).

Atualmente aceita-se que os osteoblastos desempenham um papel central na regulação das CEH. No entanto, o papel das CEH na diferenciação osteogénica das CM ainda é pouco claro. Diversos estudos apontam para uma proximidade entre estas células no chamado nicho(s) celular(es) na MO (para uma revisão ver Taichman, 2005). O conhecimento aprofundado poderá explicar porque é que muitas alterações na hematopoiese são acompanhadas de alterações significativas na arquitetura óssea. Estudos recentes demonstraram que o transplante de medula óssea tem um potencial terapêutico em crianças com osteogénese imperfeita grave, sugerindo que as CM podem funcionar em locais esqueléticos e diferenciarem-se em osteoblastos funcionais (Horwitz e colaboradores, 2002). O transplante de CEH em indivíduos com talassémia major (doença que condiciona osteoporose e osteopenia em muitos desses indivíduos) resultou na

melhoria da densidade mineral óssea (Leung e colaboradores, 2005). Na osteoporose, a perda de massa óssea e a alteração da arquitetura, é acompanhada de aumento do risco de fratura. Para explorar a possibilidade de esta patologia ser, em parte, consequência de defeito/alteração na função das CEH, as CEH de um indivíduo idoso foram isoladas com sucesso e avaliadas quanto à reatividade ao ATP. É importante salientar que neste trabalho foi possível otimizar a separação destas células multipotentes de MO humana. A dificuldade surge do facto destas células serem apenas um dos tipos celulares encontrado na MO e destas serem pouco abundantes. Por isso mesmo, foi necessário prolongar o tempo de cultura até 3 semanas, de forma a obter um número significativo de células para a realização dos ensaios. Da literatura, sabemos que CEH da MO humana mantêm o seu fenótipo indiferenciado durante este período (Delalat e colaboradores, 2009). Utilizando a separação imunomagnética, recorrendo a um anticorpo anti-CD34, conseguimos selecionar uma população de células positivas aos marcadores de superfície CD14, CD34 e CD45, confirmando tratarem-se de CEH.

Com efeito, estudos realizados em animais sugerem que as CEH intervêm na regulação do microambiente da medula óssea, na modulação e na função das CM, contribuindo para a diferenciação osteogénica possivelmente através de uma interação direta, mas desconhece-se ainda o mecanismo (Liao e colaboradores, 2011). É plausível que os mediadores desta interação sejam os nucleótidos, visto que as duas populações de células expressam recetores P2, entre os quais o recetor P2X7, e ambas parecem libertar constitutivamente ATP que é o ligando endógeno daquele recetor (Panupinthu e colaboradores, 2007; Riddle e colaboradores, 2007; Casati e colaboradores, 2010). Nas CEH o ATP é armazenado em vesículas e libertado de maneira sensível ao cálcio, atuando de forma parácrina e autócrina pela ligação a recetores purinérgicos (Casati e colaboradores, 2010). Neste estudo mostramos que o ATP aplicado exógenamente induziu um aumento da acumulação intracelular de cálcio. Sabemos da literatura que estas células expressam, entre outros (P2X1, P2X4, P2Y₁, P2Y₂, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃), o recetor P2X7 (Wang e colaboradores, 2004) e que este poderá ser um dos recetores activados por este ligando. São, no entanto, necessários mais estudos para avaliar a veracidade desta hipótese. Sabendo que (1) existe uma proximidade anatómica na MO entre as CEH e as CM, (2) ambos os grupos celulares respondem ao ATP com oscilações de cálcio intracelular, (3) ambos os tipos celulares libertarem constitutivamente ATP e (4) existe uma correlação entre defeitos hematopoiéticos e perda funcional óssea (Jung e colaboradores, 2008), bem como uma melhoria nalgumas patologias com o transplante da medula óssea, a interdependência funcional entre estas células é muito provável. Sabe-se que as CEH podem regular diretamente a expressão de citocinas pelas CM, entre as quais

a interleucina 6, o fator inibitório de leucemia, o fator de crescimento do hepatócito e a proteína inflamatória de macrófago 1α , possivelmente para promover a formação de um microambiente apropriado para que as CEH possam aderir e proliferar (Taichman e colaboradores, 2000; Yamada e colaboradores, 1995). Para além disso, vários autores mostraram que as CM podem expressar o fator de adesão VCAM-1, que por sua vez se pode associar a integrinas VLA-4 ($\alpha 4\beta 1$), permitindo assim um contacto directo entre estas células (para uma revisão, ver Taichman, 2005).

