

# Universidade da Beira Interior

## Faculdade de Ciências da Saúde



## Procedimentos e Técnicas em Laboratório de Investigação Médica em Inflamação e Osso

---

2º Ciclo de Mestrado em Ciências Biomédicas

**Ana Filipa Rodrigues Lopes**

**Covilhã, Junho 2010**



# Procedimentos e Técnicas em Laboratório de Investigação Médica em Inflamação e Osso

---

2º Ciclo de Mestrado em Ciências Biomédicas

Orientador: Professora Doutora Helena Canhão - Unidade de Investigação em Reumatologia do Instituto de Medicina Molecular da Faculdade de Medicina e Serviço de Reumatologia e doenças ósseas metabólicas do Hospital de Santa Maria

Co-Orientador: Professor Doutor Ilídio Correia – Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior

**Ana Filipa Rodrigues Lopes**

**Covilhã, Junho de 2010**

O conteúdo do presente trabalho é da exclusiva responsabilidade da autora

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer ao Professor Doutor João Eurico Fonseca a forma como me acolheu e a preocupação que sempre teve comigo, muito obrigada!

Quero agradecer à minha orientadora, a Professora Helena Canhão, que nos momentos certos me disse o que eu precisava para progredir e ter sucesso! Quero agradecer ao meu co-orientador, o Professor Ilídio Correia, que apesar de longe esteve sempre presente e muito neste trabalho.

Ao grupo da UIR obrigada por tudo! Obrigada a todos vocês que diariamente me ensinaram mais e mais! Receberam-me, acolheram-me e ajudaram-me sempre... À Joana simplesmente um mega obrigado! À Inês Perpétuo e à Diana obrigada por tanta vez me dizerem "isso não é desculpa", pela paciência e por me apoiarem até ao fim! À Rita Moura e Rita Cascão obrigada pelos bons momentos e das muitas gargalhadas que me fizeram soltar! À Inês Aleixo ...obrigada pelos momentos de muita diversão à volta das cabeças! A vocês os dois, Bruno e Ana, obrigada pela amizade! À Ana, pelos momentos de medo, alegria, cumplicidade e acima de tudo por começares a fazer parte de mim! Bruno obrigada por tudo...obrigada por estares lá de cada vez que eu gritei "Bruninhooooo"! A todos os outros elementos da UIR, muito obrigada!

Às minhas amigas covilhocas que há muitos anos me acompanham nesta longa caminhada! Obrigada por juntas vencermos sempre! Às minhas duas engenheiras biomédicas obrigada pela força e determinação com que me ajudam a enfrentar a vida!

Ao meu namorado obrigada por acima de tudo seres o meu melhor amigo e me apoiares sempre!

Aos meus pais e ao meu irmão obrigada por serem o meu exemplo de força e união, a vocês dedico este trabalho!

Por último obrigada à minha sobrinha Mafalda que me mostrou que um sorriso de uma criança vale muito mais que mil palavras de conforto!

*"Se tenho de sonhar, porque não sonhar os meus próprios sonhos?"*

Fernando Pessoa

## Resumo

A Unidade de Investigação em Reumatologia do Instituto de Medicina Molecular promove investigação de translação e excelência no campo da Reumatologia. No estágio desenvolvido foram aplicadas várias técnicas utilizadas no quotidiano de um laboratório dedicado ao estudo de doenças inflamatórias e ósseas.

Os objectivos deste trabalho prendem-se com questões de gestão laboratorial, aprendizagem de diversas técnicas laboratoriais e aplicação específica de algumas técnicas num projecto de investigação.

Para o bom funcionamento de um laboratório de investigação é necessária uma gestão laboratorial de base na manutenção dos stocks e preparação do material necessário à realização das experiências bem como o correcto processamento e armazenamento das diversas amostras recebidas. No estudo de doenças reumáticas e ósseas, como a artrite reumatóide e a osteoporose, realizam-se estudos para analisar a expressão de genes de osteoblastos e osteoclastos importantes no processo de remodelação óssea. A quantificação de proteínas solúveis pode ser correlacionada com resultados da expressão génica, com a actividade da doença ou com alterações nos processos de reabsorção óssea. No que respeita à avaliação da qualidade óssea são utilizadas técnicas de imagiologia que permitem obter dados quantitativos e qualitativos relativos à microestrutura óssea, e que podem ser correlacionados com parâmetros biomecânicos.

O estudo dos níveis de osteocalcina descarboxilada permite avaliar indirectamente a mineralização da matriz óssea. Neste estudo foram avaliados doentes com fractura do colo do fémur mas devido ao número limitado de amostras correlações dos resultados com a idade, o sexo ou densidade mineral óssea são difíceis de obter. Na perspectiva de obter resultados conclusivos e como trabalho futuro o estudo será alargado para um maior número de amostras e complementado com outras análises como a do polimorfismo da apolipoproteína E.

Este estágio constituiu uma experiência muito enriquecedora que me permitiu crescer pessoal e profissionalmente, por ter colaborado com vários profissionais da área de investigação biomédica num instituto de excelência como o Instituto de Medicina Molecular.

**Palavras-chave:** Osso, Doenças Inflamatórias, Gestão Laboratorial, Biologia Molecular, Imagiologia, Biomecânica e Osteocalcina.

## **Abstract**

The Rheumatology Research Unit of Instituto Medicina Molecular promotes excellence investigation in the field of rheumatology. During the training period in this unit several techniques used daily in a bone and inflammatory diseases laboratory were learned and applied.

The objectives of this work were to learn and be familiarized with laboratorial management, several laboratory techniques, as well as their specific application in an investigation project.

To ensure a proper functioning of a laboratory it's necessary to have a laboratorial management in what concerns to stocks maintenance, preparation of the needed material to perform the experiments as well as the correct processing and storage of the several samples received.

In the study of rheumatic or bone affecting diseases, such as rheumatoid arthritis and osteoporosis, gene expression studies to analyze the osteoblast and osteoclast function, which play a very important role in the bone regeneration process, need to be performed. Soluble proteins quantification can be correlated with gene expression results, with disease activity or with modifications in the bone resorption. In what concerns the evaluation of bone quality, imaging techniques allow the achievement of quantitative and qualitative data of the bone microstructure which can be correlated to biomechanical parameters.

The study of decarboxilated osteocalcin levels enables the indirect evaluation of bone matrix mineralization. In this study, patients with femoral neck fracture were evaluated but due to the limited number of samples, correlations between the results and the age, gender or bone mineral density were difficult to obtain. In the perspective of getting conclusive results and as future work, the study will be extended to a bigger number of samples and complemented with other analysis as apolipoprotein E polymorphism analysis.

This training period was an enriching experience which allowed me to grow both as a person and professionally by having worked with biomedical professional researchers in an excellence institute as Instituto de Medicina Molecular.

**Keywords:** Bone, Inflammatory Diseases, Laboratorial Management, Molecular Biology, Imaging, Biomechanics and Osteocalcin.

## Lista de abreviaturas:

ApoE – Apolipoproteína E	HBSS - <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>
AR - Artrite Reumatóide	HE – Hematoxilina - Eosina
OB - Osteoblastos	HSM - Hospital de Santa Maria
OC - Osteoclastos	IL- <i>Interleukin</i> - Interleucina
BMO - Densidade Mineral Óssea	IMM - Instituto de Medicina Molecular
CA - Coxartrose	LES - Lúpus Eritematoso Sistémico
cDNA - <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucleico complementar	LTA - Linfotóxina- $\alpha$
cT - <i>Cycle threshold</i> - Limiar de Ciclo	M-CSF - <i>Colony Stimulating Factor</i>
DEPC - Dietilpirocarbonato	MTX- <i>Methotrexate</i> - Metotrexato
DEXA - Densitometria Óssea	OP - Osteoporose
DMEM - <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	OPG - Osteoprotegerina
DMSO- Dimetilsulfóxido	PCR - <i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reacção de polimerase em cadeia
DNA - <i>Deoxyribonucleic acid</i> - Ácido desoxirribonucleico	RANK - <i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B</i>
dNTP's - Desoxinucleótidos trifosfatados	RANKL- <i>Receptor Activator of NF-<math>\kappa</math>B ligand</i>
ELISA – <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	RFLP - <i>Restriction Fragment Length Polymorfism</i>
FBS - <i>Fetal Bovine Serum</i> - Soro bovino fetal	RIN- <i>RNA Integrity Number</i>
FRAX - <i>WHO Fracture Risk Assessment Tool</i> – Risco Absoluto de Fractura	RLT - Tiocianato de guanidina
FMUL- Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa	RNA - <i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido Ribonucleico
Gla - $\gamma$ -carboxiglutâmico	rRNA -RNA ribossomal
Glu - Ácido Glutâmico	RPMI- <i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
	RT-PCR- PCR de transcrição reversa

RT-Qpcr - *Real Time Reverse  
Transcriptase (RT) Quantitative (q)*  
PCR - PCR quantitativo em tempo real

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*  
- Polimorfismo de nucleótido simples

TAC - Tomografia Axial Computorizada

Tm - Temperatura de *Melting*

TNF- *Tumor Necrosis Factor*

ucOC - *Undercarboxylated Osteocalcin*  
- Osteocalcina descarboxilada

UIR - Unidade de Investigação em  
Reumatologia

UV-VIS - Ultravioleta-Visível

VLDL - *Very Low Density Lipoproteins*  
– lipoproteína *de densidade muito  
baixa*

μCT- *Micro-computed Tomography*-  
microtomografia computorizada



## Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Organograma do Instituto de Medicina Molecular .....	13
<b>Figura 2</b> - Valores percentuais da distribuição da equipa da UIR. ....	14
<b>Figura 3</b> - Equilíbrio dinâmico numa unidade multicelular óssea, na qual o osso é removido pelos osteoclastos e subseqüentemente formado por osteoblastos .....	17
<b>Figura 4</b> – Número de publicações científicas e recursos humanos da UIR por ano. .	20
<b>Figura 5</b> - Princípio de funcionamento do <i>NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer</i> . Aplicação da amostra e sistema de retenção da amostra .....	24
<b>Figura 6</b> - Princípio básico do PCR. Um ciclo de PCR consiste em três fases: desnaturação, hibridação e extensão.....	26
<b>Figura 7</b> - Agilent 2100 Bioanalyzer, RNA 6000 Pico Kit , Output do Agilent RNA 6000 Pico Kit obtido no Agilent 2100 Bioanalyser para o marcador molecular e Output do Agilent RNA 6000 Pico Kit obtido no Agilent 2100 Bioanalyser para uma amostra de RNA extraído de células em cultura .....	31
<b>Figura 8</b> – Exemplo de uma curva de amplificação obtida por RT-qPCR. A amplificação é dividida em três fases: fase inicial, fase exponencial e fase limitante. A curva azul diz respeito a uma curva obtida na ausência de amostra e a curva a vermelho na presença de uma amostra .....	34
<b>Figura 9</b> – Curva de amplificação , curva de desnaturação e recta padrão para o gene de referência rRNA 18s usando SYBR green. ....	35
<b>Figura 10</b> - Resultado de um dot-blot realizado a duas amostras. ....	37
<b>Figura 11</b> - Esquema dos vários passos de uma reacção ELISA. ....	38
<b>Figura 12</b> - Trocater eléctrico <i>Biopsy-set Straumann, drilling</i> de uma cabeça de fémur, e cilindro obtido.....	39
<b>Figura 13</b> - Broca craniana de 15 mm de diâmetro, orientação da cabeça de fémur e cilindro recolhido.....	39

<b>Figura 14</b> - Técnica usada para isolamento de osteoblastos a partir de fragmentos de osso.....	40
<b>Figura 15</b> - Corte histológico de cabeças de fêmur humano. Coloração de HE. Objectiva 5X. ....	43
<b>Figura 16</b> - Corte histológico de fêmur de rato. Coloração de Tricromo de Masson. Objectiva 5X (A) e 40X (B).....	44
<b>Figura 17</b> - Corte histológico de cabeças de fêmur humano. Coloração de alizarina. Objectiva 5X .....	45
<b>Figura 18</b> - Corte histológico de cabeças de fêmur humano. Coloração de Von Kossa. Objectiva 5X .....	46
<b>Figura 19</b> - Corte histológico de cabeças de fêmur humano. Coloração de azul toluidina e fosfatase ácida. Objectiva 5X e 60x .....	47
<b>Figura 20</b> - $\mu$ CT scanner Skyscan d1172 - 1.3Mpix e sua câmera de aquisição.....	48
<b>Figura 21</b> - Princípio de funcionamento da $\mu$ CT. O processo é constituído por duas fases: uma fase de aquisição seguida de uma fase de processamento da imagem. ..	49
<b>Figura 22</b> - Imagem obtida depois do processo de reconstrução das várias fatias tomográficas. ....	50
<b>Figura 23</b> - Imagem a três dimensões (vista de dois ângulos) obtida após <i>volume rendering</i> . ....	50
<b>Figura 24</b> – Cilindro de osso trabecular, pratos que comprimem o osso trabecular e máquina universal de ensaios mecânicos Instron 5566™. A seta indica o travessão da máquina.....	52
<b>Figura 25</b> - Exemplo de curva tensão/deformação padrão. ....	53
<b>Figura 26</b> - Ciclo da vitamina K e carboxilação das proteínas dependentes da vitamina K.....	54
<b>Figura 27</b> - Produção de osteocalcina pelos osteoblastos.....	55
<b>Figura 28</b> - Correlação entre os níveis de ucOC e a idade dos doentes. ....	58
<b>Figura 29</b> - Níveis de ucOC para os dois grupos avaliados. ....	58
<b>Figura 30</b> - Níveis de ucOC de acordo com o sexo e com a razão da cirurgia. ....	59

**Figura 31-** Correlação entre os níveis de ucOC e os valores da DMO do colo do fémur, em doentes com fractura do colo do fémur e doentes com coxartrose..... 59

## Lista de Tabelas

**Tabela 1** - Parâmetros analisados no *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer*..... 25

**Tabela 2** – Características da população estudada. .... 57

## Índice

Agradecimentos.....	1
Resumo .....	2
Abstract .....	3
Índice.....	10
1. Introdução.....	12
1.1 Instituto de Medicina Molecular (IMM) / Unidade de Investigação em Reumatologia (UIR).....	12
1.2 Osso e Inflamação.....	16
2. Objectivos.....	19
3.Funções de Gestão.....	19
3.1 Gestão de Laboratório .....	19
3.2 – Biobanco.....	20
4. Técnicas desenvolvidas.....	22
4.1 Técnicas de Biologia Molecular .....	22
4.1.1 - Ácido Desoxirribonucleico ( Deoxyribonucleic acid-DNA) .....	23
A)Extracção de DNA .....	23
B) Avaliação da qualidade do DNA .....	24
C)Reacção de polimerase em cadeia ( <i>Polimerase Chain Reaction- PCR</i> ).....	25
D)Polimorfismo de nucleótido simples (SNP - <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> ) .....	27
4.1.2 Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid - RNA.....	29
A)Extracção de RNA .....	29
	10

B) Avaliação da qualidade de RNA .....	30
C) RT- PCR quantitativo em tempo real ( <i>Real Time Reverse Transcriptase</i> (RT) <i>Quantitative</i> (q)PCR – RT-qPCR).....	32
4.1.3 Proteína.....	36
A) Extração de Proteína .....	36
B) Dot-blot.....	36
C) Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA.....	37
4.2 – Drilling .....	38
4.3 – Cultura primária de Osteoblastos.....	40
4.4 – Técnicas de Imagem.....	42
4.4.1 – Histologia.....	42
4.4.2 – Histomorfometria .....	45
4.4.3 Microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT).....	48
4.5 - Testes de compressão .....	51
5- Estudo dos níveis de osteocalcina em doentes com fractura do colo do fémur.....	54
5.1 – Introdução.....	54
5.2 – Material e Métodos .....	56
5.3 – Resultados.....	56
6- Conclusão.....	61
Bibliografia.....	62
Anexos.....	64
Undercarboxylated Osteocalcin (Gluo-OC).....	64

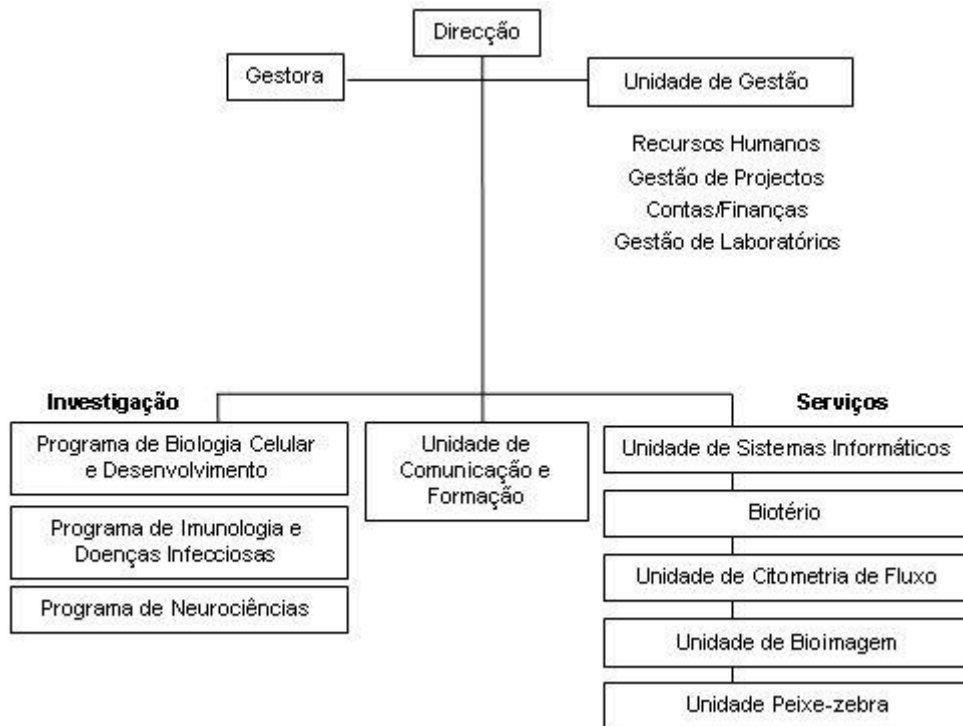
## **1. Introdução**

O presente trabalho traduz as actividades desenvolvidas durante o estágio curricular realizado na Unidade de Investigação em Reumatologia (UIR) do Instituto de Medicina Molecular (IMM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa (FMUL). Este estágio decorreu entre Setembro de 2009 e Maio de 2010 sob a orientação científica da Professora Doutora Helena Canhão e sob a co-orientação do Professor Doutor Ilídio Correia, na área da investigação científica. O presente relatório encontra-se dividido em três partes: uma primeira parte de descrição do local de estágio, uma segunda parte de descrição das actividades desenvolvidas no contexto da gestão e técnicas aplicadas e, num último capítulo, um estudo no âmbito de um projecto científico para avaliação dos níveis séricos de osteocalcina em doentes com osteoporose.

A multidisciplinaridade e a interligação de diferentes áreas presentes nesta unidade foram factores preponderantes na escolha deste local para a realização do estágio. O laboratório foi escolhido na expectativa de aplicar, de forma integrada, os vários conhecimentos adquiridos ao longo do percurso académico e também pela aprendizagem e contacto com essa diversidade de áreas, que abrangem a medicina, a indústria farmacêutica, a engenharia biomédica e a investigação laboratorial e científica.

