



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS – ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS**

DANIELA BAHIA CARDOZO

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE GLICOCORTICÓIDE
NA DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM
OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE
ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA**

Salvador
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DANIELA BAHIA CARDOZO

**EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE GLICOCORTICÓIDE
NA DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM
OSTEOBLÁSTICA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE
ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ realizado em parceria com o Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia Tecidual.

Trabalho realizado no laboratório de Biologia Celular Aplicada à Medicina do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, UFRJ.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Doria Rossi
Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Paim Rosa

Salvador
2007

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA BAHIA CARDOZO

EFEITO DE DIFERENTES DOSES DE GLICOCORTICÓIDE NA
DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM OSTEOBLÁSTICA DE
CÉLULAS MESENQUIMAIS DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Morfológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da UFRJ realizado em parceria com o Instituto de Ciências da Saúde da UFBA, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, área de concentração em Biologia Tecidual.

Radovan Borojevic _____
Doutor em Biologia, Université de Paris VI (Pierre et Marie Curie), França
Professor titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Tatiana Lobo Coelho de Sampaio _____
Doutora em Ciências, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Pós-
doutorado pela Universität Erlangen-Nürnberg (Friedrich-Alexander), Alemanha
Professor adjunto da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Vítor Antônio Fortuna _____
Doutor em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Pós-
doutorado pela Universidade de São Paulo (USP)
Professor adjunto da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Salvador, 17 de dezembro de 2007

RESUMO

A medula óssea (MO) abriga uma população de células conhecidas como células-tronco mesenquimais ou células mesenquimais do estroma da medula (MSC, *mesenchymal stem cell ou mesenchymal stromal cell*), as quais têm o potencial de diferenciar em linhagens de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular. Os glicocorticóides possuem importante papel no processo osteogênico, uma vez que quantidades fisiológicas desse hormônio são necessárias para a diferenciação e função osteoblástica, ao passo que doses farmacológicas podem causar perda de massa óssea. Um dos mecanismos de inibição da atividade osteogênica pelos glicocorticóides é a supressão da via canônica de Wnt, cuja sinalização parece regular a diferenciação das MSC para as linhagens osteogênica e adipogênica. Neste trabalho, o efeito de diferentes concentrações (10^{-6} M e 10^{-8} M) de glicocorticoide sobre a diferenciação das MSC de MO humana para a linhagem osteoblástica, e a expressão de diversos genes da via de Wnt ao longo deste processo foram investigados. Observou-se que a resposta das MSC às diferentes concentrações de dexametasona variou na dependência do estado de comprometimento associado à confluência. Após a confluência, as células tratadas com ambas as concentrações de dexametasona apresentaram deposição de cálcio após 21 dias e expressaram constitutivamente *CBFA1* (gene máster da diferenciação osteoblástica) e diversos genes da via de Wnt. Não foram observadas diferenças qualitativas na expressão destes genes entre os dois grupos. No entanto, quando o tratamento foi iniciado no momento da confluência, a maior dose de dexametasona inibiu a diferenciação das MSC para a linhagem osteogênica e estimulou a diferenciação adipogênica. Em conclusão, o efeito dos glicocorticóides sobre as MSC de MO é dependente não somente da concentração da droga, mas sobretudo da densidade celular no início da indução osteogênica.

Palavras-chave: Célula-tronco mesenquimal; Glicocorticoide; Linhagem osteoblástica; Wnt; Densidade celular.

ABSTRACT

Adult bone marrow (BM) contains a cell population known as mesenchymal stem cells or bone marrow mesenchymal stromal cells (MSC), which have the potential to differentiate towards mesenchymal tissue lineages, including bone, cartilage, adipose tissue, tendon, muscle and marrow stroma. Glucocorticoid plays an important role in the osteogenic process, once physiological amounts of this hormone are necessary for osteoblast differentiation and function, while pharmacological doses can cause loss of bone mass. One mechanism by which glucocorticoids inhibit osteogenic activity is the suppression of the canonical Wnt signaling pathway, that seems to regulate the differentiation of MSC towards osteogenic and adipogenic lineages. In this work the effect of different concentrations of glucocorticoids (10^{-6} M e 10^{-8} M) on the osteogenic differentiation of human bone marrow MSC, and the expression of various Wnt pathway genes were investigated. It was observed that the response of MSC to the different concentrations of dexamethasone varied depending upon the commitment stage associated with confluency. After confluency, the cells treated with both concentrations of dexamethasone showed calcium deposition after 21 days and expressed constitutively *CBFA1* (master gene of osteoblast differentiation) and several Wnt signaling pathway genes. No qualitative differences in the expression of these genes were observed between the groups. However, when treatment commenced around the time of confluency the higher dose inhibit the differentiation of MSC towards the osteogenic lineage and induced differentiation towards the adipogenic lineage. In conclusion, the effect of glucocorticoids on BM-MSC is dependent not only on the concentration of the drug , but rather on the cell density at the onset of osteogenic induction.

Keywords: Mesenchymal stem cells; Glucocorticoid; Osteoblast lineage; Wnt; Cellular density.

À

Fernando, companheiro, compreensivo, amoroso, presente divino, metade de mim, fonte de paz e felicidade.

Diego, pedacinho de amor e esperança que trouxe dentro de mim, agora nos brinda a vida com sua presença.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pai soberano e zeloso, força suprema que me sustenta, guia e protege, agradeço pela vida e mais essa conquista.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Isabel Doria Rossi, exemplo impecável de profissional e amiga, agradeço pela sua paciência, dedicação, sabedoria e amizade. Você personifica o significado mais amplo e sublime de ser “orientador”.

À minha co-orientadora, Prf^a Dr^a Fabiana Paim Rosa, pela oportunidade à mim concedida e apoio importante na realização desse trabalho.

À toda a equipe de pesquisadores do laboratório de Biologia Celular Aplicada à Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Leandro, Ana Paula, Daiana, Karina, Carolina, Leandra e também Gabriel), pela receptividade, colaboração e parcerias que tanto me ajudaram a executar e a crescer nas tarefas experimentais da minha pesquisa. Em especial, agradeço à Daniele Bonfim, tão prestativa, companheira e inteligente, foi tantas vezes meus braços, meus olhos, meu guia.

À Prof^a Maria Eugênia L. Duarte, pelo incentivo e contribuições, tão bem-vindos em momentos importantes desse trabalho.

Ao Prof. Radovan Borojevic, com sua sabedoria e humildade, pelos auxílios e oportunidades à mim cedidos.

À minha amada família, meus pais e irmãos queridos, solo firme e fértil no qual sempre me apoio e colho frutos de amor, incentivo e conforto.

Ao meu marido, Fernando Von Gossler, cujo amor, apoio, carinho e cuidado incansáveis me acompanharam e me estimularam em todos os momentos dessa jornada.

À FAPESB, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia, pelo apoio financeiro sob a forma de bolsa de mestrado por 2 anos, que me deu tranquilidade para me dedicar ao mestrado.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -SMA	<i>α-smooth muscle actin</i> , actina de músculo liso- α
ACTH	<i>adrenocorticotrophic hormone</i> , hormônio adrenocorticotrófico
ALP	<i>alkaline phosphatase</i> , fosfatase alcalina
AVP	<i>arginine vasopressin</i> , vasopressina arginina
Axin	<i>axis inhibitor</i> , inibidor de eixo
BM	<i>bone marrow</i> , medula óssea
BMD	<i>bone mineral density</i> , densidade mineral óssea
BMP	<i>bone morphogenetic proteins</i> , proteínas morfogenéticas ósseas
BMT	<i>bone marrow transplantation</i> , transplante de medula óssea
BMSC	<i>bone marrow stromal cells</i> , células do estroma da medula óssea
CBFA1/RUNX2	<i>core binding factor a1 / Runt-related transcription factor-2</i> , fator a1 de ligação ao núcleo / fator de transcrição relacionado ao nanismo-2
CFU-F	<i>colony forming units-fibroblastic</i> , unidades formadoras de colônias fibroblastóides
CRH	<i>corticotrophin-releasing hormone</i> , hormônio liberador da corticotropina
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i> , fator de crescimento do tecido conjuntivo
DEPC	dietilpirocarbonato
DEVH	doença de enxerto versus hospedeiro
DKK	<i>Dickkopf</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> , meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , ácido desoxirribonucléico
DVL	<i>Disheveled</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetracetic acid</i> , ácido etilendiamino tetra-acético
ES	<i>embryonic stem cells</i> , células-tronco embrionárias
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , fator de crescimento de fibroblasto
FGFR2	<i>fibroblast growth factor receptor 2</i> , receptor 2 do fator de crescimento de fibroblasto
FZ	<i>Frizzled</i>
GC	<i>glucocorticoids</i> , glicocorticóides
GR	<i>glucocorticoid receptor</i> , receptor glicocorticóide
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> , fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
GSK3 β	<i>glycogen-synthase kinase 3β</i> , quinase de síntese de glicogênio 3 β
HA/TCP	<i>hydroxyapatite-tricalcium phosphate</i> , hidroxiapatita-fosfato tricálcio
HDAC1	Histona Deacetilase 1
HLA-DR	<i>human leukocyte antigens class II</i> , antígeno leucocitário humano classe II
HPA	eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
HPTP	hiperparatireoidismo primário

