



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



SÔNIA ANDRADE SILVEIRA VAZ
Cirurgiã Dentista

**ESTUDO DO EFEITO ANABÓLICO DO PARATORMÔNIO HUMANO
(1-34) EM CULTURA DE OSTEÓBLASTOS INDUZIDOS À
APOPTOSE**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Histologia e Embriologia.

PIRACICABA
2006



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



SÔNIA ANDRADE SILVEIRA VAZ
Cirurgiã Dentista

**ESTUDO DO EFEITO ANABÓLICO DO PARATORMÔNIO HUMANO
(1-34) EM CULTURA DE OSTEÓBLASTOS INDUZIDOS À
APOPTOSE**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Doutor em Biologia Buco-Dental, área de concentração em Histologia e Embriologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvana Pereira Barros

Co-Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior

**Banca Examinadora: Prof^a. Dr^a. Darcy de Oliveira Tosello
Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior
Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Prof. Dr. Pedro Duarte Novaes
Prof. Dr. Rui Barbosa de Brito Júnior**

**PIRACICABA
2006**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

V477e	<p>Vaz, Sônia Andrade Silveira. Estudo do efeito anabólico do paratormônio humano (1-34) em cultura de osteoblastos induzidos à apoptose. / Sônia Andrade Silveira Vaz. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2006.</p> <p>Orientadores: Silvana Pereira Barros, Décio dos Santos Pinto Júnior Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Citometria de fluxo. 2. Morte celular. I. Barros, Silvana Pereira. II. Pinto Júnior, Décio dos Santos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Study of anabolic effect of human parathyroid hormone (1-34) in culture of osteoblasts induced to apoptosis

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Flow cytometry. 2. Cell death

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Darcy de Oliveira Tosello, Décio dos Santos Pinto Júnior, Fábio Daumas

Nunes, Pedro Duarte Novaes, Rui Barbosa de Brito Júnior

Data da Defesa: 22-02-2006

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 22 de Fevereiro de 2006, considerou a candidata SONIA ANDRADE SILVEIRA VAZ aprovada.

PROF. DR. DÉCIO DOS SANTOS PINTO JÚNIOR

PROF. DR. RUI BARBOSA DE BRITO JÚNIOR

PROF. DR. FÁBIO DAUMAS NUNES

PROF.ª DR.ª DARCY DE OLIVEIRA TOSELLO

PROF. DR. PEDRO DUARTE NOVAES

200802363

DEDICATÓRIA

A **DEUS**, Pai de infinita bondade, que se faz sempre presente, encorajando-nos a seguir em frente, superando desilusões e decepções profundas e nos fazendo acreditar que somos capazes de sermos felizes novamente. Pai querido, obrigada por ter me tirado do fundo do poço e por me permitir vislumbrar uma nova vida repleta de oportunidades. Renasci... graças ao teu amor! Obrigada!

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **MARIA RENIL ANDRADE SILVEIRA** e **EDEVALDE AMORIM SILVEIRA (Didi)**, que sempre e incondicionalmente estão ao meu lado, mas que no momento mais difícil me acolheram e de todas as formas me ampararam com seu imenso amor. A vocês dois, meu profundo respeito e admiração, pois muitos fazem uma tese, mas raros são aqueles que constituem uma família de verdade, com princípios e valores reais e, principalmente, muito amor e respeito. Obrigada por eu fazer parte desta história!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. José Tadeu Jorge.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP), dirigida pelo Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho, pela oportunidade de desenvolver este trabalho junto a esta instituição.

Ao Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, Coordenador Geral dos Cursos de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP.

À Prof^a. Dr^a. Silvana Pereira Barros pela oportunidade, pela orientação firme e segura e, principalmente, pela extraordinária compreensão nos momentos mais difíceis da minha vida. Obrigada!

À Prof^a. Dr^a. Altair Antoninha Del Bel Cury, pelo carinho e amizade.

À Prof^a. Dr^a. Cloris Ditzel Faraco, por ter me ensinado os primeiros passos na vida acadêmica.

À Prof^a. Dr^a. Darcy Tosello por seu jeito especial de ser: transparente, humana, amiga e muito bem humorada.

Ao Prof. Dr. Sérgio Peres Line, admirável estrela de primeira grandeza, pelo respeito, carinho e valorosa contribuição à minha formação.

Ao Prof. Dr. José Merzel e ao Prof. Dr. Fausto Bérzin pela atenção dispensada sempre que necessário.

Ao Prof. Pedro Duarte Novaes, Chefe do Departamento de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, pela sua presença sempre serena e tranqüila.

Ao Prof. Dr. Paulo Caria, coordenador do Programa de Pós-graduação em Biologia Buco-Dental da FOP, pela compreensão, amizade e seriedade.

À Eliene Romani e Maria Aparecida Santiago Varela pela inesquecível acolhida em Piracicaba, repleta de muito carinho, solidariedade e muitas risadas.

Aos colegas da Pós-graduação, Rui Barbosa Júnior, Maria Isabela, Alexandre, Marcelo, Ana Paula, Regina, Ana Cristina, Dani, Silvana Pasetto, Luciana, Valéria e Cris pela alegria de descobrir novos amigos.

Às secretárias da Morfologia, Suzete Regina T. Neder, Eli Cristina Gomes Alves e Joelma pela especial colaboração.

Às secretárias da Pós-graduação, Érica A. Pinho Sinhoreti e Raquel Q. Marcondes, sempre prontas a cooperar.

À equipe da Biblioteca, Marilene Girello, Aparecida Ramos Cassieri, Sueli Ferreira Júlio de Oliveira e Eliseu Berti.

Ao Sérgio Nauffal pela excelência na realização das análises estatísticas.

Ao Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior, o meu muito obrigada por ter me acolhido e me co-orientado, por ter permitido o desenvolvimento deste trabalho e, por ser esta pessoa tão bem-humorada, que transmite tanta alegria.

À Prof^a. Dr^a. Vera Cavalcanti de Araújo e ao Prof. Dr. Ney Soares de Araújo pelo incentivo.

À Elisabeth Ferreira Martinez (Betinha), pequena grande menina, extremamente capaz, cuja dedicação e solidariedade à minha causa foram determinantes para a conclusão deste trabalho. A você Betinha, a minha eterna gratidão.

À Patrícia Cury, que me estendeu a mão em São Paulo, em um dos momentos que mais precisei e que demonstrou ser uma grande e sincera amiga, sempre pronta a ajudar. Obrigada!

Ao colega Felipe Torquato Salles pela paciência, companheirismo e fundamental cooperação no desenvolvimento laboratorial deste trabalho.

À Maria das Graças Valenzuela, por sua inestimável ajuda científica, meu carinho e reconhecimento.

À Patrícia Galdino, técnica responsável pelo Laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP, pela disposição em ajudar sempre e, principalmente, pelo carinho e amizade.

Às professoras da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP, Prof^ª. Dr^ª. Suzana Cantanhede Orsini M. de Souza, Prof^ª. Dr^ª. Marina Helena C. G. de Magalhães, Prof^ª. Dr^ª. Marília Trierveiler Martins, e em especial à Prof^ª. Dr^ª. Andréa Mantesso.

À Karen Nakamura pelos inestimáveis momentos de descontração, recheados de futilidades e gozações.

Aos colegas da FOUSP, Filipe, Katiucha, Márcia, Sérgio e Carol por terem compartilhado desta jornada com companheirismo e afeto.

Às secretárias do Departamento de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo-FOUSP, Zilda, Néia e Nair pela atenção e carinho.

À Vanessa de Moraes Freitas, pela orientação científica.

Ao Prof. Dr. Ruy Cury do Departamento de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo – ICB/USP.

Ao amigo Eduardo Disher Vieira, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR) pela ajuda e incentivo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro no desenvolvimento desta tese de doutorado.

À minha querida Tia Miriam, companheira incondicional de todas as horas.

Aos queridos Tio Francis e Ilda, grandes amigos e incentivadores.

Aos meus amados irmãos, Fábio, Alexandre, Ângela, Marcelinho e Dudu, não apenas por termos crescidos juntos, mas porque somos uma família que se ama, se respeita e se compreende.

Aos meus verdadeiros amigos Guilherme Adolfo, Mônica Albiero, Mônica Bittencourt, Ana Carla Kuhn Calluf e Rodrigo Cicarello.

À Sirley, mulher de fibra e de presença, cuja solidariedade literalmente me salvou.

À Leo, minha fiel escudeira, que cuidou com esmero do meu lar na minha longa ausência.

E, finalmente, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho científico, o meu muito obrigada!!!

**“Os nossos conhecimentos são a
reunião do raciocínio e experiência
de numerosas mentes.”**

Emerson

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxv
LISTA DE QUADRO.....	xxix
LISTA DE TABELAS.....	xxxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxxiii
RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	3
1 INTRODUÇÃO.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
3 PROPOSIÇÃO.....	31
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
5 RESULTADOS.....	53
6 DISCUSSÃO.....	73
7 CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS.....	105

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Apoptose	morte celular programada.
AMPc	adenosina 3'5' monofosfato cíclico
BMPs	do inglês “Bone Morfogenetic Proteins”, traduzido como proteínas morfogenéticas ósseas.
BSA	do inglês “Bovine Serum Albumine”, traduzido como Albumina sérica bovina.
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa.
Confluência celular	quando as células ocupam toda a superfície de cultivo a qual estão aderidas, estando completamente circundadas por outras células.
Co.	do inglês “company”, traduzido como companhia.
CO ₂	dióxido de carbono.
cm ²	centímetros quadrados, unidade de área.
DNA	do inglês “Desoxyribonucleic Acid”, traduzido como Ácido Desoxirribonucléico.
DMSO	di-metil-sulfóxido.
ERK	Sigla indicativa de “extracelular Regulatory Kinases”, traduzida como quinases reguladoras de sinais extracelulares
Fig.	figura.
GH	do inglês “growth hormone”, traduzido como hormônio do crescimento.
µg	micrograma, unidade equivalente a 10 ⁻⁶ g.

H ₂ O _{dd}	água destilada e deionizada.
h PTH (1-33)	paratormônio humano, segmento de aminoácidos do 1 ao 33.
h PTH (1-34)	paratormônio humano, segmento de aminoácidos do 1 ao 34.
h PTH (1-36)	paratormônio humano, segmento de aminoácidos do 1 ao 36.
h PTH (1-38)	paratormônio humano, segmento de aminoácidos do 1 ao 38.
h PTH (1-84)	paratormônio humano, segmento de aminoácidos do 1 ao 84.
IGF-I	insulin-like growth factor I, traduzido como fator de crescimento semelhante a insulina I
IGF-II	insulin-like growth factor II, traduzido como fator de crescimento semelhante a insulina II
IκB-α	proteína inibidora κB do citoplasma
IL-6	interleucina 6
IEGs	genes de resposta inicial ou imediata
kDa	kilo-dalton, unidade de peso molecular, equivalente a 10 ³ daltons (Da).
L	litro, unidade de volume.
mL	mililitros, unidade equivalente a 10 ⁻³ L.
μL	microlitro, unidade equivalente a 10 ⁻⁶ L.
mm	milímetros, unidade equivalente a 10 ⁻³ m.
μm	micrômetro, unidade equivalente a 10 ⁻⁶ m.
nm	nanômetro, unidade equivalente a 10 ⁻⁹ m.
M	Molar, expressa a concentração da solução, considerando a quantidade de soluto (mol) por volume da solução (L) no SI

mM	mili-molar, unidade de massa, equivalente a 10^{-3} molar (M).
μ M	micromolar, unidade equivalente a 10^{-6} molar (M).
min	minutos.
mol/L	expressa a concentração da solução, considerando a quantidade de soluto (mol) por volume da solução (litro), molaridade.
MEM- α	do inglês “Minimum Essential Medium Alpha”, traduzido como meio Mínimo Essencial Alfa.
nM	nanomolar, unidade equivalente a 10^{-9} molar (M).
NF-kB	fator nuclear kB, fator de transcrição que regula a expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatórias e imunológicas e proliferação celular
OH	hidroxila
OPG	Proteína óssea osteoprotegerina
OPGL	Ligante (proteína extracelular) de osteoprotegerina, estimulante da diferenciação dos osteoblastos
OSTEO	linhagem de células osteoblásticas.
PBS A	do inglês “Phosphate Buffer Saline”, traduzido por solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio.
pg/mL	picogramas por mililitros
pH	potencial hidrogênico de uma solução.
PKA	proteína quinase A
hPTH	paratormônio humano
PTH-R	receptor para o PTH
PTHrp	peptídio relacionado ao PTH

®	marca registrada.
rpm	rotações por minuto.
RANK-L	Ligante para o NF-kB, induz a diferenciação de osteoclastos
RANK	Receptor do NF-KB, induz a diferenciação de osteoclastos
SFB	do inglês “Serum Bovine Fetal”, traduzido por soro fetal bovino.
SDS	do inglês “Sodium Dodecyl Sulfate”, traduzido por dodecil sulfato de sódio.
t	tempo.
T	temperatura.
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa, citocina indutora de apoptose, também conhecida como cachectina ou linfotóxina.
TRANCE	membro da família do TNF
TUNEL	do inglês “ T erminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated d UTP N ick E nd L abeling”, método imunocitoquímico de detecção e quantificação de apoptose “in vitro”, por meio da revelação de extremidades 3'-OH das fitas simples e DNA.
U/mL	Unidade por mililitro.
α	alfa

LISTA DE QUADRO

Quadro	A	Quadro que mostra os anticorpos empregados na imunofluorescência, indicando às suas diluições e suas procedências.	39
--------	---	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Valores médios dos experimentos (n=6) frente aos tratamentos versus tempo para a câmara de Neubauer.....	53
Tabela 5.2	Coeficiente de correlação de Pearson para a câmara de Neubauer.....	55
Tabela 5.3	ANOVA fator único comparativo entre os experimentos para a câmara de Neubauer.....	56
Tabela 5.4	Valores médios de contagem celular por tempo de cultivo para a câmara de Neubauer.....	57
Tabela 5.5	ANOVA fator único comparativo entre os tratamentos para a câmara de Neubauer	59
Tabela 5.6	Valores médios dos percentuais de viabilidade celular frente aos tratamentos para o citômetro de fluxo.....	60
Tabela 5.7	Coeficiente de correlação de Pearson para o citômetro de fluxo.....	61
Tabela 5.8	ANOVA fator único comparativo entre os experimentos para o citômetro de fluxo.....	62
Tabela 5.9	Estatística descritiva percentual para o citômetro de fluxo.....	63

Tabela 5.10	Testes probabilísticos F, T e Z.....	64
Tabela 5.11	ANOVA fator único comparativo entre os tratamentos para o citômetro de fluxo.....	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Desenho esquemático das glândulas paratireóides.....	7
Figura 2.2	Desenho esquemático da molécula de paratormônio humano (1-34).....	7
Figura 4.8.1 A	Fotografia do microscópio invertido de fase.....	47
Figura 4.8.1B	Fotografia de capela de fluxo laminar.....	47
Figura 4.8.1 C/D	Fotografias de estufa de cultivo celular.....	47
Figura 4.8.1 E	Fotografia de placa de cultivo celular de 6 poços.....	47
Figura 4.8.1 F	Fotografia de placas de cultivo celular.....	47
Figura 4.8.2 A	Fotografia de câmara de Neubauer.....	51
Figura 4.8.2 B	Fotografia do citômetro de fluxo FACScan.....	51
Figura 5.4 A	Histograma para o grupo TNF- α	67
Figura 5.4 B	Histograma para o grupo hPTH(1-34).....	67
Figura 5.4 C	Histograma para o grupo hPTH (1-34)/TNF- α	67
Figura 5.4 D	Histograma para o grupo Controle.....	67
Figura 5.7 A	Fotomicrografia de célula osteoblástica expressando a proteína colágeno I (pró-colágeno tipo).....	71

Figura 5.7 B	Fotomicrografia de células osteoplásticas expressando a proteína fibronectina.....	71
Figura 5.1	Gráfico de dispersão média da homogeneidade entre os experimentos independentes (n=6).....	54
Figura 5.2	Gráfico da dispersão do ponto médio da proliferação de células osteoblástica.....	55
Figura 5.3	Gráfico da dispersão média , exemplificativa das tendências da proliferação celular.....	58
Figura 5.5	Gráfico da dispersão, demonstrativo da perfeita homogeneidade entre os experimentos (n=9).....	60
Figura 5.6	Gráfico do ponto médio da viabilidade celular.....	63

RESUMO

Muitas pesquisas a respeito do paratormônio (PTH) têm demonstrado que o efeito anabólico (neofornativo) desse peptídeo sobre o tecido ósseo, quando administrado de um modo intermitente, resulta na indução de nódulos de mineralização em cultura de osteoblastos, deposição óssea e aumento da resistência a fraturas em todo o esqueleto. Frente a esses possíveis benefícios, o PTH foi aprovado recentemente pela *US Food & Drug Administration (FDA)* com o nome genérico de *Teriparatide* e com o nome comercial de *Forteo*[®] (*Lilly*) que já está sendo comercializado para o tratamento da osteoporose, mas, no entanto ainda vem suscitando grande interesse na comunidade científica, uma vez que o seu complexo mecanismo de ação não está totalmente esclarecido. Relatos científicos indicam que parte do anabolismo do PTH se deve a diferenciação e proliferação dos osteoblastos, aumentando significativamente o número destas células, e parte a um efeito inibidor da apoptose nos osteoblastos. O presente estudo investigou *in vitro* a capacidade anti-apoptótica do hPTH(1-34) em osteoblastos induzidos à apoptose pelo TNF- α , elegendo como modelo de estudo o cultivo de osteoblastos de calvária de rato. As células foram cultivadas em MEM- α , suplementado com SFB, ácido ascórbico, β -glicerofosfato e gentamicina, e foram divididas em grupos experimentais que receberam tratamentos diferentes. No grupo I, as células foram induzidas à apoptose, recebendo tratamento com o TNF- α ; no grupo II, as células não foram induzidas à apoptose e receberam tratamento intermitente com o hPTH(1-34); no grupo III, as células foram induzidas à apoptose e receberam tratamento com o hPTH(1-34); e no grupo IV, as células não foram induzidas à apoptose e não receberam tratamento com o PTH (controle). Para a detecção da apoptose foram empregados os métodos de exclusão por marcação com o corante azul de Trypan (câmara de Neubauer) e a citometria de fluxo (FACSCalibur). Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística que demonstrou que o tratamento intermitente com o PTH inibiu

a apoptose em torno de 60% nos osteoblastos induzidos pelo TNF- α , aumentando, desta forma, o número de osteoblastos.

Palavras-chave: PTH, Anabolismo ósseo, Apoptose, Citometria de fluxo.

ABSTRACT

It is still not clear why sustained elevation of parathyroid hormone (PTH) stimulates bone resorption, whereas intermittent administration stimulates bone formation. Intermittent PTH administration was recently approved by the United States Food and Drug Administration as the first form of osteoporosis therapy that increases bone mass *de novo*, reverses the bone deficit, providing a proof-of-principle that osteoblast-targeted (anabolic) agents can effectively reduce osteoporotic fractures. Considering indications that attenuation of osteoblast apoptosis by daily injections of PTH in mice should account for the increased number of osteoblasts and, thereby, the increased bone formation produced by this treatment regimen, in the present study we aimed to investigate the anti-apoptotic ability of hPTH (1-34) in cultured osteoblastic cells through induction by TNF- α in association with PTH anabolic treatment using a calvaria-derived osteoblastic cell line. Cells were cultured in MEM- α , supplemented with FBS, ascorbic acid, β -glycerphosphate and gentamicin, and were divided in experimental groups that received different treatments. In group I, cells were induced to apoptosis, receiving treatment with TNF- α ; in group II, cells were not induced to apoptosis and received intermittent treatment with hPTH(1-34); in group III, cells were induced to apoptosis and received intermittent treatment with hPTH(1-34); and in group IV, cells were not induced to apoptosis and didn't receive intermittent treatment with hPTH(1-34) (control). For determination of cell death, two methods were used: staining with Trypan Blue and flow cytometry. The results were statistically analyzed and demonstrated that intermittent treatment with hPTH(1-34) was able to inhibit apoptosis induction by 60%, thereby increasing osteoblast number even in the presence of TNF- α .

Key words: PTH, Bone anabolism, Apoptosis, Flow cytometry.