Estudos adicionais serão necessários para determinar se alterações na atividade e/ou funcionalidade das CEH podem de facto estar na génese de algumas patologias, nomeadamente da osteoporose e, se a estimulação destas células se acompanha de aumento da diferenciação osteogénica de células mesenquimatosas e da densidade mineral óssea, tornando-se potenciais alvos terapêutico.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

Nos humanos, a densidade mineral óssea diminuiu com a idade após se atingir um plateau no adulto jovem (Ritzel e colaboradores, 1997). O mecanismo molecular responsável permanece por esclarecer. Neste trabalho, exploraram-se as alterações da expressão do recetor P2X7 e dos níveis endógenos do seu ligando (ATP) no controlo da diferenciação osteogénica de CM provenientes de mulheres pós-menopáusicas comparativamente com as de um grupo controlo (mulheres jovens em idade fértil). Ensaios anteriores mostraram que a metabolização enzimática do ATP pelas NTPDases está exacerbada nas mulheres pós-menopáusicas. Apesar disso, este estudo demonstrou que as CM das mulheres pós-menopáusicas libertam constitutivamente maior quantidade de ATP que as das mulheres jovens. Deste modo, só a expressão diminuída dos recetores P2X7 (ou de outros recetores sensíveis ao ATP), poderá explicar as diferenças na atividade destas células (avaliada pelas oscilações dos níveis intracelulares de cálcio) e na mineralização das culturas encontradas entre os dois grupos etários testados. Neste contexto, propomos que o recetor P2X7 possa ser eleito com alvo terapêutico para o tratamento das doenças em que existe comprometimento da densidade óssea (e.g. osteoporose, artrite reumatoide).

Por outro lado, existem suspeitas sobre o envolvimento e potencial interdependência funcional entre as CEH e as CM mediados por mensageiros solúveis libertados constitutivamente dessas células, como o ATP. Neste trabalho, mostrou-se que as CEH em cultura reagem ao ATP através da acumulação transitória de cálcio intracelular. Os resultados apresentados, ainda que preliminares, permitiram criar as condições experimentais para, num futuro próximo, se realizarem co-culturas entre CEH e CM para testar a sua interação *in vitro*. Esperamos, então, avaliar o papel do ATP, por intermédio do recetor P2X7, como intermediário na interação funcional entre estas células.

Esperamos que este trabalho de investigação básico tenha contribuído para uma melhor compreensão do funcionamento das células multipotentes da MO e que possa ser usado, de futuro, no melhoramento da mineralização ou formação óssea em doenças como a osteoporose e a artrite reumatóide.

GLOSSÁRIO

ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÓNIMOS

α -MEM, α -*Mimimal essential medium*

CEH, Células estaminais hematopoiéticas.

CHP, Centro Hospitalar do Porto.

CHVNG/E, Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho.

CM, Células mesenquimatosas.

DC, Departamento de Cirurgia.

DEFI, Departamento de Ensino Formação e Investigação.

DIFF, Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia.

DIIC, Disciplina de Iniciação à Investigação Clínica.

FBS, Soro fetal bovino

ICBAS, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar.

JIIC, Jornadas de Iniciação à Investigação Clínica.

LC, Laboratório de Citometria

LFNB, Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia.

MIM, Mestrado Integrado em Medicina.

MO, Medula óssea.

PBS, Tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*).