### **1.1 Instituto de Medicina Molecular (IMM) / Unidade de Investigação em Reumatologia (UIR)**

Localizado no campus da FMUL, o IMM é um Laboratório Associado do Ministério da Ciência, Tecnologia e do Ensino Superior. O IMM foi criado em 2001 e resulta da associação de 5 centros de investigação da FMUL e um do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Actualmente o Instituto dispõe de uma direcção, uma unidade de gestão, diversos serviços e três programas de investigação nos quais se inserem as diferentes unidades, organizados segundo o organograma da Figura 1.



**Figura 1** - Organograma do Instituto de Medicina Molecular (adaptado de <http://www.imm.fm.ul.pt/web/imm/organization>, consultado em 20-04-2010)

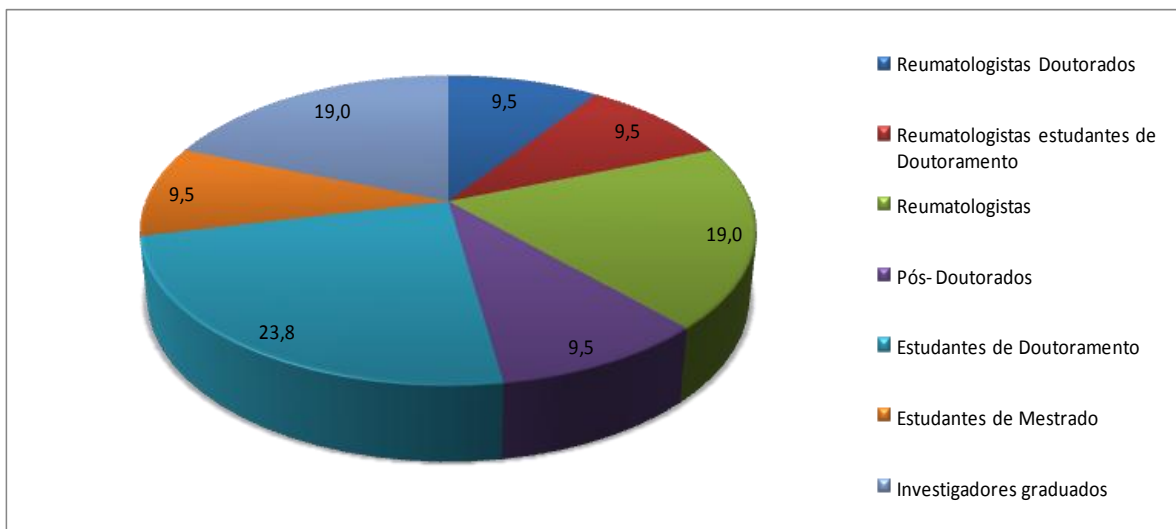
Para dar apoio às várias unidades este Instituto dispõe de serviços assegurados pelas unidades técnicas de citometria de fluxo, bioimagem, sistemas informáticos, uma unidade de peixe-zebra e um biotério. O objectivo é disponibilizar aos investigadores um conjunto de serviços que podem ser requisitados e utilizados pelas várias unidades e que contam com pessoal técnico especializado para dar apoio e formação aos investigadores no decorrer das suas experiências. O Instituto dispõe ainda de vários equipamentos para uso comum das unidades e um serviço de Biobanco para armazenamento de material biológico (o seu funcionamento encontra-se descrito no capítulo 3.2).

A Unidade de Comunicação e Formação representa a primeira linha de interacção do Instituto com a sociedade, particularmente com os media e as novas gerações, promovendo actividades científicas, divulgação à sociedade e programas de formação avançada. A Unidade de Gestão assegura todo o apoio administrativo do IMM incluindo as áreas de recursos humanos, contabilidade e finanças. Esta unidade é também responsável pela gestão de projectos, laboratórios e manutenção de equipamentos comuns, actividades essenciais para o funcionamento de um instituto de investigação. A gestão de laboratórios é ainda responsável pela central de compras e pela central de lavagens. A primeira realiza as aquisições de produtos, serviços e equipamentos do Instituto, sendo uma ponte entre as empresas nacionais e



internacionais e as várias unidades. A central de lavagens está equipada para a preparação e esterilização de todos os materiais e soluções, sendo que disponibiliza aos investigadores estes serviços de acordo com os requisitos de cada projecto.

Fundada em 2004, a UIR resulta de uma parceria entre o IMM/FMUL e o e o Serviço de Reumatologia e Doenças Ósseas Metabólicas do Hospital de Santa Maria (HSM). A UIR integra-se no programa de investigação de Imunologia e Doenças Infecciosas uma vez que tem como foco principal a investigação de doenças inflamatórias que afectam as articulações e os ossos e a relação da inflamação com as propriedades biomecânicas do osso. A equipa de investigação da UIR é formada por um coordenador, um investigador principal e uma equipa multidisciplinar constituída por vinte e uma pessoas com diferentes graus académicos, desde médicos reumatologistas a biólogos, químicos, engenheiros e anatomopatologistas, sendo que a representação percentual se encontra na Figura 2.



**Figura 2** - Valores percentuais da distribuição da equipa da UIR.

Estes elementos trabalham em proximidade promovendo investigação de translação no campo da Reumatologia. Apesar de ser uma das práticas médicas mais antigas, a medicina translacional apenas começou a ter um grande impacto a partir do século XXI [1]. Actualmente, a investigação translacional é definida como investigação que transforma descobertas científicas, no campo laboratorial clínico ou populacional, em ferramentas clínicas ou aplicações práticas que reduzem a incidência das doenças e mortalidade, melhorando assim a qualidade da vida humana [1]. A interacção entre

os diversos elementos da UIR é de extrema importância na resolução de problemas e em diferentes aproximações para a investigação desenvolvida com base num objectivo comum. Por outro lado, a multidisciplinaridade permite que cada indivíduo enriqueça o seu conhecimento pessoal através da troca de diversas informações e pontos de vista. A UIR trabalha em parceria com empresas farmacêuticas na realização de ensaios clínicos e colaborando em vários projectos de investigação na área de Reumatologia

Os objectivos da UIR são o estudo da patogénese de doenças inflamatórias articulares (artrite reumatóide (AR), artrite idiopática juvenil, espondiloartropatias soronegativas, lúpus eritematoso sistémico (LES), entre outras) e ósseas (como a osteoporose (OP)), a fim de caracterizar ferramentas potenciais para o diagnóstico precoce, o prognóstico e possíveis alvos para novas terapias.

A UIR tem vários projectos em curso entre eles o estudo do papel do inflamassoma na iniciação e perpetuação da AR. Pretende-se quantificar a activação da caspase-1 em amostras de sangue de doentes com poliartrites iniciais, doentes com AR estabelecida sob terapêutica com um imunossupressor, o Metotrexato (MTX) e em controlos saudáveis. Em amostras de líquido sinovial é quantificada a caspase-1 em doentes com AR estabelecida, osteoartroses, espondiloartropatias seronegativas e gota. Um outro projecto em desenvolvimento pretende avaliar os mecanismos e repercussão da inflamação no desenvolvimento da aterosclerose em doentes com LES ou com AR, usando indivíduos saudáveis como controlo. Para tal estão em estudo polimorfismos dos genes do *tumor necrosis factor* (TNF)- $\alpha$ , da linfotoxina- $\alpha$  (LTA) e da interleucina (IL)-6 bem como avaliações laboratoriais séricas de citocinas pró-inflamatórias e outras proteínas envolvidas no processo inflamatório. Estes parâmetros serão relacionados com a presença de factores de risco cardiovascular clássicos e com os parâmetros de avaliação da actividade das doenças.

Um outro projecto estuda o papel das células B e dos neutrófilos na AR inicial. O objectivo é caracterizar subpopulações de células B e a resposta funcional dos neutrófilos em sangue periférico de doentes com AR inicial. Este estudo permite avaliar a influência de terapias imunossupressoras na actividade funcional das células B e o comportamento das células B na AR inicial, AR estabelecida e em outras formas de artrite.

Para avaliar a resistência e qualidade ósseas está em curso um estudo em doentes submetidos a artroplastia total da anca. São estudadas as propriedades mecânicas, microarquitECTURA e microestrutura óssea destes doentes. Estes parâmetros serão depois correlacionados com a probabilidade de fractura osteoporótica do colo do fémur prevista por uma ferramenta da Organização Mundial de Saúde, o *WHO Fracture Risk*

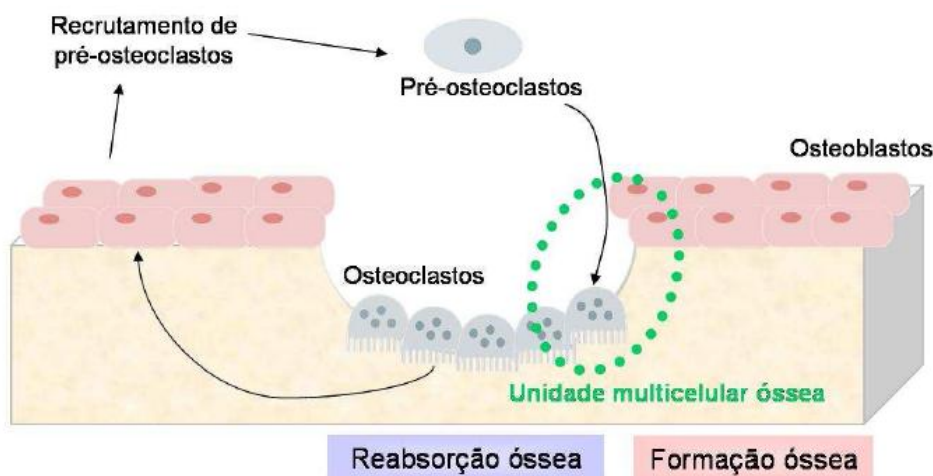
*Assessment Tool (FRAX®)*. O FRAX® é um algoritmo que calcula o risco absoluto de fractura de um indivíduo para um período de 10 anos, sem ter em conta propriedades mecânicas e aspectos biológicos [2].

## **1.2 Osso e Inflamação**

A imunidade é uma função do organismo que assegura a sua capacidade de resistência às agressões de substâncias estranhas como microrganismos e substâncias nocivas, designadas de agentes patogénicos. A imunidade pode caracterizar-se como sendo inata e adaptativa. A imunidade inata está presente no organismo desde o nascimento e não reconhece agentes patogénicos específicos reagindo imediatamente a um estímulo estranho ao corpo. Na imunidade adaptativa, o organismo demora alguns dias a responder pois existe um reconhecimento do estímulo (reconhecimento de antígenos) e uma resposta específica que destrói os agentes patogénicos. A resposta adaptativa do indivíduo vai melhorando em cada exposição ao agente pois existe memória imunológica [3]. Quando ocorrem erros na identificação dos antígenos, estruturas do nosso corpo são confundidas com estruturas exógenas e há uma reacção do sistema imunitário contra o próprio organismo, uma reacção auto-imune. Inúmeros estímulos despertam estas doenças, o que torna difícil identificar e prevenir o desenvolvimento de doenças auto-imunes. As respostas auto-imunes são frequentes, porém transitórias e reguladas, muitas vezes com tendência a evoluir para uma forma crónica. Vários estudos [4-6] demonstraram ainda que existem diversos genes associados a condições auto-imunes e, por haver uma ligação entre o gene e a susceptibilidade/ gravidade da doença, estas podem ter algum grau de hereditariedade.

O sistema imunitário interfere também na formação óssea e actividade celular. O osso é um tecido dinâmico composto essencialmente por uma matriz proteica onde se depositam cristais de hidroxiapatite e está em constante remodelação. Este processo é mantido pela acção contínua da unidade multicelular óssea composta por dois tipos de células: os osteoblastos (OB) responsáveis pela formação da matriz óssea e sua mineralização, e os osteoclastos (OC) responsáveis pela reabsorção óssea. A reabsorção óssea é mediada pela actividade acoplada dos OB e OC e depende da diferenciação e função dos mesmos sendo controlada a nível molecular [7]. Os OC

funcionais estimulam a diferenciação de OB, activando a formação de osso nas lacunas de reabsorção (figura 3).



**Figura 3** - Equilíbrio dinâmico numa unidade multicelular óssea, na qual o osso é removido pelos osteoclastos e subseqüentemente formado por osteoblastos (adaptado de [8]).

Os osteoclastos são as únicas células que tem como função reabsorver osso. A diferenciação dos OC a partir de células precursoras da linhagem mielóide, os monócitos e macrófagos, depende da conjugação de dois factores, o *Macrophage-Colony Stimulating Factor* (M-CSF) e a interacção do *Receptor Activator of NF- $\kappa$ B* (RANK) com o seu ligando (RANKL)[9-10]. O RANKL está presente na superfície dos OB mas é também expresso por células do sistema imunitário, tanto na sua forma de receptor membranar como na forma solúvel [10]. Mais ainda, as células do sistema imunitário produzem citocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1, IL-6 e IL-17, que potenciam a osteoclastogénese e/ou a activação dos OC indirectamente, isto é, aumentando a expressão de RANKL pelos OB [8, 11]. A fusão e polarização dos OC pode ser inibida pelo receptor solúvel do RANKL, a osteoprotegerina (OPG), produzida pelos OB, que impede a ligação RANK-RANKL [8].

A remodelação tem como objectivos não só estabelecer o pico de massa óssea (que ocorre entre os 20 e os 30 anos de idade) como também, na idade adulta, remover o osso danificado (com microfracturas) que posteriormente será substituído por nova matriz celular. Esta substituição requer que o processo de remodelação

esteja em equilíbrio dinâmico, ou seja, que o volume de osso removido seja substituído por igual volume de osso formado [11]. Quando a reabsorção óssea predomina e não é compensada de forma eficaz pela formação de matriz, o osso torna-se osteoporótico, com baixa massa óssea, menos resistente, conduzindo ao aumento do risco de fracturas. Por outro lado, quando a formação predomina estamos presente uma osteopetrose. É um distúrbio genético de patogénese desconhecida, caracterizado por um crescimento ósseo excessivo e anormal [12].

As doenças inflamatórias crónicas sistémicas, como por exemplo a artrite reumatóide (AR), afectam o osso mas não são doenças ósseas primárias. Na AR a inflamação crónica atinge as pequenas e grandes articulações de uma forma simétrica. Nesta doença ocorre não só hiperplasia da membrana sinovial devido à infiltração de células do sistema imune com consequente lesão articular, como também erosões justa-articulares devido à activação de OC pela inflamação local [13]. As células que infiltram a membrana sinovial são maioritariamente linfócitos e macrófagos, que produzem citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que, por sua vez, atraem mais linfócitos e monócitos, criando um ambiente cada vez mais inflamatório. No entanto, a hiper-activação do sistema imune ocorre não só nas articulações, como também a nível sistémico o que explica a ocorrência de febre, cansaço, emagrecimento, alterações pulmonares e perda de massa óssea, conduzindo a uma osteoporose secundária. Dados recentes sugerem que até um pequeno aumento sub-clínico na inflamação sistémica pode despoletar alterações no metabolismo ósseo [14-15].

A arquitectura do tecido ósseo varia com a região do corpo humano, além das diferenças existentes entre osso trabecular e osso cortical [16]. O osso trabecular compõe 20% do esqueleto e possui uma micro-estrutura porosa com elevada área superficial, sendo predominantemente encontrado nas extremidades dos ossos longos, protegido por uma camada de osso cortical. É formado por numerosas e pequenas trabéculas, onde 75-95% do volume trabecular é constituído por poros interconectados e preenchido por medula óssea. O osso trabecular possui uma porosidade elevada (30 a 90%), sendo capaz de suportar alongamentos e deformações antes de fracturar [16].

A osteoporose (OP) é uma doença óssea metabólica caracterizada por diminuição da massa óssea, alterações da microarquitectura do osso, aumento da fragilidade óssea e do risco de fractura [17]. A OP pode progredir sem sintomas dolorosos até ocorrer uma fractura, tipicamente na anca, coluna ou pulso. A fragilidade óssea não se deve apenas à diminuição da massa óssea, sendo a qualidade do osso um factor determinante para a sua resistência. Embora o conceito formal de qualidade óssea

seja difícil de definir, engloba a morfologia do osso, a sua estrutura e microarquitECTURA (conectividade entre trabéculas, geometria), as propriedades mecânicas do osso (rigidez e resistência), a arquitetura molecular (mineralização, quantidade de cálcio, orientação do colagénico) e a viabilidade do tecido ósseo (resposta das células ósseas a factores de crescimento) [17].

## **2. Objectivos**

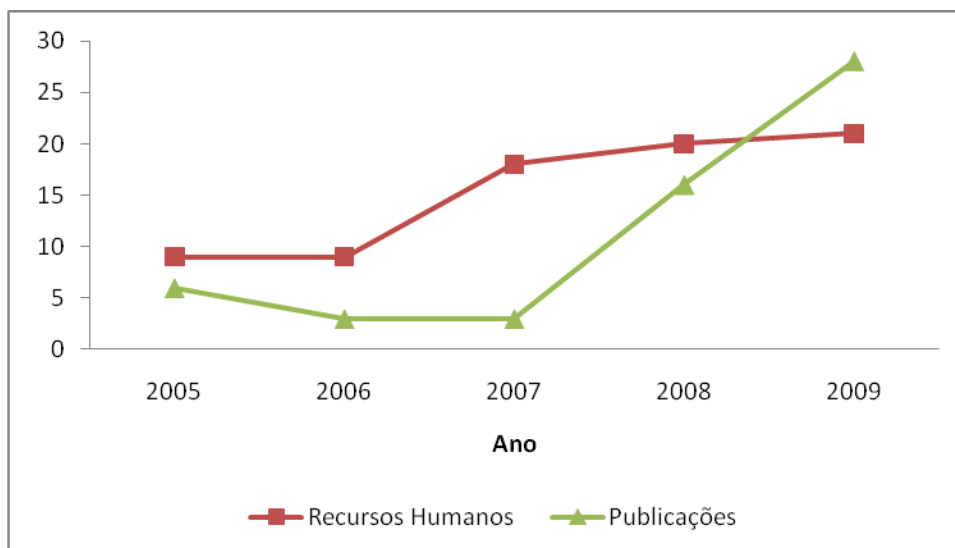
Durante o período de estágio realizei dois tipos de actividades. Fui progressivamente a responsável por funções de Gestão da Unidade, que assumi na íntegra nos últimos meses do estágio. Realizei ainda actividades de investigação trabalhando directamente no laboratório onde apliquei diversas técnicas laboratoriais que passo a seguir a descrever.

## **3. Funções de Gestão**

### **3.1 Gestão de Laboratório**

Na área da gestão de laboratório realizei tarefas de encomendas e manutenção de stocks de produtos em colaboração com a Central de Compras e com várias empresas. Estive também em contacto com a Unidade de Gestão onde, através de uma reunião mensal são fornecidas informações úteis para gestão da unidade, tais como normas gerais de separação de resíduos, alterações às normas de utilização de espaços comuns, entre outras. Na área da informática e comunicação fui responsável pela actualização da página *online* da UIR na página oficial do IMM e pela organização de eventos com o objectivo de dar a conhecer aos estudantes o que se faz no Instituto e especificamente na UIR. Através destas ferramentas é possível estabelecer contacto com a comunidade científica e interagir com a sociedade.

Nos últimos anos a unidade apresentou um aumento em termos de recursos humanos e conseqüente aumento no número de publicações científicas, como representado na figura 4. Outra das tarefas que realizei foi a organização das publicações e comunicações efectuadas nos últimos anos, de modo a facilitar a futura elaboração de relatórios de actividades.