1. INTRODUÇÃO

O paratormônio humano (hPTH) é um hormônio peptídico que fisiologicamente é sintetizado e secretado de modo contínuo pelas glândulas paratireóides frente a sinais provenientes dos receptores sensíveis ao cálcio (Brown, 1993) que monitoram variações nos níveis do cálcio sanguíneo (Habener *et al.*, 1984). Este polipeptídeo desempenha importantes funções biológicas, estando tradicionalmente descrito na literatura como um agente promotor de catabolismo ósseo (Howard *et al.*, 1981; Rodan & Martim, 1981; MacDonald *et al.*, 1987; Strewler *et al.*, 1987; Mundy, 1991; rev. por Jilka, 1998; Lee & Lorenzo, 1999), sendo o principal regulador da homeostase do cálcio e também o maior mediador endócrino do processo fisiológico de remodelação do tecido ósseo por estimular a atividade osteoclástica (Strewler *et al.*, 1987). Além disso, Selye e colaboradores (1932) demonstraram que quando o PTH era administrado de modo intermitente, diferentemente da forma liberada fisiologicamente, estimulava a formação óssea, caracterizando também uma forma de ação anabólica para o PTH. Este fato vem incitando a comunidade científica a pesquisar sobre o modo de uso não contínuo deste hormônio, visando à manutenção e formação de tecido ósseo.

No entanto, apesar de décadas de discussão o mecanismo de ação anabólica do PTH ainda não está bem esclarecido. Muitos estudos indicam que a ação anabólica do PTH se deve a uma estimulação dos osteoblastos a proliferarem e a se diferenciarem, caracterizando um processo inicial de osteogênese (MacDonald *et al.*, 1986; Dempster *et al.*, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995; Ejersted *et al.*, 1995), enquanto outros relatos relacionam diretamente a ação anabólica do PTH a uma possível manutenção dos osteoblastos pela inibição da sua apoptose (morte celular programada) (Jilka *et al.*, 1999; Hock, 2001; Stanislaus *et al.*, 2000).

Em face a esta controvérsia científica, o objetivo do presente estudo foi utilizar a cultura de células osteoplásticas, a fim de se estabelecer um sistema celular adequado para o estudo do comportamento dos osteoblastos frente aos tratamentos com o PTH e com o TNF- α , potente indutor da apoptose, visando especialmente a observação da atividade anti-apoptótica do PTH.

2. REVISÃO DE LITERATURA

1. PARATORMÔNIO (PTH)

O paratormônio (PTH), hormônio paratireoidiano ou ainda hormônio paratireóideo é um hormônio protéico produzido pelos dois pares de glândulas paratireóides (Fig. 2.1), localizadas posteriormente aos pólos superior e inferior das glândulas tireóides (Brown, 1993). Em humanos, o paratormônio humano (hPTH) codificado por um gene no cromossoma 11 é sintetizado pelas células principais das glândulas paratireóides inicialmente como parte de uma molécula maior, o pré-pró-hPTH que contém 115 resíduos de aminoácidos que posteriormente é clivado no retículo endoplasmático, onde uma seqüência contendo 25 resíduos de aminoácidos é removida do terminal amina da molécula para formar o polipeptídeo de 90 aminoácidos, o pró-hPTH. Em seguida, 6 resíduos adicionais são removidos do terminal amina do pró-hPTH no aparelho de Golgi, e finalmente, o hPTH é liberado como um polipeptídeo linear constituído por 84 resíduos de aminoácidos (hPTH 1-84) (Strewler *et al.*, 1987; Swarthouth *et al.*, 2002) (Fig. 2.2), ligados covalentemente (Genuth, 1998), com um peso molecular de aproximadamente 9,5 kDa. O hormônio (hPTH) se armazena em vesículas de secreção, aptas a liberá-lo por exocitose como o principal produto das células principais (Ganong, 1999) quando ocorre um decréscimo na concentração sérica de cálcio, uma vez que a síntese e liberação do hPTH é dependente dos níveis de cálcio ionizado.

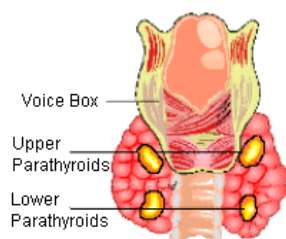


Figura 2.1- Glândulas paratireóides
unomaha.edu/hpa/endocrinehistology.html



Figura 2.2- Molécula do hPTH (1-84)
bioe.eng.utoledo.edu/.../hormone/HOME.html

O hPTH composto por 84 aminoácidos, uma vez lançado na circulação sanguínea apresenta um nível plasmático normal de 10-55 pg/mL e uma vida média inferior a 20 minutos (Genuth, 1998), sendo rapidamente inativado por clivagem no fígado pelas células de Kupffer (Brixen *et al.*, 2004) e também nos rins. Entretanto, a concentração do hPTH no microambiente ósseo é ainda desconhecida.

Dos diversos análogos do hPTH, o fragmento inicial da molécula polipeptídica do paratormônio, correspondente à seqüência dos aminoácidos 1 ao 34, representa a fração amino-terminal que é essencial à atividade biológica do hPTH (Neer *et al.*, 2001), enquanto a porção carboxi-terminal da molécula parece ser inativa. Este fragmento parece ser o mais efetivo no aumento da densidade óssea (Morley *et al.*, 1997). Baseando-se, neste dado, este peptídeo pode apresentar-se biologicamente ativo na sua forma intacta (hPTH 1-84) (nativa), ou por vários fragmentos sintéticos, tais como, hPTH (1-31), (1-34), (1-36), e (1-38) (Dempster *et al.*, 1993; Whitfield & Morley, 1995).

Estudos iniciados na década de 80 descobriram uma nova proteína, produzida por um grande número de tipos celulares, codificada por um gene no cromossoma 12 humano, um fator autócrino que está estruturalmente relacionado ao paratormônio, o PTHrP. Este peptídeo, primeiramente associado a situações de malignidade celular (Stewart *et al.*, 1980; Moseley *et al.*, 1987), também participa no desenvolvimento normal do esqueleto, considerando-se evidências de expressão de RNAm do PTHrP sob condições de normalidade (Karaplis *et al.*, 1994). A produção do PTHrP é mantida em diversos tecidos normais, tais como epitélios, tecidos mesenquimais, glândulas endócrinas e tecido nervoso central (Gracitelli *et al.*, 2002). Apesar da PTHrP ter uma estrutura molecular maior que a do PTH, sendo constituída por 141 resíduos de aminoácidos, ambas apresentam homologia acentuada nas suas extremidades N-terminais, podendo compartilhar o

mesmo receptor , o PTH1R, na cartilagem, nos ossos e nos rins (Horiuchi *et al.*, 1983). Horiuchi e colaboradores (1983) verificaram que o PTH e o PTHrP são agonistas para o receptor do PTH e que o PTHrP é sintetizado pelos osteoblastos em resposta ao PTH. Portanto, os osteoblastos também podem ser regulados pela influência de produção local de PTHrP.

O hPTH desempenha importantes funções biológicas, estando tradicionalmente descrito na literatura como o principal regulador da homeostase do cálcio e também como o maior mediador endócrino do processo fisiológico de remodelação do osso por estimular a atividade osteoclástica (Strewler *et al.*, 1987). A síntese e secreção deste hormônio ocorrem frente a sinais provenientes dos receptores sensíveis ao cálcio (Brown, 1993) que monitoram variações nos níveis do cálcio sanguíneo (Habener *et al.*, 1984). Em circunstâncias de baixas taxas séricas de cálcio, as glândulas paratireóides iniciam uma rápida resposta para elevar estes níveis, agindo diretamente nos rins e no tecido ósseo ou indiretamente no intestino mobilizando os íons cálcio. Além de aumentar o cálcio plasmático e deprimir o fosfato plasmático, o hPTH aumenta a excreção de fosfato na urina. Esta ação fosfatúrica se deve a um decréscimo na reabsorção deste elemento nos túbulos proximais. Se estabelece, desta forma, relações diretas entre a hipercalcemia e o hiperparatireoidismo primário ou hipercalcemia e a secreção de peptídeos relacionados ao hPTH (hPTHrP) por células cancerosas (Suva *et al.*, 1987). A ação catabólica do hPTH no tecido ósseo resulta da degradação deste tecido, culminando na mobilização de sais de cálcio do osso para o plasma (Dempster *et al.*, 1993). Este processo parece ser decorrente de uma alteração funcional e fenotípica dos osteoblastos, transformando-os em células aptas a reabsorção óssea (Partridge *et al.*, 1994; rev. por Teitelbaum, 2000). Nos rins o PTH age pelo aumento da reabsorção de cálcio nos túbulos distais e também aumenta a síntese do metabólito ativo da vitamina D₃, o 1,25-

diidroxicolecalciferol, por meio do aumento da atividade da enzima 1α -hidroxilase (Ganong, 1999).

Inúmeros trabalhos (Howard *et al.*, 1981; Rodan & Martin, 1981; Strewler *et al.*, 1987; Mundy, 1991; rev. por Jilka, 1998; Lee & Lorenzo, 1999) constataram e consagraram a teoria da atividade catabólica do PTH no osso quando baixas concentrações deste hormônio foram administradas ininterruptamente tanto em experimentos “*in vitro*” quanto “*in vivo*”. Logo, quando administrado desta forma, mimetizando o que ocorre no hiperparatireoidismo primário, o PTH provoca perda óssea, inicialmente no osso cortical e também do osso trabecular no decorrer do processo.

O PTH age como um fator sistêmico, fundamental à reabsorção óssea fisiológica e patológica por meio da transmissão de estímulos dos osteoblastos aos osteoclastos, uma vez que o hPTH se liga no tecido ósseo exclusivamente aos osteoblastos por meio de seus receptores específicos (hPTHr) expressos na membrana citoplasmática destas células (Rodan & Martin, 1981), deflagrando a estimulação do ligante do receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANKL) que por sua vez, é reconhecido pelo receptor do ativador do fator nuclear- κ B (RANK) presente na superfície celular dos osteoclastos (Ma *et al.*, 2001; Locklin *et al.*, 2003). O RANKL pertence à família dos ligantes do TNF, também denominado de fator de diferenciação de osteoclastos, TRANCE, OPGL (Osteoprotegerin Ligand) e ODF (Yasuda *et al.*, 1998), e parece ser o responsável pela diferenciação dos precursores dos osteoclastos em osteoclastos maduros por intermédio do receptor RANK, na presença do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (Quinn *et al.*, 1998; Martin & Ngüeen, 1994). Hirotsu e colaboradores (2004) sugerem que os osteoblastos além de ativar os osteoclastos, também promovem a sua formação e sobrevivência. Desta forma, a reabsorção óssea é diretamente

dependente do aumento do número e da manutenção de osteoclastos maduros ativos. Ma e colaboradores em 2001, estudando os efeitos catabólicos do hPTH associam uma possível inibição da expressão do (RANKL) por parte dos osteoblastos, assim como certa inibição de síntese de osteoprotegerina (OPG), um membro da família dos receptores do TNF que inibe o amadurecimento dos osteoclastos (Tsuda *et al.*, 1997; Simonet *et al.*, 1997; Yasuda *et al.*, 1998; Morigana *et al.*, 1998), em presença de hPTH administrado de modo contínuo. Estudos utilizando ratos transgênicos capazes de super-expressar osteoprotegerina desenvolveram osteopetrose devido ao não amadurecimento dos osteoclastos (Bucay *et al.*, 1998). Estudos mais recentes, sugerem que a β -arrestina 2, moléculas citoplasmáticas expressas no citoplasma dos osteoblastos, limitaria a ação anabólica do PTH, minimizando a expressão de RANKL e de osteoprotegerina (OPG), podendo também suspender a sinalização do AMPc, promovendo a osteoclastogênese (Ferrari *et al.*, 2005).

2. AÇÃO ANABÓLICA DO PARATORMÔNIO

Não obstante ter sido identificado há aproximadamente um século, os mecanismos de ação do hPTH, bem como as respostas biológicas a este hormônio ainda não são totalmente compreendidos. Este hormônio desempenha efeitos complexos e distintos no tecido ósseo, de acordo com o seu modo de administração. O hPTH foi durante muito tempo considerado exclusivamente como um agente de catabolismo, promovendo a reabsorção óssea. Entretanto, os achados de Selye (1932), demonstrando que extratos das paratireóides quando administrados intermitentemente estimulam a formação óssea, têm inspirado a comunidade científica a experimentar exaustivamente o PTH humano como um possível agente anabólico do tecido ósseo nos últimos sessenta anos. Contudo, apesar de décadas de investigações, divergências sobre as respostas bioquímicas

e fisiológicas das células-alvo e sobre a ação anabólica direta do hPTH na osteogênese ainda são comuns.

Muitos estudos indicam que a ação anabólica deste hormônio se deve a estimulação dos osteoblastos a proliferar e a se diferenciar, caracterizando um processo inicial de osteogênese (MacDonald *et al.*, 1986; Dempster *et al.*, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995; Ejersted *et al.*, 1995). O aumento do número de osteoblastos parece ser decorrente de uma resposta pós-mitótica dos osteoblastos maduros ao tratamento com o PTH em locais de remodelação óssea (Swarthout *et al.*, 2002), da diferenciação de células osteoprogenitoras da medula óssea, da ativação dos osteoblastos de revestimento (Dobnig & Turner, 1995) ou ainda, do estímulo da proliferação de osteoblastos maduros (Partridge *et al.*, 1985).

Existem também importantes relatos que relacionam a ação anabólica do PTH a uma possível manutenção dos osteoblastos pela inibição da sua apoptose (morte celular programada) (Hock, 1988), uma vez que este fato parece ser o destino da maioria destas células (Jilka *et al.*, 1998), considerando-se que 50 – 70% dos osteoblastos entram em apoptose e apenas a minoria se transforma em osteócitos ou células de revestimento ósseo (Hill *et al.*, 1997).

As mais variadas pesquisas, indicando o hPTH como uma molécula solúvel capaz de sintetizar colágeno (Jilka *et al.*, 1999) e formar um tecido ósseo histologicamente normal e biomecanicamente forte (Whitfield *et al.*, 1999) vêm sendo amplamente preconizadas tanto por estudos clínicos em animais (Hock *et al.*, 1988; Hori *et al.*, 1988; Shen *et al.*, 1999; Kimmel *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 1995; Brommage *et al.*, 1999; Jilka *et al.*, 1999) quanto em humanos (Reeve *et al.*, 1976; Reeve *et al.*, 1980; Slovik *et al.*, 1986; Sone *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997;

Dempster *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 1999; Dempster *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2001) estabelecendo-se, deste modo, uma atividade anabólica para o hPTH no metabolismo do esqueleto (Dempster *et al.*, 1993), de relevante significado clínico, questionado, experimentado e corroborado por vários pesquisadores.

Administrando 25 µg de hPTH (1-34) subcutâneo diariamente, ou seja, intermitentemente, durante 3 anos em mulheres menopausadas com osteoporose e recebendo terapia de reposição hormonal, Lindsay e colaboradores (1997) obtiveram aumentos significativos de massa óssea vertebral e menor incidência a novas fraturas. Neer e colaboradores em 2001, em um extenso trabalho realizado com 1.637 mulheres pós-menopausadas com fraturas vertebrais prévias, encontraram resultados também muito significativos no emprego do hPTH subcutâneo intermitentemente como forma de tratamento no aumento de massa óssea e na redução aos riscos de fratura óssea. Tais resultados consagraram injeções subcutâneas diárias deste peptídeo como realidade terapêutica anabólica para o tecido ósseo (Vieira, 2002).

A maioria das pesquisas sobre a atividade anabólica do PTH empregam a forma análoga deste hormônio em sua forma sintética, o PTH (1-34) em pesquisas *in vivo* e *in vitro* (Lindsay *et al.*, 1997; Fujita *et al.*, 2001) cujo peso molecular é 4.117,77 dáltons (C₁₈₁H₂₉₁N₅₅O₅₁S₂), em virtude deste fragmento amino-terminal apresentar todos os efeitos biológicos conhecidos da molécula inteira (Somjem *et al.*, 1990; Ganong, 1999). O fragmento hPTH (1-34) parece ser o mais potente indutor da resposta do AMPc e da formação óssea nas células-alvo *in vitro* e *in vivo* (Reeve *et al.*, 1976; Bringham & Potts, 1981; Habener *et al.*, 1984; Whitfield & Morley, 1997), mostrando-se ainda mais específico para os osteoblastos do que para as células renais (Lane *et al.*, 1996).

Em Dezembro de 2002, *United States Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o fragmento sintético de 34 aminoácidos do hPTH, como um novo fármaco que promove o crescimento ósseo, nomeado genericamente como *Teriparatide*, e cujo nome comercial é Forteo, produzido pela indústria farmacêutica Lilly. No Brasil, o lançamento nacional da Teriparatida (Teriparatide) aconteceu em novembro de 2003, promovido pelo laboratório Eli Lilly do Brasil. Desta forma, o hPTH se apresenta hoje como um excelente agente anabólico para o tratamento da osteoporose quando administrado de forma intermitente, isoladamente ou combinado a anti-reabsortivos (estrógenos, raloxifeno, bisfosfonatos e calcitonina) capazes de suprimir a reabsorção óssea (Rodan & Martin, 2000).

3. RECEPTORES PARA O PARATORMÔNIO

Em mamíferos, o PTH parece agir sobre o osteoblasto por intermédio de um único receptor transmembrana, o PTH1R (Abou-Samra *et al.*, 1992), que está caracteristicamente acoplado a proteínas ligantes de guanosina trifosfato (proteínas G) (Swarthout *et al.*, 2001), desencadeando uma série de reações em cascata capazes de causar alterações na estrutura e função de proteínas alvo, fundamentais à reabsorção ou à formação óssea (Parfitt, 1976). O PTH1R também está descrito na literatura como receptor acoplado a proteína G (GPCR) ou classe II ou receptor da família B (Kolakowski, 1994 *apud* Mannstad *et al.*, 1999).

BOS e colaboradores (1995) empregando culturas primárias de osteoblastos de ratos demonstram que a presença de receptores para o PTH nestas células relaciona-se a uma forte expressão de osteocalcina e atividade positiva para a fosfatase alcalina. Estabelecendo, deste modo, grande correlação entre a expressão destes receptores a osteoblastos considerados maduros.

Existem também alguns poucos relatos na literatura a respeito de um segundo receptor para o PTH nestas células, o PTH2R. Segundo Juppner (1991) a expressão do PTH2R parece estar limitada ao pâncreas, cérebro, rins e testículos, além disso este receptor parece não se ligar a PTHrP.

4. MECANISMOS MOLECULARES E VIAS DE SINALIZAÇÃO DO PARATORMÔNIO

O PTH executa paradoxalmente efeitos anabólicos e catabólicos nos osteoblastos pela ativação de diferentes vias de sinalização de dois ou mais receptores ou por variações morfológicas de um mesmo receptor ou ainda pelo fragmento peptídico empregado (rev. por Murray *et al.*, 2005). A maioria das respostas anabólicas ao PTH parecem estar relacionadas com a ativação de inúmeros caminhos de sinalização intracelulares ainda desconhecidos, entre os quais destaca-se a ativação da adenil-ciclase.

Examinando-se especificamente a inibição da apoptose e o fragmento amino terminal (1-34) do paratormônio humano, a supressão da apoptose parece ocorrer nos osteoblastos por meio da ligação do hPTH(1-34) a um receptor de membrana (PTHr1) acoplado à proteína G (Swarthout *et al.*, 2001) que estimula única e exclusivamente a via da adenil-ciclase (Partridge *et al.*, 1981; Abou-Samra *et al.*, 1992; Whitfield *et al.*, 1999), elevando as concentrações do complexo sinalizador adenosina 3'5' monofosfato cíclico (AMPc) que ativa o sistema da proteína-quinase A (PKA) e fosforila proteínas, causando alterações na estrutura e função de proteínas alvo (Somjen *et al.*, 1990; rev. por Swarthout *et al.*, 2002) e impedindo o deflagre (Rixon *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995) dos mecanismos suicidas nessas células que expressam proteínas G, ativadoras da adenil-ciclase (Turner *et al.*, 1998).

Stanislaus e colaboradores (2000) estudando a regulação da apoptose *in vivo* e *in vitro*, caracterizaram a apoptose por meio da marcação com o corante azul de Trypan e observação da morfologia celular no hemocitômetro e também pelo emprego da citometria de fluxo, sugeriram que o PTH sendo administrado em ratos jovens por 28 dias inibiu a apoptose dos osteoblastos, em virtude de um decréscimo da atividade das caspases 2, 3 e 7, e, conseqüentemente impedindo a ativação da seqüência de caspases que finalizam o processo de apoptose.