SHC, Serviço de Hematologia Clínica

SOT, Serviço de Ortopedia e Traumatologia.

UP, Universidade do Porto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, Tassinari MS, Stein GS, Lian JB. 1990. Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *Journal of Cellular Physiology* 143:213-221.
- Batista PSP. 2009. Diferenciação osteoblástica de células mesenquimatosas do tecido adiposo de rato na presença de purmorfamina. Porto: *FMUC – UC*.
- Bellows G, Aubin E, Heersche M. 1991. Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro: the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Journal of Bone and Mineral Research* 14:27-40.
- Brandao-Burch A, Key ML, Patel JJ, Arnett TR, Orriss IR. 2012. The P2X7 receptor is an important regulator of extracellular ATP levels. *Frontiers in endocrinology* 3:41.
- Casati A, Frascoli M, Traggiai E, Proietti M, Schenk U, Grassi F. 2010. Cell-autonomous regulation of hematopoietic stem cell cycling activity by ATP. *Cell Death and Differentiation* 18:396-404.
- Circular informativa DGS. 2008. Orientação técnica para a utilização da absorciometria radiológica de dupla energia. *Direção Geral da Saúde*, nº: 12/DSCS/DPCD/DSQC.
- Cheng SL, Yang JW, Riffins L. 1994. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*. *Endocrinology* 134:277-286.
- Chung CH, Golub EE, Forbes E, Tokuoka T, Shapiro IM. 1992. Mechanism of action of β -glycerophosphate on bone cell mineralization. *Calcified Tissue International* 51:305-311.
- Costa MA, Barbosa A, Neto E, Sá-e-Sousa A, Freitas R, Neves JM, Magalhães-Cardoso T, Ferreirinha F, Correia-de-Sá P. 2011. On the role of subtype selective adenosine receptor agonists during proliferation and osteogenic differentiation of human primary bone marrow stromal cells. *Journal of Cellular Physiology* 226:1353-66.
- Delalat B, Pourfathollah A, Soleiman M, Mozdarani H, Ghaemi SR, Kaviani S. 2009. Isolation and *ex vivo* expansion of human umbilical cord blood-derived CD34⁺ stem cells and their cotransplantation with or without mesenchymal stem cells. *American Journal of Hematology* 14:125-132.
- Dixon SJ, Sims SM. 2000. P2 purinergic receptors on osteoblasts and osteoclasts: potential targets for drug development. *Drug Development Research* 49:187-200.
- Freshney RI. 1994. Biology of the cultured cell. Em: *Culture of animal cells: a manual of basic technique* 3ª Edição, Wiley-Liss 9-16.
- Gotoh Y, Hiraiwa K, Naygayama M. 1990. In vitro mineralization of osteoblastic cells derived from human bone. *Journal of Bone and Mineral Research* 8:239-250.
- Grol MW, Panupinthu N, Korcok J, Sims SM, Dixon SJ. 2009. Expression, signalling, and function of P2X7 receptors in bone. *Purinergic Signalling* 5:205-221.
- Hoebertz A, Arnett T, Burnstock G. 2003. Regulation of bone resorption and formation by purines and pyrimidines. *Trends in Pharmacological Sciences* 24:290-297.
- Horwitz EM, Gordon PL, Koo WK. 2002. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:8932– 8937.
- Isern J, Méndez-Ferrer S. 2011. Stem cell interactions in a bone marrow niche. *Current Osteoporosis Reports* 9:210-218.
- Jung Y, Song J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Z. 2008. Hematopoietic stem cells regulate mesenchymal stromal cell induction into osteoblasts therapy participating in the formation of the stem cell niche. *Stem Cells* 26:2042-2051.