HSC	<i>hematopoietic stem cells</i> , células-tronco hematopoiéticas
IL	interleucina
ISCT	<i>International Society for Cellular Therapy</i> , Sociedade Internacional para Terapia Celular
LEF	<i>lymphocyte-enhancer binding factor</i> , fator de ligação melhorador de linfócitos
LRP	<i>low density lipoprotein-receptor-related protein</i> , proteína relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade
M-CSF	<i>macrophage-colony stimulating factor</i> , fator estimulador de colônias de macrófagos
MO	medula óssea
MR	<i>mineralocorticoid receptor</i> , receptor mineralocorticóide
MSC	<i>mesenchymal stem cells</i> ou <i>mesenchymal stromal cells</i> , células-tronco mesenquimais ou células mesenquimais do estroma
OE	ossificação endocondral
OIG	osteoporose induzida por glicocorticóide
OPG	osteoprotegerina
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , solução salina tamponada
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , reação em cadeia da polimerase
PI3K	<i>phosphatidylinositol 3-kinase</i> , quinase 3 do fosfatidilinositol
PPAR γ	<i>peroxisome proliferator activated receptor γ</i> , receptor ativado proliferador de peroxisoma γ
PPR	<i>PTH/ PTHrP receptor</i> , receptor de PTH/ PTHrP
PTH	<i>parathyroid hormone</i> , hormônio paratireoideo
PTHrP	<i>PTH related protein</i> , proteína relacionada ao PTH
RANKL	<i>receptor activator of NF-κB ligand</i> , ligante do receptor ativador de NF- κ B
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , ácido ribonucléico
RT	<i>reverse transcriptase</i> , transcriptase reversa
SCF	<i>stem cell factor</i> , fator de célula-tronco
SFB	soro fetal bovino
sFRP	<i>secreted Frizzled-related protein</i> , proteína secretada relacionada à Frizzled
TCF	<i>T cell factor</i> , fator de célula T
TGF- β	<i>transforming growth factorβ</i> , fator de crescimento transformador β
TMO	transplante de medula óssea
UV	ultra-violeta
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> , molécula de adesão celular vascular 1
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> , fator de crescimento do endotélio vascular
WIF-1	<i>Wnt inhibitory factor 1</i> , fator inibitório de Wnt 1
Wnt	contração dos termos <i>Wingless</i> e <i>Int</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 MEDULA ÓSSEA E MICROAMBIENTE MEDULAR	14
1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS	25
1.3 WNT E SEU PAPEL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM OSTEOGÊNICA	34
1.4 AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E SEU EFEITO NA VIA DE WNT	44
2 OBJETIVOS	53
2.1 GERAL	53
2.2 ESPECÍFICOS	53
3 MATERIAL E MÉTODOS	54
3.1 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA HUMANA	54
3.2 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM OSTEOBLÁSTICA E EFEITO DE GLICOCORTICÓIDE	55
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA PELA IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITOS DE CÁLCIO	56
3.4 REAÇÃO DE RT-PCR (<i>REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION</i>) PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE MEMBROS DA VIA WNT E DA LINHAGEM OSTEOBLÁSTICA	56
4 RESULTADOS	59
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÕES	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO	89

1 INTRODUÇÃO

No microambiente da medula óssea, coexistem as células-tronco hematopoiéticas (HSC, *hematopoietic stem cells*) – formadoras de células sanguíneas – e as células com características de células-tronco mesenquimais, também referidas como células do estroma da medula (PROCKOP, 1997), ou, mais recentemente, denominadas de células mesenquimais do estroma da medula (MSC, *mesenchymal stem cells* ou *mesenchymal stromal cells*) (HORWITZ et al., 2005). Estas últimas são células multipotentes que têm o potencial de diferenciar em linhagens de tecidos mesenquimais, incluindo osso, cartilagem, tecido adiposo, tendão, músculo e estroma medular (PITTENGER et al., 1999).

Embora ainda não se conheça a localização específica das MSC na medula óssea, sabe-se que as HSC situam-se preferencialmente em nichos mantidos por osteoblastos na região subendosteal das trabéculas ósseas (CALVI et al., 2003; ZHANG et al., 2003). As interações celulares nesses nichos são importantes na manutenção do estado indiferenciado das células-tronco, bem como na regulação de sua diferenciação para os diversos tipos celulares maduros. Estudos mostram que o aumento do número de nichos através do aumento das trabéculas ósseas determina um aumento concomitante na população de HSC (CALVI et al., 2003; TAICHMAN et al., 1996; VISNJIC et al., 2004; ZHANG et al., 2003).

Dentre os mecanismos regulatórios envolvidos nesse sistema de nichos, destaca-se as interações por Wnt. A glicoproteína Wnt, recentemente muito estudada, possui vias de sinalização que são implicadas tanto no controle da população de HSC como também nos mecanismos que regulam a diferenciação das

MSC para a linhagem osteoblástica e adipogênica (DE BOER et al., 2004; GREGORY et al., 2005a). Vale notar que a diminuição da massa óssea que se observa fisiologicamente durante o envelhecimento se acompanha de aumento de tecido adiposo da cavidade medular (NUTTALL & GIMBLE, 2004). Isto desperta a suspeita de que Wnt estaria envolvida na determinação do destino celular entre essas duas rotas de diferenciação. Portanto, é possível imaginar que as células-tronco mesenquimais seriam estimuladas a se diferenciarem tanto na linhagem osteoblástica, quanto nas demais linhagens, mantendo um equilíbrio dinâmico entre os nichos de manutenção de HSC e os de expansão e diferenciação dos progenitores. Neste contexto, pode-se especular que a diferenciação das MSC para a linhagem osteoblástica possui uma forte relação com a manutenção da população das HSC. Assim, qualquer agente que leve à diminuição desta diferenciação das MSC para osteoblastos teria como consequência uma redução da massa óssea e, portanto, dos nichos de HSC disponíveis, prejudicando, indiretamente, a produção a longo prazo das células sanguíneas, além da própria manutenção da massa óssea.

Entre as doenças que afetam o tecido ósseo, a osteoporose é extremamente comum em todo o mundo, afetando ambos os sexos, principalmente em idade mais avançada. Ela consiste de uma alteração metabólica do tecido ósseo caracterizada pela diminuição do número e da espessura do osso trabecular, causando fragilidade óssea, o que favorece a ocorrência de fraturas espontâneas (WEILBAECHER, 2000). A osteoporose é um dos principais e mais freqüentes efeitos colaterais da terapia a longo prazo com glicocorticóides, e a perda óssea está relacionada com a dose e a duração da terapia. Os glicocorticóides têm profundo e amplo efeito sobre o metabolismo ósseo, mas acredita-se que seu efeito seja principalmente de inibição direta da atividade de osteoblastos, através da modulação da via de Wnt.

Realmente, verificou-se que, *in vitro*, a dexametasona inibiu a via canônica de Wnt em osteoblastos isolados de fragmentos de fêmur humano (OHNAKA et al., 2005).

Os glicocorticóides são drogas com propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras que são comumente utilizadas no tratamento de muitas afecções, principalmente doenças imunológicas como a doença de enxerto versus hospedeiro (DEVH) que se desenvolve após quimioterapia de altas doses com resgate hematopoiético (transplante alogênico de medula óssea). Cerca de 60% dos pacientes submetidos a transplante alogênico de progenitores hematopoiéticos necessitam de uma terapia de longo prazo com glicocorticóides, cujo mais sério e freqüente efeito colateral é a osteoporose (STERN et al., 2001). Em um estudo recente, verificou-se que os sobreviventes de transplante de medula óssea (TMO) apresentavam 6,4 vezes mais chances de desenvolver osteoporose (BAKER et al., 2004).

Uma vez que a via de Wnt parece estar envolvida nos mecanismos de diferenciação de células mesenquimais para osteoblastos e adipócitos, e que os glicocorticóides têm comprovada ação inibitória dose-dependente sobre os osteoblastos através desta via, o conhecimento acerca da ação dos glicocorticóides sobre a via de Wnt nas células mesenquimais poderá despertar a possibilidade de intervir no balanço entre formação óssea e adipogênese medular e assim fornecer um objetivo terapêutico com o qual se poderia prevenir ou tratar condições onde houver formação óssea inadequada e adipogênese medular excessiva, bem como melhorar a recuperação de pacientes no pós-transplante de medula óssea.

Embora o papel da via de Wnt sobre a diferenciação de MSC para a linhagem osteogênica e os efeitos dos glicocorticóides sobre as células ósseas sejam questões bem estudadas, a influência dos glicocorticóides sobre a via de Wnt

durante a diferenciação das MSC humanas para a linhagem osteoblástica ainda permanece um campo a ser explorado.

Considerando o exposto, torna-se importante investigar o efeito dos glicocorticóides sobre a via de sinalização Wnt durante a diferenciação de células mesenquimais da medula óssea humana para a linhagem osteogênica.

1.1 MEDULA ÓSSEA E MICROAMBIENTE MEDULAR

A medula óssea é um tecido de consistência mole que preenche as cavidades internas dos ossos e é nela que ocorre a produção de células do sangue e do sistema imune. Com o aumento da idade, grande parte da medula óssea torna-se inativa (repleta de tecido gorduroso), permanecendo sua atividade principalmente nos ossos do crânio, das costelas, do esterno, da coluna vertebral, da pelve e das extremidades proximais dos fêmures (YOUNG & HEATH, 2001).