**Figura 4** – Número de publicações científicas e recursos humanos da UIR por ano.

### 3.2 – Biobanco

Existem várias definições de biobanco sendo que todas assentam no pressuposto de que se trata de uma colecção de amostras biológicas ou tecidos humanos e informação relacionada, guardados a longo-prazo, que podem ser associadas com o dador, por exemplo através de um código [18-19]. Segundo a lei portuguesa, "(...) entende-se por «banco de produtos biológicos» qualquer repositório de amostras biológicas ou seus derivados, com ou sem tempo delimitado de armazenamento, quer utilize colheita prospectiva ou material previamente colhido, quer tenha sido obtido como componente da prestação de cuidados de saúde de rotina, quer em programas de rastreio, quer para investigação, e que inclua amostras que sejam identificadas, identificáveis, anonimizadas ou anónimas." [20] .A amostra biológica é qualquer amostra de material biológico que contém ácidos nucleicos, onde está presente a informação genética de cada indivíduo. A amostra tem dupla natureza, por um lado é uma amostra biológica e por outro é uma fonte de informação [21].

A colheita de amostras biológicas requer que o dador seja previamente informado sobre o estudo e que expresse consentimento livre e esclarecido de forma gratuita e desinteressada. O direito à integridade pessoal inclui o respeito pelas peças anatómicas, mesmo quando estas são removidas do corpo e enquanto é possível a identificação da sua origem; desta forma, o consentimento informado é o instrumento através do qual a utilização destas amostras é permitida de forma a garantir o respeito e protecção pelo material. O consentimento informado é uma peça fundamental no biobanco, tanto do ponto de vista ético como legislativo, pois actua sobre os direitos do

dador para proteger os seus dados e serve os interesses da comunidade científica. O material biológico deve ser colhido de acordo com os procedimentos habitualmente descritos nos protocolos de colheita e a amostra deverá ser acondicionada adequadamente para o fim a que se destina.

O IMM-BioBank (biobanco do IMM funciona em instalações cedidas pela FMUL e tem o apoio financeiro do Alto Comissariado da Saúde. Este biobanco pretende ser uma ferramenta de apoio à investigação científica em doenças humanas, servindo como banco de amostras biológicas e base de dados de informação dos respectivos dadores. O IMM-BioBank serve ainda de base de investigação a estudos moleculares, clínicos e epidemiológicos, a desenvolver por organizações/entidades previamente autorizadas, com o objectivo de melhorar a prevenção, diagnóstico e tratamento de diversas doenças, e promover a saúde na sociedade em geral. As amostras deste biobanco são recolhidas por clínicos das mais diversas áreas e depois criopreservadas, podendo ser de sangue, plasma, urina, líquido cefalo-raquidiano, osso ou outros tipos de tecidos humanos. Ao integrar a colecção do IMM-BioBank, as amostras são adicionadas a uma base de dados onde constam informações relativas a dados clínicos e familiares dos indivíduos que consentam participar no projecto, sob rigorosas regras de protecção de dados. As bases de dados integram informação clínica e biológica permitindo uma maior complementariedade entre a investigação básica/molecular e a clínica essencial para o progresso do conhecimento em qualquer especialidade médica. As amostras ficam disponíveis, após devida autorização, para qualquer entidade de investigação que as solicite junto do IMM-BioBank.

O IMM-BioBank agrupa já centenas de amostras na sua colecção recolhidas em diversos centros médicos do país na vertente das doenças reumáticas, através do protocolo estabelecido entre a Sociedade Portuguesa de Reumatologia e o IMM, incluindo amostras de sangue, DNA, osso, líquido e membrana sinovial. Neste contexto, e no período em que colaborei com a UIR, fui responsável por receber, processar e armazenar correctamente as amostras. Nos estudos realizados na UIR, os tipos de amostras biológicas mais utilizadas são sangue, soro, líquido sinovial e cabeças de fémur. As amostras provêm de doentes com diversos diagnósticos como AR, LES, artrite idiopática juvenil, OP e osteoartrose. A amostra vem acompanhada de um protocolo preenchido pelo médico e um consentimento informado assinado pelo doente. No momento de entrada das amostras é preenchido um registo, sendo atribuído a cada amostra um código com numeração sequencial que terá correspondência com a identificação do hospital, doente e tipo de amostra biológica, por exemplo BB (biobanco) - 1 (doente 1) - HSM (Hospital de Santa Maria) - B (blood - sangue). No caso de colheitas repetidas do mesmo doente ao longo do tempo, o



código mantém-se para cada indivíduo do estudo mas acrescentam-se alíneas à numeração (por exemplo em BB-1.1-HSM-B a numeração designa amostra 1, primeira colheita). Para controlos saudáveis, a identificação das amostras mantém-se acrescentando a letra C à numeração do indivíduo (por exemplo BB-C1-HSM-B). Em simultâneo, é criada uma base de dados de acesso restrito com a descodificação da amostra e os dados relativos ao dador, de acordo com o regulado pela Comissão Nacional para a Protecção de Dados. As amostras são armazenadas de forma a preservar a sua integridade e permitir futuras utilizações.

#### **4. Técnicas desenvolvidas**

##### **4.1 Técnicas de Biologia Molecular**

Qualquer análise em genética molecular baseia-se no estudo dos ácidos nucleicos (DNA - ácido desoxirribonucleico ou RNA - ácido ribonucleico), pelo que o primeiro passo consiste em isolar e purificar uma ou mesmo as duas espécies. Existem várias técnicas através das quais se obtém DNA ou RNA com diferentes graus de pureza e de integridade. Na maioria dos casos, estas técnicas iniciam-se com o processo de libertação dos ácidos nucleicos, que envolve a lise celular, seguida de reacções enzimáticas e/ou químicas para destruir os componentes proteicos da mistura e por fim a sua separação dos outros componentes celulares, recorrendo à precipitação e posterior solubilização do ácido nucleico. O manuseamento de ácidos nucleicos purificados ou de amostras de onde estes serão extraídos requer alguns cuidados especiais. Todos os seres humanos possuem nas mãos quantidades significativas de DNases e RNases, enzimas que têm como função biológica degradar DNA ou RNA livre, respectivamente. Para além da utilização de luvas durante todos os procedimentos é necessário utilizar reagentes para descontaminar todo o material e área de trabalho. A grande revolução nos processos de purificação de ácidos nucleicos coincidiu com a descoberta de certas formulações de sílica que possuem a capacidade de adsorver os ácidos nucleicos, dependendo do pH e da concentração salina. Esta descoberta permitiu o desenvolvimento de conjuntos (*kits*) para extracção de ácidos nucleicos com grandes avanços em termos de rapidez, reprodutibilidade, rendimento e custo. A automação do processo de extracção tem como principal vantagem a padronização da extracção de um elevado número de amostras,

prevenindo erros e contaminações durante a manipulação das amostras, sendo estes *kits* amplamente utilizados na extracção de ácidos nucleicos.

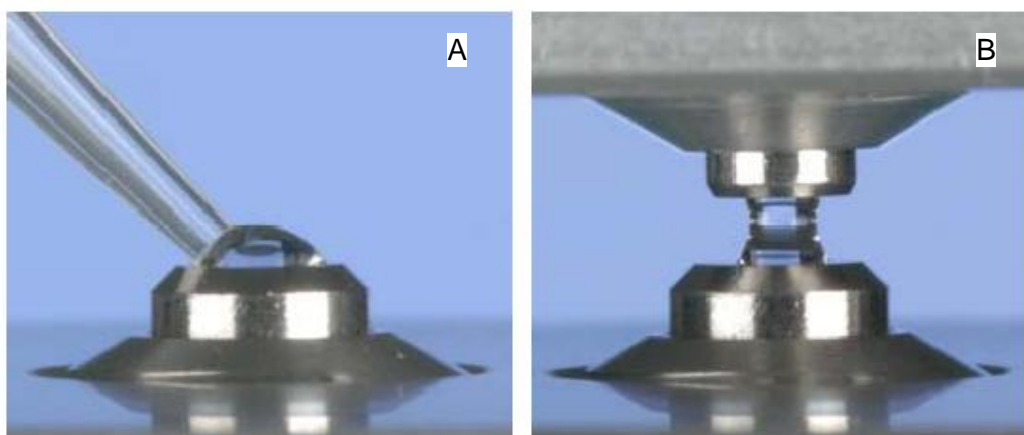
#### 4.1.1 - Ácido Desoxirribonucleico ( Deoxyribonucleic acid-DNA)

##### A) Extracção de DNA

O DNA pode provir de vírus, bactérias, plantas ou animais e, no caso dos animais, pode ser purificado a partir de sangue total, plasma, medula óssea e outros tecidos, células isoladas, células em cultura e de amostras forenses. A escolha do método a utilizar depende da natureza da amostra, sendo que no caso de amostras humanas o sangue fresco ou congelado é o mais utilizado [22]. Na realização desta técnica utilizei o *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Alemanha) que fornece um método rápido e fácil de purificar DNA total. Este kit permite obter DNA purificado livre de proteínas, nucleases e outros contaminantes ou inibidores. O processo de purificação do DNA deste *kit* é composto por várias etapas e utiliza colunas com membranas de sílica. As condições de tamponamento do lisado são ajustadas para permitir que, após a aplicação da amostra o DNA se ligue à membrana. O pH e a concentração salina do lisado garantem que proteínas e outros contaminantes, que podem inibir a amplificação do DNA ou outras reacções enzimáticas, não fiquem retidos na membrana. A remoção de contaminantes residuais que se encontrem ligados à membrana é realizada por lavagens sucessivas. A utilização de tampões de lavagem diferentes melhora significativamente a pureza do DNA eluído e asseguram a remoção completa de todos os contaminantes residuais sem afectar a ligação do DNA à membrana [22]. O DNA purificado é eluído da coluna utilizando um tampão apropriado, sendo armazenado a uma temperatura de -20°C.

## B) Avaliação da qualidade do DNA

Para controlar a eficácia do processo de extracção de DNA podem utilizar-se métodos espectrofotométricos ou microchips (ver descrição no capítulo 3.1.2 B) que permitem avaliar quantitativa e qualitativamente o DNA obtido. O Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Fisher Scientific, E.U.A) é um aparelho que permite avaliar a qualidade não só do DNA, mas também do RNA ou proteínas, tendo como principais vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostra e a rapidez. Este aparelho tem por base a medição de absorvância numa coluna de líquido criada entre duas superfícies ópticas, numa gama de comprimentos de onda ultravioleta-visível (UV-VIS) entre 220nm e 750nm (Figura 5).



**Figura 5** - Princípio de funcionamento do *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer*. Aplicação da amostra (A) e sistema de retenção da amostra (B) (adaptado de <http://www.nanodrop.com/> - consultado em 01-05-2010) .

O software associado ao *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* permite obter não só à concentração do DNA como também diversos parâmetros que caracterizam a sua qualidade. Os valores das absorvâncias indicam a presença dos ácidos nucleicos e proteínas e o rácio das absorvâncias indicam o grau de pureza da amostra (Tabela 1).

**Tabela 1** - Parâmetros analisados no *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer*

<b>Parâmetro Analisado</b>	<b>Significado</b>
<b>Abs</b> <sub>260nm</sub>	Comprimento de onda a que absorvem os ácidos nucleicos
<b>Abs</b> <sub>280nm</sub>	Comprimento de onda a que absorvem as proteínas e os fenóis
<b>Abs</b> <sub>230nm</sub>	Comprimento de onda a que absorvem o EDTA, os polissacáridos e o etanol
<b>Abs</b> <sub>260nm</sub> / <b>Abs</b> <sub>230nm</sub>	Mede o grau de pureza dos ácidos nucleicos e varia normalmente entre 1,8 – 2,2 (valores muito abaixo destes podem indicar a presença de contaminantes co-purificados)
<b>Abs</b> <sub>260nm</sub> / <b>Abs</b> <sub>280nm</sub>	Mede o grau de pureza do DNA e do RNA; um valor de ~1,8 (para o DNA) corresponde normalmente a uma amostra “pura” (valores muito abaixo deste podem indicar a presença de proteínas, fenóis ou outros contaminantes que absorvam a cerca de 280 nm)

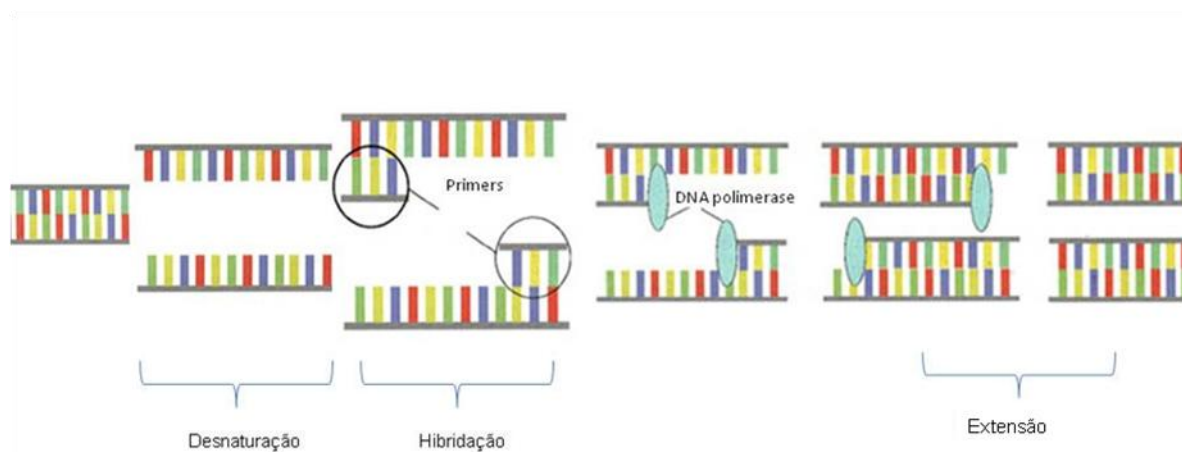
### **C)Reacção de polimerase em cadeia (*Polimerase Chain Reaction- PCR*)**

O PCR é um procedimento rápido para a amplificação enzimática *in vitro* de segmentos específicos de DNA, sendo uma das técnicas mais utilizadas nas diversas áreas do diagnóstico molecular. A descoberta desta tecnologia teve um enorme impacto na evolução da genética molecular, possibilitando a adopção de métodos automatizados para a análise do genoma e introduzindo a possibilidade de amplificar uma sequência de interesse contida numa amostra de DNA, obtendo-se múltiplas cópias dessa sequência.

O princípio básico desta técnica baseia-se nas propriedades das polimerases de DNA que sintetizam uma cópia de uma cadeia de DNA quando encontram uma extremidade 3' livre. Para tal, as duas cadeias do DNA de cadeia dupla são separadas (desnaturação) por calor, seguindo-se a ligação específica de um oligonucleótido sintético (*primer*) a uma temperatura mais baixa. Depois desta hibridação específica, a polimerase inicia então a síntese da cadeia complementar à região 3' do DNA-molde. No fim de cada ciclo estará duplicada a quantidade de DNA da zona de interesse e no

final do processo teremos amplificado  $2^n$  vezes o segmento de DNA de interesse, sendo que  $n$  corresponde ao número de ciclos efectuados.

Para a reacção de PCR são necessários diversos componentes: a amostra de DNA que contém a sequência alvo, *primers*, desoxinucleótidos trifosfatados (dNTP's) e uma polimerase de DNA termoestável. Podem ser ainda adicionados outros componentes com vista à optimização do funcionamento da polimerase, como por exemplo cloreto de magnésio ( $MgCl_2$ ) cuja concentração depende da especificidade e qualidade do DNA amplificar. Os *primers* são utilizados em largo excesso relativamente ao DNA a ser amplificado, já que são necessárias pelo menos tantas moléculas de *primer* quantas as cadeias de DNA que se deseja formar. Os *primers* devem ser desenhados de modo a emparelharem perfeitamente com a extremidade 3' da cadeia simples (após desnaturação) do segmento a amplificar, pois hidridam perfeitamente com esta zona do DNA-molde. A extremidade 3' dos *primers* fica assim livre para que a polimerase inicie a produção da nova cadeia no sentido 5' - 3' (Figura 6) .



**Figura 6** - Princípio básico do PCR. Um ciclo de PCR consiste em três fases: desnaturação, hibridação e extensão.

Os fragmentos produzidos no primeiro ciclo vão servir de molde para o ciclo seguinte, tendo o produto preponderante as extremidades determinadas pelos locais de ligação de ambos os *primers* (figura 6). Esta amplificação ocorre durante repetidos ciclos de temperatura, 94°C para desnaturação do DNA, 45°C a 70°C para hibridação

dos *primers* à sequência-alvo e 72°C para a síntese da nova cadeia, sendo realizada em equipamentos denominados termocicladores. O DNA amplificado pode então ser visualizado num gel de agarose, observando-se, numa situação ideal, uma banda correspondente ao DNA amplificado, pela técnica de electroforese e permite que este venha a ser utilizado para diversos fins.

A técnica de electroforese consiste na separação de ácidos nucleicos numa matriz porosa (por exemplo, géis de agarose) sob a força de um campo eléctrico que provoca a migração dos ácidos nucleicos em direcção ao pólo positivo, já que estes estão carregados negativamente. A agarose é um polissacarídeo e forma uma rede que retém as moléculas durante a migração. Dependendo da concentração, a agarose permite separar DNA de tamanhos diferentes. Aos produtos de PCR é adicionada uma substância corante e densa que se intercala nas bases de DNA e permite reter o DNA no fundo do poço de aplicação da amostra no gel, para que este não se dissolva no tampão, permitindo ainda acompanhar virtualmente a migração no gel. As amostras são colocadas nos poços do gel, utilizando sempre um poço para referência onde se adiciona um marcador de peso molecular constituído por fragmentos de dimensões conhecidas. As moléculas de maior peso molecular migram a uma velocidade menor relativamente às moléculas mais pequenas, resultando numa separação dos fragmentos de DNA por tamanho. A localização final do DNA no gel é observada por exposição do gel a radiação UV, observando-se a fluorescência das bandas devido à adição de um agente intercalante aquando da preparação do gel. Actualmente, por ser mais sensível e ter baixo risco para a saúde, o GelRed é um excelente substituto para o brometo de etídio, o agente intercalante comumente utilizado.

#### **D) Polimorfismo de nucleótido simples (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*)**

Aproximadamente 99,7% do genoma é idêntico entre os indivíduos, variando de pessoa para pessoa apenas em algumas regiões, designando-se estas diferenças de polimorfismos [23]. Apesar de representarem uma pequena percentagem do genoma, os polimorfismos têm um papel crítico em diversos tipos de análises moleculares de diagnóstico. Os *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) são o tipo de polimorfismos mais frequente no genoma humano e existem mais de 9 milhões de SNPs registados em bases de dados públicas. Designa-se por SNP uma variação num único nucleotídeo num local específico do genoma que é, por definição, encontrada em mais de 1% da população [23]. A frequência média global de SNPs no genoma humano é de aproximadamente uns por cada 1000 pares de bases, mas não se encontram

uniformemente distribuídos, e ocorrem mais frequentemente em regiões codificantes do genoma do que nas regiões não-codificantes. Nas regiões codificantes, os SNPs podem causar alterações na estrutura e função da proteína, conduzindo ao desenvolvimento de doenças ou alterações na resposta a uma terapêutica. Por outro lado, os SNPs em regiões não-codificantes, não alteram a codificação das proteínas, mas servem como importantes marcadores genéticos em estudos comparativos ou de genética evolutiva [23]. Quando presentes em locais de regulação de um gene, os SNPs podem afectar as taxas de transcrição provocando mudanças na produção da proteína codificada. Estudos de genotipagem de SNPs em larga escala realizados a um grupo de pacientes e comparados com uma população saudável (controlo), permitem observar eventuais diferenças no genótipo. Estas diferenças permitem relacionar a susceptibilidade dos portadores dos genes alterados associados à doença com as proteínas codificadas, contribuindo para uma futura prevenção e tratamento da doença.