- Ke HZ, Qi H, Weidema AF, Zhang Q, Panupinthu N, Crawford DT, Grasser WA, Paralkar VM, Li M, Audoly LP, Gabel CA, Jee WS, Dixon SJ, Sims SM, Thompson DD. 2003. Deletion of the P2X7 nucleotide receptor reveals its regulatory roles in bone formation and resorption. *Molecular Endocrinology* 17:1356-1367.
- Leung F, Hung W, Lam K. 2005. Bone mineral density in children with thalassaemia major: determining factors and effects of bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplantation* 36:331-336.
- Liao J, Hammerick KE, Challen GA, Goodell MA, Kasper FK, Mikos AG. 2011. Investigating the role of hematopoietic stem and progenitor cells in regulating the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of Orthopaedic Research* 29:1544-1553.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193:265-275.
- Nakamura E, Uezono Y, Narusawa K, Shibuya I, Oishi Y, Tanaka M, Yanagihara N, Nakamura T, Izumi F. 2000. ATP activates DNA synthesis by acting on P2X receptors in human osteoblast-like MG-63 cells. *American Journal of Cellular Physiology* 279:C510-519.
- Noronha-Matos JB, Costa MA, Magalhães-Cardoso MT, Ferreirinha F, Pelletier J, Freitas R, Neves JM, Sévigny J, Correia-de-Sá P. 2012. Role of ecto-NTPDases on UDP-sensitive P2Y(6) receptor activation during osteogenic differentiation of primary bone marrow stromal cells from postmenopausal women. *Journal of Cellular Physiology* 227:2694-2709.
- Ohlendorff SD, Tofteng CL, Jensen JE, Petersen S, Civitelli R, Fenger M, Abrahamsen B, Hermann AP, Eiken P, Jorgensen NR. 2007. Single nucleotide polymorphisms in the P2X7 gene are associated to fracture risk and to effect of estrogen treatment. *Pharmacogenetics and Genomics* 17:555-567.
- Oliveira CM. 2007. Estudo dos genes expressos na osteogênese. Ribeirão Preto: *FMRP – USP*.
- Orriss IR, Knight G, Utting J, Taylor S, Burnstock G, Arnett T. 2009. Hypoxia Stimulates Vesicular ATP Release From Rat Osteoblasts. *Journal of Cellular Physiology* 220:155-162.
- Orriss IR, Burnstock G, Arnett T. 2010. Purinergic signalling and bone remodeling. *Current Opinion in Pharmacology* 10:1-9.
- Orris IR, Key M, Brandao-Burch A, Patel J, Burnstock G, Arnett T. 2012. The regulation of osteoblast function and bone mineralization by extracellular nucleotides: The role of p2x receptors. *Bone* 51:389-400.
- Panupinthu N, Zhao L, Possmayer F, Ke H, Sims S, Dixon S. 2007. P2X7 nucleotide receptors mediate blebbing in osteoblasts through a pathway involving lysophosphatidic acid. *The Journal of Biological Chemistry* 282:3403-3412.
- Riddle RC, Taylor AF, Rogers JR, Donahue HJ. 2007. ATP release mediates fluid flow-induced proliferation of human bone marrow stromal cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 22:589-600.
- Ritzel H, Amling M, Po M, Hahn M, Delling G. 1997. The thickness of human vertebral cortical bone and its changes in aging and osteoporosis: A histomorphometric analysis of the complete spinal column from thirty-seven autopsy specimens. *Journal of Bone and Mineral Research* 12:89-95.
- Romanello M, Pani B, Bicego M, D'Andrea P. 2001. Mechanically induced ATP release from human osteoblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289:1275-1281.
- Romanello M, Codognotto A, Bicego M, Pines A, Tell G, D'Andrea P. 2005. Autocrine/paracrine stimulation of purinergic receptors in osteoblasts: contribution of vesicular ATP release. *Biochemistry and Biophysical Research Communications* 331:1429-1438.
- Schmidt R, Kulbe KD. 1993. Long-term cultivation of human osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research* 20:211-221.
- Széliça M. 2007. Avaliação da qualidade de vida em idosos com osteoporose. Rio de Janeiro: *Universidade Veiga de Almeida*.