A maior parte da medula óssea encontra-se entre uma delicada teia de lâminas ósseas que formam o osso trabecular, dentro da qual se alojam o tecido hematopoiético e seu estroma. As superfícies trabeculares são revestidas por uma camada de células endosteais reconhecidas como células osteogênicas. Também encontram-se nas margens trabeculares alguns osteoclastos ocasionais. Uma rede de sinusóides se ramifica por todos os espaços intertrabeculares, repousando sobre um estroma fibroblástico, sendo que as arteríolas e vênulas se estendem na direção do centro desses espaços. As trabéculas, arteríolas e vênulas formam o arcabouço estrutural ao redor do qual se desenvolve a granulopoiese; a eritropoiese e megacariopoiese ocorrem em aposição às finas ramificações dos sinusóides. Essa arquitetura trabecular e vascular da medula fornece a estrutura básica, o suprimento

nutricional e sistema de remoção de detritos para a hematopoiese, mas o suporte para a autorenovação e diferenciação dos precursores hematopoiéticos é fornecido pelo estroma medular. Este estroma consiste em uma mistura heterogênea de diferentes tipos celulares e uma complexa matriz extracelular de reticulina, fibronectina e proteoglicanos (WILKINS, 1992).

As células hematopoiéticas encontram-se nos espaços extravasculares, entre os seios venosos, em íntima associação com o estroma, formando um *continuum* tridimensional. A população de células que constitui o estroma é heterogênea, e inclui células de origem hematopoiética, como macrófagos, e várias linhagens celulares de origem mesenquimal, incluindo as células denominadas comumente de células reticulares, adipócitos, osteoblastos, fibroblastos, células endoteliais e células musculares lisas da parede de vasos (SIMMON et al., 2001; TAICHMAN, 2005; WEISS, 1976).

O tipo celular predominante no estroma da medula pós-natal é uma célula delgada e fusiforme (lembra fibroblastos), conhecida como célula reticular, célula adventícia ou célula Weston-Bainton. As células reticulares expressam atividade de fosfatase alcalina associada à membrana, marcador de comprometimento osteogênico. Elas representam o substrato físico do microambiente hematopoiético e fornecem uma cobertura adventícia aos sinusóides medulares, emitindo prolongamentos para o espaço hematopoiético circundante. A cobertura reticular do sinusóide vascular é suspensa assim que as células hematopoiéticas maduras se aproximam do sinusóide, se preparando para atravessar o endotélio e entrar na circulação. As células reticulares podem acumular lipídios e se converter a adipócitos *in vivo*. A conversão adiposa é uma ocorrência fisiológica e uma mudança

adaptativa reversível na medula óssea pós-natal (BIANCO & COSSU, 1999; WEISS, 1976).

O estroma medular primitivo é estabelecido durante o desenvolvimento através de uma série complexa de eventos que acontecem após a diferenciação das células osteogênicas primitivas, a formação do primeiro osso e a invasão vascular do osso rudimentar. Essa relação íntima das células do estroma com a rede vascular da medula também é encontrada na medula adulta. No esqueleto pós-natal, o osso e a medula óssea dividem uma parte significativa de seu leito vascular. A rede vascular da medula, assim como o sistema circulatório dos outros órgãos, é formada por uma camada contínua de células endoteliais e pericitos subendoteliais. Na porção arterial e capilar dessa rede, os pericitos expressam tanto a fosfatase alcalina (ALP) quanto a α -actina de músculo liso (α -SMA). Na porção venosa, as células situadas no lado abluminal do endotélio apresentam uma morfologia reticular, com longos processos que emergem da parede venosa até os cordões hematopoiéticos adjacentes onde estabelecem contatos íntimos célula-célula, conduzindo estímulos microambientais para as células sanguíneas em maturação. Essas células reticulares adventíciais expressam ALP, mas não a α -SMA. Apesar disso, em vista de sua localização e da sabida diversidade de pericitos em diferentes sítios, essas células reticulares podem ser consideradas como autênticos pericitos especializados dos sinusóides venosos da medula. Assim, as propriedades fenotípicas dos pericitos da medula variam ao longo das diferentes secções da rede vascular da medula (arterial/capilar e sinusóides venosos pós-capilar). Além disso, as células reticulares adventíciais do segmento venoso podem acumular lipídios e se converter a um fenótipo de adipócitos, principalmente em duas circunstâncias: a) durante o crescimento do esqueleto, quando há expansão da cavidade medular e b) quando há uma redução

anormal do número de células hematopoiéticas. A conversão em adipócitos é um mecanismo através do qual o tamanho e a permeabilidade de todo o sistema sinusoidal é regulado reversivelmente na medula óssea. Além disso, essa cobertura de pericitos parece ser vital para a manutenção dos microvasos, uma vez que a perda dessa cobertura de pericitos está associada com a regressão vascular por apoptose, enquanto que um revestimento normal de pericitos parece estabilizar e evitar a destruição dos vasos (BIANCO et al., 2001).

A função mais conhecida do estroma medular é a de sustentação hematopoiética. Segundo Visnjic et al. (2004), o estroma da medula óssea é uma matriz de suporte necessária para a manutenção e diferenciação dos progenitores hematopoiéticos, sendo essenciais para a hematopoiese, processo pelo qual HSC se autorenovam e geram progenitores hematopoiéticos que se diferenciam nas células sanguíneas maduras. As células do estroma participam da hematopoiese fornecendo sinais de sobrevivência e/ou de diferenciação através de contato íntimo com os componentes hematopoiéticos e pela secreção de citocinas como a interleucina-6 (IL-6), IL-7, ligante de cKit (SCF, *stem cell factor*), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF, *granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) e outros. De fato, *in vitro*, as células do estroma da medula óssea (BMSC, *bone marrow stromal cells*) servem como uma fonte rica de fatores de crescimento para uma variedade de processos hematopoiéticos. (TAICHMAN, 2005).

Atualmente, sabe-se que o tecido estromal da medula de muitas espécies de mamíferos, incluindo roedores e humanos, é capaz de uma extensa regeneração após uma variedade de insultos tais como radiação, drogas citotóxicas e perturbações mecânicas (SHORT et al., 2003).

A gordura da medula tem sido considerada historicamente um mero tecido passivo de armazenagem, o qual preenche as cavidades medulares. Porém, a identificação recente das adipocinas, tais como a leptina e adiponectina, que são secretadas pelo tecido adiposo e têm funções endócrinas críticas, tem nos levado a reconsiderar o papel do tecido adiposo. Está se tornando claro que o tecido adiposo exerce um importante papel fisiológico como um órgão endócrino, secretando hormônios que estão envolvidos na obesidade, aterogênese, diabetes e inflamação. Evidências crescentes de transdiferenciação indicam um alto grau de plasticidade entre osteoblastos e adipócitos, sugerindo que esses adipócitos altamente funcionais poderiam reverter-se para um fenótipo osteoblástico, uma vez dado o correto sinal. É possível que os mesmos fatores metabólicos que dirigem a adipogênese nos tecidos adiposos extramedulares também ajam dentro do microambiente da medula óssea. A falta de exercício regular e dieta rica em calorias promovem diferenciação de adipócitos e obesidade. Isto tem efeitos direto e indireto sobre o metabolismo ósseo (NUTTALL & GIMBLE, 2004).

Os progenitores hematopoiéticos, assim como as células que constituem o estroma e as diferentes glicoproteínas da matriz extracelular, mostram uma distribuição específica na medula, sugerindo que haja a formação de microambientes específicos, ou nichos (JACOBSEN & OSMOND, 1990; NILSSON et al., 1998; NILSSON et al., 2001; WEISS, 1976; WESTEN & BAITON, 1979). Estudos recentes demonstraram que os osteoblastos endosteais possuem importante papel nesses nichos, produzindo muitos fatores essenciais para a sobrevivência, renovação e maturação das HSC. Esses componentes regulatórios osteoblásticos incluem receptores célula-célula, citocinas solúveis e associadas à superfície celular

e fatores de crescimento (CALVI et al., 2003; TAICHMAN, 2005; VISNJIC et al., 2004; ZHANG et al., 2003).

O papel dos osteoblastos no controle do *pool* de HSC ficou claramente demonstrado em dois elegantes trabalhos. Utilizando camundongos mutantes com inativação do receptor para proteína morfogenética óssea (BMP), Zhang et al. (2003) demonstraram que as células osteoblásticas que revestem a superfície óssea funcionam como um componente-chave do nicho, uma vez que a sinalização de BMP através do receptor de BMP tipo IA (BMPRIA) induz um aumento da área de osso trabecular que se acompanha de aumento do número de células com características de HSC. Além disso, os autores observaram que as HSC interagem com osteoblastos que revestem a superfície óssea via N-caderina e β -catenina (Fig. 1).

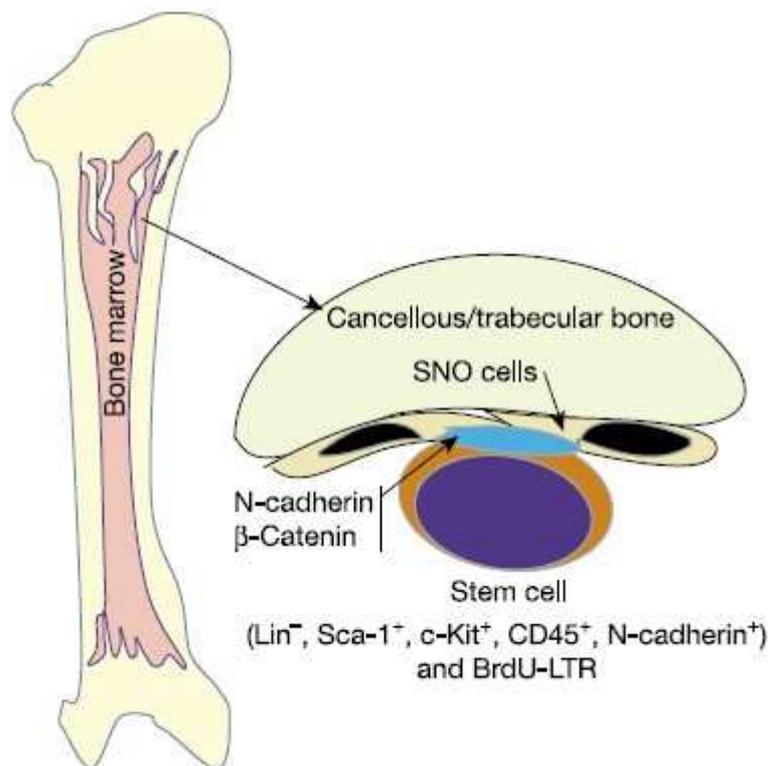


Figura 1. Nicho de células-tronco hematopoiéticas. Notar o papel-chave dos osteoblastos (SNO, *spindle-shaped N-cadherin⁺ osteoblastic cells*) da superfície do osso trabecular na manutenção dessas células. (Fonte: ZHANG et al., 2003).