Os SNPs podem ser identificados pela técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). O DNA contendo o polimorfismo é diferenciado pela análise de padrões derivados da sua clivagem, que resultam na presença de fragmentos de diferentes tamanhos, após digestão das amostras de DNA com endonucleases de restrição específicas. Estas enzimas reconhecem sequências específicas de DNA e cortam-no nesses locais, designados locais de restrição. Desta clivagem resultam fragmentos menores de DNA, os fragmentos de restrição. Estas enzimas são altamente específicas e cada uma reconhece e corta apenas uma determinada sequência de nucleotídeos, em geral constituída por 4 ou 6 pares de bases [23]. Para a genotipagem de um SNP localizado num local de restrição, o produto de PCR contendo o SNP é incubado com a enzima de restrição adequada e o produto da reacção de restrição é depois avaliado num gel de agarose. O genótipo é facilmente determinado a partir dos tamanhos dos produtos de restrição. Este método, tem uma produção limitada, é aplicável a um número limitado de SNPs e não requer a utilização de sondas.

#### 4.1.2 Ácido Ribonucleico (Ribonucleic acid - RNA)

##### A) Extracção de RNA

O processamento do RNA é bem mais difícil que o do DNA, já que as RNases são mais estáveis que as DNases e, ao contrário destas, não necessitam de cofactores para funcionar. Existem vários métodos para extracção de RNA total baseados na utilização de agentes desnaturantes fortes, tais como fenol e sais de guanidina. Um método básico consiste na extracção com fenol seguida da precipitação do RNA por etanol. De forma a diminuir a contaminação com RNases das soluções e equipamentos é recomendável tratá-los com dietilpirocarbonato (DEPC) ou proceder à descontaminação por autoclavagem.

No caso de tecidos é necessário ultrapassar um obstáculo inicial que consiste em chegar às células que se encontram no interior do tecido. Como o tecido pode ser mole (biópsias, peças cirúrgicas) ou muito duro (osso, fósseis, etc.), existem várias técnicas específicas para cada tipo de tecido: descalcificação para o osso, processamento em micrótomo para biópsias fixadas, degradação enzimática para tecidos frescos, ou ainda lise por congelamento em azoto líquido seguida de maceração. Utilizei esta técnica para obter uma amostra de osso passível de se extrair RNA. Para extrair RNA das amostras de osso utilizou-se primeiramente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen, Reino Unido), seguido de um tratamento com proteinase K. O TRIzol<sup>®</sup> consiste numa solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Durante a homogeneização e lise da amostra, o TRIzol<sup>®</sup> mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. A adição de clorofórmio separa a solução em duas fases, aquosa e orgânica. O RNA permanece na fase aquosa obtendo-se no final RNA total ao qual se pode ainda adicionar proteinase K, para degradar as proteínas.

O TRIzol<sup>®</sup> e o isopropanol podem ainda estar a contaminar o RNA, por isso pode ser realizada uma limpeza do RNA utilizando o *RNeasy mini kit* (Qiagen, Alemanha) e podendo efectuar-se também um tratamento com DNase I. O *RNeasy mini kit* pode ser utilizado, não só para a limpeza de amostras, como também para a extracção de RNA de células isoladas ou em cultura. Este *kit* combina as propriedades de ligação selectiva de uma membrana à base de sílica com a tecnologia de microcentrifugação. As amostras são homogeneizadas na presença de um tampão desnaturante contendo tiocianato de guanidina (RLT), que imediatamente inactiva as RNases para garantir a



purificação do RNA intacto. O etanol é adicionado para fornecer condições adequadas para ligação da amostra à coluna. O RNA é posteriormente eluído em água, ficando purificadas todas as moléculas de RNA com mais de 200 nucleotídeos..

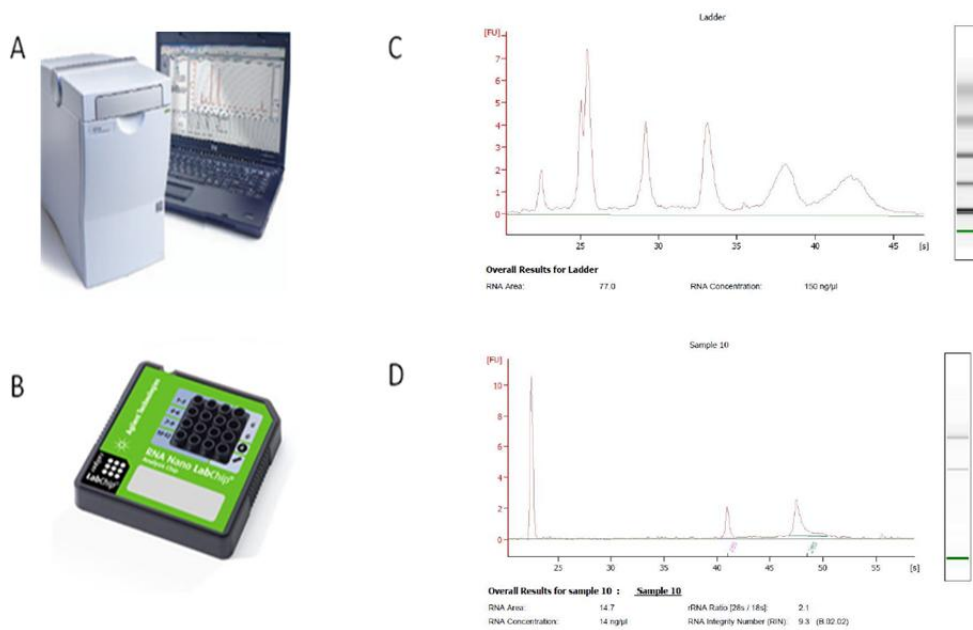
## **B) Avaliação da qualidade de RNA**

A qualidade do RNA pode ser avaliada pelos métodos anteriormente referidos para avaliar a qualidade de DNA como por exemplo a análise de um gel de agarose, através de métodos espectrofotométricos como permite o Nanodrop ou ainda por microchips. Utilizando um gel de agarose para verificar a integridade do RNA observar-se-ão duas bandas correspondentes às moléculas de RNA ribossomal (rRNA) 28S e 18S, mas também outras bandas correspondentes a moléculas de RNA ribossomal menores. O RNA é considerado de alta qualidade quando a relação entre os pesos moleculares dos fragmentos 28S:18S é igual ou superior a 2,0 [24]. O resultado obtido com este tipo de técnica não permite tirar conclusões inequívocas pois a interpretação do gel está muito dependente do avaliador. O *Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer* (Fisher Scientific, E.U.A) permite avaliar a integridade do RNA da mesma forma que se avalia a integridade do DNA.

A análise da integridade do RNA pode ser também feita por microchips sendo que para leitura destes utilizei o *Agilent 2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, E.U.A.), representado no figura 7.A. Devido à influência crítica da integridade do RNA nas análises posteriores é necessário reproduzir, uniformizar e classificar a qualidade de RNA. O *Agilent 2100 Bioanalyzer* é um dispositivo automático de leitura de um sistema de electroforese capilar em *microchip* (figura 7.B) que permitem separar pequenas quantidades de RNA de acordo com o seu peso molecular para posterior detecção por fluorescência induzida. Nesta técnica é utilizado também um marcador de peso molecular de RNA com fragmentos de RNA com dimensões e fluorescências conhecidas (figura 7.C). O resultado da leitura das amostras é um electroforograma (figura 7.D) onde a fluorescência medida se correlaciona com a quantidade de RNA por comparação com o marcador de peso molecular. Os dados produzidos em formato digital podem ser facilmente reprocessados e são disponibilizados sob a forma de duas imagens: imagem do gel e electroforograma. O electroforograma fornece uma análise detalhada e permite a avaliação visual da qualidade de uma amostra de RNA.

O software *Bioanalyzer* (Agilent Technologies, E.U.A.) gera automaticamente o rácio entre as subunidades ribossomais 28S e 18S. A fim de padronizar o processo de interpretação da integridade do RNA, a Agilent Technologies introduziu uma nova

ferramenta para a avaliação da qualidade do RNA, *RNA Integrity Number* (RIN). O algoritmo do software RIN (Agilent Technologies, E.U.A.) permite classificar a pureza do RNA numa escala numérica de 1 a 10, sendo que o 1 representa o RNA mais degradado e 10 representa RNA mais intacto [24]. Este software permite comparar diferentes resultados uma vez que remove interpretações individuais e padroniza o processo de avaliação da qualidade do RNA [25].



**Figura 7** - Agilent 2100 Bioanalyzer (A), RNA 6000 Pico Kit (B), Output do Agilent RNA 6000 Pico Kit obtido no Agilent 2100 Bioanalyser para o marcador molecular (C) e Output do Agilent RNA 6000 Pico Kit obtido no Agilent 2100 Bioanalyser para uma amostra de RNA extraído de células em cultura (D)

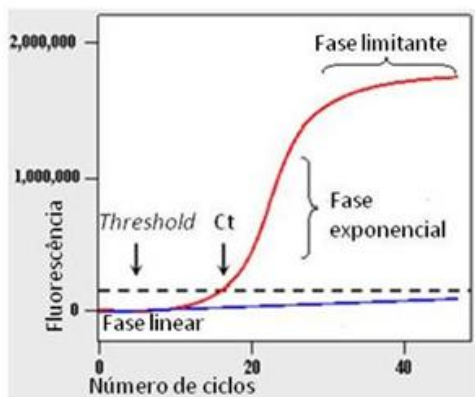
### **C) RT- PCR quantitativo em tempo real (*Real Time Reverse Transcriptase (RT) Quantitative (q)PCR – RT-qPCR*)**

As polimerases de DNA utilizadas em PCR reconhecem adenina, timina, citosina e guanina, mas não o uracilo que é incorporado no RNA em vez da timina. Para usar o RNA como modelo para PCR, este tem de ser convertido numa sequência de DNA, o DNA complementar (cDNA). O processo de conversão de RNA em cDNA é denominado transcrição reversa e é realizado utilizando uma enzima, a transcriptase reversa. Alterações na expressão génica podem provocar alterações nas mais diversas funções celulares. As alterações na expressão génica podem ser verificadas analisando o RNA responsável pela síntese proteica, já que a existência de uma proteína específica implica a expressão e transcrição de DNA em mRNA específico para essa proteína. A análise do mRNA obriga à utilização de primers específicos que se ligam na junção exão-exão. Na aplicação desta técnica utilizei o DyNAmo cDNA Synthesis kit (Finnzymes, Finlândia) para sintetizar cDNA a partir de RNA extraído de amostras de osso humano. Este kit inclui os random primers e os oligo dT e utiliza a enzima M-MuLV RNase H<sup>+</sup> como transcriptase reversa. Utilizaram-se as concentrações iniciais de 0,6 ng/μL de RNA e 60ng/μl de random hexamers. A reacção foi efectuada no termociclador Piko Thermal Cyclor (Finnzymes, Finlândia) segundo as condições recomendadas pelo fabricante: 30 minutos a 37°C e 5 minutos a 85°C. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C.

A descoberta do RT-qPCR teve um papel importante na medicina molecular e no diagnóstico clínico. Esta técnica baseia-se na detecção e quantificação de um sinal fluorescente proporcional à amplificação do produto monitorizado em tempo real. Combina a técnica RT-PCR (PCR de transcrição reversa) com a detecção em tempo real, utilizando um sistema integrando constituído por um termociclador, sondas fluorescentes, detectores de fluorescência e um software que permite monitorizar em tempo real o aumento na fluorescência durante cada ciclo de PCR para fornecer resultados quantitativos. O RT-qPCR em tempo real requer o uso de equipamentos e reagentes dispendiosos, mas permite uma quantificação exacta partindo de uma menor quantidade de RNA. Muitas das principais proteínas encontram-se em quantidades ínfimas e a quantificação dos seus mRNAs por RT-qPCR em tempo real representa a única técnica suficientemente sensível para medir a sua expressão com fiabilidade. Este método utiliza os mesmos reagentes de um PCR clássico acrescido de fluorocromos intercalados em cadeias de DNA como o SYBR Green (Finnzymes,

Finlândia), ou presentes em sondas de hibridação específicas como a TaqMan (Finnzymes, Finlândia). Na presença de produto de PCR, os fluorocromos são excitados por uma fonte de luz, sendo emitido um sinal proporcional à quantidade de produto. Os fluorocromos intercalados em cadeias de DNA apresentam as vantagens de ter um sinal forte e de serem de baixo custo, apesar de se ligarem inespecificamente. A temperatura de desnaturação (temperatura de melting,  $T_m$ ) depende do tamanho e composição do fragmento desejado, e portanto é possível distinguir o sinal de fluorescência do produto desejado a partir dos sinais de produtos indesejáveis que apresentam  $T_m$  mais baixas. Esta análise pós-PCR é fundamental para assegurar a rapidez e fiabilidade dos resultados. As reacções de PCR foram preparadas utilizando o DyNAmo Flash SYBR Green qPCR kit (Finnzymes, Finlândia) de acordo com as instruções do fabricante. As reacções foram efectuadas segundo as seguintes condições: 2 minutos para activar a enzima a 50°C, 7 minutos a 95°C para uma desnaturação inicial, 10 segundos a 95°C para desnaturação e 45 segundos a 60°C para extensão e emparelhamento dos primers. No fim para desenhar a curva de desnaturação a temperatura foi aumentada 1°C por minuto desde os 50 até aos 95°C.

As variações na intensidade de fluorescência representam a quantidade de produto produzida em cada ciclo. A partir dos valores de intensidade de fluorescência e do número de ciclos é produzida uma curva de crescimento da amplificação, representada na figura 8. A intensidade de fluorescência emitida durante os primeiros ciclos, durante a fase linear, vai definir os valores da linha de base [26]. O valor que representa o número de ciclos em que a reacção alcança um crescimento significativo de fluorescência acima da linha de base é denominado de Ct (Cycle threshold). De seguida ocorre um aumento de detecção de sinal fluorescente pelos receptores associados ao crescimento exponencial de produtos de PCR (fase exponencial). O valor de Ct no gráfico de resultados (figura 8) encontra-se situado no início da fase exponencial. Nos ciclos finais da reacção de PCR ocorre uma atenuação da acumulação de produto (fase limitante). Existem diversas causas que podem influenciar este efeito, como a acumulação de inibidores da polimerase e de produtos secundários da reacção [26].

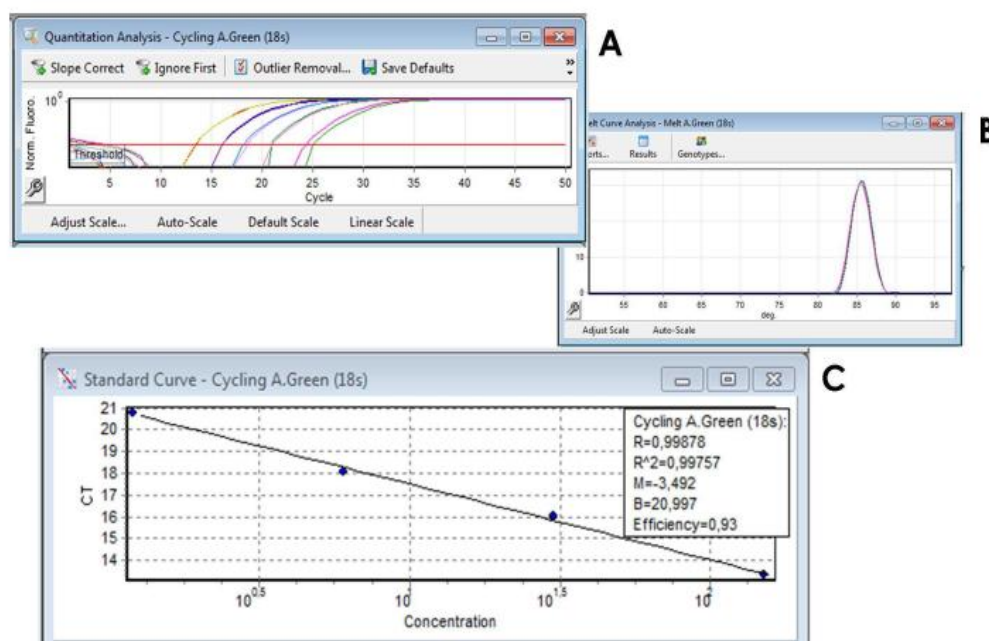


**Figura 8** – Exemplo de uma curva de amplificação obtida por RT-qPCR. A amplificação é dividida em três fases: fase inicial, fase exponencial e fase limitante. A curva azul diz respeito a uma curva obtida na ausência de amostra e a curva a vermelho na presença de uma amostra (adaptado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechQPCR.shtml> - consultado em 02-05-2010).

Apesar de ter uma grande utilização, o RT-qPCR tem vários problemas associados à sua utilização, tais como a variabilidade de RNA e dos protocolos de extração que podem co-purificar inibidores e as diferentes eficácias dos processos RT-PCR e Real Time PCR. Por estes motivos, é importante escolher um método preciso de normalização de forma a controlar essas variações. Na interpretação dos resultados, no entanto, deve ter-se sempre em conta que pode existir uma discrepância entre quantidade de mRNA e os níveis de proteína. Sabendo que a expressão de um gene está dependente do estado metabólico da célula é necessário perceber se o nosso gene de interesse está a ser mais ou menos expresso do que numa situação basal. Para esta comparação é necessário normalizar os dados de expressão dos nossos genes de interesse com os dados de expressão de um gene-padrão (housekeeping) [27]. Um gene-padrão é um gene cuja expressão de mRNA é constante independentemente do tecido ou órgão, num organismo pluricelular, ou das condições de crescimento, em microrganismos. Estes genes são necessários para manter a sustentabilidade da célula e o seu nível de expressão é constante.

Os genes de proteínas específicas do metabolismo ósseo e um gene padrão (rRNA 18s) foram analisados por RT-qPCR no Rotor Gene 6000 (Corbett Research - Qiagen, Alemanha). A eficiência do RT-PCR foi controlada através de curvas-padrão realizadas para cada par de primers utilizado. A curva-padrão relaciona a intensidade dos sinais de fluorescência produzidos durante os ciclos com concentrações

conhecidas de mRNA e o exemplo da construção de uma curva-padrão está representado na figura 9. A quantificação absoluta utiliza padrões de concentrações de amostras diluídas em série para gerar uma curva padrão que produz uma relação linear entre Ct e as quantidades iniciais de RNA total ou de cDNA, permitindo determinar a concentração com base nos valores de Ct [26]. Este método assume que todos os padrões e as amostras têm eficiências de amplificação semelhantes. Aplicando a equação  $\text{Concentração-do-gene} = 10^{(b-Ct)/m}$ , onde b corresponde à ordenada na origem e m ao declive da recta padrão, conseguimos saber a quantidade de RNA.



**Figura 9** – Curva de amplificação (A), curva de desnaturação (B) e recta padrão (C) para o gene de referência rRNA 18s usando SYBR green.

### **4.1.3 Proteína**

A proteómica é a análise sistemática de todas as sequências proteicas e padrões de expressão das proteínas nos tecidos, e envolve o isolamento, separação, identificação e caracterização funcional de todas as proteínas e interações proteicas num organismo [28]. O proteoma é o conjunto de proteínas presentes numa célula, num tecido ou num organismo. As proteínas são as moléculas que executam todas as funções celulares e são traduzidas a partir do mRNA por ribossomas. Após a tradução, as proteínas são modificadas (por exemplo por glicosilação) e classificadas de acordo com a sua localização [28]. Anormalidades na produção ou função das proteínas têm sido relacionadas com muitas doenças. Para compreender a melhor forma de tratar uma determinada doença é necessário identificar as proteínas associadas a essa doença e perceber o seu funcionamento. A monitorização dos níveis das proteínas através da proteómica quantitativa permite avaliar o efeito da regulação da expressão génica que ocorre pós-transcrição e pós-tradução e fornece numerosas pistas quanto à sua função biológica [29].