- Taichman RS, Reilly MJ, Matthews LS. 2000. Human osteoblast-like cells and osteosarcoma cell lines synthesize MIP-1 in response to IL-1 and TNF stimulation in vitro. *British Journal of Haematology* 108:275-283.
- Taichman RS. 2005. Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche. *Blood* 105:2631–2639.
- Tavares V, Canhão H, Gomes J, Simões E, Romeu J, Coelho P, Santos R, Malcata A, Araújo D, Vaz C, Branco J. 2007. Recomendações para o diagnóstico e terapêutica da osteoporose. *Acta Reumatologia Portuguesa* 32:49-59.
- Wang L, Jacobsen SEW, Bengtsson A, Erlinge D. 2004. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. *BMC Immunology* 3:5-16.
- Weinzierl K, Hemprich A, Frerich B. 2006. Bone engineering with adipose tissue derived stromal cells. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 34(8):466-471.
- WHO. 2004. Scientific group on the assessment of osteoporosis at primary health care level. Brussels, *World Health Organization*.
- Wong M, Rao LG, Ly H. 1990. Long-term effects of physiologic concentrations of dexamethasone on human bone derived cells. *Journal of Bone and Mineral Research* 5:803-813.
- Yamada M, Matsuzaka T, Uetani M, Hayashi, Tsuji Y, Nakamura T.1995. Normal age-related conversion of bone marrow in the mandible: MR imaging findings. *American Journal of Roentgenology* 165:1223–1228.

LISTA DE ANEXOS

- Folha de rosto de estudo de investigação
- Pedidos de autorização (Presidente do Conselho de Administração do CHP, Presidente da Comissão de Ética do CHP, Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP).
- Termos de responsabilidade (Aluno, Orientador, Regente da DIIC)
- Termos de autorização local (Departamento de Medicina; Serviço de Hematologia Clínica)

Lista de documentos para

TRABALHOS ACADÉMICOS DE INVESTIGAÇÃO (que conferem grau)

	Data de entrega (ou NA, não aplicável)	Secretariado (Assinatura)
Documentos comprovativos		
Inscrição em Licenciatura, Mestrado ou Doutoramento	NA	
Cartas do Aluno, a solicitar autorização institucional		
Presidente do Conselho de Administração	X	
Presidente da CES	X	
Diretor do DEFI	X	
Termos de responsabilidade de Alunos e Orientadores		
Aluno	X	
Orientador do Projeto	X	
Supervisor do Projeto, Responsável pela DIIC	X	
Termos de autorização local (no CHP)		
Responsáveis por Unidades / Gabinetes / Setores	X	
Diretores de Serviço	X	
Diretores / Conselhos de Gestão de Departamentos	X	
Proposta		
Folha de Rosto do Estudo de Investigação	X	
Proposta de Trabalho Académico de Investigação	X	
Anexos		
Curriculum Vitae do Aluno	NA	
Termo de Consentimento Informado	NA	
Folheto com informação para dar aos Participantes	NA	
Carta a solicitar dispensa Consentimento Informado	NA	
Inquéritos / questionários ou guiões de entrevistas	NA	
Formulário para recolha de dados clínicos	NA	
Outros documentos	NA	

SECRETARIADO: Data de conclusão da entrega de documentação

Data

___/___/___

Assinatura

FOLHA DE ROSTO DO ESTUDO DE INVESTIGAÇÃO

TÍTULO

PAPEL DOS RECETORES P2X7 NA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÉNICA DAS CÉLULAS MESENQUIMATOSAS DO ESTROMA DA MEDULA ÓSSEA - ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE MULHERES EM IDADE FÉRTIL E PÓS-MENOPÁUSICAS COM OSTEOPOROSE

CLASSIFICAÇÃO

Trabalho Académico de Investigação X (Mestrado Integrado em Medicina)

Projeto de Investigação X

VERSÃO

Novo X

CALENDARIZAÇÃO

Data de início: 09/2011 (execução: 08/2012)

Data de conclusão: 06/2013 (execução: 03/2013) Prazo a cumprir: 06/2012

ALUNOS E ORIENTADORES

Aluno

Elsa Meireles, aluna do 5º ano do MIM de ICBAS/UP; e-mail: elsamc_meireles@hotmail.com ; Telemóvel: 916598381.