O PTH também pode promover o anabolismo ósseo estimulando a proliferação e diferenciação celular (MacDonald *et al.*, 1986; Canalis *et al.*, 1989; Linkhart & Mohan, 1989; Fensfeld *et al.*, 1992; Dempster *et al.*, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995; Ejersted *et al.*, 1995; Onya *et al.*, 1995; Sabatini *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1997; Neer *et al.*, 2001). O alto índice de síntese de DNA observada por MacDonald e colaboradores (1986), estudando o PTH como um tratamento intermitente, foi sugestivo de um efeito anabólico do PTH, em células ósseas humanas. Outras pesquisas apontam que o aumento do número de osteoblastos parece ser decorrente de um efeito mitogênico do PTH sobre os osteoblastos maduros (Sömjen *et al.*, 1990; Partridge *et al.*, 1995; Swarthout *et al.*, 2002). Na proliferação e diferenciação dos osteoblastos, em particular, a via de sinalização ativada pelo PTH, quando vários fragmentos foram testados *in vitro* (Sömjen *et al.*, 1990), sugeriram que a proliferação dos osteoblastos frente a este estímulo não ocorre via ativação da adenil-ciclase, mas pelo estímulo de um segundo e distinto caminho de sinalização, a fosfolipase C e proteína-quinase. No entanto, Sabatini e colaboradores (1996) sugeriram que a ativação da via adenil-ciclase/proteína-quinase A (AC/PKA) é a principal responsável pelos efeitos proliferativos do PTH. O fragmento hPTH (1-34) quando aplicado de forma pulsátil *in vivo* e *in vitro* age como um estimulador da proliferação dos osteoblastos (Onya

et al., 1997) e da diferenciação de células osteoprogenitoras ósseas (Nishida *et al.*, 1994).

Segundo Canalis e colaboradores (1989) o PTH parece modular processo de proliferação dos osteoblastos e a expressão de genes importantes para a codificação de proteínas da matriz extracelular. Outras pesquisas indicam que o complexo PKA-AMPC ativa as quinases reguladoras de sinais extracelulares (extracelular-regulated kinase - ERKs) no caminho de promoção do crescimento ósseo *in vivo* e *in vitro* (Ishizuya *et al.*, 1997), promovendo a regulação de componentes do ciclo celular, alterando, por exemplo, a expressão de ciclinas, complexos protéicos reguladores do ciclo celular, causando interferências na proliferação celular (rev. por Swarthout *et al.*, 2002). Alterações nas concentrações de qualquer um dos mensageiros secundários podem regular a expressão gênica (rev. por Swarthout *et al.*, 2002), uma vez que se verificou que o maior efeito do PTH em cultura de células, após a ativação das vias de sinalização, foi a alteração direta na estimulação dos fatores de transcrição com um aumento da expressão gênica (Hock *et al.*, 1994; rev. por Partridge *et al.*, 1994), principalmente em proto-oncogenes de resposta rápida inicial (IEGs) em osteoblastos normais e malignizantes (Greenfield *et al.*, 1993). Os IEGs são fundamentais à proliferação e diferenciação de muitos tipos celulares e importantes reguladores da transcrição de muitos genes osteoblásticos (rev. por Sheng & Greenberg, 1990). O PTH promove também um aumento na transcrição do gene c-fos (rev. por Goltzman, 1999) pela ativação do complexo PKA/AMPC, estimulando maior produção da proteína Fos que parece ser relevante na inibição da apoptose na célula óssea (rev. por Onishi & Hruska, 1997).

Informações conclusivas e promissoras sobre uma série de eventos biomoleculares relacionados ao PTH como um fator anabólico na formação de

osso já estão descritas na literatura. Resultados científicos demonstrados por Gruber e colaboradores (1995) e Reginster e colaboradores (1999) indicam que o PTH em seu processo de anabolismo interage sinergisticamente com outros hormônios (GH) e fatores de crescimento (IGF-I, IGF-II, TGF- β), proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) e citocinas (IL). Mogi & Togari (2003) atribuem a BMP-4 uma função sinalizadora, capaz de ativar uma cascata de caspases que participam na diferenciação dos osteoblastos. O TGF- β e o FGF são fatores relevantes na proliferação de células osteoprogenitoras e na osteogênese. Ambos fatores de crescimento incrementam a formação óssea e minimizam a reabsorção em modelos com osteoporose. A expressão reduzida de TGF- β no osso está relacionada a diversos modelos animais de osteopenia. Manipulações genéticas do TGF- β , do FGF e de seus receptores sugerem a sua participação no controle da osteogênese e da massa óssea *in vivo* (Fromigué *et al.*, 2004).

5. TECIDO ÓSSEO E PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR

O tecido ósseo é um tipo de tecido conjuntivo especializado constituído, portanto, por abundância de células, dispersas em uma matriz extracelular composta por duas fases: uma orgânica e outra inorgânica.

As populações celulares reconhecidas nas diferentes fases do desenvolvimento do tecido ósseo são os osteoblastos, os osteócitos e os osteoclastos. Os osteoblastos são os responsáveis diretos pela síntese e deposição de matriz extracelular, que se torna mineralizada pela precipitação do carbonato contendo cristais de hidroxiapatita. Todo este evento compreende o envolvimento de células em diferentes estágios de maturação, tais como: células

indiferenciadas (mesenquimais), células fusiformes proliferativas positivas para a atividade da enzima fosfatase alcalina (pré-osteoblastos), células diferenciadas (osteoblastos propriamente ditos) e células maduras não proliferativas, produtoras de matriz (osteócitos) (Katchburian & Arana, 1999). Este tecido apresenta ainda elementos celulares responsáveis pelo processo de reabsorção óssea, os osteoclastos, cujos precursores se encontram na medula óssea (Robey *et al.*, 1993).

A porção orgânica da matriz extracelular é constituída por aproximadamente 90% de colágeno do tipo I e por proteínas não colagênicas, sendo a fase inorgânica composta principalmente por hidroxiapatita (Fisher *et al.*, 1989). Os colágenos são uma família de proteínas fibrosas, predominantemente, estruturais, encontrados em todos os animais multicelulares, constituindo 25% da massa protéica total dos mamíferos (Alberts *et al.*, 1994). A molécula de colágeno, no tecido ósseo, é sintetizada pelos osteoblastos (Linde, 1985) em ribossomos ligados à membrana e, posteriormente é injetada para a luz do retículo endoplasmático como um grande precursor molecular. Na luz do retículo endoplasmático, o precursor sofre hidroxilações e glicosilações sucessivas, transformando-se na molécula de pró-colágeno. O pró-colágeno é o precursor solúvel do colágeno, presente preferencialmente ao redor do núcleo (Oliveira *et al.*, 2003), e que ao ser excretado da célula é maturado, denominando-se de colágeno. O colágeno tipo I, em especial, está mais presente em tecidos conjuntivos densos, sendo importante para a estabilização da arquitetura tecidual (Narayanan & Page, 1983). Além do colágeno do tipo I presente no osso maduro, mais recentemente, descobriu-se também mínima presença de colágeno do tipo III e tipo V neste tecido (Roldan *et al.*, 1989; Heersche *et al.*, 1992; Robey *et al.*, 1993). Na fase orgânica do osso estão presentes inúmeras famílias protéicas, incluindo o colágeno, glicoproteínas e proteoglicanas. A deposição de matriz osteóide pelos osteoblastos está sujeita a uma regulação por fatores extrínsecos

tais como, os fatores de crescimento, forças físicas, e por fatores intrínsecos da célula, como por exemplo, fase no ciclo celular, estágio de maturação e idade do animal (Robey *et al*, 1993).

As proteínas não colagênicas desempenham um papel estrutural de fibrilogênese do colágeno e também regulam a mineralização da matriz. Além disso, elas ainda podem participar na sinalização do ciclo celular dos osteoblastos, assim como na adesão intercelular e entre as células e a matriz mineralizada (Glimcher, 1989). Segundo Ingram e colaboradores (1993) apesar das proteínas não-colagênicas representarem 10% da matriz orgânica do osso e estarem incorporadas a este tecido mineralizado, ainda não está esclarecido o seu papel durante a formação e a remodelação óssea. Entre as proteínas não-colagênicas destacam-se a osteonectina, as sialoproteínas ósseas, a osteocalcina, a osteopontina, a osteoprotegerina e a fibronectina.

A osteonectina (ON), proteína não colagênica, que apresenta 38 kDa, abundantemente secretada pelos osteoblastos, representa de 2 a 3% das proteínas totais no tecido ósseo em desenvolvimento na maioria das espécies animais, incluindo o homem. Esta proteína apesar de não ser encontrada exclusivamente no tecido ósseo, devido à sua abundância neste tecido, é um excelente marcador de osteogênese. A osteonectina parece possuir potencial para um grande número de atividades biológicas, podendo se ligar à hidroxiapatita e ao cálcio, regulando deste modo a cristalização das apatitas da matriz óssea (Termine, 1989), assim como ao colágeno I (Termine *et al.*, 1981; Ingram *et al.*, 1993; Robey, 1996).

Outra família de proteínas não-colagênicas também encontrada abundantemente na matriz óssea juntamente com a osteonectina são as sialoproteínas ósseas (BSP) que podem ser classificadas em BSP-I ou

osteopontina, uma fosfo-proteína de 44 kDa e BSP-II, ambas relacionadas a promoção de adesão celular (Termine, 1989). Elas correspondem a 10 ou 15 % das proteínas não colagênicas da matriz óssea.

A osteocalcina (GLA/OC), uma proteína ácido glutâmica dependente de vitamina K com um peso molecular de 6 kDa, tem sido descrita na literatura como a única proteína osteoblasto específica verdadeira. A sua biossíntese é modulada pelo PTH e pode estar duzentas vezes aumentada durante o processo de deposição mineral da matriz extracelular, estando ainda relacionada com a reabsorção óssea *in vitro*, devido à sua ação quimiotática para osteoclastos (Ingram *et al.*, 1993).

A fibronectina é uma glicoproteína fibrosa de adesão celular encontrada nos tecidos conjuntivos, inclusive na matriz extracelular óssea, relacionada especialmente aos processos de adesão e de migração celular, induzindo ao crescimento celular e tecidual. Liga-se ao colágeno e aos demais componentes da matriz extracelular (Alberts *et al.*, 1994). Segundo Oliveira e colaboradores (2003), a fibronectina localiza-se na célula, preferencialmente, formando redes citoplasmáticas que se estendem de uma célula a outra.

A matriz mineralizada confere ao tecido ósseo as propriedades ideais para suas funções mecânicas de suporte e proteção, assim como sua função metabólica no equilíbrio da homeostasia mineral (Fawcett, 1993). A compreensão dos fatores fisiológicos e patológicos que regulam o metabolismo do tecido ósseo é de suma importância para uma intervenção preventiva e curativa, mais específicas. Beresford e colaboradores (1993) relatam que o isolamento das células do tecido ósseo em cultura permitiu otimizar o entendimento da regulação metabólica do osso. De acordo com Freshney (2000) o estudo *in vitro*

empregando cultivo celular caracteriza um excelente modelo de estudo devido a: facilidade da padronização da amostra, em decorrência da possibilidade do controle de algumas variáveis, tais como: pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂ e homogeneidade das amostras. No entanto, cabe lembrar que este tipo de estudo *in vitro* só pode ser extrapolado para a realidade quando as células em cultivo expressam suas funções normalmente (Freshney, 2000).

Amplamente utilizadas as células de linhagem osteoblástica permitem o estudo da osteogênese por expressarem proteínas próprias do tecido ósseo, assim como serem capazes de formar nódulos de mineralização (Harris *et al.*, 1995) quando devidamente induzidas ao fenótipo de osteoblastos maduros por meio da adição de suplementos específicos ao meio de cultivo, tais como, ácido ascórbico e β-glicero-fosfato (Deboni *et al.*, 1996). Stein & Lian (1993) *apud* Oliveira e colaboradores (2003) referem-se aos sistemas de cultivo de células osteogênicas como um modelo que permite o estudo de diversos eventos biológicos do tecido ósseo, desde que protocolos adequados de esterilização e desinfecção sejam seguidos (Freshney, 2000). Apesar destas considerações, há críticas quanto à validade do cultivo celular, questionando sobre a reprodutibilidade das funções fisiológicas, uma vez que as células encontram-se isoladas, e não sujeitas à exposição aos demais fluídos orgânicos, provenientes da circulação (Freshney, 2000).

6. FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF-α)

A grande família das citocinas é constituída por proteínas solúveis ou glicoproteínas produzidas pelas células da imunidade inata e adquirida e que agem como comunicadores químicos entre as células, podendo ser secretadas, ligadas à membrana celular ou armazenadas na matriz extracelular. As

citocinas regulam o funcionamento de parte do sistema imune, defendendo o organismo contra traumas físicos e químicos e agentes biológicos, por meio do envio de sinais às células de defesa. Embora as citocinas sejam estruturalmente diferentes, elas compartilham diversas propriedades, estimulando muitas respostas das células envolvidas na imunidade e na inflamação (Roitt *et al.*, 1999).

O fator de necrose tumoral alfa, citotoxina do macrófago ou cachectina pertence ao vasto grupo das citocinas e é capaz de promover uma resposta antitumoral. O nome, fator de necrose tumoral, provem da capacidade desta citocina para causar necrose dos tumores devido à trombose dos vasos sanguíneos em resposta à sua injeção *in vivo*. O'Malley e colaboradores (1962) inoculando camundongos portadores de tumores com o soro de camundongos tratados previamente com lipopolisacarídeo, proveniente da parede celular de bactérias gram-negativas, observaram a necrose dos tumores. Em 1975, pesquisadores do *Memorial Sloan-Kettering Cancer Center of New York*, confirmaram os achados de O'Malley e colaboradores, verificando que animais tratados com lipopolisacarídeo liberavam no soro um fator capaz de causar necrose hemorrágica em tumores. A este fator designou-se Fator de Necrose Tumoral (TNF) (Carswell *et al.*, 1975).

O gene responsável pela codificação do TNF alfa humano está localizado no cromossoma 6 (Pennica *et al.*, 1984) e a sua secreção ocorre nas células T-antígeno-estimuladas, células matadoras naturais (NK), macrófagos, leucócitos, mastócitos, e principalmente nos fagócitos mononucleares ativados (Lewis *et al.*, 1991). É secretado como uma forma protéica precursora estável não-glicosilada ligada à membrana (transmembrana), tipo II, com um amino-terminal intracelular e um grande domínio carboxi-terminal extracelular. O TNF alfa é expresso, portanto, na membrana como um homotrímero que após

clivagem proteolítica da membrana plasmática do macrófago por uma metaloproteinase conversora de TNF alfa, também ligada à membrana, libera a forma secretada e ativa do TNF alfa humano que circula como um homotrímero estável de 51 kDa, constituída por 157 resíduos de aminoácidos (Roitt *et al.*, 1999).

Além de induzir a necrose de tumores, destacam-se entre as ações fisiológicas do TNF alfa, a sua participação em processos inflamatórios, estimulando o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os sítios de infecção por meio de diversas ações sobre as células endoteliais vasculares e leucócitos. O TNF alfa é um mediador de eventos biológicos e que também atua regulando o crescimento e a diferenciação de vários tipos celulares. Na inflamação, atua sobre os fagócitos mononucleares, estimulando-os a secretarem outras citocinas, como a interleucina 1 (IL-1), por exemplo (Fiers, 1991). Esta ação combinada com outras citocinas, denomina-se cascata de citocinas que apresentam atividades biológicas semelhantes ou complementares (Beyaert & Fiers, 1998). Concentrações plasmáticas baixas ($<10^{-9}$ M), moderadas e altas ($\geq 10^{-9}$ M) do TNF- α determinam diferentes desempenhos nos distintos tecidos alvo, culminando em processos inflamatórios locais, efeitos sistêmicos e choques sépticos, respectivamente (Beutler, 1995). O TNF alfa pode agir como um potente mediador parácrino e endócrino das funções inflamatórias e imunes (Stashenko *et al.*, 1991), participando na homeostase tecidual e, atuando principalmente na resposta inflamatória aguda por bactérias gram-negativas e outros microorganismos infecciosos, sendo também responsável por muitas complicações sistêmicas das infecções graves (Fiers, 1991). Esta citocina sintetizada no microambiente ósseo (Delaney *et al.*, 1994 *apud* Hill *et al.*, 1997; Hock *et al.*, 2001) parece ter ação pleiotrópica em osteoblastos, alterando a síntese de DNA e consenqüentemente de várias proteínas da matriz óssea como o colágeno

(Nanes *et al.*, 1989), a osteocalcina (Nanes *et al.*, 1991) e ainda enzimas proteolíticas como as metaloproteinases (Panagakos & Kumar, 1994). É uma citocina pro-inflamatória freqüentemente envolvida em estados patológicos, tais como: septicemias, artrite reumatóide, periodontite (Stashenko *et al.*, 1991; Roberts, 1997); infecções pulpares e periapicais com comprometimento ósseo e osteoporose (Tani-Ishi *et al.*, 1995).

Outra ação do TNF que suscita grande interesse é a indução da apoptose (morte celular programada) de alguns tipos celulares, uma vez que os receptores para o TNF alfa estão relacionados a moléculas sinalizadoras da morte que estão associadas a proteases específicas capazes de deflagar uma cascata de proteases, culminando na degradação celular. O significado fisiológico deste evento ainda não é totalmente conhecido, mas uma das explicações para este mecanismo é a eliminação de células danificadas, velhas ou desnecessárias, ou seja, homeostase e renovação tecidual (Steller *et al.*, 2003). Esta atividade do TNF alfa têm sido amplamente empregada, preferencialmente em uma concentração de 10^{-9} M, como um excelente método para se induzir a morte celular programada em cultura de células (Kitajima *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997; Jilka *et al.*, 1998; Ali *et al.*, 1999; Chae *et al.*, 2000; Sanders & Stern, 2000; Chua *et al.*, 2002; Ahuja *et al.*, 2003).

A ação do TNF é observada em muitos tipos celulares, por meio da sua ligação ao seu receptor específico de membrana (TNF-R) que está conjugado a transdução de sinais intracelulares e as vias de mensagem secundárias nas células alvo. Há dois tipos de receptores para o TNF, o receptor tipo I (TNFR I) e o receptor tipo II (TNFR II). Ambos os receptores se ligam tanto ao TNF- α quanto ao TNF- β ou linfotoxina. Estes receptores pertencem a uma família de receptores com domínios extracelulares conservados, ricos em cisteína. A análise comparativa na seqüência de

nucleotídeos sugere que eles são membros de uma nova família de proteínas que incluem os receptores para o fator de crescimento de nervos em ratos e em humanos. Os receptores para o TNF- α , o TNFR1 e o TNFR2 são codificados por diferentes cromossomas. O gene que codifica o receptor para o TNF do tipo I (p55) localiza-se no cromossoma humano 12, banda 12p13 e o gene que codifica o tipo II (p75) está localizado no cromossoma humano 1, banda 1p36.2 (Kemper *et al.*, 1991).

Ao associar-se ao ligante TNF, esses receptores podem estimular a expressão de genes ou ativar proteínas intracelulares associadas que induzem a apoptose. A ativação dessas diferentes vias de sinalização deve-se a ligação de proteínas adaptadoras distintas aos diferentes domínios das porções citoplasmáticas do receptor. Quando o receptor se liga ao TNF na presença citosólica do fator associado ao receptor TNF (TRAF) a expressão genética é deflagrada pela ativação do fator de transcrição, denominado fator nuclear κ B (NF- κ B ou TRANCE), importante caminho de sinalização nos processos de reabsorção mediada pelos osteoblastos. A ligação de agentes patofisiológicos, como citocinas e intermediários reativos de oxigênio ativam o NF- κ B, que a partir disso se encaminha para o núcleo onde se liga finalmente ao DNA, controlando a expressão gênica. (Ali *et al.*, 1999). Presente no citoplasma de diversos tipos celulares, este fator age regulando a transcrição de muitos genes NF- κ B envolvidos em inflamações e, em alguns tipos celulares agindo na prevenção ou indução da morte celular programada. O NF- κ B é ativado em um evento biológico de múltiplas etapas, nas quais inibidores específicos de cada fase podem ser recrutados frente a determinados sinais, interrompendo a sua ativação. Uma vez ativado, o NF- κ B desempenha nos osteoclastos um importante papel na diferenciação e ativação destas células e, nos osteoblastos, evidências apontam para o NF- κ B como um regulador da

expressão de genes fundamentais (rev. por Bauerle & Henkel, 1994). Ali e colaboradores (1999) estudando a ativação do NF- κ B em osteoblastos humanos por fatores estimulantes da reabsorção óssea sugerem que a ativação do NF- κ B nos osteoblastos pode ser um caminho de sinalização comum para a ativação de genes que sinalizam para os osteoclastos conduzindo a reabsorção óssea. A apoptose é desencadeada quando o receptor para o TNF se liga a esta citocina em presença do domínio citoplasmático, o domínio de morte associado ao receptor (TRADD), ativando a cascata de caspases efetoras.

O TNF alfa tem sido muito estudado devido à sua capacidade de reabsorver o tecido ósseo e por estar envolvido em patologias de interesse na odontologia, tais como a infecção pulpar e a periodontite. Tani-Ishii e colaboradores (1995) empregando métodos imunocitoquímicos verificaram marcação positiva para o TNF alfa e para IL-1 em polpa dental e osso periapical inflamados a partir do segundo dia de contaminação, e cuja expressão aumentava com o tempo, sugerindo que ambas as citocinas desempenham um importante papel na patogênese das doenças pulpares e periodontais com concomitante perda óssea.