No mesmo ano, Calvi et al. (2003) verificaram, utilizando um outro modelo transgênico em que o aumento da área de osso trabecular foi induzida por ativação do receptor de PTH/PTHrP (PPR), que isto resultava numa maior produção total de Jagged-1, o que, por sua vez ativa Notch1, resultando na expansão de HSC por aumento da auto-renovação induzida por Notch.

Esses grupos independentes demonstraram que a ativação das células da linhagem osteogênica, com conseqüente aumento do número de trabéculas ósseas, determinava concomitantemente aumento do *pool* de HSC. Embora os mecanismos envolvidos no controle deste *pool* ainda não estejam completamente esclarecidos, os autores observaram que o número de nichos “disponíveis” no microambiente medular tem influência sobre o número de HSC. Desta forma, é possível imaginar que a diminuição do número de trabéculas ósseas, ou seja, diminuição dos nichos disponíveis, teria impacto no *pool* de HSC e, conseqüentemente, na produção a longo prazo das células sanguíneas.

O esqueleto é composto por dois tipos de tecido, cartilagem e osso, os quais são formados pelos condrócitos e osteoblastos, respectivamente. Os ossos são formados durante o desenvolvimento embrionário por dois processos diferentes: ossificação intramembranosa e endocondral. A maioria dos ossos chatos, como alguns do crânio e as laterais da clavícula é formada pela ossificação intramembranosa, na qual os osteoblastos se diferenciam a partir de uma lâmina de tecido conjuntivo de células mesenquimais condensadas que começam a secretar osteóide, o qual mais tarde torna-se mineralizado e reorganizado em osso compacto. Entretanto, a maioria dos ossos do esqueleto axial e apendicular é formada pela ossificação endocondral (Fig. 2): condensações mesenquimais se diferenciam em condrócitos, formando um molde de cartilagem que pré-desenha o elemento

esquelético futuro. Os condrócitos do centro do elemento cartilaginoso páram de proliferar e amadurecem em condrócitos hipertróficos, os quais são caracterizados pelo aumento de tamanho, vacuolização e secreção de uma matriz extracelular distinta. As células mesenquimais que circundam a cartilagem se achatam e formam o pericôndrio. As células pericondriais adjacentes à região central do molde de cartilagem recebem um sinal, a proteína Indian Hedgehog (Ihh), dos condrócitos pré-hipertróficos, a qual induz o programa osteogênico nestas células, iniciando a diferenciação osteoblástica. Assim, durante a ossificação endocondral, os primeiros osteoblastos se desenvolvem de dentro de um tecido mesenquimal condensado, semelhante ao processo de ossificação intramembranosa; entretanto, com a diferença de que estes osteoblastos necessitam do produto gênico Ihh como sinal indutivo proveniente dos condrócitos (HARTMANN, 2006).

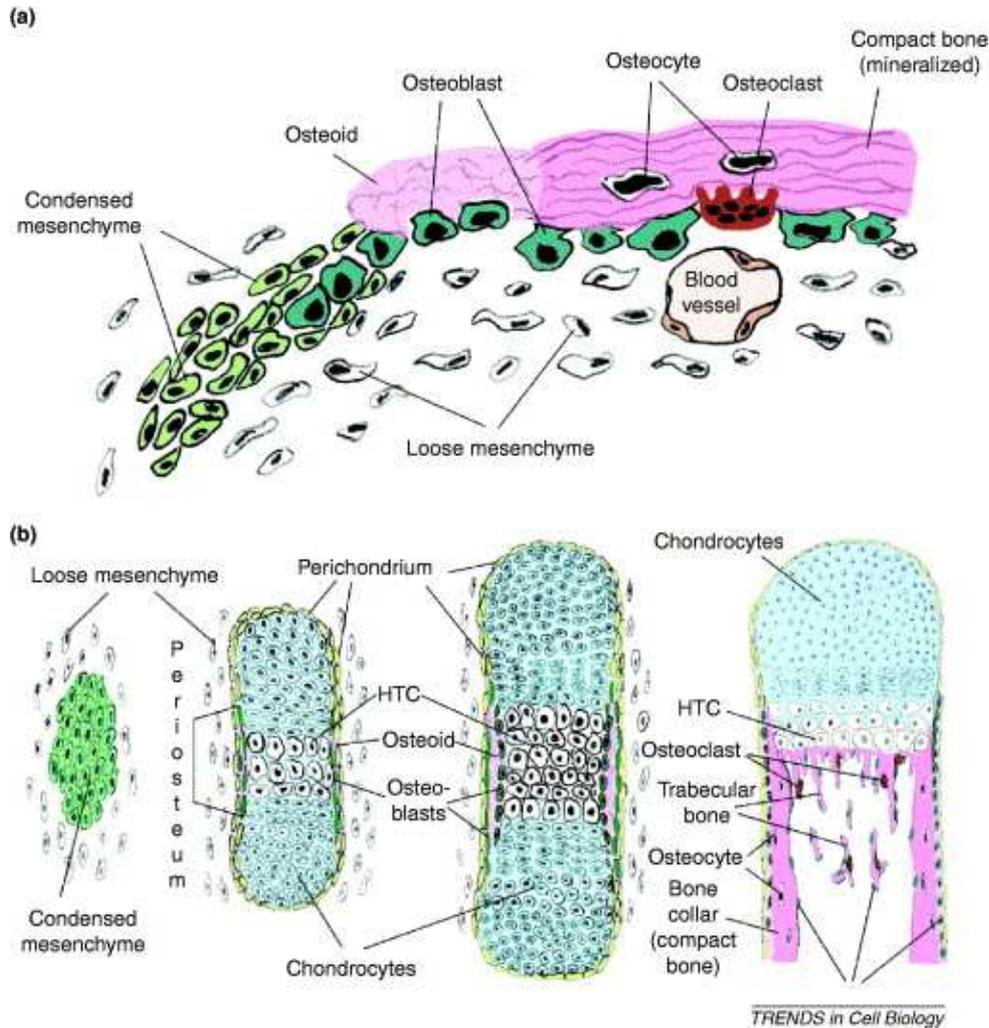


Figura 2. Formação do esqueleto através da ossificação intramembranosa (a) e endocondral (b). (a) O processo intramembranoso se inicia com a diferenciação osteoblástica a partir de condensações mesenquimais. Primeiramente os osteoblastos produzem uma matriz fibrilar, não-mineralizada (osteóide), a qual se tornará organizada em osso compacto. (b) Na ossificação endocondral os condrócitos se desenvolvem a partir de uma condensação do mesênquima formando um molde cartilaginoso do futuro elemento esquelético. As células mesenquimais que circundam esse molde formam o pericôndrio. Na região do pericôndrio adjacente aos condrócitos hipertróficos (HTC), os primeiros precursores osteoblásticos começam a se diferenciar. Essa região é conhecida como periosteio. (Fonte: HARTMANN, 2006).

Como vimos, a ossificação endocondral (OE) se inicia com a hipertrofia dos condrócitos e progride com a transformação de uma cartilagem avascular não-calcificada pré-existente para uma cartilagem calcificada permissiva à vascularização. Isto ocorre primeiramente na região central da diáfise do modelo cartilaginoso nos ossos longos (centro primário de ossificação) (CHARBORD et al.,

1996; JACENKO et al., 2002). Segue-se a invasão vascular do rudimento de cartilagem, com migração de precursores de monócitos e macrófagos, precursores dos osteoclastos, que formam a cavidade medular. Neste período, ainda na ausência de hematopoiese, há o desenvolvimento de um leito vascular caracterizado por estruturas formadas por tecido conjuntivo frouxo centralizadas por arteríola, notando-se células positivas para α -SMA na região abluminal destas arteríolas. Em seguida, há o surgimento de células hematopoiéticas que se localizam exclusivamente nestas estruturas (CHARBORD et al., 1996). Estas observações levaram à hipótese de que os vasos sanguíneos invasores importam consigo as MSC e as HSC que migram com o tecido conjuntivo perivascular e avançam na cartilagem hipertrófica e calcificada. Enquanto os osteoclastos/condroclastos degradam a cartilagem hipertrófica, as células mesenquimais se diferenciam nas células primitivas da medula e nos osteoblastos. Os osteoblastos se alinham no centro cartilaginoso hipertrófico e depositam osteóide nesse centro de ossificação primário. A substituição da cartilagem madura pelo osso e medula, juntamente com o estabelecimento de centros de ossificação secundários nas extremidades externas do tecido (epífises) define as placas cartilaginosas de crescimento, as quais promovem potencial de crescimento longitudinal para os ossos até a maturidade. A rede formada pelas espículas ósseas trabeculares se projeta pela medula e proporciona nichos hematopoiéticos. O resultado final da OE é o estabelecimento da medula, resultando em espaços colonizados por células sanguíneas, que foram entalhados a partir de uma cartilagem embrionária, sendo que a hematopoiese se sucede quase exclusivamente dentro dos ossos endocondrais (JACENKO et al., 2002).