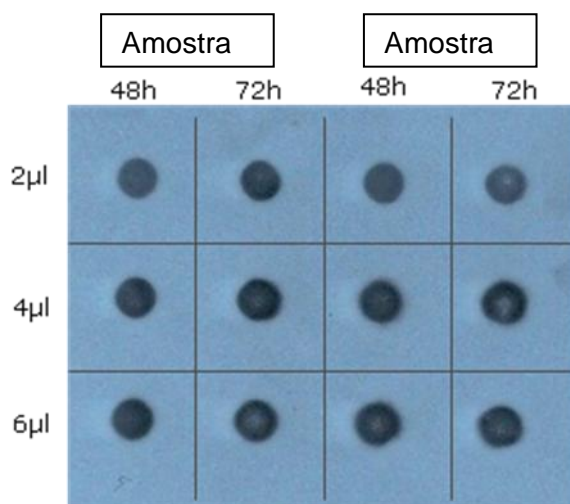
#### **A)Extracção de Proteína**

A eficiência do processo de extracção de proteínas tem um papel importante na proteómica. Para extrair proteína de pó de osso, obtido de acordo com o descrito em 3.1.2, alínea a, foi adicionado à amostra inicial um tampão de lise e esta mistura foi mantida a 4°C durante 72h, sob agitação. Por fim o sobrenadante, onde se encontram as proteínas suspensas, foi recolhido por centrifugação sendo depois congelado a -20°C para futuras utilizações.

#### **B)Dot-blot**

O dot-blot consiste numa técnica em que as proteínas se ligam covalentemente a uma membrana sem ocorrer qualquer tipo de separação electroforética. Assim, esta técnica não permite obter informação quanto ao peso molecular e número de espécies responsáveis pelo sinal. É um método particularmente útil em experiências em que a

discriminação qualitativa é menos relevante que a quantitativa e permite avaliar a proteômica a larga escala [30]. Realizei esta técnica em estudos de proteômica no osso. Na realização do protocolo tratou-se previamente a membrana com tampão de transferência que mantém a membrana receptiva e de seguida aplicaram-se as amostras. Bloqueou-se com tampão de ligação durante 45 minutos seguindo-se uma incubação com um anticorpo primário em tampão de ligação, durante a noite, a 4°C e com agitação. O tampão de ligação é constituído por leite que bloqueia ligações inespecíficas. Lavou-se a membrana com tampão de lavagem e incubou-se com o anticorpo secundário em tampão de ligação, durante 1 hora, a 4°C e com agitação. Lavou-se novamente a membrana com tampão de lavagem e revelou-se após 10 minutos de exposição, por auto-radiografia num filme de raios- X (Figura 10).



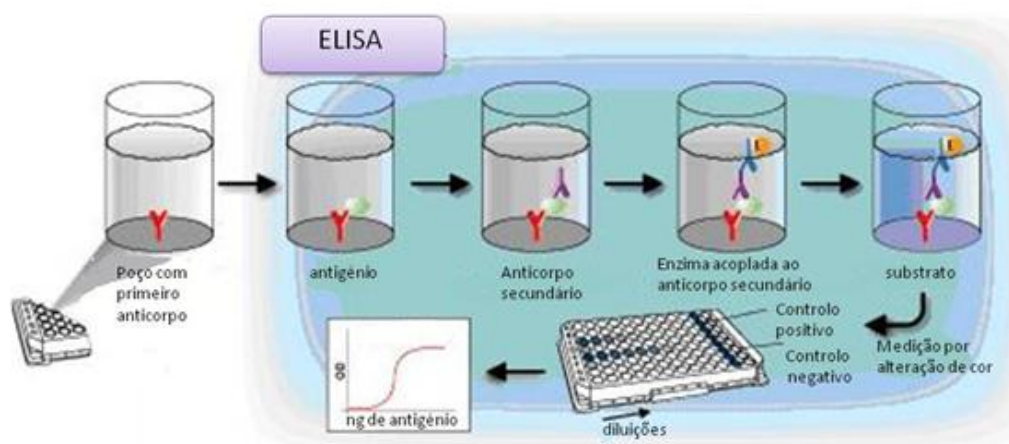
**Figura 10** - Resultado de um dot-blot realizado a duas amostras.

### C) Enzyme Linked Immunosorbent Assay - ELISA

Esta tecnologia de avaliação da ligação anticorpo-antígeno explora a especificidade de anticorpos contra proteínas permitindo determinar se uma determinada proteína está presente numa amostra e, em caso afirmativo, em que quantidade. A técnica *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) utiliza dois anticorpos, um anticorpo específico para o antígeno e um segundo anticorpo que se encontra acoplado a uma enzima e que irá produzir a resposta por produção de um



sinal cromogénico ou fluorescente (Figura 11). A amostra é incubada com o primeiro anticorpo para permitir a ligação deste às proteínas específicas. É então adicionado o segundo anticorpo que reconhece a proteína específica (Figura 11). A quantificação da proteína é determinada pela intensidade relativa de cor ou fluorescência desenvolvida. A amostra com concentração de proteína desconhecida é então comparada com uma curva padrão gerada a partir de diluições seriadas de uma proteína de concentração conhecida, os *standards*. Esta técnica é muito frequentemente utilizada na análise quantitativa de citocinas em amostras biológicas. Esta técnica foi utilizada para quantificar a osteoprotegerina (OPG) presente no soro, utilizando o *Human OPG Elisa Kit* (RayBio, E.U.A.), de acordo com as instruções do fabricante.

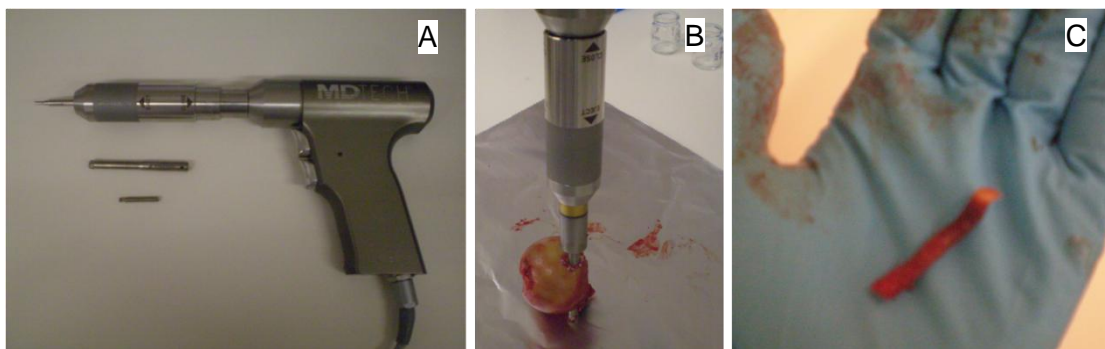


**Figura 11** - Esquema dos vários passos de uma reacção ELISA.

## 4.2 – Drilling

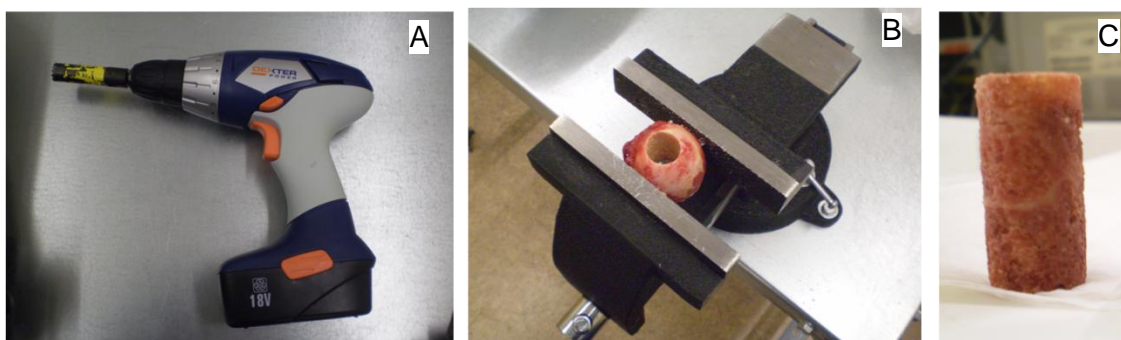
O *drilling* é uma técnica de recolha de amostras cilíndricas de amostras sólidas. As amostras cilíndricas são obtidas de cabeças de fémur de doentes submetidos a artroplastia total da anca, realizada no HSM, por motivo de fractura do colo do fémur ou coxartrose. O consentimento escrito foi obtido de todos os doentes e o estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsínquia (Edinburgo, 2000) e aprovado pela comissão de ética do HSM.

Após cirurgia recolhem-se no laboratório pequenos cilindros com cerca de 5 mm de diâmetro (e comprimento variável, figura 12-C) das cabeças de fémur com um trocater eléctrico *Biopsy-set Straumann* (Straumann, Suíça) (figura 12-A). Estes cilindros serão posteriormente utilizados em diversas técnicas, nomeadamente histomorfometria,  $\mu$ CT e cultura celular, como descrito nos capítulos seguintes. Após este procedimento as cabeças de fémur são congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 12** - Trocater eléctrico *Biopsy-set Straumann* (A), *drilling* de uma cabeça de fémur (B), e cilindro obtido (C)

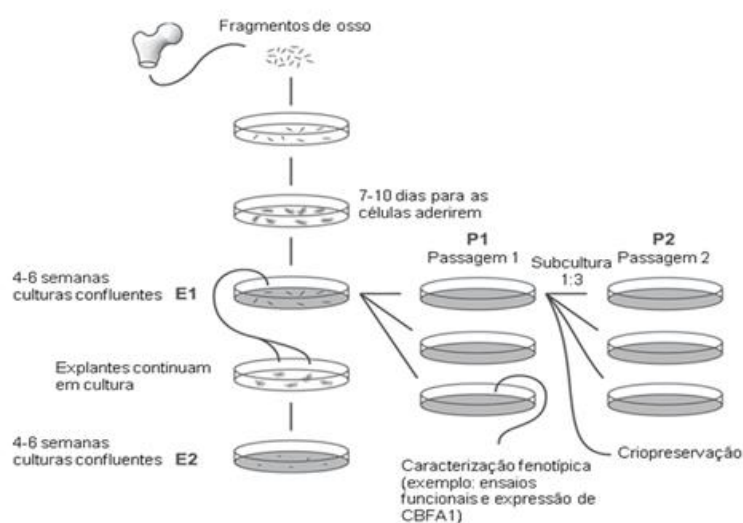
Antes da realização dos ensaios de compressão, descritos no capítulo 4.5, as cabeças femorais são descongeladas à temperatura ambiente, sendo realizadas três medições do diâmetro de cada cabeça de fémur. Para a execução dos ensaios mecânicos, é necessário que os cilindros obtidos tenham as mesmas dimensões, de modo a permitir comparar os resultados das várias amostras. Deste modo, os cilindros de osso foram obtidos perfurando as cabeças de fémur na direcção de maior tensão *in vivo*, com uma broca craniana de 15 mm de diâmetro (Figura 13). A altura de cada cilindro é variável, uma vez que depende do tamanho das cabeças de fémur.



**Figura 13**- Broca craniana de 15 mm de diâmetro (A), orientação da cabeça de fémur (B) e cilindro recolhido (C).

### 4.3 – Cultura primária de Osteoblastos

Os osteoblastos são as células responsáveis pela formação do osso. Sintetizam a maior parte dos constituintes da matriz óssea e controlam a sua subsequente mineralização. Os explantes de osso são obtidos a partir do *drilling*, descrito na secção anterior. As amostras são lavadas em *Hank's Balanced Salt Solution 1X* (HBSS; Invitrogen, Reino Unido). Posteriormente, o osso é cortado em pequenos fragmentos que são colocados em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Invitrogen, Reino Unido) suplementado com 50000 unidades de Penicilina/Estreptomicina (Invitrogen, Reino Unido), 2mM de L-glutamina (Invitrogen, Reino Unido) e 10% de soro bovino fetal (FBS; Invitrogen, Reino Unido). As culturas são mantidas a 37°C com 5 % de CO<sub>2</sub> e o meio é mudado a cada 6-7 dias até as culturas atingirem a confluência, altura em que se realizam as passagens, de acordo com o explicitado na figura 14.



**Figura 14** - Técnica usada para isolamento de osteoblastos a partir de fragmentos de osso (adaptado de [31]).

A caracterização das células em cultura é feita, após a primeira passagem, por dois ensaios funcionais: ensaio de mineralização (para testar a capacidade das células em

cultura de mineralizarem a matriz extra-celular) e detecção da fosfatase alcalina. As células são ainda caracterizadas por de estudos de expressão genica.

O ensaio de mineralização consiste na substituição do meio de cultura por meio de mineralização, composto por igual quantidade de DMEM completo (como acima descrito) suplementado com vitamina C (50µg/ml; Fluka, Alemanha), β-glicerolfosfato (0,1M; Sigma, Alemanha), o que é mudado a cada 2 dias durante 3 semanas. Após esse tempo as células são fixadas em paraformaldeído 10% (Sigma, Alemanha) durante 5 minutos para posterior marcação Von Kossa, que cora as deposições de cálcio de castanho escuro. Esta marcação consiste na incubação das células durante 1 hora em solução de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 5% (Sigma, Alemanha) e sob UV. Para revelação a cultura é de seguida incubada com tiosulfato de sódio 5% (Sigma, Alemanha) durante 2 minutos e o resultado observado, após secagem, ao microscópio óptico.

Para a detecção da fosfatase alcalina as células são fixadas em paraformaldeído 4% durante 5 minutos e de seguida são incubadas com uma solução composta por *Naphtol AS-MX Phosphate Alkaline Solution* (Sigma, Alemanha) e *Fast Violet B Salt* (Sigma, Alemanha). Depois de 1 hora de incubação, protegidas da luz, as células são lavadas com água desionizada e, uma vez secas, observam-se ao microscópio óptico, sendo que a precipitação do substrato hidrolisado pela enzima apresenta coloração amarelo acastanhado.

Para caracterizar as células em cultura foi também estudada a expressão génica de genes codificantes para proteínas responsáveis pela diferenciação de osteoblastos. Ao fim da segunda/terceira passagem as células são armazenadas durante a noite a -80°C (congelação lenta) em criotubos com meio *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI, Invitrogen, Reino Unido) suplementado com 40% de FBS e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, Alemanha), um crioprotector. Os criotubos são depois armazenados em azoto líquido. Posteriormente a expressão génica é avaliada por PCR.

## 4.4 – Técnicas de Imagem

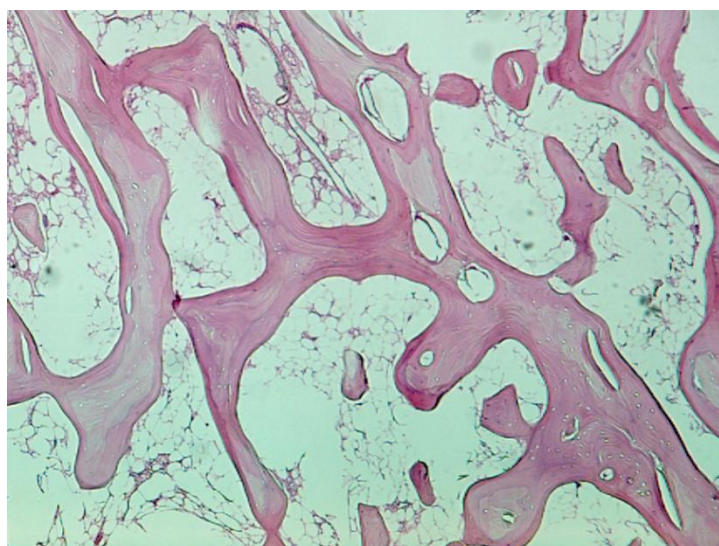
### 4.4.1 – Histologia

O processamento histológico compreende os seguintes passos: fixação, desidratação, diafanização, impregnação, inclusão, corte, montagem e coloração. No caso do tecido ósseo é necessário efectuar um passo inicial de descalcificação, que pode ser realizado por diversas soluções descalcificadores ou recorrendo a uma solução mista de ácido fórmico, acetato de cálcio e ácido nítrico.

A fixação das amostras deve ser efectuada de forma rápida, de modo a preservar a arquitectura tecidular semelhante à apresentada *in vivo*, evitando processos degenerativos como autólices e o efeito das proteases. Este efectua-se em formaldeído a 4% durante 6 a 24h, dependendo do tamanho do fragmento, agitação e temperatura, o que confere rigidez à amostra. Uma vez terminada a fixação inicia-se o processo de desidratação, realizado por imersão em soluções de concentração crescente de álcool, 70%, 96% e 100%. Esta etapa tem por objectivo retirar de forma gradual toda a água presente no tecido. Na diafanização, etapa seguinte, faz-se a substituição do álcool por xilol. O álcool não é miscível com a parafina, pelo que se torna necessária a presença de um agente intermédio, o xilol, que é miscível quer com o álcool quer com a parafina. Poderá então iniciar-se a impregnação, processo através do qual a parafina irá ocupar os espaços anteriormente ocupados por xilol. As amostras estão assim preparadas para serem incluídas em moldes contendo parafina líquida a uma temperatura superior a 60°C (temperatura de fusão da parafina). O objectivo deste processamento é a manutenção da arquitectura tecidular, o mais semelhante à apresentada *in vivo* e permitir que a amostra apresente a mesma rigidez que o meio de inclusão. Este aspecto é extremamente relevante pois permite que no momento do corte não haja diferença entre estruturas (amostra e molde de parafina). Em poucos minutos a parafina endurecerá e obter-se-á um bloco de parafina contendo o fragmento de tecido no seu interior. O corte foi realizado em microtomo de Minot, sendo os blocos inicialmente desbastados (para retirar o excesso de parafina) até que a amostra fique na zona de contacto com a lâmina. Os cortes histológicos deverão apresentar uma medida de 5 µm, e as lâminas obtidas colocadas em estufa a 60°C

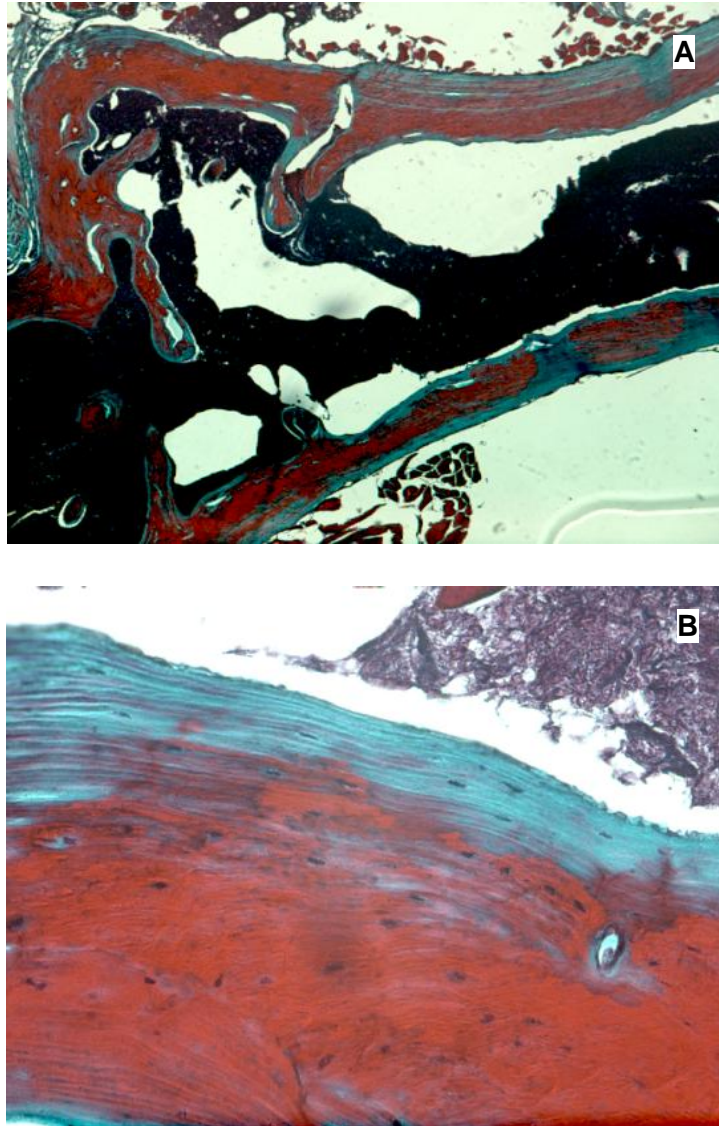
com o objectivo de promover a aderência do corte à lâmina e também a remoção do excesso de parafina.