7. APOPTOSE (MORTE CELULAR PROGRAMADA)

É um evento fisiológico responsável pela homeostase dos tecidos adultos e embriogênicos, controlando o balanço entre a proliferação e a manutenção do número de células. Desempenha também, um mecanismo de defesa no qual, as células que sofreram injúrias físicas, químicas e biológicas, infecções por vírus ou que apresentam mutações genéticas, por exemplo, são prontamente eliminadas (Steller, 1995). A morte celular programada parece estar também relacionada a patologias como o câncer, desordens neurodegenerativas (Raff et al., 1993) e osteoporose (Manolagas, 2000).

A palavra apoptose, de origem grega (*αποπτωση*), apresenta como significado clássico a expressão “folhas caindo das árvores” ou ainda, “pétalas caindo das flores”, sendo cientificamente denominada de morte celular programada. Em biologia, a denominação apoptose ou morte celular programada surgiu da observação de células que morriam durante o desenvolvimento embriológico em insetos, na fase de pupa. Este termo foi empregado na literatura científica pela primeira vez por Lockshin e Willians (1965 a, b, c, d *apud* Lokshin & Zakeri, 2001) na descrição da degeneração de tecidos musculares do bicho-da-seda (*Antheraea pernyi*), em resposta à droga ecdisona, hormônio que regula a metamorfose desses animais. O emprego do termo apoptose consagrou-se em 1972, quando Kerr e colaboradores, estabeleceram distinções morfológicas em células cuja morte resultava de processos fisiológicos normais. Enquanto, a morte por necrose estaria associada a injúrias agudas às células, culminando no extravasamento de material intracelular sobre os demais elementos celulares, a apoptose, segundo estes autores se caracterizaria por uma série de alterações celulares. A apoptose é caracterizada por condensação da cromatina nuclear, encolhimento (“shrinking”) do citoplasma, dilatação do retículo endoplasmático e embolhamento (“blebbing”) da membrana citoplasmática. A célula em apoptose apresenta inúmeras alterações morfológicas e bioquímicas, entre elas, a mais característica é a fragmentação do DNA, devido à liberação de endonucleases (Noble *et al.*, 1997), mediadas por cascatas de caspases (rev. por Clarke, 1989; Steller, 1995).

Evidências sustentam a teoria de que a ação anti-apoptótica direta do PTH sobre os osteoblastos exige a ligação deste hormônio ao seu receptor (PTH1R) e é supostamente mediada pela via de sinalização dependente do AMPc (Partridge *et al.*, 1981; Abou-Samra *et al.*, 1992; Whitfield *et al.*, 1999), capaz de interferir em alguns dos caminhos da morte celular (Rixon *et al.*, 1994;

Dobnig & Turner, 1995). O PTH parece inibir os mecanismos suicidas em células que expressam proteínas G, ativadoras da adenil-ciclase (Turner *et al.*, 1998). Em virtude dos osteoblastos produzirem AMPc em resposta ao PTH, é provável que a ação inibidora da apoptose pelo PTH seja realmente mediada por proteínas G (Jilka *et al.*, 1999). Outros relatos indicam que o PTH inibe a apoptose de osteoblastos, devido a uma diminuição da atividade das caspases, comprometendo o reconhecimento da caspase-3 (Stanislaus *et al.*, 2000) e impedindo a ativação da seqüência de caspases que culminaria no processo de apoptose.

Muitos autores que empregam o cultivo de células nas mais variadas pesquisas, visando o efeito anabólico e anti-apoptótico do PTH, utilizaram baixas doses deste hormônio, entre 10^{-7} e 10^{-9} M (Bringham & Potts, 1981; Sönjem *et al.*, 1990; Fensenfeld *et al.*, 1992; Civitelli *et al.*, 1994; Zang *et al.*, 1994). O cultivo celular permite verificação da indução à apoptose por métodos como a exclusão das células coradas pelo azul de Trypan (Freshney, 1990), bem como pelo método de citometria de fluxo (Onishi *et al.*, 1997, Jilka *et al.*, 1998, Stanislaus *et al.*, 2000, Mogi *et al.*, 2004), no qual as células apoptóticas, apresentando fragmentos oligossomais (rev. por Clarke, 1989; ver. por Sandri e Carraro, 1999) de DNA corados com o fluorocromo iodeto de propídeo (Nicoletti *et al.*, 1997) emitem menor fluorescência, após exposição ao laser (Wyllie *et al.*, *apud* Nicoletti *et al.*, 1991) .

Os mecanismos que desencadeiam o processo de apoptose podem ser induzidos por agentes das mais variadas origens (Ashkenazi & Dixit, 1998 *apud* Moshnikova *et al.*, 2001), entretanto, em estudos desta natureza, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) vem sendo amplamente empregado, considerando-se a sua natural presença no microambiente ósseo (Delaney *et al.*, 1994 *apud* Hill *et al.*, 1997). Além disso, Hill e colaboradores (1997)

pesquisando os múltiplos sinais extracelulares capazes de promover a sobrevivência ou a apoptose em osteoblastos, testando dezenas de fatores de crescimento e citocinas, observaram que o TNF- α foi o único tratamento testado que induziu a morte celular programada na ausência de toxicidade celular.

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi investigar *in vitro* a capacidade do fragmento peptídico hPTH (1-34) a 1 nanomolar (10^{-9} M) em inibir a morte celular programada, em osteoblastos de ratos induzidos à apoptose pela citocina TNF- α a 10^{-9} M, quando aplicado às células por quinze minutos/dia durante cinco dias. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer e em citômetro de fluxo.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR

4.1.1 Linhagem Celular

Os estudos de proliferação e de inibição da morte celular programada foram realizadas empregando-se uma linhagem de células osteoblásticas não imortalizadas, derivadas de cultura primária de calvária de fetos de ratos Wistar coletadas no dia E18, denominadas OSTEO, cedidas gentilmente pelo Prof. Dr. Paulo Tambasco de Oliveira da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FORP (Ribeirão Preto/Brasil).

4.1.2 Local do Cultivo Celular

O cultivo celular foi realizado no Laboratório de Cultivo Celular da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Esse trabalho não envolveu manipulação direta com seres humanos, e foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP), por meio do parecer de apuração registrado sob o protocolo número 89/04, de 26 de Junho de 2004 (Anexo 1).

A manipulação das células foi realizada em capela de fluxo laminar (VECO/ Campinas, São Paulo, Br.) (Figura 4.8.1 B), seguindo-se os protocolos para a manutenção da esterilidade deste ambiente, assim como a desinfecção dos materiais utilizados no interior da capela (Freshney, 2000).

4.1.3 Descongelamento das Células e Condições de Cultivo

As células OSTEO encontravam-se estocadas em nitrogênio líquido a -192°C e crioprotegidas por di-metil-sulfóxido (DMSO – Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.). O tubo criogênico (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.) contendo as células foi descongelado em banho-maria (Dubnoff/ Modelo 145/ FANEM/ São Paulo, Br) a 37°C por 2 minutos. Em seguida, as células em suspensão foram transferidas por meio de uma pipeta de vidro graduada em mililitros (Costar Corporation, Cambridge, MA., U.S.A.) e um pipetador automático Pipet Aid (Drummond Scientific Co./ Modelo 115 VAC – 4 W/ Broomall, PA., U.S.A.) para um frasco de cultivo (Costar Corporation, Cambridge, MA., U.S.A.) de 25 cm^2 de área cultivável, contendo 5 mL de meio Minimum Essential Medium Alpha - MEM- α (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino – FBS (Cultilab, Campinas, São Paulo, Br), $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico, β -glicerofosfato a 7 mM (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.) (Deboni *et al.*, 1996) e $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.). Após a devida identificação do frasco de cultivo, as células foram incubadas em estufa (Fig. 4.8.1 C/D) (Forma Scientific Inc., Ohio, U.S.A.) a 37°C , em uma atmosfera umidificada contendo 95% de ar (O_2) e 5% de gás carbônico (CO_2) por um período de 2 horas. Passado este tempo, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco, evitando-se que os efeitos citotóxicos do DMSO produzissem alterações nas células. As células foram então reincubadas em estufa de CO_2 a 37°C por 48 horas. Nas passagens celulares visando a expansão da amostra, assim como na experimentação das drogas (hPTH e TNF- α) empregou-se sempre o meio MEM- α suplementado conforme já descrito.

A viabilidade e a proliferação celular foram monitoradas diariamente, utilizando-se microscopia óptica de contraste de fase positiva – microscópio invertido de fase (Figura 4.8.2 A) (Wilowerts S/ WILL I, Hund Wetzlar, Alemanha),

sem o emprego de qualquer corante. O meio de cultura foi trocado em média a cada 2 dias, considerando-se possíveis alterações do pH, em virtude do metabolismo celular.

4.1.4. Subcultivo

Quando as células ocupavam 70% da área cultivável do frasco, formando uma monocamada, processo denominado de subconfluência, procedeu-se a um subcultivo (repique ou passagem). O meio do frasco de cultivo foi aspirado empregando-se uma pipeta do tipo Pasteur (Costar Corporation, Cambridge, MA., U.S.A.), conectada a uma bomba à vácuo (Dia-Pump/ Modelo A/ FANEM/ Campinas, São Paulo, Br). A monocamada celular foi, então, lavada com 1,5 mL de solução tampão fosfato-salina sem cálcio e sem magnésio (PBS), pH 7,2, e em seguida, o PBS foi substituído por 2 mL de uma solução de tripsina (Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.) a 0,25% em PBS por 3 a 5 minutos, à 37° C, permitindo a separação das células. A tripsina foi posteriormente inativada com 5 mL de meio de cultura fresco e as células em suspensão foram transferidas para um tubo de centrifugação de 15 mL (Corning Incorporated, N.Y., U.S.A.) e centrifugadas a 1.000 rpm, a 300XG, por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a aspiração do sobrenadante, o precipitado de células (“pellet”) foi ressuspenso no próprio tubo de centrifugação em 1 mL de MEM- α fresco com o auxílio de uma pipeta de vidro de 1 mL. Frações dessa suspensão de células foram distribuídas em frascos de 75 cm² (Figura 4.8.2 F), contendo 15 mL de meio de cultivo fresco e os frascos foram reincubados nas mesmas condições já descritas previamente. Este procedimento caracteriza uma nova passagem da cultura, bem como, a amplificação do número de células, necessária para se estabelecer uma quantidade adequada destes espécimes a ser empregada nos experimentos.

Além disso, objetivando a perpetuação da linhagem celular, amostras representativas da cultura foram transferidas para criotubos, contendo crio-protetor com 5 -10% de DMSO (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.),

mantidas em freezer a -20° C por 2 horas, transferidas para o freezer -80° C por até 7 dias e, finalmente acondicionados no tambor de nitrogênio líquido a -190° C.

4.2 DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS DENSIDADE DE SEMEADURA

Após algumas passagens, resultando na expansão do cultivo celular (aumento do número de células), pôde-se, então, proceder aos experimentos.

Para se estimar o número de células vivas (viáveis), presentes em cada um dos frascos de cultivo, aplicou-se o ensaio de exclusão de células coradas pelo corante azul de Trypan, proposto por Freshney, em 1990. Cada uma das garrafas de cultivo, contendo as células foi tripsinizada e as células, suspendidas e centrifugadas por 10 minutos a 1.000 rpm. O precipitado foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo fresco, 0,1 mL desta suspensão de células foi transferida para um tubo de centrifugação (Corning Incorporated, N.Y., U.S.A.), contendo 0,8 mL de α -MEM e 0,1 mL do corante azul de Trypan a 0,4% (Sigma Chemical, Co., St. Louis, MO., U.S.A.), criando um fator de diluição 10. Imediatamente, algumas gotas dessa solução de células coradas foram depositadas com o auxílio de uma pipeta de vidro do tipo Pasteur (Costar Corporation, Cambridge, MA., U.S.A.) em uma câmara de Neubauer (Baxter Healthcare Corporation, Mc Gaw Park, IL., U.S.A.) (Fig. 4.8.2 A). Em seguida, procedeu-se a análise e a contagem das células sob microscopia de luz (microscópio de contraste de fase) (Fig. 4.8.1 A) com objetiva de 10 X. As células coradas pelo azul de Trypan caracterizavam as células não viáveis (mortas), enquanto que, as células viáveis (vivas) mostravam-se arredondadas e isentas do corante. Tanto as células vivas ou viáveis (V) quanto as não-viáveis foram contadas, cujos valores foram aplicados à seguinte equação:

Número Total de Células

$$N: (NTC \times D \times 10^4) / Nq$$

onde:

N: número total de células

NTC: número total de células contadas (viáveis e não-viáveis)

D: fator de diluição

Nq: número de quadrados contados da câmara de Neubauer

10^4 : volume da câmara de Neubauer

Após a determinação do número de células vivas, efetuaram-se os cálculos, considerando-se 10^4 ou 10^5 células por mL como possíveis densidades de semeadura para esta pesquisa.

4.3 DROGAS EMPREGADAS

As células foram tratadas com o fragmento do paratormônio humano sintético, o hPTH (1-34) (Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, P.A., U.S.A.) a 10^{-9} M e com o fator de necrose tumoral alfa humano, o TNF- α (Sigma, St. Louis, MO., U.S.A.) também na concentração de 10^{-9} M. Ambas as drogas foram reconstituídas em água destilada estéril e, posteriormente, diluídas na concentração desejada diretamente no meio de cultivo α -MEM (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) suplementado com 10% de SFB (Cultilab Mat. Cult. Cel. Ltda, Campinas, São Paulo, Br.), ácido ascórbico a 50 μ g/mL, 7mM de β -glicerofosfato (Sigma, St. Louis, MO., U.S.A.) e o antibiótico gentamicina (Gibco-Invitrogen Corporation, Grand Island, N.Y., U.S.A.) 50 μ g/mL.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DO FENÓTIPO OSTEoblÁSTICO

Visando a verificação da indução do fenótipo osteoblástico na amostra empregada nesta pesquisa, assim como a maturidade destas células, procedeu-se aos seguintes experimentos:

4.4.1 Imunofluorescência

A linhagem de osteoblastos OSTEO foi plaqueada em lamínulas de vidro, acondicionadas em placas de Petri de 35 mm, em uma densidade de 10^4 células por mL de meio, cultivadas até sub-confluência, fixadas em metanol a -20°C por 6 minutos e lavadas em PBS. Houve bloqueio da marcação inespecífica por meio de incubação das células em solução de albumina bovina 1% (BSA) (Sigma St. Louis, MO., U.S.A.) em PBS, suplementada com 5% de soro fetal bovino por 30 minutos à temperatura ambiente. Procedeu-se a incubação da amostra de células com os anticorpos primários em diferentes concentrações (quadro A) durante 45 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente. Como controle negativo, omitiu-se a incubação dos anticorpos primários, e as amostras foram submetidas a lavagens com PBS. O anticorpo secundário empregado foi o anti-coelho biotinilado (DAKO) (Ig G) em uma concentração de 1:50 por 30 minutos à temperatura ambiente e, o anticorpo terciário utilizado foi a estreptavidina conjugada com a fluoresceína em uma concentração de 1:50 por 30 minutos à temperatura ambiente e protegidos da luz. Após as incubações primária, secundária e terciária as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro, empregando-se o meio de montagem Vectashield® conjugado com DAPI (Vector Laboratories Inc., Burlingame, C.A., U.S.A.). Para a análise dos resultados empregou-se epi-iluminação em microscópio de fluorescência Zeiss Axiophot (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), por meio de objetivas Plan Neofluor de 20x, 40x e 63x e abertura numérica de 1,4. As imagens foram registradas em filme fotográfico Kodak Elite Chrome 400.

Quadro A – Quadro representativo dos anticorpos primários empregados, suas concentrações e procedências

Anticorpos Primários			
	Concentração	Hospedeiro	Procedência

Anti-Colágeno tipo I	1:25/1:50	coelho	Byogenesis
Anti-Fibronectina	1:600	coelho	DAKO

4.5 CINÉTICA DO CRESCIMENTO CELULAR

CURVA DE CRESCIMENTO

4.5.1 Densidade de Semeadura das Células

Procedeu-se ao plaqueamento das células em uma densidade de 10^4 células/mL por poço em 4 poços de placas de 6 poços (6 *well plates*) (TPP®, Trasadingen, Suíça) (Fig. 4.8.1 E) para a realização da curva de crescimento celular. Aguardou-se um prazo de 24 horas para o assentamento das células antes de submetê-las ao tratamento com as drogas, hPTH(1-34) e TNF- α , por um período de 12, 24, 48 e 72 horas. Delineando-se desta forma os seguintes grupos experimentais:

4.5.2 Grupos Experimentais

Grupo TNF- α

Células tratadas com o TNF- α a 10^{-9} M (induzidas à apoptose) por 12, 24, 48 e 72 horas.

Grupo hPTH (1-34)

Células tratadas com o hPTH (1-34) a 10^{-9} M por 12, 24, 48 e 72 horas.

Grupo hPTH (1-34)/TNF- α

Células tratadas com o TNF- α a 10^{-9} M (induzidas à apoptose) e tratadas com o hPTH (1-34) a 10^{-9} M por 12, 24, 48 e 72 horas.

Grupo Controle

Células que não receberam qualquer tipo de tratamento por 12, 24, 48 e 72 horas.

Transcorrido os tempos determinados, cada grupo experimental foi tripsinizado, conforme descrito previamente, e a solução de células foi levada à câmara de Neubauer para contagem celular.

Foram realizados 6 experimentos (n=6) independentes com 3 repetições (triplicatas) para cada um dos experimentos.

4.5.3 Contagem das Células

Após os períodos de 12, 24, 48 e 72 horas sob a ação das drogas, cada um dos grupos foi enzimaticamente tratado com uma solução de tripsina por 3-5 minutos, transferido para tubos de centrifugação de 15 mL (Corning Incorporated, N.Y.,U.S.A.) e centrifugados por 10 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi removido e a suspensão de células foi ressuspendida em 1 mL de meio de cultivo MEM- α . Procedeu-se, então, ao protocolo de contagem celular já descrito no item 4.2 (Determinação do Número de Células), aplicando-se o número de células encontradas para cada grupo à fórmula de número total de células (N).

4.5.3.1 Curvas de Crescimento

Considerando-se os valores encontrados para cada um dos grupos e a sua aplicação na equação específica para o cálculo do número total de células (N), pôde-se criar tabelas e gráficos demonstrativos da proliferação celular em

função dos períodos de tempo aplicados (12, 24, 48 e 72 horas) e das drogas testadas hPTH (1-34), TNF- α e ambos).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS APOPTÓTICAS (FACScan)

4.6.1 Densidade de Semeadura das Células

As células foram tripsinizadas, conforme já descrito, e plaqueadas em uma densidade de 10^4 células por placa. Foram utilizadas neste experimento placas de cultivo celular do tipo Petri, de 90 mm de diâmetro (Corning Incorporated, Corning, NY, USA). Após o plaqueamento, aguardou-se o prazo de 24 horas para o assentamento das células, antes do início dos tratamentos.

4.6.2 Grupos Experimentais

Para este experimento, cujo objetivo foi investigar o comportamento das células, induzidas ou não à apoptose, em presença do hPTH (1-34), estabeleceram-se 4 grupos experimentais, descritos detalhadamente nos quadros abaixo:

Grupo TNF- α

Células (induzidas à apoptose) tratadas continuamente por 24 horas com o TNF- α a 10^{-9} M durante 5 dias.

Grupo PTH (1-34)

Células tratadas intermitentemente por 15 minutos diários com o hPTH (1-34) a 10^{-9} M durante 5 dias.

Grupo PTH (1-34)/TNF- α (Grupo PTH/TNF)

Células (induzidas à apoptose) tratadas continuamente por 24 horas com o TNF- α a 10^{-9} M e tratadas intermitentemente por 15 minutos diários com o hPTH (1-34) a 10^{-9} M durante 5 dias.

Grupo Controle

Células que não receberam qualquer tipo de tratamento, apenas foram submetidas às trocas de meio de cultivo durante os 5 dias.

Após o assentamento das células, o meio de cultivo (MEM- α suplementado) do grupo TNF- α foi aspirado e um novo meio de cultivo, contendo TNF- α em uma concentração de 10^{-9} M foi adicionado às células, permanecendo por 24 horas. Em seguida, o meio de cultivo do grupo TNF- α foi removido, as células foram lavadas 3 vezes com PBS estéril e receberam novamente novo meio de cultivo, contendo o TNF- α a 10^{-9} M que permaneceu mais 24 horas em contato com a população celular, e assim sucessivamente até se completar 5 dias de tratamento com a droga TNF- α . No grupo hPTH (1-34) o meio de cultivo foi substituído por um novo meio, contendo hPTH (1-34) por apenas 15 minutos, então procederam-se as lavagens com PBS estéril e um meio de cultivo fresco e sem a droga foi adicionado a estas células. Isto se repetiu até a conclusão do experimento. E, para o grupo hPTH (1-34)/TNF- α o meio de cultivo foi substituído por um meio contendo previamente TNF- α a 10^{-9} M que permaneceu 24 horas no cultivo e que após este período foi removido, permitindo a lavagem das células com PBS estéril e a subsequente aplicação do meio, contendo hPTH (1-34) a 10^{-9} M por apenas 15 minutos. Enquanto que, no grupo controle realizaram-se apenas as trocas do meio de cultivo por meio fresco nos mesmos momentos de substituições ocorridas nos demais grupos, visando padronizar o experimento.