Orientador do projeto

Paulo Correia de Sá, médico, Professor Catedrático do ICBAS/UP, Diretor do LFNB e do DIFF do ICBAS/UP. e-mail: farmacol@icbas.up.pt. Tel: 351 22 0428 212

Coorientador do projeto

Bernardo Matos, bioquímico, mestre investigador do LFNB e do DIFF do ICBAS/UP. e-mail: bernardonm@gmail.com ; Telemóvel: 939459570.

Supervisor do projeto / Responsável pela DIIC

Margarida Lima, médica, especialista em Imunohemoterapia, SHC do HSA/CHP; Professora Auxiliar Convidada do ICBAS/UP, responsável pela DIIC. Telemóvel: 966327115; e-mail: director.defi@hgsa.min-saude.pt; mmc.lima@clix.pt.

OUTROS INVESTIGADORES

Investigadores

Adelina Costa, ICBAS/UP; **Bernardo Matos**, ICBAS/UP; **Fátima Ferreirinha**, ICBAS/UP; **Paulo Correia de Sá**, ICBAS/UP; **Marta Gonçalves**, HSA/CHP; **Margarida Lima**, HSA/CHP; **José Marinhos**, CHVNG/E; **Rui Rocha**, CHVNG/E.

PROMOTOR O próprio X

INSTITUIÇÕES E SERVIÇOS

Unidades, Departamentos e Serviço do CHP

Departamento de Medicina (DM), Serviço de Hematologia Clínica (SHC), Laboratório de Citometria (LC).

Outras Instituições intervenientes

Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto (ICBAS/UP), Departamento de Imuno-Fisiologia e Farmacologia (DIFF), Laboratório de Farmacologia e Neurobiologia (DFNB).

Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia/Espinho (CHVNG/E), Departamento de Cirurgia (DC), Serviço de Ortopedia e Traumatologia (SOT).

CARATERÍSTICAS DO ESTUDO

Alvo do estudo		Países / Instituições envolvidos	
Humanos	X	Nacional	X
		Institucional	X
Natureza do estudo		Caraterísticas do estudo (desenho)	
Laboratorial	X	Observacional	X
		Analítico	X
		Transversal	X

Participantes

Existência de grupo controlo: Sim X

Seleção dos participantes: Não aleatório (por conveniência)

Outros aspetos relevantes para a apreciação do estudo:

Participação de grupos vulneráveis	Não X
Convocação de doentes / participantes	Não X
Consentimento informado	Sim X (CHVNG/E)
Inquéritos / questionários	Não X
Entrevistas	Não X
Colheita de produtos biológicos	Sim X
Armazenamento de produtos biológicos	Não X
Criação de bancos de produtos biológicos	Não X
Realização de exames / análises	Não X
Realização de estudos genéticos	Não X
Recolha de dados	Não X
Criação de bases de dados	Não X
Saída para outras instituições	Sim X (CHVNG/E -> ICBAS/UP)

ORÇAMENTO E FINANCIAMENTO

Orçamento: 7.100,00 euros

Contrato financeiro em anexo: Não X

Financiamento:

Interno (CHP) 0,00 euros Externo 7.100,00 euros

Entidades financiadoras: ICBAS / DIIC

INDICADORES

Apresentação dos resultados nas Jornadas de Iniciação à Investigação; Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina

Data:

Assinatura do proponente (Aluno):

PEDIDOS DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

Título do trabalho: **“Papel dos recetores P2X7 na diferenciação osteogénica das células mesenquimatosas do estroma da medula óssea - análise comparativa entre mulheres em idade fértil e pós-menopáusicas com osteoporose”**

Aluna: Elsa Meireles.