A coloração, etapa final deste processo, permite a identificação de diversas estruturas tecidulares por utilização de corantes. A acção da maioria dos corantes baseia-se na interacção entre os radicais ácidos dos corantes com os básicos dos tecidos ou vice-versa. Após coloração coloca-se uma lamela a cobrir as amostras, com o auxílio de um meio de montagem sintético, *Entellan*. Após secagem as lâminas podem ser observadas ao microscópio. A coloração de hematoxilina-eosina (HE) é utilizada na rotina de histologia para diagnóstico histopatológico e como base para colorações especiais e ensaios de imunohistoquímica. A hematoxilina (corante básico de cor basófila) liga-se às estruturas ácidas dos tecidos, como por exemplo os núcleos, permitindo observar um bom detalhe nuclear; a eosina (corante ácido de cor eosinófila) tem afinidade para as estruturas básicas dos tecidos, como o citoplasma ou o tecido conjuntivo (figura 15).



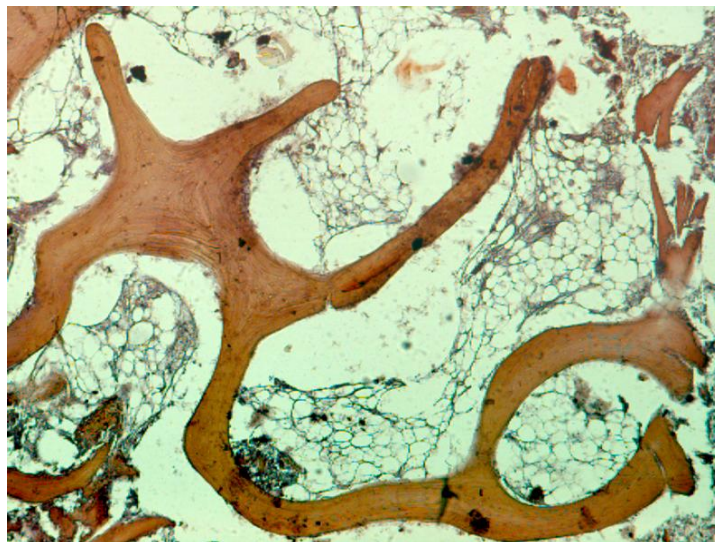
**Figura 15** - Corte histológico de cabeças de fémur humano. Coloração de HE. Objectiva 5X.

A coloração de Tricromo de Masson é utilizada para corar as fibras de colagénio de azul. A ligação do azul de anilina é possível porque o tecido é tratado com ácido que permite que os tecidos menos permeáveis mantenham a coloração vermelho e os mais permeáveis libertam o corante vermelho e incorporem o azul (figura 16).



**Figura 16** - Corte histológico de fêmur de rato. Coloração de Tricromo de Masson. Objectiva 5X (A) e 40X (B)

A coloração de alizarina é uma técnica que permite identificar depósitos de cálcio nos tecidos. O cálcio apresenta afinidade para a alizarina e forma-se um complexo de cristais de cálcio com o corante de cor alaranjada por um processo de quelação (figura 17).



**Figura 17-** Corte histológico de cabeças de fêmur humano. Coloração de alizarina. Objectiva 5X

#### 4.4.2 – Histomorfometria

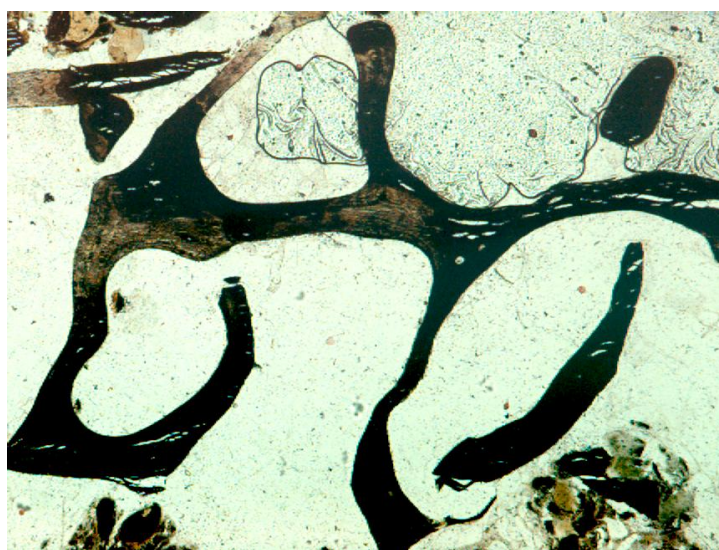
A histomorfometria define-se como o estudo da organização microscópica e estrutura de um tecido. Especificamente, a histomorfometria óssea permite avaliar quantitativa e qualitativamente a microarquitetura do osso utilizando amostras calcificadas. Com esta técnica é possível diferenciar o tecido mineralizado do não-mineralizado (matriz osteóide), bem como analisar elementos celulares [32].

O processamento das amostras compreende cinco passos essenciais: fixação, desidratação, diafanização, impregnação e inclusão. A fixação realiza-se em álcool a 70%, durante 72 horas à temperatura ambiente. Após a fixação, é necessário retirar toda a água do tecido por desidratação através de soluções de concentração crescente de etanol, 96% e 100%, por imersão durante 24h em cada uma das soluções. A diafanização permite substituir o etanol existente na amostra por uma solução intermédia entre o etanol e a substância de impregnação, o metilmetacrilato, uma vez que este não é miscível com a água. A amostra é portanto colocada em acetona durante 24 horas. Na etapa de impregnação a amostra é embebida em metilmetacrilato, por um período mínimo de 72 horas a -20°C. Esta etapa irá permitir que a amostra fique correctamente embebida no meio, que posteriormente irá polimerizar, obtendo-se uma amostra homogénea. A temperatura negativa utilizada nesta etapa permite que o meio permaneça em estado líquido. Após a impregnação, a amostra incluída em metilmetacrilato é colocada a uma temperatura entre 5°C e 10°C.



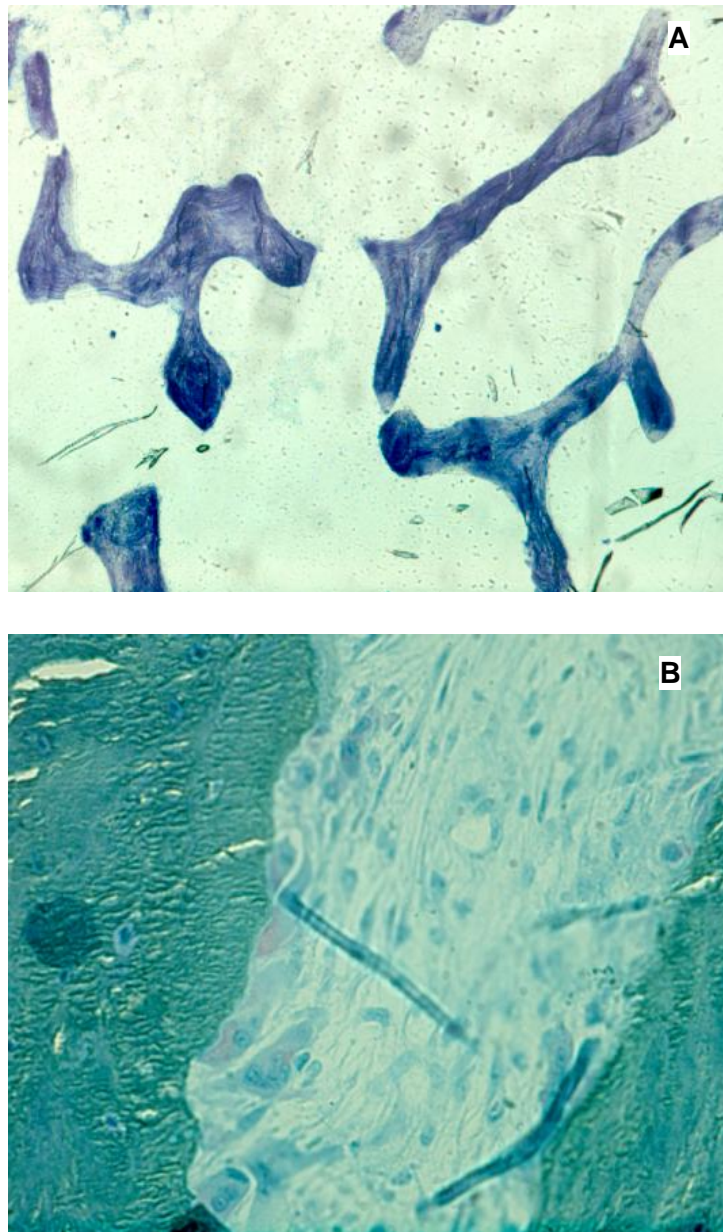
Terminada a polimerização, retira-se a amostra do molde e efectua-se o seu polimento de modo a que estas fiquem em forma de um paralelepípedo ajustável ao suporte do micrótomo. O corte é realizado num micrótomo de Minot semi-automático (Leica RM 2245, Alemanha) com capacidade para cortar amostras de osso calcificado utilizando uma lâmina de tungsténio. O bloco é colocado no micrótomo, orientando a amostra com o osso cortical perpendicular ao gume da faca.

Após o corte é realizada a coloração que permite a diferenciação entre os elementos estruturais e celulares do tecido. Existem várias colorações disponíveis e que são utilizadas de acordo com as estruturas que se pretende estudar. Um dos corantes utilizados é o azul de toluidina, um corante básico que cora de violeta/azul o osso mineralizado e de azul pálido o osteoíde. Esta coloração também permite a visualização das linhas de cimento correspondentes às diferentes fases do crescimento ósseo. Na técnica de Von Kossa, utilizada para uma análise quantitativa do osteoíde, o nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ ) cora de preto os tecidos calcificados (figura 18), enquanto o tricrómio cora o tecido não calcificado (osteoíde) de vermelho [32].



**Figura 18** - Corte histológico de cabeças de fémur humano. Coloração de Von Kossa. Objectiva 5X

Para uma melhor observação dos OC e das suas lacunas de reabsorção utiliza-se a fosfatase ácida, uma enzima lisossómica presente nas células ósseas (figura 19-B). Os OC, responsáveis pela reabsorção óssea, coram de vermelho devido ao seu conteúdo rico em fosfatase ácida, enquanto que o tecido ósseo terá uma cor azul proveniente do azul de toluidina usado como contraste (figura 19-A).



**Figura 19** - Corte histológico de cabeças de fêmur humano. Coloração de azul toluidina (A) e fosfatase ácida (B). Objectiva 5X (A) e 60x (B).

A coloração com tetraciclina permite estudar o metabolismo ósseo e deste modo os parâmetros dinâmicos do osso[33]. Deposita-se na interface osso mineralizado/matriz osteóide, região conhecida como frente de mineralização, e tem a propriedade de se tornar fluorescente quando exposta à luz polarizada. Dessa forma, a frente de mineralização pode ser facilmente identificada como uma linha verde/amarela. A mineralização ocorre à medida que a frente de mineralização avança sobre a matriz

osteóide, permitindo uma avaliação qualitativa da formação de novo osso *in vivo*. Para tal são duas tomas de tetraciclina, com um intervalo de 15 dias entre tomas, terminando quatro dias antes da biópsia. Para este tipo de coloração os cortes são obtidos com uma espessura de 10  $\mu\text{m}$ .

Após o processamento e coloração as lâminas são observadas ao microscópio, com uma câmara acoplada que transfere as imagens para um computador com um software específico para realizar a análise quantitativa e qualitativa da amostra. A análise das amostras é realizada por atribuição de pixéis, sendo estes posteriormente convertidos em unidades de medida. Com esta técnica obtêm-se imagens a duas dimensões, mas é possível analisar parâmetros a três dimensões recorrendo à capacidade do software de inferir valores relativos à organização espacial da amostra. Assim, é possível analisar quantitativamente diversos parâmetros histomorfométricos, como espessura trabecular, separação trabecular, número de trabéculas, número de osteoclastos, lacunas de reabsorção, espessura cortical, entre outros. Nos campos seleccionados para análise, cujo número (entre 15 e 30) depende do intuito da análise, todas as regiões com detritos ósseos resultantes do processamento tecidual devem ser eliminadas devido à sua interferência no processo de quantificação. Os resultados obtidos são relacionados com dados obtidos através de outras técnicas como microtomografia computadorizada ( $\mu\text{CT}$ ) e ensaios mecânicos.

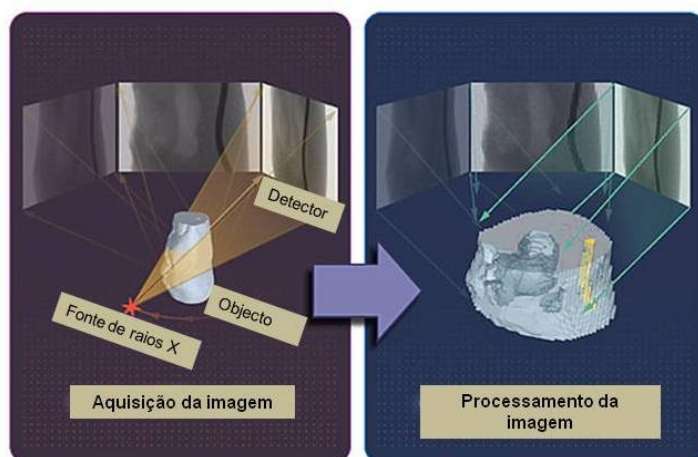
#### 4.4.3 Microtomografia computadorizada ( $\mu\text{CT}$ )

A microtomografia computadorizada (*micro-computed tomography* -  $\mu\text{CT}$ ) é uma técnica imagiológica realizada num aparelho de raio-X de alta resolução. As amostras estudadas foram examinadas utilizando o  $\mu\text{CT}$  scanner (Skyscan d1172 - 1.3Mpix, Bélgica) (Figura 20).



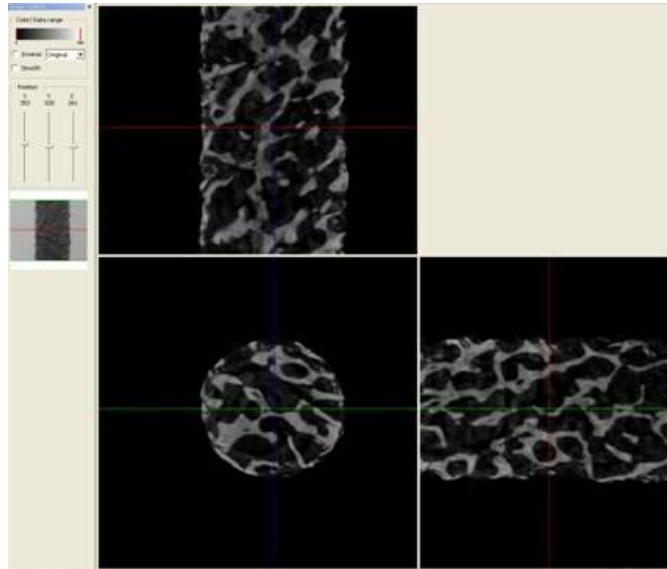
**Figura 20** -  $\mu\text{CT}$  scanner Skyscan d1172 - 1.3Mpix (A) e sua câmara de aquisição (B).

Este procedimento permite a visualização da morfologia e da microarquitetura de um objecto de forma não destrutiva e não invasiva, idêntica ao método de tomografia computadorizada axial (TAC) realizado nos hospitais, mas numa escala menor e com alto poder de resolução. O provete (amostra de interesse) é colocado entre a fonte de raios-X e uma série de detectores planares que recolhem as imagens das projecções ampliadas. A amostra está em rotação, sendo adquiridas milhares de imagens com o incremento de um ângulo (determinado pelo observador), que são depois processadas pelo computador, constituindo fatias virtuais da amostra (Figura 21) [34].



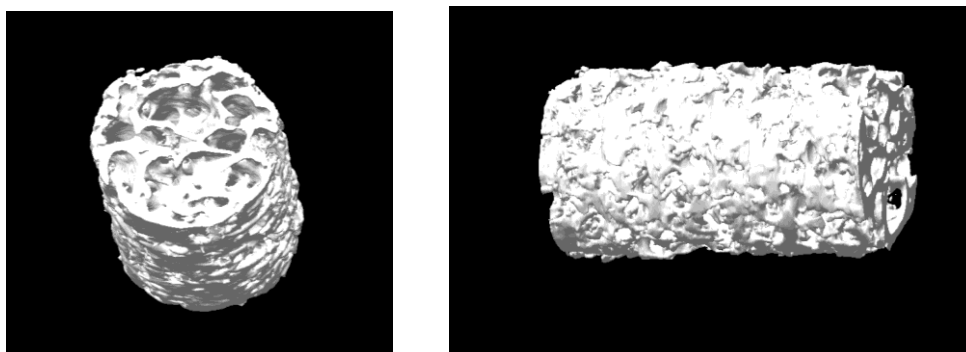
**Figura 21** - Princípio de funcionamento da  $\mu$ CT. O processo é constituído por duas fases: uma fase de aquisição seguida de uma fase de processamento da imagem. (adaptado de <http://www.skyscan.be/company/methods.htm>-consultado em 27-03-2010)

O tempo de aquisição das imagens radiográficas varia de acordo com as dimensões da amostra, o número de parâmetros a adquirir, a resolução da imagem (tamanho do pixel) e o ângulo de incremento entre imagens. As fatias tomográficas são ajustadas, reconstruindo virtualmente a estrutura tridimensional do objecto (Figura 22) [34]. A reconstrução é efectuada pelo algoritmo modificado de Feldkamp no software *Nrecon* (SkyScan, Bélgica).



**Figura 22** - Imagem obtida depois do processo de reconstrução das várias fatias tomográficas.

Uma outra forma de observar a amostra consiste em realizar uma reconstrução denominada *volume rendering* (Figura 23). Este processo é mais demorado do que a reconstrução anterior e permite a visualização e manipulação do objecto no espaço. No entanto, a sua realização não é necessária para o cálculo dos parâmetros estruturais e morfológicos.