Os experimentos envolvendo os grupos experimentais supracitados foram repetidos 9 vezes em triplicatas.

4.6.3 Leitura no Citômetro de Fluxo – FACScan

Para a análise do DNA, no exato momento em que estes experimentos foram concluídos, as células foram tripsinizadas e transferidas das placas de cultivo para tubos de centrifugação de 15 mL (Corning Incorporated, N.Y.,U.S.A.), em seguida foram centrifugadas, e o seu sobrenadante foi removido, acrescentando-se ao tubo de centrifugação contendo o “*pellet*” de células a solução tampão de citrato de sódio a 0,1%, contendo iodeto de propídeo 50µg/mL e Triton X-100 a 0,1% (Nicoletti *et al.*, 1997) por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, 50 µL desta solução de células e tampão foram transferidas para tubos específicos de leitura e levadas para análise no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA., U.S.A.) (Fig. 4.8.2 B) lotado no laboratório de Fisiologia, chefiado pelo Prof. Dr. Rui Curi do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP-SP). Os dados obtidos (tabelas e histogramas) foram capturados e analisados pelo programa de informática *CellQuest*.

Em decorrência do processo de apoptose, caracterizado por uma clivagem da cromatina entre os nucleossomos por endonucleases específicas, observa-se uma fragmentação excessiva do DNA em subunidades oligossomais (Wyllie *at al.*, apud Nicoletti *et al.*, 1991). As células apresentam diferentes conteúdos de fluorescência, dependendo diretamente da sua viabilidade. O iodeto de propídeo é excitável por laser argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560-580 nm (FL2). Este fluorocromo, por meio do rompimento das células após exposição ao tampão de lise, se ligou ao DNA e as células contendo núcleos íntegros emitiram alta fluorescência. Já, as células com fragmentação do DNA puderam ser observadas pela ocorrência de eventos com baixa fluorescência. Isto se deve a menor marcação do DNA lesado.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística foi empregada tanto para os experimentos analisados por meio de contagem em câmara de Neubauer quanto para os experimentos analisados pelo citômetro de fluxo, visando fazer um comparativo de grupos usando distribuição de probabilidade por meio do teste de hipótese, utilizando o pacote ferramenta de análise de dados (estatística descritiva, ANOVA e teste F) do programa de informática Microsoft Excel.

4.8 FIGURAS RELACIONADAS AO CULTIVO CELULAR

A descrição da figuras encontra-se a seguir, no verso desta página.

Figura 4.8.1 A - Fotografia de microscópio invertido de fase
(Wilowerts S/ WILL I, Hund Wetzlar, Alemanha).

Figura 4.8.1 B – Fotografia de capela de fluxo laminar
(VECO/ Campinas, São Paulo, Br).

Figura 4.8.1 C – Fotografia de incubadora
(Forma Scientific Inc., Ohio, U.S.A.) – visão interna.

Figura 4.8.1 D – Fotografia de incubadora
(Forma Scientific Inc., Ohio, U.S.A.) – visão externa.

Figura 4.8.1 E – Fotografia de placas de cultivo celular de 6 poços (6 *well plates*)
(TPP®, Trasadingen, Suíça).

Figura 48.1 F - Fotografia de Placas de cultivo celular do tipo Petri, de 90 mm de diâmetro (Corning Incorporated, Corning, NY, USA).

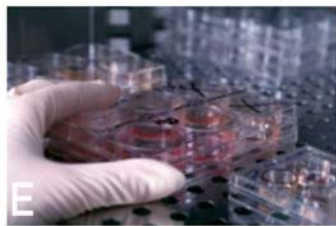


Figura 4.2

Descrição de figuras no verso desta página.

Figura 4.8.2. A – Fotografia da câmara de Neubauer
(Baxter Healthcare Corporation, Mc Gaw Park, IL., U.S.A.).

Figura 4.8.2 B – Fotografia do citômetro de fluxo FACScan
(Becton Dickinson, San Jose, CA., U.S.A.).



Figura 4.3

5. RESULTADOS

QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS POR MEIO DA CÂMARA DE NEUBAUER

A partir do tempo zero, quando as células foram plaqueadas em 4 poços (4×10^4 células por poço) de placas de cultivo de 6 poços, houve um aumento no número celular em todos os grupos, exceto no grupo tratado exclusivamente com o TNF- α .

A tabela 5.1 descreve a síntese dos valores obtidos a partir dos valores médios, de todas as triplicatas dos 6 experimentos (n=6) independentes, considerando a amostragem dos experimentos analisados na câmara de Neubauer.

Tabela 5.1 - Valores médios das triplicatas, dos experimentos (n=6) frente aos tratamentos versus tempo – Câmara de Neubauer

AMOSTRA / DROGA	TNF α	hPTH(1-34)	PTH/TNF*	Controle
Experimento 1	17640	292000	61200	241600
Experimento 2	12280	416000	58800	289600
Experimento 3	21640	257600	37200	188800
Experimento 4	18400	312000	61200	291600
Experimento 5	12280	436000	62600	287600
Experimento 6	16920	309600	34800	238800

Fonte: Média da amostragem da contagem na câmara de Neubauer.

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

A figura 5.1 descreve um gráfico comparativo entre os experimentos, demonstrando que existe uma forte correlação de igualdade entre os experimentos, conforme o padrão de repetição em cada tratamento.

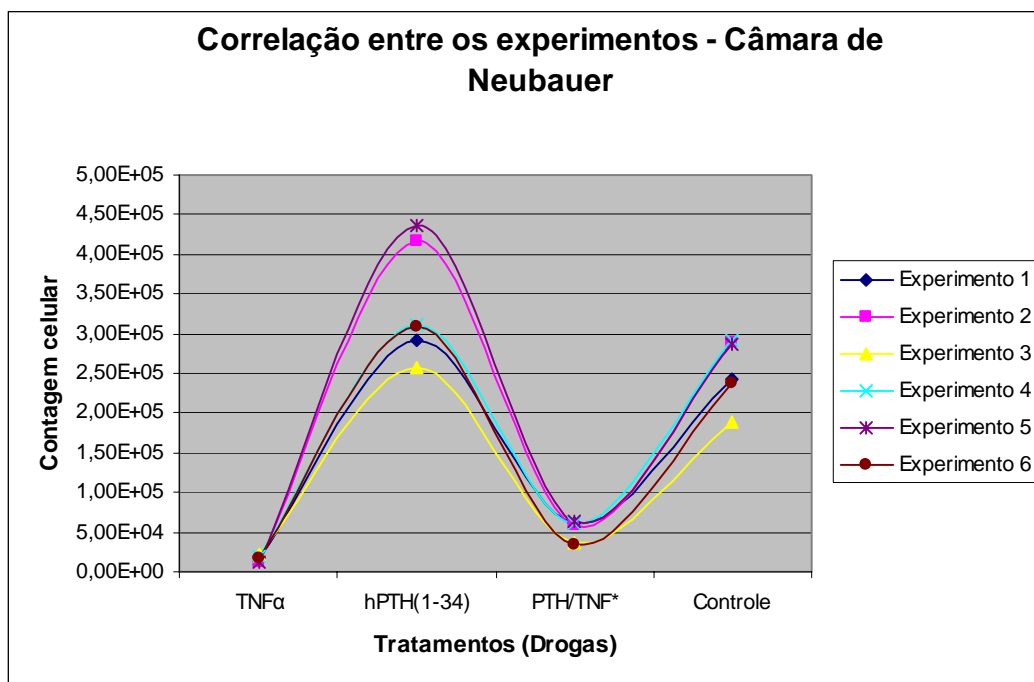


Figura 5.1 – Gráfico da dispersão média da homogeneidade entre os 6 experimentos independentes (n=6).

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

Outra consideração refere-se à correlação entre os experimentos, estabelecida pelo método do Coeficiente de Correlação de Pearson. Por este método se realizou um comparativo dos experimentos, um a um. Pearson diz que valores entre 0,6 e 1,0, estabelecem um forte correlação entre os dados, e que a medida que os valores se aproximam de 0, descreve-se uma fraca correlação entre os experimentos. Portanto, comparando-se os 6 experimentos analisados por meio da câmara de Neubauer, obteve-se uma correlação forte entre os experimentos, conforme demonstrado na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Coeficiente de Correlação de Pearson, comparativo entre os tratamentos.

	TNFalfa	hPTH(1-34)	PTH/TNF	Controle
Experimento 1	1	0,69	0,66	0,77
Experimento 2	0,89	1	0,56	0,77
Experimento 3	0,83	0,73	1	0,77
Experimento 4	1	0,74	0,56	1
Experimento 5	0,66	0,60	1	1
Experimento 6	0,68	1	1	0,68

Fonte: Amostragem da contagem na câmara de Neubauer

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

Baseando-se novamente na tabela 5.1, pôde-se reduzir os valores médios das triplicatas dos 6 experimentos ao ponto médio da amostragem, demonstrando a diferença entre os comportamentos das células nos diferentes tratamentos empregados, conforme descrito em Materiais & Métodos, item 4.5., representado pelo gráfico da figura 5.2, a seguir:

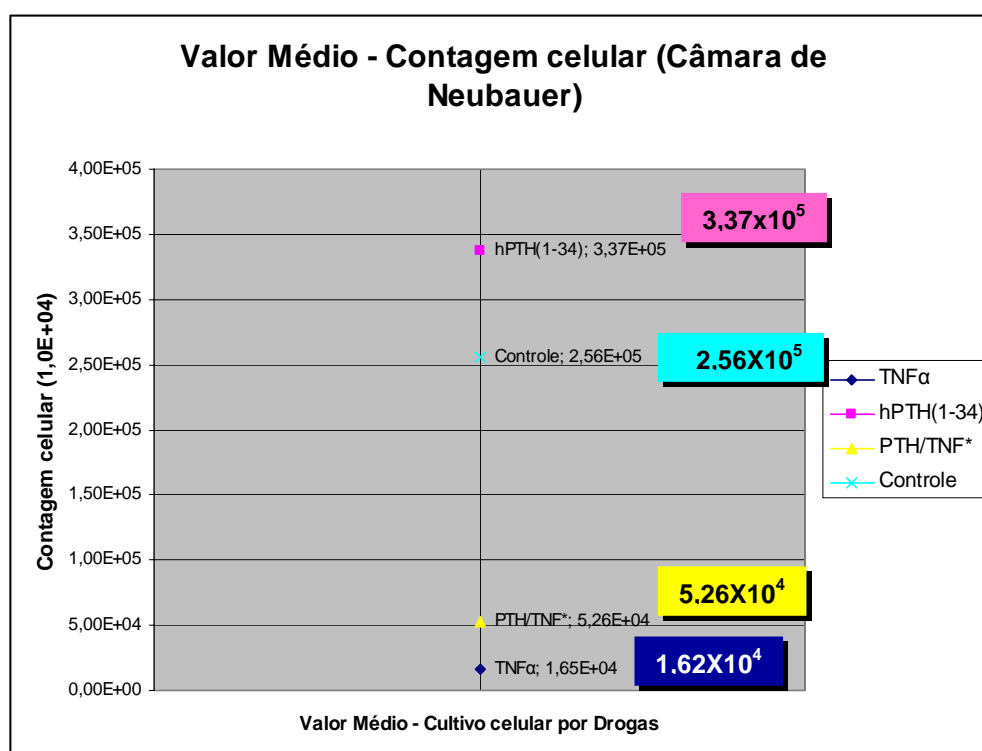


Figura 5.2 - Gráfico da Dispersão (XY) do ponto médio da proliferação de células osteoblásticas em cultura submetidas a diferentes tratamentos. Os dados obtidos representam a média de triplicatas de 6 experimentos (n=6) independentes. A densidade de plaqueamento inicial foi de 4×10^4 células/mL.

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α .

Análise da variância entre os experimentos (n=6)-Câmara de Neubauer

A ferramenta ANOVA é um procedimento estatístico de análise da variância (ANOVA). Neste caso, especificamente, utilizou-se a ferramenta ANOVA Fator Único para testar a homogeneidade (igualdade) entre os experimentos (n=6), baseando-se na tabela resumida 5.3.

Para que os experimentos sejam considerados homogêneos na variância é necessário que o valor de F seja menor que o valor do F crítico, para se admitir a hipótese de que os grupos testados são iguais. Testando os grupos hPTH (1-34) e Controle, verificou-se que apesar de variâncias diferentes não há diferença estatística entre estes dois grupos, pois o valor de $F(=2,5)$ foi MENOR que o valor do F Crítico ($=2,9$). ($P=0,1$).

Tabela 5.3 - ANOVA Fator Único comparativo entre os experimentos

Anova: fator ÚNICO EXPERIMENTOS - NEUBAUER

RESUMO	Contagem	Soma	Média	Variância
Experimento 1	4	612440	153110	1,8E+10
Experimento 2	4	776680	194170	3,7E+10
Experimento 3	4	505240	126310	1,3E+10
Experimento 4	4	683200	170800	2,3E+10
Experimento 5	4	798480	199620	3,9E+10
Experimento 6	4	600120	150030	2,1E+10

ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Experimentos	1,58E+10	5	3,15E+09	2,5	0,1	2,9
Erro	1,93E+10	15	1,29E+09			
Total	4,71E+11	23				

Fonte: Pesquisa de campo. Aplicativo MS-Excel 2003, Ferramenta de Análise ANOVA Fator único (2005).

Para quantificar as células foram testados distintos tempos de cultivo (12 h, 24 h, 48h e 72h). A tabela 5.4, a seguir, descreve a resposta proliferativa das

células, por meio de contagem celular em câmara de Neubauer, frente aos diferentes tratamentos em seus respectivos tempos, iniciando em 0h e após os períodos de 12, 24, 48 e 72 horas.

Tabela 5.4 - Valores médios de contagem celular por tempo de cultivo

Horas/Média	TNF α	hPTH(1-34)	PTH/TNF*	Controle
0h	4,00E+04	4,00E+04	4,00E+04	4,00E+04
12h	1,95E+04	1,96E+05	2,40E+04	2,67E+04
24h	1,31E+04	3,97E+05	4,33E+04	2,67E+05
48h	5,93E+03	4,70E+05	7,27E+04	3,63E+05
72h	4,07E+03	5,83E+05	8,32E+04	5,85E+05

Fonte: Amostragem da contagem na câmara de Neubauer

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

4,00E+04: Notação científica correspondente a 4×10^4 células

5,85E+05: Notação científica correspondente a $5,85 \times 10^5$ células

Aplicando-se os valores demonstrados na tabela 5.4, elaborou-se o gráfico da figura 5.3 que representa as médias das triplicatas por tempo de cultivo, no qual se observam diferentes situações entre a amostragem de seis experimentos independentes (n=6). Para cada um dos seis experimentos, observou-se que os grupos experimentais apresentaram comportamentos distintos entre eles e que houve uma tendência similar para os mesmos tratamentos (Grupos) entre os experimentos. Analisando os resultados obtidos nota-se que as células tratadas com o TNF- α (Grupo TNF- α) foram realmente induzidas à apoptose e que o grupo tratado exclusivamente com o hPTH (1-34) (Grupo hPTH 1-34) mostrou maior proliferação celular quando comparado aos demais grupos, enquanto que as células induzidas à apoptose com o TNF- α e subsequentemente tratadas com o hPTH (1-34) (Grupo hPTH 1-34/TNF- α) apresentaram redução na taxa de mortalidade.

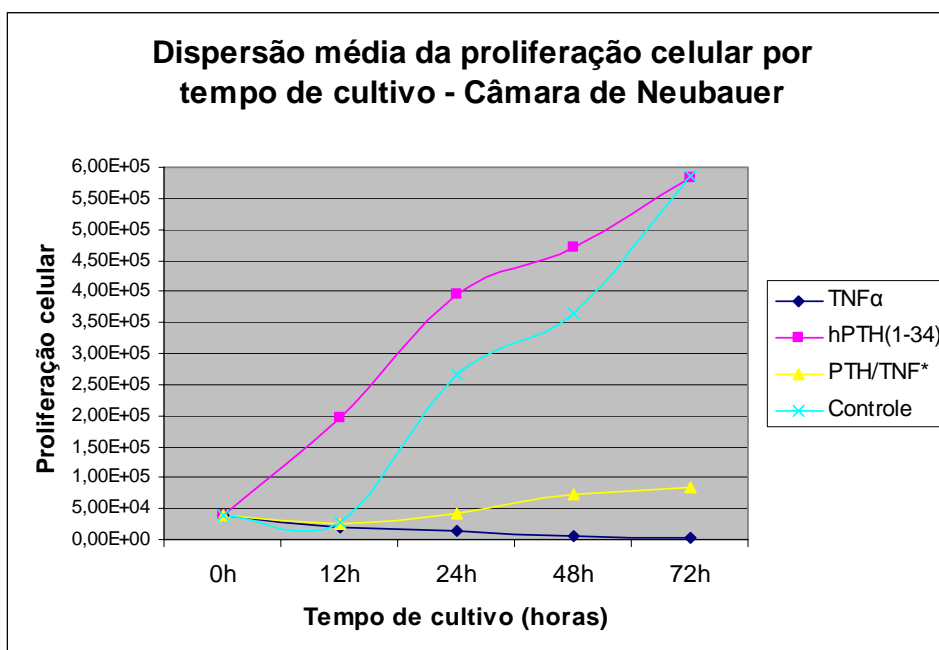


Figura 5.3 - Gráfico da Dispersão Média, exemplificativo das tendências da proliferação celular nos diferentes tratamentos, considerando todos os experimentos ($n=6$), contendo 3 réplicas cada.

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

Análise da variância entre os tratamentos - Câmara de Neubauer

A ferramenta ANOVA Fator Único também foi empregada para testar a homogeneidade (igualdade) entre os tratamentos, considerando-se às respostas celulares. Com base na tabela resumida 5.5, obteve-se o valor de $F(=113,0)$ que foi MAIOR que o valor do F Crítico ($=3,3$), rechaçando a hipótese de igualdade e configurando a clara heterogeneidade (diferença) entre os tratamentos. A probabilidade das médias dos dois grupos, em 95% dos casos, indicaram que os grupos foram homogêneos (iguais) ($P=0,0$).

Tabela 5.5 - ANOVA Fator Único comparativo entre os tratamentos

Anova: fator ÚNICO - TRATAMENTOS NEUBAUER

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
TNFalfa	6	99160	16526,7	1,3E+07
hPTH(1-34)	6	2023200	337200,0	5,1E+09
PTH/TNF	6	315800	52633,3	1,7E+08
Controle	6	1538000	256333,3	1,7E+09

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Tratamentos	4,36E+11	3	1,45E+11	113,0	0,0	3,3
Erro	1,93E+10	15	1,29E+09			
Total	4,71E+11	23				

Fonte: Pesquisa de campo. Aplicativo MS-Excel 2003, Ferramenta de Análise ANOVA Fator único (2005).

QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS POR MEIO DE CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi realizada com uma amostragem de nove experimentos independentes (n=9), contendo três repetições cada um. A solução de células foi submetida à leitura no citômetro de fluxo FACScan, após preparo prévio, conforme descrito no item 4.6.3, em Materiais & Métodos. Os dados obtidos (valores numéricos e seus respectivos histogramas) foram reproduzidos na figura 5.4. e foram descritos na tabela 5.6, representativo de todos os experimentos por cada um dos tratamentos. A partir destes valores, procedeu-se também a uma análise estatística descritiva para estes experimentos, com base na tabela 5.8.

Tabela 5.6 - Médias aritméticas dos percentuais de viabilidade celular frente aos tratamentos - Citômetro de Fluxo.

	TNFalfa	hPTH(1-34)	PTH/TNF*	CONTROLE
Exper 1	6,3	97,9	58,2	96,9
Exper 2	4,8	98,8	58,6	97,0
Exper 3	3,3	97,8	60,3	97,1
Exper 4	2,4	98,4	58,4	96,3
Exper 5	5,9	98,5	59,1	96,7
Exper 6	5,7	97,9	57,4	96,8
Exper 7	5,8	98,5	59,8	96,3
Exper 8	4,3	98,9	59,7	96,0
Exper 9	3,3	98,4	60,2	97,6

Fonte: Pesquisa de campo, citômetro de fluxo % (2005).

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α .

Assim como apresentado para a câmara de Neubauer, procedeu-se inicialmente a uma análise comparativa entre os experimentos analisados pelo citômetro de fluxo.