Na vida pós-natal e adulta, três tipos celulares estão envolvidos na regulação da massa óssea pela contínua remoção e substituição de osso (remodelação ou homeostase óssea): os osteoblastos, que produzem a matriz óssea e participam da mineralização; os osteócitos, que são osteoblastos aprisionados em lacunas; e os osteoclastos, que reabsorvem a matriz óssea. Para balancear a produção e reabsorção óssea em indivíduos saudáveis, os osteoblastos secretam fatores que regulam a diferenciação de osteoclastos, e osteócitos produzem fatores que regulam a atividade dos osteoblastos (HARTMANN, 2006). Os osteoblastos e osteócitos derivam de uma célula mesenquimal primitiva chamada célula osteoprogenitora. O perióstio e a medula óssea são fontes importantes dessas células osteoprogenitoras mesenquimais. Já os osteoclastos são células fagocitárias multinucleadas derivadas da linhagem dos monócitos/macrófagos, que se diferenciam sob a influência principalmente de 2 citocinas: M-CSF e RANKL. Esta última é expressa pelos osteoblastos e seus precursores como uma proteína transmembrana que reconhece seu receptor, RANK, nas células osteoclásticas (KIM et al., 2006; WEILBAECHER, 2000).

A região subendosteal da medula óssea parece ser bem mais complexa e dinâmica do que se sabe, e é possível imaginar que isto afete a formação dos nichos de células tronco, modificando a migração e a auto-renovação destas (ROSSI et al., 2005). Além da camada de osteoblastos, a região subendosteal apresenta uma camada de células reticulares subendosteais e osteoclastos, que não formam uma camada celular, mas que se encontram esparsamente dispostos ao longo do endóstio, em sítios de reabsorção óssea. Os osteoblastos, que se encontram em diferentes graus de ativação, recobrem a superfície interna do osso compacto e a superfície do osso trabecular. O pólo basal está aderido firmemente à superfície

óssea, enquanto o lado apical interage com as células do sistema hematopoiético, especialmente com as HSC. As características e a função das células reticulares subendosteais são pouco conhecidas, pois, em geral, não há uma distinção muito clara entre estas e as demais células reticulares que constituem o estroma medular. Só recentemente células reticulares e osteoblastos da região subendosteal foram isolados e verificou-se que elas se distinguem quanto à capacidade de sustentar, *in vitro*, a proliferação e a diferenciação de HSC. Análise da expressão gênica destas populações sugere que elas estabelecem uma comunicação que não só regula a proliferação e diferenciação das HSC, mas também de ambas as populações estromais. Além disso, o padrão de expressão gênica das células reticulares subendosteais é o de uma população mais indiferenciada, compatível com o perfil das células tronco mesenquimais (BALDUÍNO et al., 2005).

1.2 CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

Quase todos os componentes do estroma da medula óssea, inclusive os osteoblastos e osteócitos, são derivados de uma célula-tronco mesenquimal (MSC, *mesenchymal stem cells*) comum (Fig.3).

Essas células são consideradas células-tronco dos tecidos não-hematopoiéticos na medula óssea. Elas são comumente referidas como MSC, devido à sua habilidade em diferenciar em tecidos mesenquimais (osso, cartilagem, estroma mielóide, tecido adiposo e muscular), ou como células do estroma da medula, pois elas parecem emergir do complexo leque de estruturas de suporte encontrado na medula. Essas células do estroma podem ser isoladas de outras células da medula pela sua tendência em aderir ao plástico de cultura de tecido,

como demonstrado originalmente, e tem morfologia semelhante à de fibroblastos (MANKANI et al., 2001; PITTENGER et al., 1999; PROCKOP, 1997).

A presença dessas células na medula foi evidenciada em um trabalho pioneiro realizado por Friedenstein, iniciado em meados de 1970. Friedenstein (*apud* Prockop, 1997) colocou amostras de células totais da medula óssea em placas de cultura e após aproximadamente 4 horas descartou as células que eram não-aderentes. Com isso, ele descartou a maior parte das HSC e seus progenitores. Ele relatou que o pequeno número de células aderentes era heterogêneo em aparência, mas as células mais firmemente aderidas eram fusiformes e formavam focos de 2 a 4 células, chamadas então de unidades formadoras de colônias fibroblastóides (CFU-F, *colony forming units-fibroblastic*). Estas permaneciam latentes por 2 a 4 dias e depois começavam a se multiplicar rapidamente. Após longo período em cultura, as células aderentes se tornavam mais uniformemente fusiformes na aparência. A característica mais impressionante dessas células, no entanto, era a habilidade que elas tinham de se diferenciar em colônias que se assemelhavam a pequenos depósitos de osso ou cartilagem.

Pittenger et al. (1999) isolaram uma população celular aderente da medula óssea da crista ilíaca humana, que foi caracterizada pela sua morfologia espraçada e pela presença de alguns antígenos de superfície (SH2/CD105, SH3, CD29, CD44, CD71, CD90, CD106, CD120a, CD124) e ausência de marcadores da linhagem hematopoiética, incluindo CD14, CD34 e o antígeno comum de leucócitos CD45. O potencial dessas células de gerar múltiplas linhagens celulares foi testado através da indução de diferenciação em 3 linhagens mesenquimais (adipócitos, osteócitos e condrócitos) sob condições controladas *in vitro*, no que obtiveram êxito.

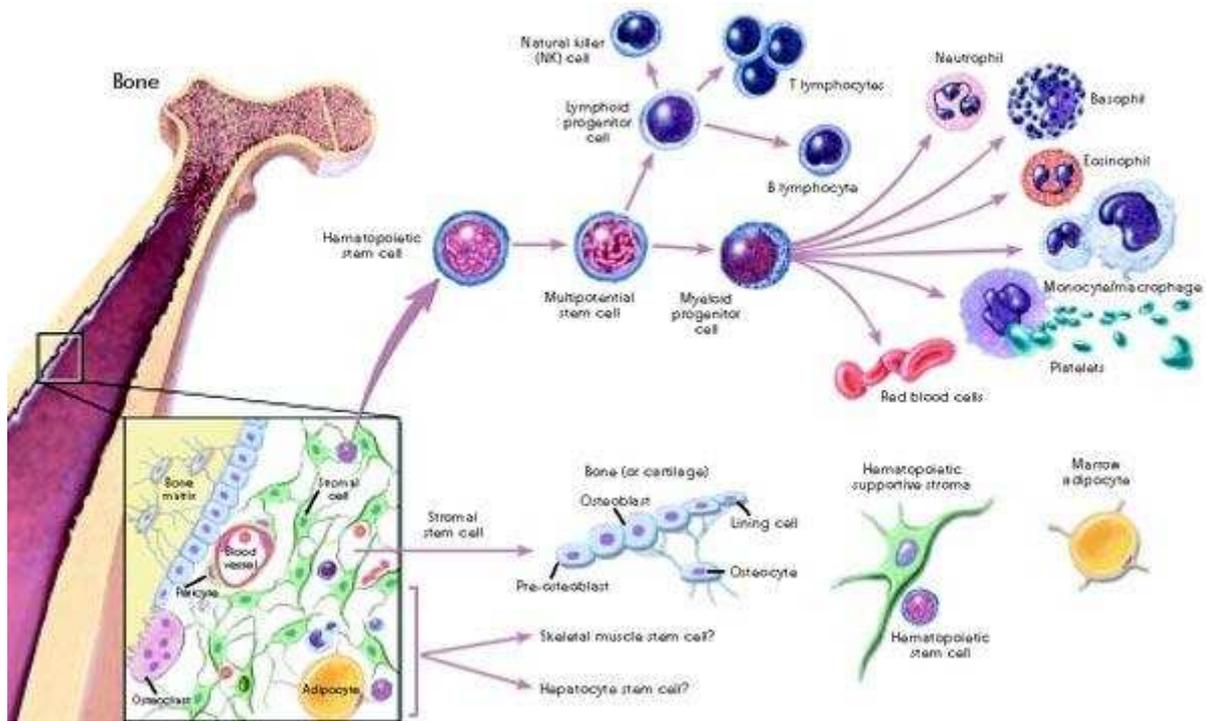


Figura 3. A medula óssea possui duas populações de células-tronco. As células-tronco hematopoiéticas diferenciam-se nas diversas linhagens celulares do sangue, enquanto as células-tronco mesenquimais formam os elementos celulares que compõem o estroma que sustenta a hematopoiese. (Disponível em: www.stemcells.nih.gov/info/basics/basics4.asp).

Gronthos et al. (2003) isolaram uma população altamente enriquecida em células-tronco do estroma da medula óssea humana obtida de aspirados da crista ilíaca, através do uso do anticorpo STRO-1 (marcador de uma pequena população de células mononucleares da medula óssea humana rica em CFU-F) em combinação com o anticorpo para VCAM-1, molécula de adesão celular vascular expressa constitutivamente pelo tecido estromal da medula. Eles observaram que as MSC não apresentavam características fenotípicas de leucócitos nem dos elementos maduros do estroma e que elas são quiescentes e expressam atividade de telomerase *in vivo*; enquanto que demonstraram extensa proliferação e capacidade de diferenciação em osso, cartilagem e tecido adiposo *in vitro*. No entanto, com o contínuo subcultivo das MSC (acima de 25 duplicações populacionais), os clones das MSC mostraram uma capacidade reduzida ou incapacidade para diferenciar naquelas três linhagens celulares estromais. Para avaliar sua capacidade em

desenvolver tecido ósseo humano *in vivo*, as MSC foram implantadas no tecido subcutâneo de camundongos imunodeficientes usando partículas de hidroxiapatita/fosfato tricálcio como veículo. Os autores verificaram que somente um pouco mais da metade dos clones (54%) formaram ossículos.