**Figura 23** - Imagem a três dimensões (vista de dois ângulos) obtida após *volume rendering*.

Para diferenciar o tecido ósseo do tecido não-ósseo a imagem deve ser binarizada, ou seja, tem de se escolher um valor limiar (*threshold*) para os níveis de cinzentos,

que será aplicado à imagem antes do cálculo dos parâmetros micro-estruturais. O resultado é uma imagem onde a fase branca corresponde ao tecido ósseo e a fase preta ao tecido não-ósseo (não quantificado). O cálculo dos parâmetros micro-estruturais é efectuado usando a imagem binarizada, de modo que a precisão dos valores obtidos depende dos valores de *threshold* utilizados para a binarização.

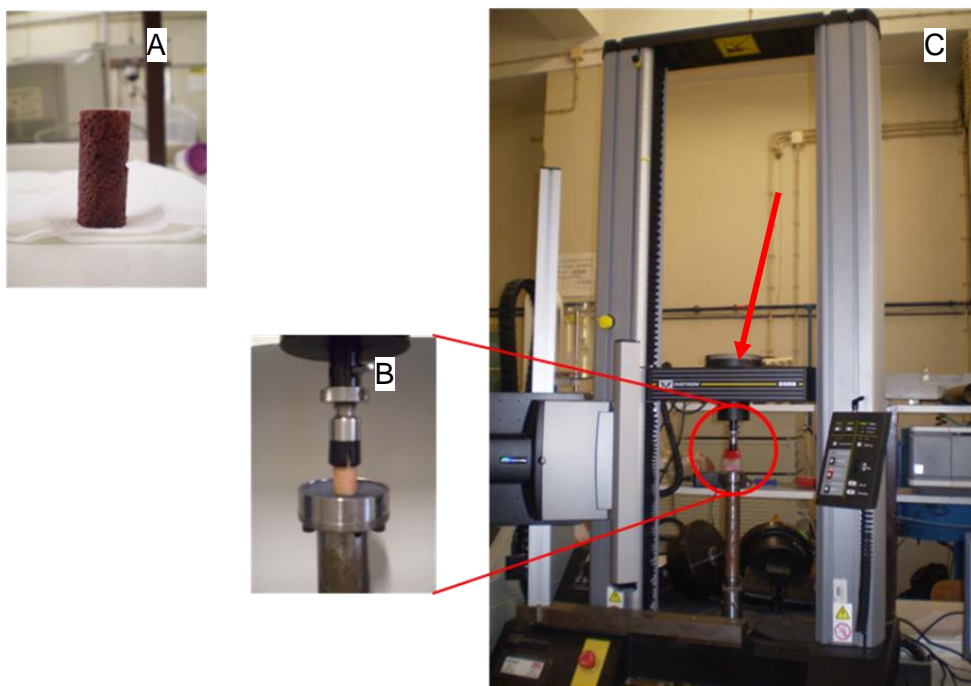
O conhecimento das propriedades macroscópicas e microscópicas de estruturas biológicas, como o osso, é de grande interesse na caracterização da qualidade da amostra. A  $\mu$ CT permite efectuar uma avaliação quantitativa tridimensional das características estruturais.

#### 4.5 - Testes de compressão

O esqueleto tem como principais funções servir de suporte e proteger os órgãos vitais. Para desempenhar essas funções o tecido ósseo tem de ser rígido, mas ao mesmo tempo flexível para suportar as forças e os movimentos a que está sujeito ao longo da vida de um indivíduo. O osso trabecular renova-se ao longo da vida, tentando adaptar o desempenho mecânico às condições a que é exposto [35].

Os testes mais utilizados para avaliar o desempenho mecânico do tecido ósseo são denominados testes de compressão e utilizam amostras de osso trabecular. Os dados obtidos a partir destes testes permitem caracterizar o comportamento mecânico do osso face à aplicação de uma carga e avaliar a sua resistência mecânica. Como se pretende apenas testar o osso trabecular é necessário cortar os topos de cada cilindro, que correspondem ao osso cortical, usando uma serra eléctrica. Este processo permite que as bases fiquem paralelas entre si e perpendiculares ao eixo do cilindro. Após o *drilling*, efectua-se a remoção da medula óssea e da gordura existentes na estrutura trabecular. Os cilindros são imersos numa solução composta por porções iguais de clorofórmio e metanol e mantidos sob agitação durante três horas. Após o tratamento de desengorduramento os cilindros são colocados em PBS até à realização dos testes de compressão. Antes de iniciar a execução destes, os cilindros de osso trabecular são polidos com uma lixa de carboneto de silício de modo a garantir o contacto máximo entre as bases da amostra e os pratos de compressão. Realizei os ensaios de compressão no Instituto Superior Técnico, numa máquina universal de ensaios mecânicos (Instron 5566™; Instron Corporation, Canton, E.U.A.) (Figura 24). Esta máquina está ligada a um computador com o software *Bluehill*® 2 (Instron, Copyright 1997-2007, USA), que permite definir as características de ensaio, como a

velocidade do deslocamento do travessão e corrigir as curvas tensão/deformação de acordo com as dimensões de cada amostra (altura e diâmetro).



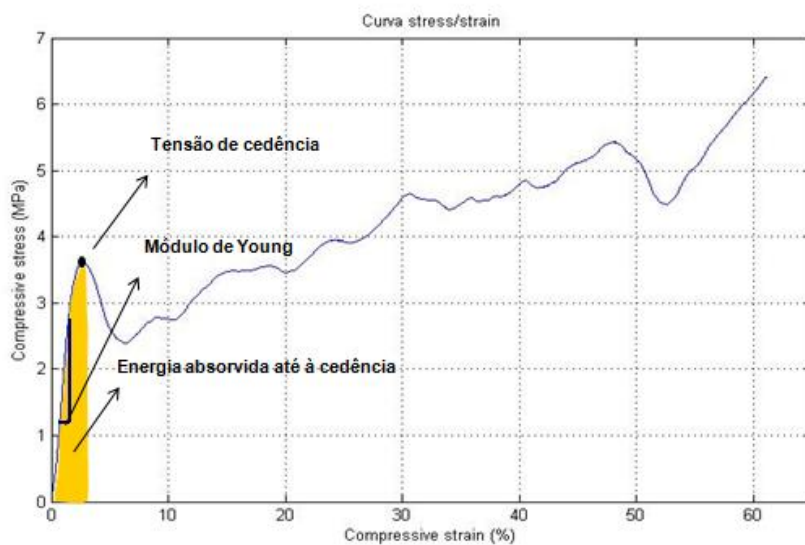
**Figura 24** – Cilindro de osso trabecular (A), pratos que comprimem o osso trabecular (B) e máquina universal de ensaios mecânicos Instron 5566™ (C). A seta indica o travessão da máquina.

O travessão da máquina (indicada pela seta na figura 24-C), que se encontra ligado ao prato superior da montagem (Figura 24-C), deslocar-se-á comprimindo o provete de osso trabecular, permitindo a medição da deformação sofrida pelo cilindro.

O comportamento biomecânico de compressão do osso trabecular pode ser traduzido por uma curva tensão/deformação (figura 25). Esta curva pode ser descrita em três fases: na primeira fase (região elástica) o material deforma-se reversivelmente, isto é, se se retirar a força aplicada este retoma as suas dimensões originais; na segunda fase (região plástica) o material deforma-se irreversivelmente, estando macroscopicamente intacto apesar de a quantidade de energia absorvida levar ao desenvolvimento de micro-fissuras; a terceira fase é caracterizada pela densificação do material e conseqüente aumento de tensão sem deformação, ou seja, deixam de existir espaços dentro da estrutura, ocorrendo o colapso total [36].

A análise da região de elasticidade de uma curva tensão/deformação permite o cálculo de três parâmetros: tensão de cedência, energia absorvida até à cedência e módulo de *Young* (figura 25). A tensão de cedência é definida como o valor de tensão atingido no final da região elástica, ou seja, a força que é necessária aplicar para a

estrutura começar a desenvolver as primeiras micro-fissuras . Esta propriedade é um indicador da resistência óssea. Por outro lado, a energia absorvida até à cedência é determinada pelo cálculo da área sob a curva tensão/deformação até à tensão de cedência, a qual corresponde à capacidade do osso absorver energia, deformando-se sem propagação das micro-fissuras no seu interior. O módulo de *Young* determina a rigidez do material e corresponde ao declive entre dois pontos na região linear da curva, ou seja, o osso é tanto mais rígido e menos flexível quanto maior for o valor do módulo de *Young* [35] .



**Figura 25** - Exemplo de curva tensão/deformação padrão.

Esta deformação é traduzida assim no eixo dos xx do gráfico de tensão/deformação. O cálculo das propriedades mecânicas anteriormente referidas é efectuado com o auxílio da ferramenta matemática *MatLab 7,1* (R14 SP3, The Mathworks, Inc, Copyright 1984-2006, USA), utilizando os pontos da curva de tensão-deformação.

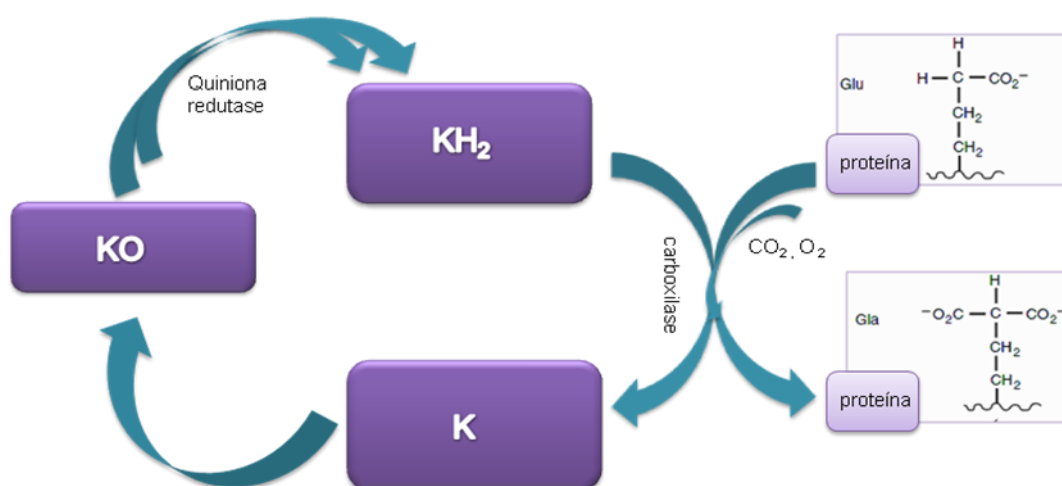


## 5- Estudo dos níveis de osteocalcina em doentes com fractura do colo do fémur

### 5.1 – Introdução

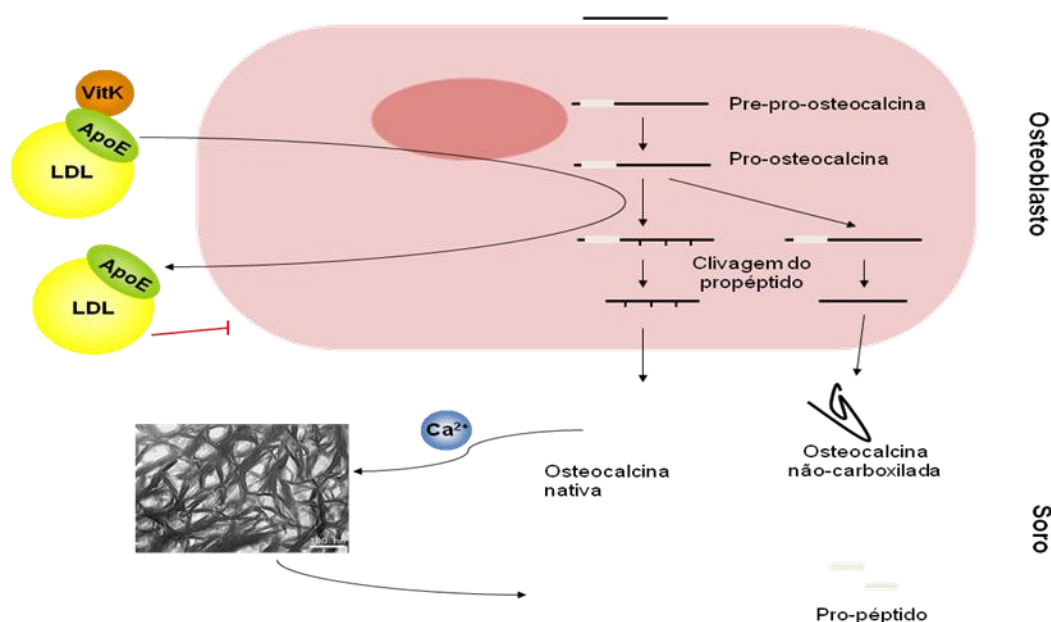
A osteoporose é um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial. Trata-se de uma doença óssea caracterizada pela deterioração da microarquitetura do osso e diminuição da massa óssea, com conseqüente aumento da fragilidade do osso e susceptibilidade para a ocorrência fractura [37-38]. Vários estudos têm demonstrado que défices nos níveis de vitamina K estão relacionados com as fracturas osteoporóticas . A vitamina K actua como co-factor essencial na reacção de carboxilação de resíduos específicos de ácido glutâmico (Glu). Durante esta reacção a forma reduzida da vitamina K ( $KH_2$ , hidroquinona) é convertida num epóxido, cuja regeneração requer uma redutase específica, a carboxilase (figura 1) [39].

Proteínas dependentes da vitamina K necessitam desta como co-factor da carboxilase em reacções de modificações pós-transcricionais em que resíduos de ácido glutâmico são convertidos em ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) (Figura 1)[39] .



**Figura 26** - Ciclo da vitamina K e carboxilação das proteínas dependentes da vitamina K ( $KH_2$ – hidroquinona, K – vitamina K, KO- epóxido da vitamina K) Adaptado de [39].

A osteocalcina é uma proteína de baixo peso molecular constituída por 49 aminoácidos, contendo 3 resíduos de ácido  $\gamma$ -carboxiglutâmico (Gla) e é produzida pelos osteoblastos durante a formação da matriz óssea. É uma das proteínas não colagenosas mais abundantes na matriz extracelular óssea e o seu doseamento no soro constitui um importante marcador biológico da actividade osteoblástica [40]. O precursor da osteocalcina, sintetizado pelo osteoblasto, é carboxilado na presença da vitamina K resultando osteocalcina carboxilada que é depois incorporada na matriz óssea. A osteocalcina carboxilada tem a capacidade de se ligar ao cálcio, devido à presença dos três resíduos Gla. Quando os níveis de vitamina K são insuficientes no osso, a osteocalcina não é carboxilada e a forma descarboxilada (ucOC, undercarboxylated osteocalcin) é secretada pelos osteoblastos para a circulação sanguínea (Figura 2).



**Figura 27** - Produção de osteocalcina pelos osteoblastos.

Quando a remodelação óssea está acelerada, o precursor da osteocalcina é excessivamente sintetizado e há um aumento dos níveis ucOC. Estudos demonstram que para reduzir os níveis ucOC no soro é necessário aumentar os níveis de vitamina K que entram na célula [41].

Existem diversos estudos que correlacionam a quantidade de ucOC com vários factores, tais como sexo, idade, risco de fractura e menopausa. O doseamento da ucOC permite estimar indirectamente os níveis de vitamina K e a mineralização da

matriz óssea. Este estudo teve por objectivo avaliar os níveis de ucOC num grupo de doentes fracturaram o colo do fémur e comprar num grupo de doentes com coxartrose

## 5.2 – Material e Métodos

Neste estudo foram utilizadas amostras de doentes que foram submetidos a artroplastia total da anca recrutadas segundo a Declaração de Helsínquia (Edinburgo, 2000) e as boas práticas clínicas. Todos os doentes assinaram um consentimento informado autorizando a colheita de amostras biológicas para fins de investigação. A cada doente foi colhida uma amostra de sangue para a recolha de soro e neste foi doseada a osteocalcina descarboxilada (ucOC) por ELISA utilizando o Undercarboxylated Osteocalcin (Gluo-OC) EIA kit (Takara Bio, Japão) segundo as indicações do fabricante.

Os resultados foram analisados de acordo com a sua distribuição, recorrendo ao teste não-paramétrico Mann-Whitney, tendo sido considerados estatisticamente significativos os valores de  $p$  menores que 0,05 . A análise estatística foi realizada usando o *software* GraphPad Prism (GraphPad software, Inc., EUA).

## 5.3 – Resultados

Colheram-se amostras a 34 doentes dos quais 15 foram submetidos a cirurgia por fractura do colo do fémur e 19 por coxartrose. Os doentes foram agrupados de acordo com o sexo e a razão da cirurgia. As características da população em estudo estão resumidas na tabela 1.

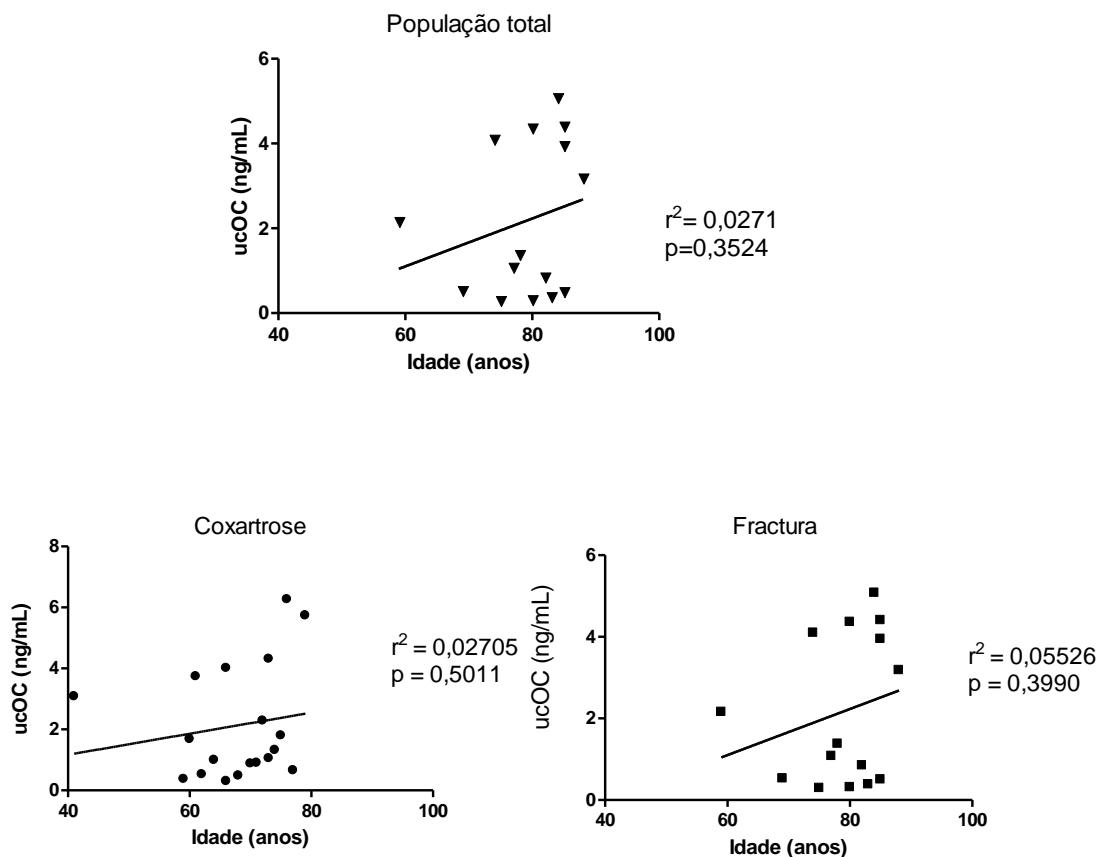
**Tabela 2** – Características da população estudada.