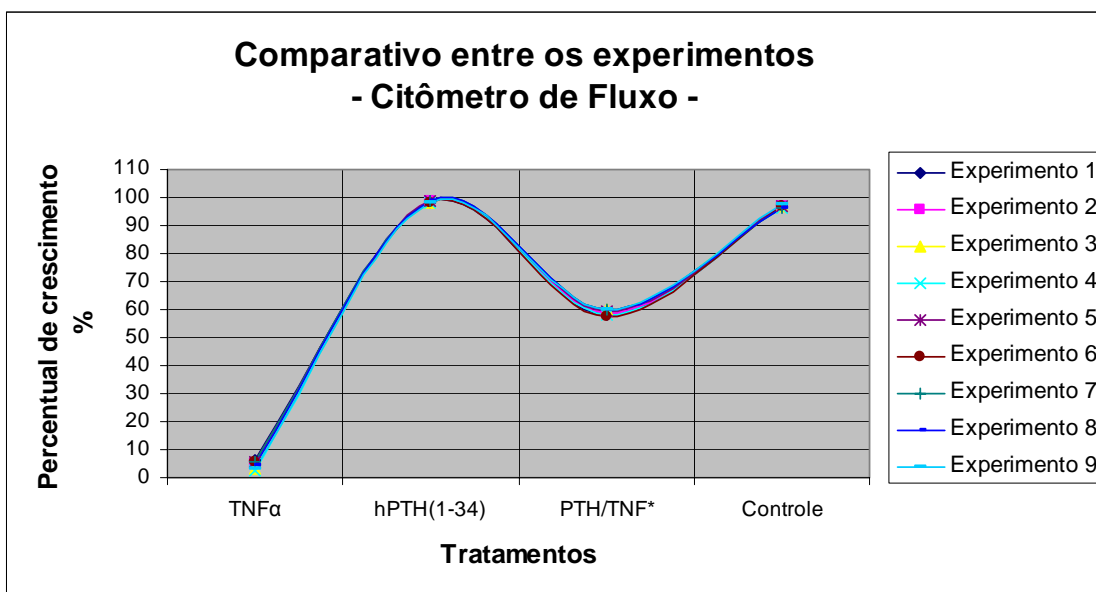


Figura 5.5 - Gráfico da Dispersão e Regressão (XY), demonstrativo de uma relação de perfeita homogeneidade entre as triplicatas de 9 experimentos independentes (n=9), indicativa de alta reprodutibilidade experimental. PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α .

A figura 5.5, acima, baseada na tabela de dados 5.6 descreve um comparativo da correlação de igualdade entre os 9 experimentos.

Empregando-se para este caso, o Coeficiente de Correlação de Pearson, para comparação entre estes experimentos analisados em citômetro de fluxo, obteve-se uma correlação que além de perfeita foi forte entre todos os experimentos (98%: perfeita e forte).

Tabela 5.7 - Coeficiente de correlação de Pearson, comparativo entre os tratamentos.

	TNF	PTH	PTH/TNF	Controle
Experimento 1	1	0,98	0,98	0,98
Experimento 2	0,98	1	0,98	0,98
Experimento 3	0,98	0,98	1	0,98
Experimento 4	0,98	0,98	0,98	1
Experimento 5	1	0,98	0,98	0,98
Experimento 6	1	1	0,98	1
Experimento 7	0,98	0,98	1	0,98
Experimento 8	1	0,98	0,98	0,98
Experimento 9	0,98	0,98	1	0,98

Fonte: Amostragem da contagem em citômetro de fluxo.

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α .

Análise da variância entre os experimentos (n=9)-Citômetro de fluxo

Para que os experimentos (n=9) sejam considerados homogêneos na variância é necessário que o valor de F seja menor que o valor do F crítico, para se admitir a hipótese de que os experimentos são iguais. Logo, testando-se os dados descritos na tabela resumida 5.7, verificou-se que apesar de variâncias diferentes não há diferença estatística entre eles, pois o valor de $F(=0,6)$ foi MENOR que o valor do F Crítico ($=2,4$). ($P=0,8$).

Tabela 5.8- ANOVA Fator Único comparativo entre os experimentos

Anova: fator único para EXPERIMENTOS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
Experimento 1	4	259,3	64,8	1863,9
Experimento 2	4	259,2	64,8	1943,8
Experimento 3	4	258,5	64,6	1978,2
Experimento 4	4	255,5	63,9	2017,5
Experimento 5	4	260,2	65,1	1884,9
Experimento 6	4	257,8	64,5	1888,9
Experimento 7	4	260,4	65,1	1877,9
Experimento 8	4	258,9	64,7	1940,8
Experimento 9	4	259,5	64,9	2002,7

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Experimentos	4,4	8	0,5	0,6	0,8	2,4
Erro	22,3	24	0,9			
Total	52200,3	35				

Considerando-se, a partir de agora, os distintos tratamentos aplicados ao cultivo celular, conforme descrito em Materiais & Métodos, item 4.6., procedeu-se a síntese dos valores fornecidos pelo programa de informática *CellQuest*, após leitura da emissão de fluorescência pelas células. Estes valores médios estão descritos na tabela 5.9 e representados na figura 5.6, na qual se observa o ponto médio que sintetiza o percentual de viabilidade para cada tratamento.

Tabela 5.9 - Estatística descritiva percentual obtida do Citômetro de Fluxo

<i>Estatística Descritiva</i>				
	TNF	hPTH	PTH/TNF	CONTROLE
Média	4,7	98,4	59,1	96,7
Erro padrão (SE)	0,5	0,1	0,3	0,1571
Mediana	4,8	98,4	59,1	96,8
Modo	3,3	98,4	#N/D	96,3
Desvio padrão	1,4	0,4	1,0	0,5
Variância da amostra	1,9	0,2	1,0	0,2
Curtose	-1,4	-1,2	-1,0	-0,2
Assimetria	-0,4	0,0	-0,3	0,2
Intervalo	3,9	1,1	2,9	1,5
Mínimo	2,4	97,8	57,4	96,0
Máximo	6,3	98,9	60,3	97,6
Soma	41,9	885,2	531,7	870,7
Contagem	9,0	9,0	9,0	9,0
Nível de confiança(95,0%)	1,1	0,3	0,8	0,4

Fonte: Pesquisa de campo. Dispositivo: MS- Excel 2003, Ferramenta de Análise (2005).

PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

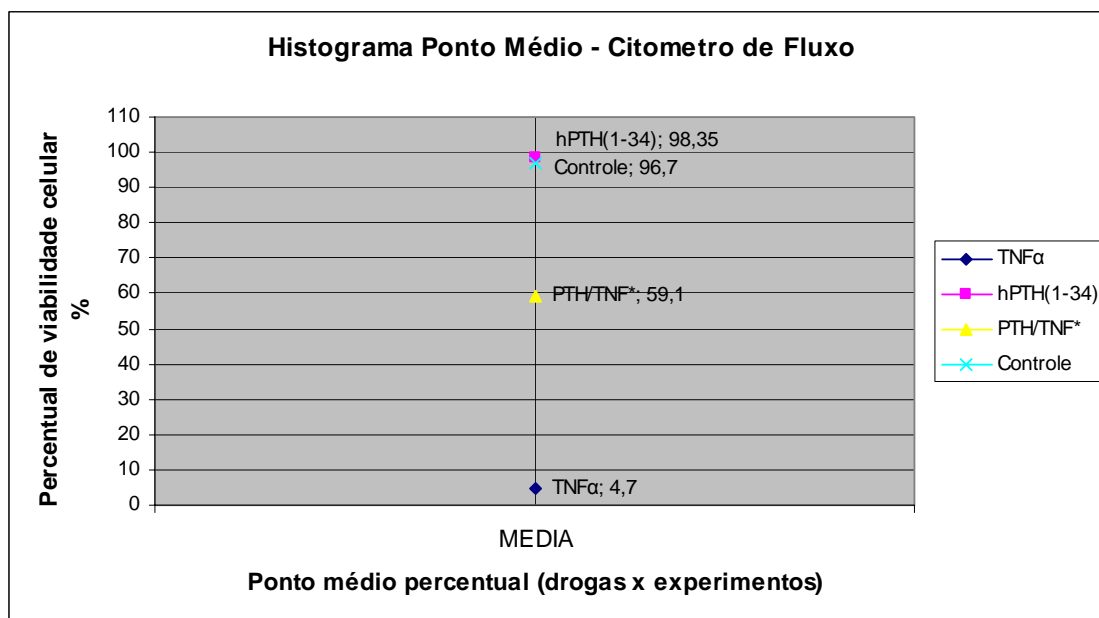


Figura 5.6 - Gráfico do ponto médio da Dispersão e Regressão (XY) da viabilidade das células osteoblásticas em cultura submetidas a diferentes tratamentos. Os dados obtidos representam a média das triplicatas de 9 experimentos (n=9) independentes. PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α .

O tratamento com o hPTH (1-34)/TNF- α inibiu a morte celular em 59,1%, as células em tratamento com o hPTH (1-34) apresentaram viabilidade de 98,4%, e o grupo Controle, ou seja, as células que não receberam qualquer tipo de tratamento, apresentaram viabilidade de 96,7%. Não há diferenças estatísticas entre o grupo tratado com hPTH (1-34) e o grupo controle ($P < 0,05$).

O teste F é uma ferramenta da estatística descritiva que se aplica a variâncias, enquanto o teste T é adequado à análise de igualdade entre as médias e o teste Z, analisa médias proporcionalmente iguais (valores relativos). Para se determinar a força estatística dos dados, foram utilizados, sobre a Tabela 5.6, os diferentes testes probabilísticos: **Teste F**, **Teste T** e **Teste Z** em todas as matrizes da tabela de dados das drogas empregadas, tomando como a base as réplicas do grupo de hPTH. Neste estudo, em particular, optou-se pelo teste, F por ele apresentar melhor desempenho quando se trabalha com variâncias semelhantes.

Tabela 5.10 - Diferentes testes probabilísticos comparados com o grupo hPTH(1-34)

	TESTE F	TESTE T	TESTE Z
PTH x TNF	0,002	0,0000	0
PTH x			
PTH+TNF	0,016	0,0000	0
PTH x PTH	1	1	0,5
PTH x			
Controle	0,642	0,0002	0,0

Fonte: Pesquisa de campo. Aplicativo MS- Excel 2003, Funções TesteF, TesteT e TesteZ (2005).
PTH/TNF*: hPTH (1-34)/TNF- α

Comparativamente, os testes probabilísticos, por si mesmos, determinam as diferenças entre as diferentes drogas, sendo que o emprego de hPTH (1-34), em todos os testes, é o que mais se aproxima estatisticamente da matriz de dados do grupo de Controle ($F=1$, $T=1$ e $z=0,5$).

Análise da variância entre os tratamentos -Citômetro de fluxo

Tabela 5.10 - ANOVA Fator Único comparativo entre os tratamentos

Anova: fator ÚNICO para TRATAMENTOS

<i>RESUMO</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Variância</i>
TNF	9	41,8	4,6	1,9
PTH	9	885,1	98,3	0,2
PTH+TNF	9	531,7	59,1	1,0
Controle	9	870,7	96,7	0,2

ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Tratamentos	52173,7	3	17391,2	18708,6	0,0	3,0
Erro	22,3	24	0,9			
Total	52200,3	35				

Fonte: Pesquisa de campo. Aplicativo MS- Excel 2003, Ferramenta de Análise ANOVA Fator único (2005).

Para que os tratamentos sejam considerados homogêneos na variância é necessário que o valor de F seja menor que o valor do F crítico, para se admitir a hipótese de que os tratamentos são iguais. Desta forma, testando-se os dados descritos na tabela resumida 5.8 verificou-se que há uma diferença estatística entre eles, pois o valor de $F(=18708,6)$ foi MAIOR que o valor do F Crítico ($=3,0$). ($P=0,0$). Em suma, os tratamentos imprimiram diferenças no comportamento das células, por meio da indução à apoptose no caso do TNF- α e por inibir a morte em células induzidas à apoptose (Grupo hPTH(1-34)/ TNF- α).

Figura 5.4.A - Histograma demonstrativo da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2-H) pelos osteoblastos que foram induzidos à apoptose pelo TNF- α . M1 representa a porcentagem de células apoptóticas e M2 representa as células viáveis.

Figura 5.4.B - Histograma demonstrativo da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2-H) pelos osteoblastos que não foram induzidos à apoptose e que receberam tratamento com o hPTH (1-34). M1 representa a porcentagem de células apoptóticas e M2 representa as células viáveis.

Figura 5.4.C - Histograma demonstrativo da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2-H) pelos osteoblastos que foram induzidos à apoptose pelo TNF- α e posteriormente submetidos ao tratamento intermitente com hPTH (1-34) a 10^{-9} M por 5 dias. M1 representa a porcentagem de células apoptóticas e M2 representa as células viáveis.

Figura 5.4.D - Histograma demonstrativo da intensidade de fluorescência emitida no comprimento de onda 560-580 nm (FL2-H) pelos osteoblastos que não foram submetidos a qualquer tratamento (Grupo Controle). M1 representa a porcentagem de células apoptóticas e M2 representa as células viáveis.

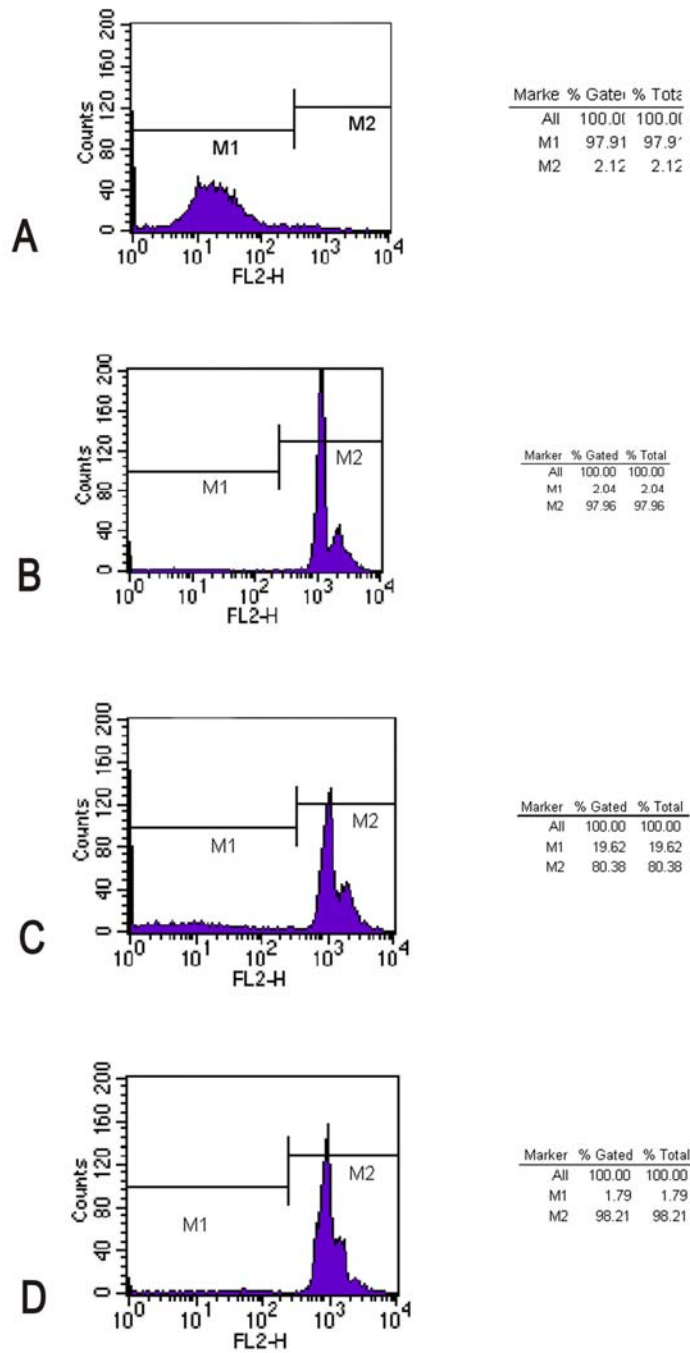


Figura 5.4

FIGURAS RELATIVAS À IMUNOFLUORÊSCÊNCIA

Figura 5.7 A - Célula osteoblástica induzida ao fenótipo osteoblástico e submetida à imunocitoquímica. Presença de marcação intensa pelo colágeno tipo I, caracterizada na forma de vesículas dispersas pelo citoplasma e especialmente concentradas ao redor do núcleo (630 X).

Figura 5.7 B - Células osteoblásticas induzidas ao fenótipo osteoblástico e submetidas à imunofluorescência. Imunoreação positiva intensa para a fibronectina (FN), caracterizada por marcação difusa pelo citoplasma e também por marcação em forma de rede (400 X).

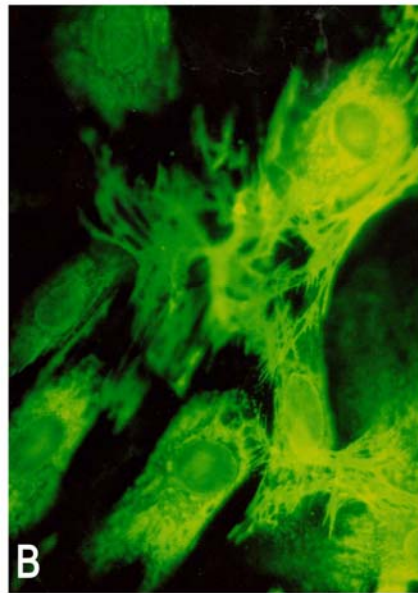
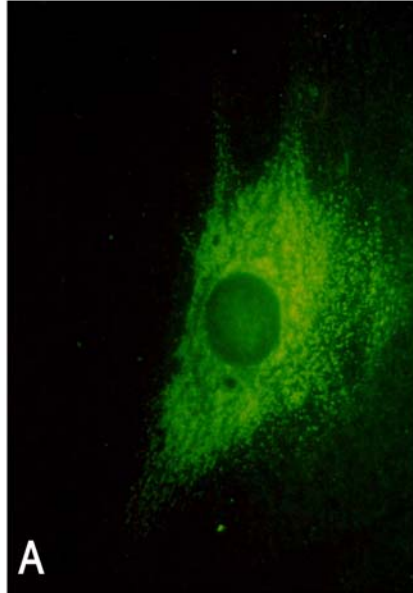


Figura 5.9

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, elegeu-se como modelo culturas primárias de osteoblastos normais de rato e que apresentavam fenótipo de células maduras. O modelo *in vitro* vem sendo amplamente empregado em investigações sobre o efeito intermitente do paratormônio em osteoblastos (Brighurst & Potts, 1981; MacDonald *et al.*, 1986; Canalis *et al.*, 1989; Linkhart & Mohan, 1989; Civitelli *et al.*, 1994; Bos *et al.*, 1996; Isogai *et al.*, 1996; Sabatini *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1997; Jilka *et al.*, 1998; Koh *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 2001; Fujita *et al.*, 2002; Ferrari *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2005; Koh *et al.*, 2005). Observações *in vivo* e *in vitro* das respostas dos osteoblastos frente a tratamentos pulsáteis com o hPTH (1-34) representaram, considerando-se certas discrepâncias da literatura, estratégias na investigação da apoptose em células ósseas (Jilka *et al.*, 1999; Stanislaus *et al.*, 2000). Nesta pesquisa, em especial, o cultivo de células favoreceu a indução das células à apoptose, cuja possível inibição pelo paratormônio era o foco principal deste estudo, uma vez que a apoptose, segundo Jilka e colaboradores (1998) parece ser o destino natural de 50-70% dos osteoblastos e, apenas a minoria se torna osteócitos ou células de revestimento ósseo (periósteo ou endósteo) (Parfitt, 1990 *apud* Jilka *et al.*, 1998).

Brighurst & Potts (1981) investigando a síntese de colágeno promovida pelo fragmento (1-34) do paratormônio *in vitro* relataram a utilidade do sistema de cultivo de calvária de camundongos em mimetizar a atividade óssea *in vivo*, decorrente de tratamentos com análogos sintéticos do hPTH. Lian & Stein (1992) ressaltaram que o isolamento das células do tecido ósseo em cultura permite otimizar o entendimento da regulação metabólica do osso. De acordo com Freshney (2000), o estudo *in vitro* empregando cultivo celular caracteriza um excelente modelo de estudo devido ao fato de facilitar a padronização da amostra, em decorrência da possibilidade do controle de algumas variáveis, tais como: temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂ e homogeneidade das

amostras. No entanto, este tipo de estudo só pode ser extrapolado para a realidade quando as células em cultivo expressam as suas funções normalmente (Freshney, 2000).

O mecanismo da apoptose ou morte celular programada é deflagrado pela ativação de cascatas de caspases e endonucleases que promovem a fragmentação do DNA cromossômico em pequenos fragmentos oligossomais (rev. por Clarke, 1989; rev. por Sandri e Carraro, 1999). É um processo fisiológico fundamental no desenvolvimento normal embrionário e na homeostase de tecidos adultos (Steller, 1995; Hock et al., 2001), incluindo o tecido ósseo (Noble *et al.*, 1997). A apoptose também desempenha importante função em diversas situações patológicas, tais como, câncer, desordens neurodegenerativas (Raff *et al.*, 1993) e osteoporose (Manolagas, 2000).