Assim, o isolamento de uma população pura em MSC ainda é evasivo. Nem todas as CFU-F são de fato células-tronco multipotentes e deve ser levado em conta que é o comportamento das MSC após transplante, e não seu fenótipo *in vitro*, que fornece a informação mais confiável acerca do verdadeiro potencial de diferenciação dessas células (BIANCO et al., 2001).

De acordo com Prockop (1997), uma das maiores lacunas para a caracterização das MSC isoladas pela sua aderência ao plástico na ausência das células hematopoiéticas não-aderentes é se estas diferem das células aparentemente semelhantes que formam as monocamadas das culturas de longa-duração que sustentam as HSC. Estas células aderentes têm muitas das características das MSC isoladas pela sua aderência ao plástico, mas não está claro se elas retêm o potencial de diferenciar em osso, cartilagem e outras células mesenquimais, ou se elas diferenciaram em outro fenótipo por causa de sua interação contínua com as células hematopoiéticas. Segundo ele, MSC de camundongos, ratos, coelhos e humanos prontamente se diferenciam em colônias de osteoblastos (depositando minerais na forma de hidroxiapatita), condrócitos (sintetizando matriz cartilaginosa) e adipócitos em resposta a dexametasona, 1,25-dihidroxitamina D₃ ou citocinas tais como as BMP-2. Em resposta à 5-azacitidina e anfotericina B ou à anfotericina B sozinha, elas se diferenciam em mioblastos que se fusionam em miotubos ritmicamente pulsantes.

Com o propósito de facilitar a pesquisa na área e a comparação de resultados de estudos entre diferentes grupos de pesquisa, o Comitê de Célula Tronco Tecidual e Mesenquimal da Sociedade Internacional para Terapia Celular (ISCT) propôs critérios mínimos para a definição das MSC humanas: 1) as células devem ser aderentes ao plástico quando mantidas em condições padrão de cultura; 2) as células devem expressar os antígenos de superfície CD105, CD73 e CD90, e não expressar os CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e o HLA-DR (HLA class II); e 3) as células devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos sob condições padrão de cultura na presença de meio indutor, demonstrado por coloração celular *in vitro* (DOMINICI et al., 2006). A multipotencialidade das MSC, a facilidade em seu isolamento e cultura, assim como seu alto potencial de expansão *ex vivo*, tornam estas células uma ferramenta terapêutica atrativa capaz de participar de uma ampla gama de aplicações clínicas, tanto em estratégias terapêuticas celulares quanto genéticas. Elas são previstas para o tratamento de várias desordens de tecidos mesenquimais, como a osteogênese imperfeita, osteoporose, osteoartrose, meniscectomia e distrofia muscular, assim como para defeitos teciduais localizados e na engenharia de tecidos e órgãos transplantáveis. Soma-se à isto a aparente hipo-imunogenicidade das MSC, permitindo sua utilização em transplantes alogênicos (KASSEM et al., 2004; MINGUEL et al., 2001). Também cogita-se em utilizá-las no tratamento de desordens do sistema imunológico, tais como doença de enxerto-versus-hospedeiro, rejeição após transplante de órgãos e doença autoimune, devido à seus efeitos anti-proliferativo, imunomodulatório e anti-inflamatório (LE BLANC & RINGDÉN, 2006).

Na área da bioengenharia tecidual, as células do estroma da medula óssea humana (BMSC) estão sendo usadas para fechamento de defeitos ósseos. A

extensão e qualidade da formação óssea pelas BMSC transplantadas dependem fortemente da matriz de suporte com a qual as células são transplantadas; atualmente, a hidroxiapatita/fosfato tricálcio (HA/TCP) tem se mostrado uma boa opção de matriz. Mankani et al. (2001) em seus experimentos mostraram que o tamanho das partículas de HA/TCP exerce um papel crucial na determinação da extensão da formação óssea pelas BMSC pois modificam a estrutura do transplante. Os transplantes com partículas de HA/TCP de 0,1-0,25 mm tiveram a maior formação óssea, seguidos daqueles com partículas de 0,25-0,5 mm. Partículas acima ou abaixo destes tamanhos tiveram progressivamente menos osso formado. Com seus experimentos, pôde-se concluir que a diferenciação osteogênica das BMSC transplantadas é influenciada pelo arranjo relativo da matriz e das células dentro do transplante; algum espaço vazio é necessário para permitir o crescimento interno dos capilares, enquanto espaços vazios excessivos favorecem o desenvolvimento de tecido fibroso não mineralizado.

Devido à baixa frequência de MSC na medula óssea, torna-se necessária sua expansão *in vitro* previamente ao seu uso clínico. Porém, vários relatos na literatura concordam que as MSC entram em senescência a partir do momento em que são cultivadas, ao mesmo tempo em que perdem seu potencial de célula-tronco, como já mencionado. O número de duplicações populacionais, o comprimento do telômero e o potencial de diferenciação diminuem à medida que o número de passagens *in vitro* aumenta (BONAB et al., 2006).

Na medula óssea pós-natal, as MSC parecem residir, segundo alguns autores, principalmente na parte abluminal dos sinusóides medulares, formando uma rede celular tridimensional que permeia a rede sinusoidal subjacente. Os sinusóides emanam das ramificações terminais das arteríolas e as MSC, da sua camada

adventicial (BIANCO & ROBEY, 2000). No entanto, como já comentado, células com características de MSC também parecem estar localizadas na região subendosteal das trabéculas ósseas (BALDUÍNO et al., 2005; MUGURUMA et al., 2006). Não existem, ainda, dados específicos acerca das características e propriedades do microambiente dos progenitores mesenquimais. Evidências obtidas em análises *in vivo* e *in vitro* sustentam o conceito de que as MSC residentes na medula óssea originam todos os progenitores dos tecidos mesenquimais distantes. A fim de investigar a localização de MSC isoladas da medula óssea após infusão sistêmica, Prockop (1997) utilizou MSC de uma linhagem de camundongos transgênicos que expressam um gene mutado para colágeno tipo I, o qual serviu como marcador. As MSC marcadas foram injetadas em camundongos isogênicos irradiados. Os resultados sugeriram que as MSC do doador foram capazes de migrar não só para a medula óssea dos receptores, mas também para uma variedade de tecidos. Além disso, a expressão do gene marcador para colágeno tipo I em osso, mas não em cartilagem, sugeriu que a progênie das MSC expressa genes de forma tecido-específica.

Entretanto, outros dados demonstram que precursores mesenquimais residem em outros tecidos não-medulares, tais como osso e músculo. Isto levanta a questão da origem deste progenitor, ou seja, se seria residente e tecido-específico, ou se seria recrutado da medula óssea ou de outro tecido mesenquimal. Há relatos que sugerem que o recrutamento de progenitores ocorre durante o período de desenvolvimento do organismo, assim como durante o reparo tecidual na vida adulta (MINGUEL et al., 2001). Evidências sugerem que o processo de reparo tecidual é dirigido por células-tronco residentes nos vários tecidos, mas que são repostas por células-tronco precursoras da medula óssea. Parece que estas MSC reparam as

injúrias teciduais através de 3 mecanismos: criação de um meio que favorece a regeneração das células endógenas, transdiferenciação e, talvez, fusão celular (PROCKOP et al., 2003). Por outro lado, um número crescente de relatos aponta para as células da parede de vasos sanguíneos (células do músculo liso vascular / pericitos) como a identidade celular dos progenitores mesenquimais. Por exemplo, pericitos isolados de capilares da retina bovina são STRO-1+ e exibem o potencial de diferenciação para uma variedade de tipos celulares incluindo osteoblastos, adipócitos, condrócitos e fibroblastos (SHORT et al., 2003).

Confirmando esta hipótese, foi possível isolar populações de MSC murinas pós-natais de diferentes tecidos (SILVA-MEIRELLES et al., 2006). Observou-se que: 1) as MSC podem ser obtidas e cultivadas *in vitro* a partir do cérebro, baço, fígado, rins, pulmão, medula óssea, músculo, timo e pâncreas; 2) culturas de MSC podem ser geradas tanto de grandes quanto de pequenos vasos sanguíneos; e 3) as MSC derivadas dos diferentes tecidos são capazes de se diferenciar nas três linhagens mesenquimais, osteogênica, adipogênica e condrogênica, mas seu potencial de diferenciação varia dependendo do tecido de origem. Assim, foi sugerido que a distribuição das MSC por todo o organismo pós-natal está relacionada à sua existência em nichos perivasculares (SILVA-MEIRELLES et al., 2006).

Estes resultados reforçam a idéia de um modelo para a origem das MSC da MO baseado no raciocínio de que as células do estroma da medula são células perivasculares, as quais provêm da adventícia dos sinusóides medulares e que, deste modo, elas seriam um subgrupo especial de pericitos. Assim, um progenitor mesodermal multipotente, capaz de dar origem às linhagens miogênica e osteogênica, poderia ter sido formado durante o desenvolvimento, como um elemento peritelial fisicamente associado à parede externa dos vasos em formação.

Em termos gerais, um modelo no qual a própria parede vascular seria uma fonte de progenitores mesodermis que assim estariam presentes em qualquer tecido em desenvolvimento, crescimento ou regeneração (BIANCO & COSSU, 1999).