PRESIDENTE DO CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO DO CHP

Exmo. Senhor Presidente do Conselho de Administração do CHP

Elsa Meireles, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

__/__/____

PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA PARA A SAÚDE DO CHP

Exma. Senhora Presidente da Comissão de Ética para a Saúde do CHP

Elsa Meireles, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados. Para os devidos efeitos informa que os participantes são doentes do Centro Hospitalar de Vila Nova de Gaia Espinho e que o presente trabalho se insere em projeto de investigação mais vasto que foi previamente aprovado pela Comissão de Ética desse Hospital.

Data

Assinatura

__/__/____

DIRETORA DO DEPARTAMENTO DE ENSINO, FORMAÇÃO E INVESTIGAÇÃO DO CHP

Exma. Senhora Diretora do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP

Elsa Meireles, na qualidade de Aluna, vem por este meio, solicitar a Vossa Exa. autorização para realizar no Centro Hospitalar do Porto o Estudo de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Data

Assinatura

__/__/____

TERMOS DE RESPONSABILIDADE

Título do trabalho: **“Papel dos recetores P2X7 na diferenciação osteogénica das células mesenquimatosas do estroma da medula óssea - análise comparativa entre mulheres em idade fértil e pós-menopáusicas com osteoporose”**

Aluna: Elsa Meireles.

ALUNO

Na qualidade de Aluna, comprometo-me a executar o Trabalho Académico de Investigação acima mencionado, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados, respeitando os princípios éticos e deontológicos e as normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Elsa Meireles	___/___/___	_____

ORIENTADOR DO PROJETO

Na qualidade de Orientador, solicito autorização do Conselho de Administração para que a Aluna acima referido possa desenvolver no CHP o seu Trabalho de Investigação. Informo que me comprometo a prestar a orientação necessária para uma boa execução do mesmo e a acompanhar a Aluna nas diferentes fases da sua realização, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Paulo Correia de Sá	___/___/___	_____
Instituição ICBAS/UP	Departamento DIFF	Serviço Farmacologia e Neurobiologia

SUPERVISOR DO PROJETO / RESPONSÁVEL PELA DIIC

Na qualidade de Docente Responsável pela DIIC / Supervisor do Aluno no CHP, comprometo-me a prestar a orientação necessária para uma boa execução do Trabalho de Investigação, de acordo com o programa de trabalhos e meios apresentados. Mais declaro que acompanharei a Aluna, responsabilizando-me por supervisionar a execução do trabalho no CHP, bem como por zelar pelo respeito dos princípios éticos e deontológicos e pelo cumprimento das normas internas da instituição.

Nome	Data	Assinatura
Margarida Lima Departamento: DEFI	___/___/___	_____

TERMOS DE AUTORIZAÇÃO LOCAL

Título do trabalho: **“Papel dos recetores P2X7 na diferenciação osteogénica das células mesenquimatosas do estroma da medula óssea - análise comparativa entre mulheres em idade fértil e pós-menopáusicas com osteoporose”**

Aluna: Elsa Meireles.

RESPONSÁVEIS POR UNIDADES E SETORES

Na qualidade de Responsável pelo Laboratório, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Laboratório	Nome do Responsável	Data	Assinatura
Citometria	Margarida Lima	___/___/___	_____

DIRETORES DE SERVIÇO

Na qualidade de Diretor de Serviço, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Serviço	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Hematologia Clínica	Jorge Coutinho	___/___/___	_____

DIRETORES / CONSELHOS DE GESTÃO DE DEPARTAMENTO

Na qualidade de Diretor do Departamento, declaro que autorizo a execução do Estudo de Investigação acima mencionado e comprometo-me a prestar as condições necessárias para a boa execução do mesmo, de acordo com o programa de trabalhos e os meios apresentados.

Departamento	Nome do Diretor	Data	Assinatura
Medicina	José Lopes Gomes	___/___/___	_____