No presente estudo as células osteoblásticas foram induzidas com sucesso à apoptose pela adição da citocina TNF- α ao meio de cultivo, contendo 10% de FBS em uma concentração de 10^{-9} M em concordância com os achados de Jilka e colaboradores (1998). A apoptose foi detectada por meio da marcação com o corante azul de Trypan e observação da morfologia celular no hemocítmetro e também pelo emprego da citometria de fluxo (FACSCalibur) conforme descrito por Onishi e colaboradores (1997), Jilka e colaboradores (1998), Stanislaus e colaboradores (2000), Mogi e colaboradores (2004). O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória presente no tecido ósseo (Hill *et al.*, 1997) que desempenha importante papel na remodelação óssea anormal e em doenças ósseas inflamatórias (Stashenko *et al.*, 1991; Manolagas, 1992), assim como em estados patológicos como septicemias, artrite reumatóide, periodontite (Stashenko *et al.*, 1991; Roberts, 1997), infecções pulpares e periapicais com concomitante perda óssea (Tani-Ishii *et al.*, 1995). Relatos científicos demonstraram que circunstâncias como a deficiência de estrogênio aumentava a síntese de TNF- α e IL-1 promovendo a osteoporose (Stashenko *et al.*, 1991). Devido à sua ocorrência natural no microambiente ósseo (Delaney *et al.*, 1994 *apud* Hill *et al.*, 1997; Hock

et al., 2001), o TNF- α vem sendo rotineira e amplamente empregado nos dias de hoje como um potente indutor da apoptose em estudos relacionados aos osteoblastos (Kitajima *et al.*, 1996; Hill *et al.*, 1997; Ali *et al.*, 1999; Jilka *et al.*, 1999; Chae *et al.*, 2000; Sanders & Stern, 2000; Chua *et al.*, 2002., Ahuja *et al.*, 2003).

Jilka e colaboradores (1998) investigando a morte celular programada, estimularam a apoptose em osteoblastos por meio da adição do TNF- α ao meio de cultivo, e quantificaram o número de células apoptóticas empregando métodos distintos, baseados na fragmentação do DNA (rev. por Sandri & Carraro, 1999), como a citometria de fluxo, o TUNEL e também a exclusão por marcação com o corante azul de Trypan a 0,4%. Segundo Jilka e colaboradores (1999) a observação da apoptose é influenciada pela sensibilidade do método de detecção utilizado, após compararem os métodos azul de Trypan e TUNEL, que se mostraram correlatos.

Está estabelecido na literatura que a ação anabólica do paratormônio promove a deposição de tecido ósseo em animais (Hock *et al.*, 1988; Hori *et al.*, 1988; Kimmel *et al.*, 1993; Qi *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 1999; Brommage *et al.*, 1999; Jilka *et al.*, 1999), normalmente ratos e camundongos submetidos a injeções diárias de PTH, assim como em seres humanos (Reeve *et al.*, 1976; Slovik *et al.*, 1986; Neer *et al.*, 1987; Sone *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1997; Dempster *et al.*, 1999; Fujita *et al.*, 1999; Dempster *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2001; Koch *et al.*, 2001). Especialmente em mulheres pós-menopausadas, onde se observa além da neoformação óssea, também aumento significativo na resistência a fraturas (Lindsay *et al.*, 1997; Cosman *et al.*, 2001; Dempster *et al.*, 2001; Neer *et al.*, 2001; Holick, 2005; Lu *et al.*, 2005). Além disso, em cultivos de células que apresentam fenótipo osteoblástico maduro pode-se verificar a síntese de proteínas do tecido ósseo (Bringham & Potts, 1981; Bos *et al.*, 1995; Onishi *et al.*, 1997) e, em alguns casos, dependendo do tempo de tratamento com o PTH, a formação de nódulos de mineralização (Bos *et al.*, 1995; Jilka *et al.*, 1999). O processo de

anabolismo ósseo, no entanto, se deve em parte à manutenção dos osteoblastos pela inibição da apoptose (Hock *et al.*, 2001).

Neste estudo verificou-se que a percentagem de células induzidas à apoptose foi significativamente menor em células que receberam tratamento concomitante e intermitente com o hPTH (1-34), demonstrando que este peptídeo foi capaz de inibir a morte dos osteoblastos, corroborando, desta forma, os trabalhos que indicam o PTH como um agente de anabolismo ósseo, e mais especificamente como um agente anti-apoptótico. Jilka e colaboradores (1999) investigando o anabolismo ósseo promovido pelo hPTH(1-34) empregaram um modelo *in vivo*, submetido à injeções subcutâneas diárias de paratormônio por mais de 4 semanas, no qual verificaram aumento na densidade mineral óssea por meio de radiografias e histomorfometrias, assim como raríssimas apoptoses quando comparados aos grupos controle, empregando em secções ósseas vertebrais não calcificadas o método de marcação dos fragmentos de DNA mediada pela enzima desoxinucleotidil-transferase terminal (TUNEL). Modelos *in vitro* também foram utilizados, como o cultivo de osteoblastos de humanos, de murinos e de camundongos e que foram induzidos à apoptose pela adição de dexametazona ou TNF- α a 10^{-9} M ao meio de cultivo e posteriormente tratados com bPTH(1-34) a 10^{-8} M. Para a determinação da apoptose foi empregada a dupla marcação com o azul de Trypan e o TUNEL, que foram correspondentes, em consistência com os achados de Perry e colaboradores (1997). E, como resultado verificaram a inibição da apoptose nas células expostas intermitentemente ao paratormônio, reportando que a ação anabólica desse hormônio não foi capaz de estimular a formação óssea pelo aumento do número de células.

O mecanismo de ação anabólica deflagrado pelo PTH em osteoblastos é altamente complexo, no qual a ativação de vias independentes e distintas de sinalização intracelular depende diretamente do fragmento PTH utilizado (rev. por Murray *et al.*, 2005). Considerando-se o efeito supressor da

apoptose e o fragmento N terminal (1-34) do paratormônio, o efeito anti-apoptótico parece ocorrer diretamente nos osteoblastos por meio da ligação do hPTH(1-34) a um receptor de membrana (PTHR1) acoplado à proteína G (Swarthout *et al.*, 2001) que estimula exclusivamente a adenil-ciclase (Whitfield *et al.*, 1999), elevando as concentrações do complexo sinalizador adenosina 3'5' monofosfato cíclico (AMPC) que ativa o sistema da proteína-quinase A (PKA) e fosforila proteínas, causando alterações na estrutura e função de proteínas alvo (Sömjen *et al.*, 1990; rev. por Swarthout *et al.*, 2002) e, finalmente, interfere em alguns caminhos da morte celular programada (Rixon *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995) por inibir os mecanismos suicidas nessas células que expressam proteínas G, ativadoras da adenil-ciclase (Turner *et al.*, 1998). Stanislaw e colaboradores (2000) estudando a regulação da apoptose *in vivo* e *in vitro*, caracterizaram a apoptose por meio da marcação com o corante azul de Trypan e observação da morfologia celular no hemocítômetro e também pelo emprego da citometria de fluxo, sugeriram que o PTH sendo administrado em ratos jovens por 28 dias inibiu a apoptose dos osteoblastos, em virtude de um decréscimo da atividade das caspases 2, 3 e 7, e, conseqüentemente impedindo a ativação da seqüência de caspases que finalizam o processo de apoptose.

Outro modo de ação anabólica promovido pelo paratormônio é a estimulação dos osteoblastos à proliferação e diferenciação (MacDonald *et al.*, 1986; Canalis *et al.*, 1989; Linkhart & Mohan, 1989; Fensenfeld *et al.*, 1992; Dempster *et al.*, 1993; Nishida *et al.*, 1994; Dobnig & Turner, 1995; Ejersted *et al.*, 1995; Onya *et al.*, 1995; Sabatini *et al.*, 1996; Onishi *et al.*, 1997; Neer *et al.*, 2001). MacDonald e colaboradores (1986) reportaram como um efeito anabólico do PTH, em células ósseas humanas, a intensa síntese de DNA, indicativa de proliferação celular frente a este hormônio. Outras pesquisas apontam que o aumento do número de osteoblastos parece ser decorrente de um efeito mitogênico do PTH sobre os osteoblastos maduros (Sönjem *et al.*, 1990; Partridge *et al.*, 1995; Swarthout *et al.*, 2002). Testando diferentes fragmentos do PTH *in vitro*, Sönjen e colaboradores (1990) sugeriram que a proliferação dos

osteoblastos frente a este estímulo não ocorre via ativação da adenil-ciclase, mas pelo estímulo da fosfolipase C e proteína-quinase em desacordo com os achados de Sabatini e colaboradores (1996) que sugeriram que a ativação da via adenil-ciclase/proteína-quinase A (AC/PKA) é a principal responsável pelos efeitos proliferativos do PTH. Nishida e colaboradores (1994) examinaram *in vivo* os efeitos intermitentes do hPTH (1-34) em células isoladas de ratos tratados com PTH subcutâneo e sugeriram que este fragmento peptídico induz, pelo menos em parte, ao anabolismo ósseo por meio da proliferação e diferenciação de células osteoprogenitoras da medula óssea. Observações de Onya e colaboradores (1997) indicaram que o tratamento intermitente com o hPTH (1-34) *in vitro* resulta no aumento do número de osteoblastos.

No entanto, os resultados do presente estudo não demonstraram diferença estatística no percentual de proliferação entre as células do grupo controle e as células tratadas de forma intermitente com o PTH. Este dado sugere que houve anabolismo apenas por meio da inibição da apoptose e não por aumento da proliferação celular em concordância com os resultados de Onya e colaboradores (1995), Dobnig & Turner (1995) e Jilka e colaboradores (1999). Lu e colaboradores (2005), investigando o efeito do hPTH(1-34) em uma concentração de 10^{-9} a 10^{-12} M em osteoblastos de camundongo que apresentavam decréscimo na atividade da fosfatase alcalina promovido pela dexametasona, observaram que todas as baixas concentrações de paratormônio estudadas foram capazes de reverter a inibição da atividade enzimática, estimulando, portanto, a proliferação celular, e que a dose de 10^{-11} M foi significativamente superior às demais doses no antagonismo da inibição enzimática induzida. No entanto, nas células que não foram expostas à dexametasona e que foram tratadas com o PTH não se observou qualquer alteração na atividade da fosfatase alcalina, nem aumento da diferenciação e da proliferação celular.

Os resultados em cultivo celular aqui apresentados corroboram os demais trabalhos que indicam o hPTH (1-34) como um inibidor da apoptose em

osteoblastos quando aplicado de forma intermitente. No entanto, novos estudos *in vitro* e *in vivo* se fazem necessários para o melhor entendimento dos mecanismos biológicos e das distintas respostas dos osteoblastos frente ao tratamento anabólico com o PTH (1-34) ou com fragmentos peptídicos de ação similar. Convém aqui salientar a complexidade das interações moleculares que ocorrem durante as vias de sinalização estimuladas pela ligação do paratormônio ao seu receptor nos osteoblastos, bem como a influência do estágio de diferenciação no qual se encontram as células. Além disso, não se pode negligenciar a interferência de fatores moduladores da apoptose presentes no micro-ambiente ósseo, tais como, citocinas e diferentes hormônios.

7. CONCLUSÕES

Baseado na amostra e nos resultados de curva de crescimento e de citometria de fluxo (FACScan) obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A indução à apoptose aplicando-se o TNF- α a 10^{-9} M aos osteoblastos foi bem sucedida, demonstrando baixos níveis de proliferação celular.
- O tratamento intermitente com o hPTH (1-34) a 10^{-9} M não exibiu resultado estatisticamente diferente ao do grupo controle, mas houve uma tendência indicativa de que o uso do hPTH(1-34) resulta em valores maiores que o grupo controle em todas as amostras.
- O tratamento intermitente com o hPTH (1-34) a 10^{-9} M inibiu em torno de 60% a morte celular programada induzida pelo TNF- α .

8. REFERÊNCIAS*

Abou-Samra AB, Juppner H, Force T, Freeman MW, Kong XF, Schipani E. Expression cloning of a common receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide from rat osteoblast-like cells – A single receptor stimulates intracellular accumulation of both cAMP and inositol triphosphates and increases intracellular free calcium. **Proc Natl Acad Sci.** 1992; 86 (1): 2732-6.

Ahuja SS, Zhao S, Bellido T, Plotkin LI, Jimenez F, Bonewald F. CD40 ligand blocks apoptosis induced by tumor necrosis factor {alpha}, glucorticoids, and etoposide in osteoblasts and the osteocyte-like cell line murine long bone osteocyte-y4. **Endocrinology.** 2003; 144(5): 1761-9.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff, M, Roberts K, Watson J. **Cells junctions, cell adhesion and the extracellular matrix.** *In: Molecular biology of the cell.* 3. ed. New York: Garland; 1994. p. 949-1009.

Ali NN, Gilston V, Winyard PG. Activation of NF- κ B in human osteoblasts by stimulators of bone resorption. **FEBS Letters.** 1999; 460(2): 315-20.

Ashkenazi, A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. **Science.** 1998; 281: 1305-8.

Bauerle P A, Henkel T. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. **Ann Rev Immunol.** 1994; 12: 141-179.

* De acordo com a norma utilizada na FOP/UNICAMP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Belows, CG, Aubin JE, Heersche JNM, Antosz E. Mineralized bone nodules formed in vitro enzymatically released rat calvaria cell population. **Calcif Tissue Int.** 1986; 38 (3): 143-54.

Beresford JN, Graves SE, Smoothy CA. Formation of mineralized nodules by bone derived cells *in vitro*: a model of bone formation? **Amer J Med Gen.** 1993; 45(2): 163-78.

Beutler B, Cerami A. The biology of cachetin/TNF- α primary mediator of the host response. **Annu Rev Immunol.** 1988; 7: 625-55.

Beyart R, Fiers W. Tumor necrosis factor and lymphotoxin. *In*: Mire-Sluis A, Thorpe R, editores. **Cytokines.** Academic Press. 1998. p. 336-60.

Bos MP, van der Meer JM, Feyen JHM, Herrmann-Erlee MPM. Expression of the parathyroid hormone receptor and correlation with other osteoblastic parameters in fetal rat osteoblasts. **Calcif Tissue Int.** 1996; 58: 95-100.

Bringhurst FR, Jr Potts, JT. Bone collagen synthesis *in vitro*: structure/activity relations among parathyroid hormone fragments and analogs. **Endocrinology.** 1981; 108(1): 103-8.

Brixen KT, Christensen PM, Ejersted C, Langdahl BL. Teriparatide (byosynthetic human parathyroid hormone 1-34): a new paradigm in the treatment of osteoporosis. **Basic Clin Pharmacol Toxicol.** 2004; 94(6): 260-70.

Brommage R, Hotchkiss CE, Lees CJ, Stancil MW, Hock JM, Jerome CP. Daily treatment with human recombinant parathyroid hormone (1-34), LY 333334, for 1 year increases bone mass in ovariectomized monkeys. **J Clin Endocrinol Metab.** 1999; 84(10): 3757-63.

Brown EM. Mechanisms underlying the regulation of parathyroid hormone secretion in vivo and in vitro. **Curr Opin Nephrol Hypertens.** 1993; 2: 541-51.

Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. **Genes Dev.** 1998; 12:1260-8.

Canalis E, Centrella M, Burch W, McCarthy TL. Insulin-like growth factor I mediates selective anabolic effects of parathyroid hormone in bone cultures. **J Clin Invest.** 1989; 83: 60-65.

Carswell EA, Old LJ, Kasse RL, Green S, Fiore N, Willianson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1975; 72: 3666-70.

Chae HJ, Chae SW, Kang JS, Bang BG, Cho SB, Park RK. Dexamethasone suppresses tumor necrosis factor- α -induced apoptosis in osteoblasts: possible role for ceramide. **Endocrinology.** 2000; 141(8): 2904-13.

Chua CC, Chua BH, Chen Z, Landy C, Hamdy RC. TGF- β 1 inhibits multiple caspases induced by TNF- α in murine osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Biochim Biophys Acta.** 2002; 1593: 1-8.

Clarke, P. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. **Anatomy and embryology.** 1990; 181(3): 195-213.

Civitelli R, Bacasai BJ, Mahaut-Smith MP, Adams SR, Avioli LV, Tsien RY. Single-cell analysis of cyclic AMP response to parathyroid hormone in osteoblastic cells. **J Bone Miner Res.** 1994; 9(9): 1407-17.

Cosman F, Nieves J, Woelfert L. Parathyroid hormone added to established hormone therapy: effects on vertebral fracture and maintenance of bone mass after parathyroid hormone withdrawal. **J Bone Miner Res.** 2001; 16(5): 925-31.

Deboni MCZ, Jaeger MMM, Araújo NSA. Obtenção e caracterização de linhagem de células osteoblásticas. **RPG.** 1996; 3(3); 220-9.

Dempster DW, Cosman F, Parisien M, Shen V, Lindsay R. Anabolic actions of parathyroid hormone on bone. **Endocr Dev.** 1993; 14: 690-709.

Dempster DW, Parisien M, Silverberg SJ, Liang XG, Schnitzer M, Shen V. On the mechanism of cancellous bone preservation in postmenopausal women with mild primary hyperparathyroidism. **J Clin Endocrinol Metab.** 1999; 84(5): 1562-66.

Dempster DW, Cosman F, Kurland ES, Zhou H, Nieves J, Woelfert L. Effects of daily treatment with parathyroid hormone on bone microarchitecture and turnover in patients with osteoporosis: a paired biopsy study. **J Bone Miner Res.** 2001; 16(10): 1844-53.

Dobnig H, Turner RT. Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells. **Endocrinology.** 1995; 136: 3632-38.

Ejersted C, Andreassen TT, Hauge E-M, Melsen F, Oxlund H. Parathyroid hormone (1-34) increases vertebrae bone mass compressive strength, and quality in old rats. **Bone**. 1995; 17(6): 507-11.

Fawcett DW. **Bone**. In: Bloom & Fawcett, A textbook of histology. 12. ed. Great Britain, 1993.

Fensenfeld AJ, Iida-Klein A, Hahn TJ. Interrelationship between parathyroid hormone and insulin: effects on DNA synthesis in UMR-106-01 cells. **J Bone Miner Res**. 1992; 7(11): 1319-25.

Ferrari SL, Pierroz DD, Glatt V, Goddard DS, Bianchi EN, Lin FT et al. Bone response to intermittent parathyroid hormone is altered in mice null for β -arrestin2. **Endocrinology**. 2005; 146(4): 1854-1862.

Fiers W. Tumor necrosis factor: characterization at the molecular, cellular and *in vivo* level. **FEBS Lett**. 1991; 285: 199-212.

Fisher, LW, Termine, JD. Noncollagenous proteins influencing the local mechanisms of calcification. **Clin Orthop**. 1989; 200: 362-85.

Freshney, RI. **Biology of the cultured cell**. In: Cultured of animal cells: a manual of basic technique. 4. ed. New York: Wiley; 2000.

Fromiguè O, Modrowski D, Marie PJ. Growth factors and Bone formation in osteoporosis: roles for fibroblast growth factor and transforming growth factor beta. **Curr Pharm Design**. 2004; 10(21): 2593-2603.

Fujita T, Fukuyama R, Izumo N, Hirai T, Meguro T, Nakamuta H *et al.* Transactivation of core binding factor alpha1 as a basic mechanism to trigger parathyroid hormone-induced osteogenesis. **Jpn J Pharmacol.** 2001; 86 (4): 405-16.

Fujita T, Meguro T, Fukuyama R, Nakamuta H, Koida M. New signaling pathway for parathyroid hormone and cyclic AMP action on extracellular-regulated kinase and cell proliferation in bone cells. **J Biol Chem.** 2002; 277(25): 22191-200.

Ganong WF. Controle hormonal do metabolismo do cálcio e fisiologia do osso. *In:* **Fisiologia Médica.** 17. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

Genuth M. Endocrine regulation of calcium and phosphate metabolism. *In:* Berne, RM, Levy MN. **Physiology.** 1. ed. St. Louis: Mosby, 1998. p. 848-71.

Glimcher MJ. Mechanisms of calcification: Role of collagen fibrils and collagen-phosphoprotein complexes in vitro and in vivo. **Anat Rec.** 1989; 24(2): 139-53.

Goltzman D. Interactions of PTH and PTHrP with the PTH/PTHrP receptor and downstream signaling pathways: exceptions that provide the rules. **J Bone Miner Res.** 1999; 14: 173-7.

Gracitelli MEC, Vidoris AAC, Luba R, Lazaretti-Castro M. Paratormônio e osteoporose: encontrando o fio da meada. Bases fisiológicas para utilização do PTH no tratamento da osteoporose. **Arq Bras Endocrinol Metab.** 2002; 46(3): 1-11.