Como dito anteriormente, na vida pós-natal, o estroma medular sofre modificações, principalmente relacionadas ao aumento de células acumuladoras de gordura frequentemente acompanhada de redução da massa óssea. Uma vez que o fenótipo adipocítico é reversível, acredita-se que haja uma interrelação entre a diferenciação das MSC da medula para um ou outro fenótipo (NUTTALL & GIMBLE, 2004).

A formação da cavidade e do estroma medular necessita do fator de transcrição *CBFA1*, o qual controla a diferenciação osteogênica e dirige a formação óssea. Na ausência deste gene não há o desenvolvimento de medula óssea, pois não há formação óssea, o que sugere um comprometimento osteogênico das células do estroma da medula primitiva (BIANCO & COSSU, 1999). Em acordo com isto, verificou-se que *CBFA1* é comumente expresso nas células do estroma da medula na vida pós-natal. No entanto, isto não prediz sua verdadeira capacidade osteogênica após transplante *in vivo*, uma vez que a expressão de *CBFA1* não impede a diferenciação em fenótipos não osteoblásticos, tais como adipócitos e condrócitos (BIANCO & ROBEY, 2000).

Assim, estas células originariam tanto os adipócitos da medula como os osteoblastos. Talvez, por isso, a diminuição de volume ósseo associada à osteoporose e osteopenia senil seja acompanhada por um aumento do número de células acumuladoras de gordura na medula. De fato, um aumento destas células é observado em todas as condições que levam à perda óssea, tais como ovariectomia, imobilização, exposição à gravidade zero ou tratamento com glicocorticóides. Já

existem muitas evidências de um relacionamento inverso entre a diferenciação adipocítica e a osteogênica. A interação entre esses tipos celulares e o comprometimento em diferenciar para cada linhagem é uma área de grande interesse científico (BERESFORD et al., 1992; NUTTALL & GIMBLE, 2004).

Células pré-osteoblásticas, quando tratadas com ácido ascórbico e β -glicerofosfato, se diferenciam e mineralizam dentro de 21 dias. O processo de diferenciação pode ser genericamente dividido em 3 estágios distintos: 1) proliferação, 2) formação e maturação da matriz e 3) mineralização com nódulos de hidroxiapatita. A presença do ácido ascórbico aumenta a síntese de colágeno e os níveis de fosfatase alcalina. Esta, através da interação com o β -glicerofosfato, produz quantidades crescentes de fosfato inorgânico no ambiente extracelular. Este, por sua vez, além de ser componente do mineral hidroxiapatita, é necessário como mecanismo de sinalização nos eventos que precedem a mineralização (BECK, 2003).

1.3 WNT E SEU PAPEL SOBRE A DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM OSTEOGÊNICA

Wnt é uma glicoproteína secretada, lipossolúvel, que está envolvida na comunicação celular durante o desenvolvimento e desempenha papel central no controle do destino, da proliferação e da sobrevivência de diversos tipos celulares. Existem cerca de 19 diferentes moléculas da família Wnt que se ligam a uma família de receptores (10 membros) transmembranares do tipo serpentina chamados de Frizzled (Fz). Wnts ativam mais de um tipo de via de sinalização intracelular. A via canônica envolve a ligação de Wnt ao seu receptor Fz, que atua sinergicamente com

os receptores de lipoproteína de baixa-densidade (LRP-5 e LRP-6) e ativa a proteína intracelular Dishevelled (DVL). DVL, por sua vez, bloqueia a ação da proteína GSK3 β , cuja função é fosforilar a β -catenina e, conseqüentemente, ativar o complexo de destruição via proteossoma. A inibição de GSK3 β bloqueia a degradação de β -catenina, que se acumula no citoplasma e é progressivamente translocada para o núcleo. No núcleo, β -catenina se liga ao promotor de *TCF / LEF* (*T cell factor-1 / Lymphocyte enhancer factor-1*) e ativa a transcrição destes fatores que, por sua vez, estimulam a transcrição de uma grande gama de genes envolvidos, entre outras condições, na proliferação e na manutenção do estado indiferenciado, como *ciclina D1*, *MYC*, *NOTCH1* e *HOXB4* (Fig. 4) (STAAL & CLEVERS, 2005). A atividade da via de Wnt pode ser modulada extracelularmente por muitos antagonistas secretados, incluindo as proteínas ricas em resíduo de cisteína Dickkopf (DKK), que competem com Wnt para ligar-se ao seu co-receptor (LRP), as proteínas secretadas relacionadas à Frizzled (sFRP), que se ligam às proteínas Wnt em solução, impedindo a ativação da via, e outros como Cerberus e fator inibitório de Wnt-1 (WIF-1) (GAUR et al., 2005; MOON et al., 2004; OHNAKA et al., 2005; STAAL & CLEVERS, 2005).

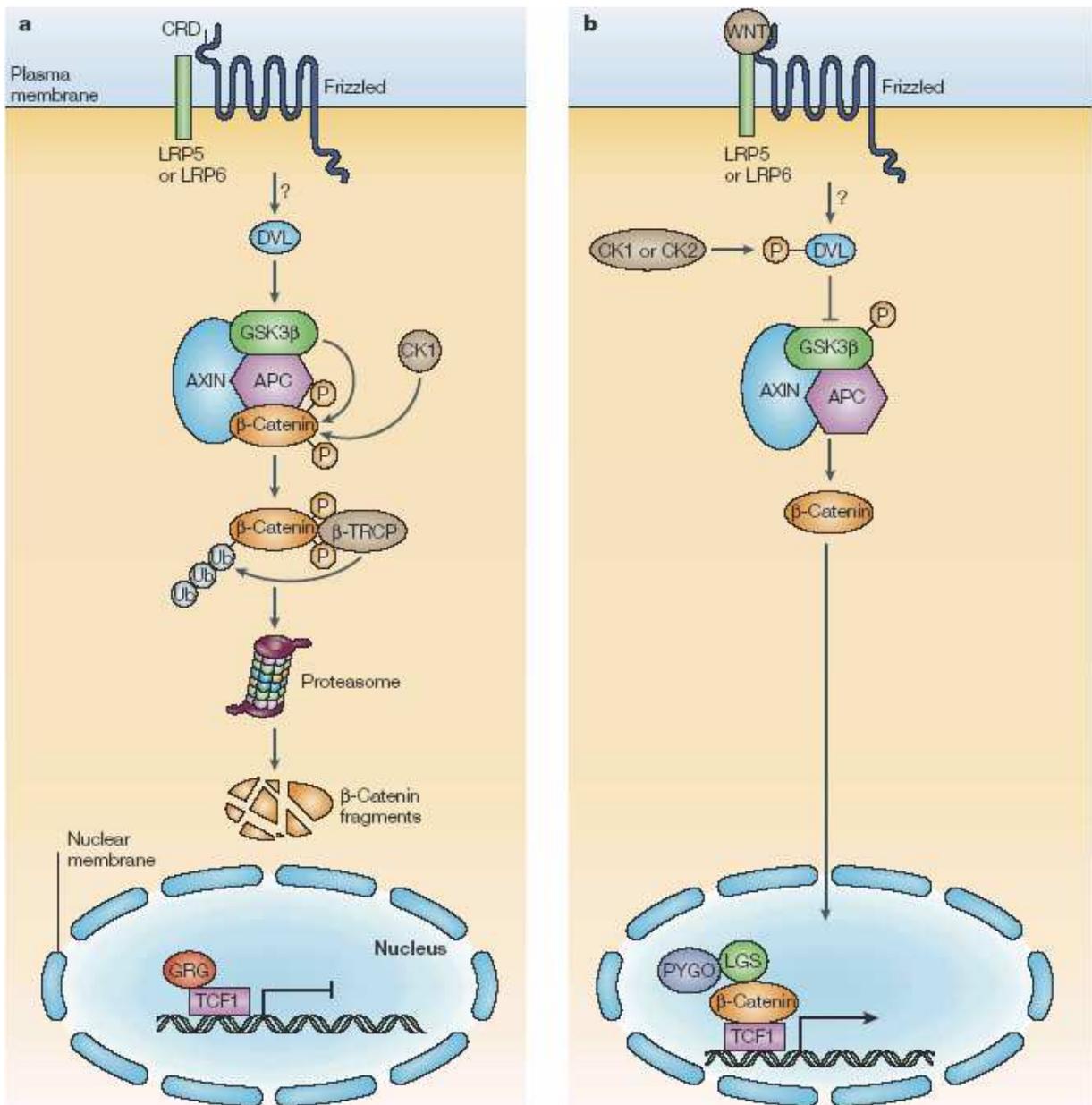


Figura 4. Via canônica de sinalização de Wnt. (a) Na ausência de Wnt, a β -catenina se associa a um complexo de destruição multiproteico constituído por AXIN, APC, CK1 e GSK3 β . Após sofrer fosforilação pela CK1 e GSK3 β , a β -catenina sofre ubiquitinação e assim é degradada pelo proteossoma. Membros da família TCF/LEF estão ligados, no núcleo, à repressores que o deixam inativos. (b) A proteína Wnt se liga ao seu receptor, Frizzled, e ao co-receptor, LRP5 ou LRP6, o que resulta na inativação da GSK3 β pela DVL. A β -catenina, assim desfosforilada, se acumula e migra para o núcleo, onde se liga ao TCF/LEF para ativar os genes alvo. As proteínas nucleares PYGO e LGS ajudam na atividade transcricional da β -catenina. (Fonte: STAAL & CLEVERS, 2005).