	Fractura			Coxartrose		
	Total	Homens	Mulheres	Total	Homens	Mulheres
<b>Número de doentes</b>	15	2	13	19	7	12
<b>Idade (anos ± dp)</b>	78.9±7.5	73.5±6.4	79.8±7.5	67.7±8.9	64.4±5.7	69.7±9.9
<b>DMO ± dp (g cm<sup>-3</sup>)</b>	0.71±0.1 (n=6)			0.85±0.1 (n=7)		
<b>ucOC ± dp (ng/ml)</b>	2.17±1.8	0.95±0.6	2.36±1.9	2.12±1.9	1.52±1.8	2.48±2.1

Os resultados apresentados são media±desvio padrão (dp); DMO – densidade mineral óssea ucOC= osteocalcina descarboxilada.

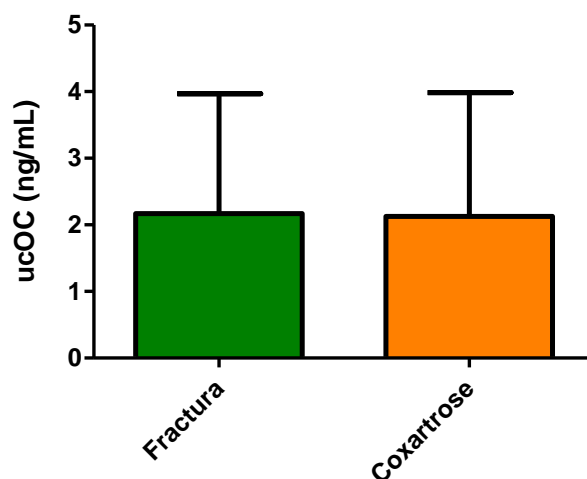
As diferenças de idades entre fracturas e CA são estatisticamente significativas (p<0,001).

Ao correlacionar os níveis de ucOC com a idade não se observou qualquer associação entre os dois parâmetros. No caso de doentes com fractura há uma tendência de associação positiva entre os níveis de ucOC com a idade, mas esta correlação não é estatisticamente significativa, sendo que a uma idade mais elevada correspondem valores mais elevados de ucOC (Figura 28).



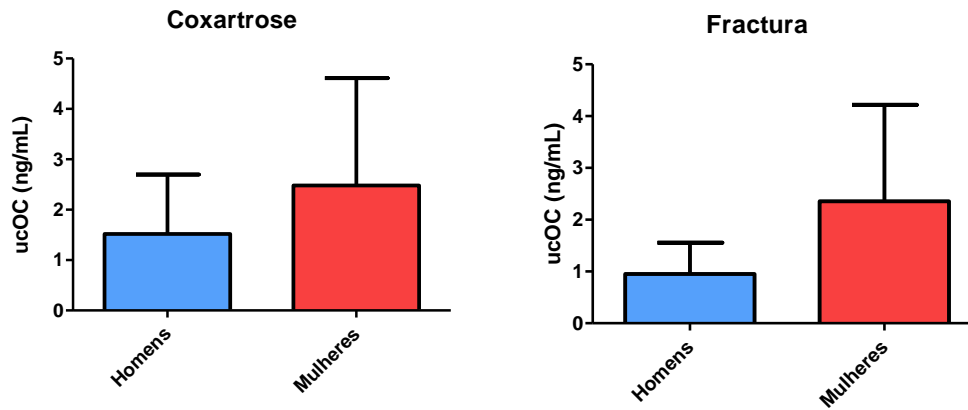
**Figura 28** - Correlação entre os níveis de ucOC e a idade dos doentes.

Ao analisar os níveis de ucOC nos doentes operados por fractura e nos doentes operados por CA não observamos diferenças estatisticamente significativas (Figura 29).



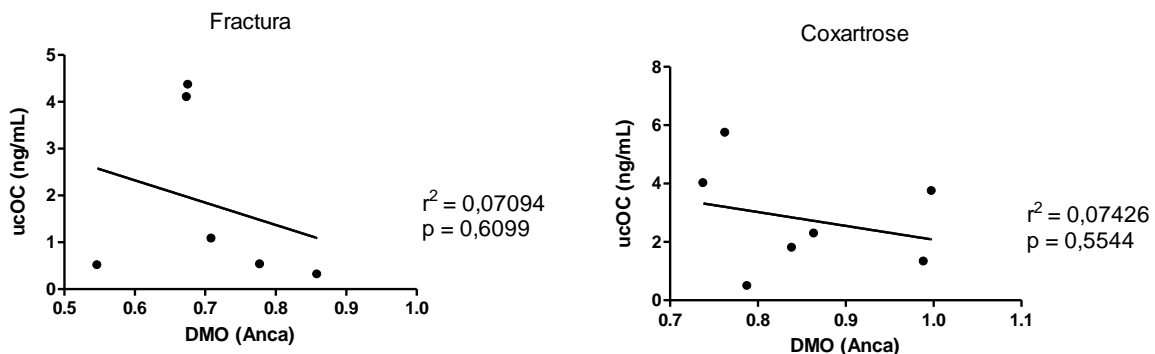
**Figura 29** - Níveis de ucOC para os dois grupos avaliados.

No entanto, avaliando cada grupo de doentes e considerando separadamente homens e mulheres, é de salientar que as mulheres apresentam maiores níveis de ucOC (apesar desta diferença não ser estatisticamente significativa) (Figura 30).



**Figura 30-** Níveis de ucOC de acordo com o sexo e com a razão da cirurgia.

O diagnóstico de osteoporose é efectuado através da absorciometria de dupla energia radiológica (densitometria óssea ou DEXA). Com este método determina-se o valor da densidade mineral óssea (DMO) a nível da coluna lombar (representativa do osso trabecular) e a nível do colo do fémur (representativa do osso cortical). Ao procurar uma associação entre os valores de DMO ao nível do colo do fémur e os níveis de ucOC não se observou qualquer correlação, apesar de em todas as situações se observar uma tendência de associação negativa (Figura 31).



**Figura 31-** Correlação entre os níveis de ucOC e os valores da DMO do colo do fémur, em doentes com fractura do colo do fémur e doentes com coxartrose

## 5.4 – Discussão

Os resultados obtidos não nos indicam correlações significativas entre os níveis de ucOC e a idade, sexo ou BMD, o que se pode dever ao facto de a amostra utilizada ser limitada em número. No entanto, de realçar que a tendência de associação positiva entre os níveis de ucOC com a idade é indicativa de que um aumento da idade corresponderá a uma diminuição da mineralização óssea. As amostras humanas são variáveis e heterogéneas, pelo que não podemos tirar conclusões com base nestes resultados preliminares, devendo o esclarecimento dos resultados obtidos partir do aumento do número de amostras.

Outro factor importante que deverá ser avaliado como complemento a este estudo é a importância dos polimorfismos da apolipoproteína E (ApoE) nos níveis de ucOC e consequentemente no processo de mineralização óssea. A maioria das lipoproteínas têm apolipoproteínas que determinam a interacção das lipoproteínas com os seus receptores à superfície das células. Algumas apolipoproteínas podem mediar a endocitose das lipoproteínas permitindo que o seu conteúdo lipídico (e a vitamina K) entrem na célula. O transporte da vitamina K para as células não é uniforme. O osso e o fígado, por exemplos, são tecidos que possuem diferentes requisitos para uma eficiente *entrada* da vitamina K na célula [42]. A disponibilidade da vitamina K no osso está afectada pelo metabolismo das lipoproteínas. A ApoE é um dos factores que contribuem como elo de ligação entre a vitamina K e o seu transportador. A ApoE é uma glicoproteína polimórfica que se associa às lipoproteínas do tipo VLDL (*very low density lipoproteins*) e promove a remoção destas partículas do plasma. O *locus* da ApoE apresenta, na maioria dos humanos, três produtos génicos comuns que diferem na sua composição em arginina (Arg) e cisteína (Cys) nas posições 112 e 158 das respectivas cadeias polipeptídicas [43]. Os três alelos  $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$ , e  $\epsilon 4$  têm diferentes capacidades de ligação aos receptores celulares e combinações de dois dos três alelos principais podem originar seis possíveis genótipos: ApoE  $\epsilon 2/\epsilon 2$ , ApoE  $\epsilon 3/\epsilon 3$ , ApoE  $\epsilon 4/\epsilon 4$ , ApoE  $\epsilon 2/\epsilon 3$ , ApoE  $\epsilon 3/\epsilon 4$  e ApoE  $\epsilon 2/\epsilon 4$  [43]. O alelo ApoE  $\epsilon 3$  é o mais frequente e vários estudos indicam uma associação entre o genótipo da ApoE e o risco de fractura e osteoporose [44]. Este polimorfismo será avaliado na população de interesse e será estudada a sua associação com os níveis de ucOC bem como com outros factores determinantes da qualidade óssea e as propriedades biomecânicas do osso.

## 6- Conclusão

Com a realização deste estágio foi possível integrar um laboratório de investigação e adquirir conhecimentos de gestão e técnicas laboratoriais, bem como desenvolver um projecto de investigação. O trabalho desenvolvido em ambos os campos permitiu aplicar os conhecimentos anteriormente obtidos durante o percurso académico de forma coerente e prática. Devido à natureza multifacetada do Mestrado em Ciências Biomédicas a realização deste tipo de trabalho tornou-se uma mais-valia no conhecimento prático de diversas áreas.

Durante o estágio aprendi e pratiquei várias técnicas praticadas num laboratório de investigação nos campos da inflamação e do osso. Estudos genéticos, como a detecção de polimorfismos, permitem obter resultados importantes para compreender o prognóstico e até mesmo na avaliação da susceptibilidade a doenças. Por outro lado, estudos de expressão génica permitem perceber a actividade metabólica de células de interesse, neste caso das células envolvidas na remodelação óssea, os osteoblastos e os osteoclastos.

A relação entre resistência óssea, densidade mineral óssea e risco de fractura está bem estabelecida na literatura. Na unidade é estudada a associação entre as propriedades mecânicas do osso e outras variáveis estruturais (microestrutura, mineralização, expressão génica) obtidas a partir de técnicas diversas. O estudo dos níveis de osteocalcina em doentes com fractura do colo do fémur permitiu utilizar metodologias para o desenvolvimento de um projecto de investigação. No decorrer do mesmo verificou-se que o número de amostras utilizadas era muito reduzido, não sendo possível correlacionar significativamente os níveis de ucOC com a idade, sexo ou DMO. Para complementar os resultados obtidos e no seguimento do trabalho, este estudo será efectuado num maior número de amostras e serão também estudados outros parâmetros como por exemplo a existência de uma associação entre os níveis de ucOC e de apolipoproteína E e de polimorfismos nesta proteína.

O desenvolvimento deste trabalho numa unidade de investigação translacional permitiu-me compreender que os resultados provenientes da parceria entre a investigação básica e a clínica desempenham um papel extremamente importante. Resultados de trabalhos assim desenvolvidos podem conduzir a um aumento da prevenção das doenças, tornando cada vez mais eficazes e específicos os tratamentos médicos.



## Bibliografia

1. Lee, W.H., *Translational medical research: present and future*. Am J Transl Res, 2009. **1**(2): p. 99-100.
2. Rodrigues, A., et al., *Evaluation of bone mechanical strength and fracture risk assessment (Frax) in patients with hip joint replacement surgery*. Acta Reumatol Port, 2009. **34**(3): p. 504-10.
3. IAN MACKAY, M.D. and F.S.R. M.D., *Advances in Immunology*. The New England Journal of Medicine, 2000. **343**.
4. Wordsworth, B.P. and J.I. Bell, *The immunogenetics of rheumatoid arthritis*. Springer Semin Immunopathol, 1992. **14**(1): p. 59-78.
5. Eike, M.C., et al., *Genetic variants of the HLA-A, HLA-B and AIF1 loci show independent associations with type 1 diabetes in Norwegian families*. Genes Immun, 2009. **10**(2): p. 141-50.
6. Brown, M.A., *Genetics and the pathogenesis of ankylosing spondylitis*. Curr Opin Rheumatol, 2009. **21**(4): p. 318-23.
7. Theill, L.E., W.J. Boyle, and J.M. Penninger, *RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 795-823.
8. Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J.E. Fonseca, *Osteoimmunology--the hidden immune regulation of bone*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(3): p. 250-5.
9. Dacy, P., T. Schinke, and G. Karsenty, *The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance*. Science, 2000. **289**(5484): p. 1501-4.
10. Pettit, A.R., et al., *RANKL protein is expressed at the pannus-bone interface at sites of articular bone erosion in rheumatoid arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2006. **45**(9): p. 1068-76.
11. Schett, G., et al., *How antirheumatic drugs protect joints from damage in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(10): p. 2936-48.
12. Stark, Z. and R. Savarirayan, *Osteopetrosis*. Orphanet J Rare Dis, 2009. **4**: p. 5.
13. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
14. Nose, M., et al., *Comparison of osteoclast precursors in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis and osteoporosis patients*. J Bone Miner Metab, 2009. **27**(1): p. 57-65.
15. Schett, G., et al., *High-sensitivity C-reactive protein and risk of nontraumatic fractures in the Bruneck study*. Arch Intern Med, 2006. **166**(22): p. 2495-501.
16. Abdulghani, S., et al., *Biomechanical effects of inflammatory diseases on bone-rheumatoid arthritis as a paradigm*. Autoimmun Rev, 2009. **8**(8): p. 668-71.
17. Sambrook, P. and C. Cooper, *Osteoporosis*. Lancet, 2006. **367**(9527): p. 2010-8.
18. Cambon-Thomsen, A., E. Rial-Sebbag, and B.M. Knoppers, *Trends in ethical and legal frameworks for the use of human biobanks*. Eur Respir J, 2007. **30**(2): p. 373-82.
19. Auray-Blais, C. and J. Patenaude, *A biobank management model applicable to biomedical research*. BMC Med Ethics, 2006. **7**: p. E4.
20. Decreto-Lei nº12/2005 de 26 de Janeiro de 2005 - Informação genética pessoal e informação de saúde. Diário da República – I série A, n. 2004, D.I.S.o.D.G.H.U.d.O.d.
21. Lee, J.H., et al., *Comparisons of three automated systems for genomic DNA extraction in a clinical diagnostic laboratory*. Yonsei Med J, 2010. **51**(1): p. 104-10.
22. Kim, S. and A. Misra, *SNP genotyping: technologies and biomedical applications*. Annu Rev Biomed Eng, 2007. **9**: p. 289-320.
23. Fleige, S. and M.W. Pfaffl, *RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance*. Mol
- 24.

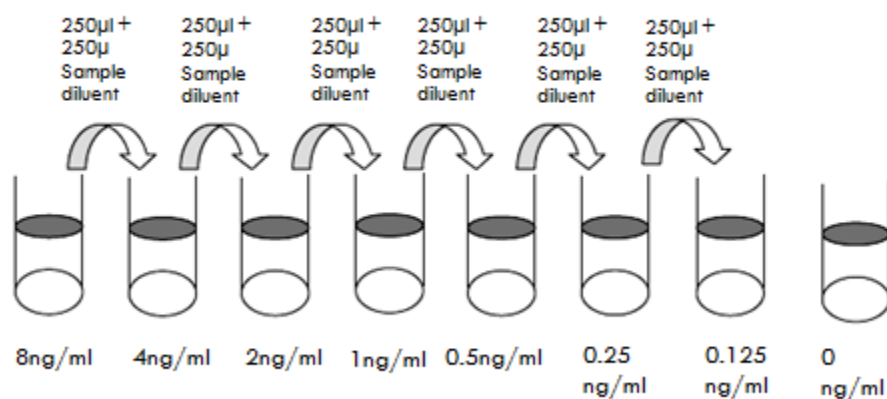
- Aspects Med, 2006. **27**(2-3): p. 126-39.
25. Schroeder, A., et al., *The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements*. BMC Mol Biol, 2006. **7**: p. 3.
  26. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. Biotechniques, 2005. **39**(1): p. 75-85.
  27. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes Immun, 2005. **6**(4): p. 279-84.
  28. Lim, M.S. and K.S. Elenitoba-Johnson, *Proteomics in pathology research*. Lab Invest, 2004. **84**(10): p. 1227-44.
  29. Zhang, H., et al., *Proteomics in bone research*. Expert Rev Proteomics, 2010. **7**(1): p. 103-11.
  30. Jiang, X., et al., *Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis*. J Proteome Res, 2007. **6**(6): p. 2287-94.
  31. Miep H. Helfrich, P. and M. Stuart H. Ralston, *Bone Research Protocols*. 2003.
  32. Lespessailles, E., et al., *Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture*. Joint Bone Spine, 2006. **73**(3): p. 254-61.
  33. Ralston, S.H., *Bone densitometry and bone biopsy*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2005. **19**(3): p. 487-501.
  34. Teo, J.C.M., et al., *Determination of Bone Trabeculae Modulus-An Ultrasonic Scanning and MicroCT (mCT) Imaging Combination Approach*. Experimental Mechanics, 2006. **46**: p. 453-461.
  35. Aspden, R.M., *Bone Research Protocols*, ed. P. Miep H. Helfrich and M. Stuart H. Ralston. 2003.
  36. Gupta, H.S. and P. Zioupos, *Fracture of bone tissue: The 'hows' and the 'whys'*. Med Eng Phys, 2008. **30**(10): p. 1209-26.
  37. Weber, P., *Vitamin K and bone health*. Nutrition, 2001. **17**(10): p. 880-7.
  38. Iwamoto, J., et al., *High-dose vitamin K supplementation reduces fracture incidence in postmenopausal women: a review of the literature*. Nutr Res, 2009. **29**(4): p. 221-8.
  39. Berkner, K.L. and K.W. Runge, *The physiology of vitamin K nutrition and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis*. J Thromb Haemost, 2004. **2**(12): p. 2118-32.
  40. Berkner, K.L., *The vitamin K-dependent carboxylase*. Annu Rev Nutr, 2005. **25**: p. 127-49.
  41. Yamauchi, M., et al., *Relationships between undercarboxylated osteocalcin and vitamin K intakes, bone turnover, and bone mineral density in healthy women*. Clin Nutr, 2010.
  42. Shearer, M.J. and P. Newman, *Metabolism and cell biology of vitamin K*. Thromb Haemost, 2008. **100**(4): p. 530-47.
  43. Beavan, S.R., et al., *Ethnic differences in osteocalcin gamma-carboxylation, plasma phylloquinone (vitamin K1) and apolipoprotein E genotype*. Eur J Clin Nutr, 2005. **59**(1): p. 72-81.
  44. Shiraki, M., et al., *Association of bone mineral density with apolipoprotein E phenotype*. J Bone Miner Res, 1997. **12**(9): p. 1438-45.

## Anexos

### Undercarboxylated Osteocalcin (Gluo-OC) EIA kit (Takara Bio, Japão)

#### Preparação dos reagentes

- Reconstituir o *biotinilated antibody-POD conjugated* em 1ml H<sub>2</sub>O.
- Adicionar 1ml H<sub>2</sub>O ao Vial 3 (standard de ucOC) para preparar um stock de 8ng/ml.
- Preparar as diluições dos standards em *Sample Diluent* de acordo com o esquema.



#### Protocolo

1. Equilibrar os reagentes à temperatura ambiente
2. Adicionar 100µl de standards e amostras e incubar durante 2 à temperatura ambiente, no escuro.
3. Lavar 3 vezes com PBS.
4. Adicionar 100µl de *biotinilated antibody-POD conjugated* e incubar durante 1h à temperatura ambiente no escuro.
5. Lavar 4 vezes com PBS.
6. Adicionar 100µl de *substrate solution* e incubar durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro (verificar a alteração de cor).
7. Adicionar 100µl de *stop solution* (ácido sulfúrico 1N) e medir a 450nm.