Gravielli Y, Sherman Y, Bem-Sassone. Identification of programmed cell death *in situ* via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. **J Cell Biol.** 1992; 119(3): 493-501.

Greenfield EM, Gornick SA, Horowitz MC, Donahue HJ, Shaw S. Regulation of cytokine expression in osteoblasts by parathyroid hormone: rapid stimulation of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA. **J Bone Miner Res.** 1993; 8(10): 1163-71.

Habener JF, Rosenblatt M, Jr Potes JT. Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, actions, and metabolism. **Physiol Rev.** 1984; 64(3): 985-1053.

Heershe JN, Reimers SM, Wrana JL, Wane, MY, Gupte AK. Changes in expression of alpha 1 type 1 collagen and osteocalcin mRNA in osteoblasts at different stages of maturity as shown by *in situ* hybridization. **Proc Finn Dent Soc.** 1992; 88(1): 173-82.

Hill PA, Tumber A, Meikle MC. Multiple extracellular signals promote osteoblast survival and apoptosis. **Endocrinology**, 1997; 138: 3849-58.

Hirota H, Tuohy NA, Woo JT, Stern PH, Clipstone NA. The calcineurin nuclear factor of activated T cells signaling pathway regulates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. **J Biol Chem.** 2004; 279(140): 13984-92.

Hock JM, Gera I, Fonseca J, Raisz LG. Human parathyroid hormone (1-34) increases bone mass in ovariectomized and orchdectomized rats. **Endocrinology.** 1988; 122: 2899-2904.

Hock JM, Krishnan V, Onya JE, Bidwell JP, Milas J, Stanislaus D. Osteoblast apoptosis and bone turnover. **J Bone Miner Res.** 2001; 16(6): 975-81.

Holick MF. PTH (1-34): a novel anabolic drug for treatment of osteoporosis. **South Med J.** 2005; 98(11): 1114-7.

Hori M. et al. Effect of human parathyroid hormone (1-34) on the experimental osteopenia of rats induced by ovariectomy. **Bone Miner.** 1998; 3: 193-9.

Horiuchi N, Holick MF, Potts JT Jr, Rosenblat M. A parathyroid hormone inhibitor *in vivo*: design and biological evaluation of a hormone analog. **Science.** 1983; 220: 1053-5.

Howard GA et al. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture. **Proc Natl Acad Sci.** 1981; 78: 3204-08.

Ingram, RT, Clarke, BL, Fisher, LW, Fitzpatrick LA. Distribution of non-collagenous proteins in the matrix of adult bone: evidence of anatomic and functional heterogeneity. **J Bone Miner Res.** 1993; 8(9): 1019-29.

Ishizua T, Yokose S, Hori M, Noda T, Suda T, Yoshiki S. Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. **J Clin Invest.** 1997; 99: 2961-70.

Isogai Y, Ishizuya T, Yamaguchi A, Hori M, Takahashi N. Parathyroid hormone regulates osteoblast differentiation positively or negatively depending on the differentiation stages. **J Bone Miner Res.** 1996; 11: 1384-93.

Iu M-F, Kaji H, Naito J, Sowa H. Low-dose parathyroid hormone and estrogen reverse alkaline phosphatase activity supresse by dexamethasone in mouse osteoblastic cells. **J Bone Miner Metab.** 2005; 23: 450-5.

Jilka RL, Weinstein, RS, Bellido T, Parfitt MA, Manolagas S. Osteoblast programmed cell death (apoptosis): modulation by growth factors and cytokines. **J Bone Miner Res.** 1998; 13(5): 793-802.

Jilka RL. Cytokines, bone remodeling, and estrogen deficiency – A 1998 update. Mini-Review. **Bone.** 1998; 23(2): 75-81.

Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas S. Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. **J Clin Invest.** 1999; 104(4): 439-46.

Juppner H, Abou-Samra AB, Freeman M, Kong XF, Scchipiani E, Richards J et al. A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone related peptide. **Science.** 1991; 254: 1024- 6.

Karaplis AC, Luz A, Glowacki J, Bronson RT, Tybulewicz VL, Kronenberg HM et al. Lethal skeleton dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormona-related peptide gene. **Genes Dev.** 1994; 8: 277-89.

Katchburian, E, Arana, V. **Histologia e embriologia oral: texto-atlas correlações clínicas.** 1. ed. São Paulo: Panamericana; 1999.

Kemper O, Wallach D, Engelmann H, Nophar Y, Adeska D. Holtmann H. Soluble and cell surface receptors for tumor necrosis factor. **J Biol Chem.** 1991; 35: 51-7.

Kerr JFR, Wyllie AH, Currie, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging amplifications in tissue kinetics. **Br J Cancer**. 1972; 26: 239-57.

Kimmel DB, Bozatto RP, Kronis KA, Coble T, Syndrey D, Kwong P et al. The effect of recombinant human (1-84) or synthetic human (1-34) parathyroid hormone on the skeleton of adult, osteopenic, ovariectomized rats. **Endocrinology**, 1993; 132: 823-31.

Koh AJ, Beecher CA, Rosol TJ, McCauley LK. 3',5'-Cyclic AMP activation in osteoblastic cells: effects on PTH-1 receptors and osteoblastic differentiation *in vitro*. **Endocrinology**. 1999; 140: 3145-62.

Koh AJ, Demiralp B, Neiva KG, Hooten J, Nohutcu RM, Shim H et al. Cells of the osteoclast lineage as mediators of the anabolic actions of parathyroid hormone in bone. **Endocrinology**. 2005; 146(11): 4584-96.

Lane NE, Kimmel DB, Nilsson HL Magnus, Choen F, Newton S et al. Bone-selective analogs of human PTH (1-34) increase bone formation in an ovariectomized rat model. **J Bone Miner Res**. 1996; 11(5): 614-25.

Lee SK, Lorenzo JA. Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprogenin. **Endocrinology**. 1999; 140: 3552-61.

Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennet GL, Rice GC, Wong GHW et al. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. **Proc Natl Acad Sci USA**. 1991; 88: 2830-4.

Linde, A. Session II: cells and extracellular matrices of the dental pulp. The extracellular matrix of the dental pulp and dentin. **J Dent Res.** 1985; 64(3): 523-29.

Lindsay R, Nieves J, Formica C, Henneman E, Woelfert L, Shen V. Randomized controlled study of effect of parathyroid hormone on vertebral bone mass and fracture incidence among postmenopausal women on estrogen with osteoporosis. **Lancet.** 1997; 350: 550-5.

Linkhart TA, Mohan S. Parathyroid hormone stimulates release of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-II from neonatal mouse calvaria in organ culture. **Endocrinology.** 1989; 125(3): 1484-91.

Locklin RM, Khosla S, Turner RT, Riggs BL. Mediators of biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. **J Cell Biochem.** 2003; 89: 180-90.

Lokshin RA, Zuber Z. Programmed cell death and apoptosis: Origins of the theory. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2001; 2(7): 545-50.

Ma YL, Cain RL, Hallada, LD, Yang C, Zeng Q, Miles R et al. Catabolic effects of continuous human PTH 91-380 *in vivo* is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. **Endocrinology.** 2001; 142(9): 4047-54.

MacDonald BR, Gallagher JA, Russel RG. Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. **Endocrinology.** 1986; 118(6):45-49.

Mannstadt M, Juppner H, Gardella TJ. Receptors for PTH and PTHrP: their biological importance and functional properties. **Am J Physiol.** 1999; 277: 655-75.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: Basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. **Endocr Rev.** 2000; 21: 115-37.

Martin TJ, Ngüenn KW. Mechanisms by which cells of the osteoblastic lineage control osteoclast formation and activity. **J Cell Biochem.** 1994; 56: 357-66.

McClelland P, Onya JE, Miles RR, Tu Y, Liang J, Harvey AK et al. Intermittent administration of parathyroid hormone (1-34) stimulates matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) expression in rat long bone. **J Cell Biochem.** 1998; 70(3): 391-401.

Mogi M, Togari A. Activation of caspase is required for osteoblastic differentiation. **J Biol Chem.** 2003; 278(48): 47477-82.

Moseley JM, Kubota M, Diefenbach-Jaegger H, Wettenhall REH, Kemp BE, Suva LJ et al. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. **Proc Natl. Acad Sci.** 1987; 84: 5048-52.

Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Anabolic effects of parathyroid hormone bone. **Trends Endocrinol Metab.** 1997; 8: 225-31.

Morley P, Whitfield JF, Willick GE. Parathyroid hormone: an anabolic treatment for osteoporosis. **Curr Pharm Des.** 2001; 7(8): 671-87.

Morigana T, Nakagawa N, Yasuda H, Tsuda E, Higashio K. Cloning and characterizing of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor. **Eur J Biochem.** 1998; 254: 685-91.

Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. **J Periodont Res.** 1991; 26: 213-17.

Murray TM, Rao LG, Divieti P, Bringhurst FR. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl-terminal ligands. **Endocr Rev.** 2005; 26(1): 78-113.

Nanes MS, McKoy WM, Marx SJ. Inhibitory effects of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on deoxyribonucleic acid and collagen synthesis by rat osteosarcoma cells (ROS 17/2.8). **Endocrinology.** 1989; 124: 339: 345.

Nanes MS, Rubin J, Titus L, Hendy GN, Catherwood B. Tumor necrosis factor-alpha inhibits 1,25-dihydroxy-vitamin D3-stimulated bone Gla protein synthesis in rat osteosarcoma cells (ROS17/2.8) by a pretranslational mechanism. **Endocrinology.** 1991; 128: 2577-82.

Naranayan, AS, Page, RC. Connective tissue of the periodontium: a summary of current work. **Coll Relat Res.** 1983; 3(1): 33-64.

Neer RM, Arnaud CD, Zanchetta JR, Prince R, Gaich GA, Reginster GY et al. Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. **N Engl J Med.** 2001;344: 434-41.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measurement thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods.** 1997; 139 (1991): 271-9.

Nishida S, Yamaguchi A, Tanizawa T, Endo N, Masiva, Uchiyama Y *et al.* Increased bone formation by intermittent parathyroid hormone administration due to the stimulation of proliferation and differentiation of osteoprogenitor cells in bone marrow. **Bone**.1994; 15(6): 717-23.

Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. **Bone**. 1997; 20(3): 273-82.

Oliveira PT, Zalzal SF, Irie K, Nanci A. Early expression of bone matrix proteins in osteogenic cell cultures. **J Histochem**. 2003; 51: 633-41.

O'Malley WE, Achistein B, Shear MJ. Action of bacterial polysaccharide on tumors II: damage of osteosarcoma 37 by serum of mice treated with *Serratia marcescens* polysaccharide and induced tolerance. **J Natl Cancer Inst**. 1962. 29: 1169-75.

Onishi T, Zhang W, Cao Xu, Hruska K. The mitogenic effect of parathyroid hormone is associated with E2F-dependent activation of cyclin-dependent kinase 1 (cdc2) in osteoblast precursors. **JBMR**. 1997; 12(9): 1596-607.

Onishi T, Hruska K. Expression of p27Kip1 in osteoblast-like cells during different hormone. **Endocrinology**. 1997; 138: 1995-2004.

Onya JE, Bidwell J, Herring J, Hulman J, Hock JM. *In vivo*, human parathyroid hormone fragment (hPTH 1-34) transiently stimulates immediate early response gene expression, but not proliferation, in trabecular bone cells of young rats. **Bone**. 1995; 17: 479-84.

Onya JE, Miller B, Hulman J, Liang J, Galvin R, Frolik C et al. Proliferatin cells in the primary spongiosa express osteoblastic phenotype in vitro. **Bone**. 1997; 20(2): 93-100.

Panagakos FS, Kumar S. Modulation of proteases and their inhibitors in immortal human osteoblast-like cells by tumor necrosis factor-alpha in vitro. **Inflammation**. 1994; 18: 243-265.

Parfitt AM. The actions of parathyroid hormone on bone: Relation to bone remodeling and turn over, calcium homeostasis, and metabolic bone disease. Part III. PTH and osteoblasts, the relationship between bone turnover and bone loss, and the state of the bones in primary hyperparathyroidism. **Metabol Clin Exp**. 1976; 25: 1033-69.

Partridge NC et al. Activation of adenosine 3',5'- monofosfato – dependent protein kinase in normal and malignant bone cells by parathyroid hormone, prostaglandin E₂, and prostacyclin. **Endocrinology**. 1981; 108: 220-25.

Partridge NC, Opie AL, Opie RT, Martin TJ. Inhibitory effects of parathyroid hormone on growth of osteogenic sarcoma cells. **Calcif Tissue Int**. 1985; 37(5): 519-25.

Partridge NC, Bloch SR, Pearman AT. Signal-transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene-expression. **J Cell Biochem**. 1994; 55: 321-7.

Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynk R, Pallidino MA et al. Human tumor necrosis factor: Precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. **Nature**. 1984; 312: 724-29.

Qui H, Li M, Wronski TJ. A comparison of the anabolic effects of parathyroid hormone at skeletal sites with moderate and severe osteopenia in aged ovariectomized rats. **J Bone Miner Res**. 1995; 10: 949-55.

Quin JM, Elliot MT, Gillsepi MT, Martin TJ. A combination of osteoclast differentiation factor and macrophage-colony stimulatoin factor is sufficient for both human and mouse osteoclast formation in vitro. **Endocrinology**. 1998; 139: 4424-27.

Raff MC, Barrers BA, Burne JF, Coles HS, Yshizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. **Science**. 1993; 262: 695-700.

Reeve J et al. Preliminary trial of low doses of human parathyroid hormone 1-34 peptide in treatment of osteoporosis. **Calcif Tissue Res**. 1976; 21: 469-77.

Reeve J *et al*. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: a multicentre trial. **Br Med J**. 1980; 280(6228): 1340-4.

Reginster JY et al. Promising new agents in osteoporosis. **Drugs R D**. 1999; 1(3): 195-201.

Rixon RH, Whitfield JF, Gagnon L, Isaacs RJ, Maclean S, Chakravarthy B. Parathyroid hormone fragments may stimulate bone growth in ovariectomized rats by activating adenyl cyclase. **J Bone Miner Res** .1994; 9(8):1179-89.

Roberts FA, Hockett RD Jr, Bucy RP, Michalek SM. Quantitative assesment of inflammatory cytokine gene expression in chronic adult periodontitis. **Oral Microbiol Immunol**. 1997; 12(6): 336-4.

Robey, PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. **Connect Tissue Res**. 1996; 35(1): 131-6.

Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. **Calcif Tissue Int**, 1981; 33: 349-51.

Roitt I. **Imunologia**. São Paulo: Manole; 1999.

Roldan GA, Heath JK, Rodan SB, Yoon K, Noda M. **Osteoblast phenotypic expression and bone markers**. In: Lindh E, Thorell JL. Clinical Impact of bone and connective tissue markers. Great Britain; Academic Press; 1989. p. 113-20.

Sabatini M, Lesur C, Pacherie M, Pastoureau P, Kucharczyk N, Fauchère JL et al. Effects of parathyroid hormone and agonists of adenyl cyclase and protein kinase C pathways on bone cell proliferation. **Bone**. 1996; 18(1): 59-65.

Sanders JL, Stern PH. Protein kinase c involvement in interleukin-6 production by parathyroid hormone and tumor necrosis factor-alpha im UMR-106 osteoblastic cells. **J Bone Miner Res**. 2000; 15(5): 885-93.

Sandri M, Carraro U. Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. **IJBCB**. 1999; 31(1): 1373-90.

Selye H. On the stimulations of new and irradiated ergosterol. **Endocrinology**. 1932; 16: 547-58.

Shen V, Dempster DW, Mellish RWE, Brichman R, Horbert W, Lindsay R. Effect of combined and separated intermittent administration of low-dose human parathyroid hormone fragment (1-34) and 17 β estradiol on bone histomorphometry in ovariectomized rats with established osteopenia. **Calcif Tissue Int**. 1992; 50: 214-20.

Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of *c-fos* and other immediate early genes in the nervous system. **Neuron**. 1990; 4: 477-85.

Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**. 1997; 89(1): 309-19.

Slovik DM, Rosenthal DI, Doppelt SH, Potts JT, Jr Daly AM, Campbell JA et al. Restoration of spinal bone in osteoporotic men by treatment with human parathyroid hormone (1-34) and 1,25-(OH)₂D. **J Bone Miner Res**. 1986; 1: 377-81.

Sone T. A small dose of human parathyroid hormone (1-34) increased bone mass in the lumbar vertebrae in patients with senile osteoporosis. **Miner Electrolyte Metab**. 1995. 21: 232-35.

Sömjen D, Binderman I, Schluter KD, Wingender E, Mayer H, Kaye AM. Stimulation by defined parathyroid hormone fragments of cell proliferation in skeletal-derived cell cultures. **Biochem J**. 1990; 272(3): 781-5. 1990.

Stanislaus D, Yang X, Liang JD, Wolfe J, Cain RL, Onya JE et al. *In vivo* regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid hormone (1-34) fragment. **Bone**. 2000; 27(2): 209-18.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. **J Periodontol**. 1991; 62(8): 504-9.

Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. **Apoptosis**. 1995; 267: 1445-9.

Stewart AF, Horst R, Deftos LJ, Cadman EC, Lang R, Broadus AE. Biochemical evaluation of patients with cancer-associated hypercalcemia. Evidence for humoral and non-humoral groups. **N Engl J Med**. 1980; 303: 1377-81.

Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL, Partridge NC. Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. **J Biol Chem**. 2001; 276: 7586-92.

Swarthout JT, D'Alonzo RC, Selvamurugan N, Partridge NC. Parathyroid hormone-dependent signaling pathways regulating genes in bone cells. **Gene**. 2002; 282(1-2): 1-23.

Strewler GJ, Stern PH, Jacobs JW, Ekelof J, Klein RF, Leung SC et al. Parathyroid hormone-like protein from human renal carcinoma cells. Structural and functional homology with parathyroid hormone. **J Clin Invest**. 1987; 80: 1803-07.

Suva LG, Winslow GA, Wettenhall RE, Hammonds RG, Moseley JM, Diefenbach-Jaegger H et al. A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression. **Science**. 1987; 237: 893-96.

Tani-Ishin, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp periapical lesion following surgical pulp exposure. **Oral Microbiol Immunol**. 1995; 10(4): 213-9.

Teitelbaum, S.L. Bone Resorption by osteoclasts. **Science**. 2000; 289(5484): 1504-08.

Termine, JD, Kleinman, HK, Whitson, SW, Conn, KM, McGarvey, ML, Martin, GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. **Cell**. 1981; 26 (1): 99-105.

Termine, JD. **Biochemistry of bone matrix**. In: Lindh E, Thorell JL. Clinical Impact of bone and connective tissue markers. Great Britain; Academic Press; 1989. p. 91-100.

Tsuda E, Goto M, Mochizuki S. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**. 1997; 234(1): 137-42.

Turner PR et al. Apoptosis mediated by the PTH/PTHrP receptor: role of JNK and calcium signaling pathways. **Bone**. 1998; 23: 155.

Vieira JGH. Testemunho de um observador eventual. Paratormônio no tratamento da osteoporose: da controvérsia à realidade. **Arq Bras Endocrinol Metab**. 2002; 46(3): 288-90.

Walsh CA, Bowler WB, Bilke G, Fraser WD, Gallagher JA. Effects of PTH on PTHrP gene expression in human osteoblast: up-regulation with the kinectines of an immediate early gene. **Biochem Biophys Res Commun.** 1997; 239(1): 155-9.

Whitfield JF, Morley P. Small building fragments of parathyroid hormone: new therapeutic agents for osteoporosis. **Trends Pharmacol Sci.** 1995; 16(11): 382-6.

Whitfield JF, Morley P. **Anabolic treatments for osteoporosis.** 1. ed. Boca Raton: CRC Press, 1997.

Whitfield JF et al. The bone-building action of the parathyroid hormone: implications for the treatment of osteoporosis. **Drugs Aging.** 1999; 15(2): 117-29..

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Mochizuki SI, Yano K, Fujise N et al. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. **Endocrinology.** 1998; 139: 1329-37.

Zang XY, Tan YB, Pang ZL, Zhang WZ, Zhao J. Effects of parathyroid hormone and estradiol on proliferation and function of human osteoblasts from fetal long bone. An in vitro study. **Chin Med J.** 1994; 107(8): 600-3.

Zhang C, et al. Effects of intermittent administration of low dose human PTH (1-34) on cancellous and cortical bone lumbar vertebral bodies in adult beagles. **Bone.** 1997; 21: 501-6.

ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 89/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, APROVOU o protocolo de pesquisa *"Estudo da ação anabólica do paratormônio em cultura de células osteoblásticas, pertencentes as linhagens OSTEO I e HfoB 1.19 tratadas TNF-alfa"*, de responsabilidade da Pesquisadora Sônia Andrade Silveira Vaz, sob orientação do Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 26 de julho de 2004

Prof.^a Dr.^a ROSA HELENA MIRANDA GRANDE
Coordenadora do CEP-FQUSP