A via de sinalização de Wnt é fundamental durante o desenvolvimento de muitos sistemas orgânicos, estando associada ao desenvolvimento dos membros nos vertebrados, formação dos túbulos renais, desenvolvimento do sistema nervoso central e modulação da atividade cerebral, desenvolvimento vascular, pulmonar,

dentário, hepático e cardíaco, controle da proliferação e da diferenciação celular em vários órgãos e finalmente na manutenção e autorenovação de diferentes populações de células-tronco e de progenitoras (estudos demonstram que a sinalização de Wnt promove a expansão, a adaptação e sobrevivência das células-tronco *in vivo*). A via de Wnt também está envolvida na supressão tumoral, pois sua desregulação é fator chave no início de vários tumores, como carcinoma de cólon (MOON et al., 2004; STAAL & CLEVERS, 2005). Diversos membros da família de Wnt já foram identificados em células-tronco embrionárias, células cancerosas do cólon e progenitores hematopoiéticos, como timócitos imaturos. A sinalização de Wnt fornece sinais proliferativos para as células progenitoras mais imaturas em ambas as linhagens linfóides B e T, assim como fornece sinais de auto-renovação para as HSC (STAAL & CLEVERS, 2005). Trabalhos recentes têm demonstrado a importância da via de Wnt na proliferação e manutenção do estado indiferenciado de progenitores hematopoiéticos (AUSTIN et al., 1997; MURDOCH et al., 2003; REYA et al., 2003; VAN den BERG et al., 1998).

A via de sinalização Wnt também parece ser um importante regulador da formação óssea, atuando em praticamente todas as etapas do processo osteogênico. A via de Wnt parece ser muito importante no desenvolvimento esquelético normal. Existem evidências de regulação direta de *RUNX2* (ou *CBFA1*, gene máster da diferenciação osteoblástica) pela sinalização canônica de Wnt, sugerindo que *RUNX2* seja um gene alvo do complexo β -catenina / *TCF1* para a estimulação de formação óssea. Assim, a sinalização Wnt / *TCF* ativa a expressão de *RUNX2*, induzindo a diferenciação osteogênica e desenvolvimento esquelético, com um papel tão significativo quanto o da sinalização das BMP (proteínas morfogenéticas ósseas) (BARON & RAWADI, 2007; GAUR et al., 2005). Inclusive,

parece que as vias de Wnt e BMP se entrecruzam (BAIN et al., 2003; CHEN et al., 2007; HARTMANN, 2006; LUO et al., 2004). Tanto Wnt3A quanto BMP-9 estimulam o *CTGF* (*connective tissue growth factor*) nos estágios iniciais da diferenciação osteogênica, o que parece regular a proliferação e recrutamento de células osteoprogenitoras; porém, sua atividade é inibida durante a diferenciação terminal dos osteoblastos (LUO et al., 2004). A ativação da diferenciação osteoblástica induzida por BMP2 parece ser dependente da ativação da sinalização mediada por β -catenina. Em linhagem celular mesenquimal murina, o aumento de β -catenina não degradável foi suficiente para induzir a expressão de fosfatase alcalina (BAIN et al., 2003) e somente o bloqueio da sinalização canônica de Wnt, mas não de BMP-2, foi capaz de inibir a expressão de fosfatase alcalina em diversas linhagens de células mesenquimais, sugerindo que a ação de BMP-2 se deva à sinalização mediada por β -catenina (RAWADI et al., 2003). De fato, BMP-2 induz a expressão de diferentes tipos de Wnt e seus receptores em células mesenquimais, com conseqüente ativação da transcrição de *TCF* mediada por β -catenina (CHEN et al., 2007).

Estudos com camundongos *knock-out* e transgênicos para os componentes da via de Wnt, tais como Wnt-10b, LRP5/6, sFRP1, Dkk-2, Axin-2 e β -catenina têm demonstrado que a via canônica de sinalização de Wnt modula a maioria dos aspectos da fisiologia osteoblástica, incluindo proliferação, diferenciação, formação da matriz óssea, mineralização e apoptose, assim como influencia a osteoclastogênese e reabsorção óssea (BODINE & KOMM, 2006; HARTMANN, 2006).

No entanto, essa modulação parece ser bastante complexa e enquanto a elevação da sinalização canônica de Wnt pode ser necessária para a proliferação dos pré-osteoblastos, assim como para o início e progressão da diferenciação

osteoblástica, a supressão desta via por antagonistas como DKK-2 parece ser essencial para a diferenciação terminal e mineralização da matriz (BODINE & KOMM, 2006).

A perda do antagonista de Wnt, sFRP1, leva a um aumento da massa óssea (WANG et al., 2005), mas camundongos deficientes de um outro antagonista da via de Wnt, Dkk2, são osteopênicos (LI et al., 2005a). Na verdade, os camundongos $Dkk2^{-/-}$ têm um fenótipo ósseo complexo, caracterizado não só por um defeito na maturação terminal dos osteoblastos e mineralização da matriz, mas também por um aumento dos osteoclastos, dependente do aumento da expressão de dois fatores importantes na diferenciação destas células, RANKL e M-CSF, que são produzidos pelos osteoblastos. Notou-se que a sinalização canônica de Wnt estimulava a expressão de Dkk2, o qual é importante nos estágios finais da diferenciação osteogênica, particularmente na formação da matriz mineralizada. Segundo os autores, Dkk2 formaria um circuito que regularia a diferenciação osteogênica, sendo que a via canônica de Wnt funcionaria como estimulador inicial, enquanto Dkk2 atuaria nas fases finais. Apesar de Dkk2 ser um inibidor da via de Wnt, parece improvável que esse fenótipo seja atribuído somente a uma redução da sinalização de Wnt. Sugere-se que Dkk2 tenha funções adicionais que são independentes de seu antagonismo da sinalização de Wnt durante a osteogênese, como foi demonstrado recentemente para Dkk1 na cardiogênese (LI et al., 2005a).

A atenuação da osteoclastogênese, induzida pela ativação da via de Wnt parece envolver também a regulação transcricional da Osteoprotegerina (OPG), um fator inibitório da diferenciação osteoclástica, que é produzido e secretado pelos osteoblastos. No entanto, o resultado da sinalização é modificado por vários

moduladores extracelulares da via canônica de Wnt, provavelmente através da interação intracelular com outras vias de sinalização (HARTMANN, 2006).

Evidências do papel da sinalização de Wnt na diferenciação de osteoblastos em humanos foram mostradas pelos estudos genéticos que demonstraram que uma mutação no gene que codifica o co-receptor de Wnt, LRP5, está presente nos pacientes que apresentam a síndrome de osteoporose associada ao pseudoglioma (NUTTALL & GIMBLE, 2004).

Mas, como falado anteriormente, Wnt também regula a diferenciação para a via adipogênica. De fato, o papel da via de Wnt no controle de diferenciação para a linhagem osteoblástica ou adipogênica tem sido confirmado em diferentes estudos (DE BOER et al., 2004; GAUR et al., 2005; GREGORY et al., 2005a; LI et al., 2005a; NUTTALL & GIMBLE, 2004; WANG et al., 2005).

Os mecanismos transcricionais que regulam a adipogênese e osteoblastogênese dependem, em parte, de receptores nucleares de hormônios e seus ligantes. Um destes é o PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*), cujos ligantes (ácidos gordurosos de cadeia longa e seus derivados e compostos de tiazolidinediona) promovem a adipogênese das células do estroma da medula óssea e inibem a osteogênese. Esses agentes não somente ativam o PPAR γ , mas também suprimem a expressão e ação da proteína regulatória da transcrição osteoblástica *CBFA1*. Outras vias-alvo adicionais incluem os ligantes e receptores de notch/delta/jagged, relacionados com a família de receptores do fator de crescimento epidérmico. A superexpressão de notch *in vitro* inibe a osteogênese e estimula a adipogênese em modelos celulares, uma vez que leva à regulação inibitória do receptor de Wnt e ao baixo fluxo de seu mediador, β -catenina. Nesta outra via, a família Wnt de peptídeos sinalizadores interage com um complexo de receptores que

incluem as proteínas relacionadas ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (LRPs). As mutações ativadoras desta molécula resultam em um fenótipo de massa óssea elevada, enquanto sua inativação resulta em redução da massa óssea. (MOON et al., 2004; NUTTALL & GIMBLE, 2004).

As células do estroma de MO expressam diversos membros da via de Wnt, mas o papel desta via na diferenciação das MSC para a linhagem osteoblástica tem sido ainda pouco explorado.

Um perfil comum de expressão de Wnt e Fz foi identificado em MSC primárias isoladas da MO de diferentes doadores voluntários (ETHERIDGE et al., 2004). A expressão de Wnt 2, 4, 5a, 11 e 16 e Fz 2, 3, 4, 5 e 6 foi observada em todas as MSC, mesmo em diferentes passagens *in vitro*, e parece não ser afetada por períodos de congelamento. Este perfil comum de expressão de Wnt e Fz pode ser importante, não somente na identificação de uma sinalização Wnt-dependente específica nos programas de proliferação e diferenciação mesenquimal, mas também na caracterização do fenótipo das MSC. Com o mRNA extraído das linhagens celulares mesenquimais MC3T3-E1 e C2C12, os autores identificaram um perfil de expressão similar, mas não idêntico, compartilhando a expressão de Wnt 4, 5a e 11 e Fz4 e 6 (ETHERIDGE et al., 2004).

A ativação da via de Wnt com cloreto de lítio (forte inibidor de GSK3 β) ou meio condicionado enriquecido em Wnt3a em MSC de MO mostrou que o controle de proliferação e diferenciação é dose dependente. Em altas concentrações, a sinalização via Wnt estimulou a diferenciação para a linhagem osteogênica e inibiu a diferenciação adipocítica (DE BOER et al., 2004).

Bennet et al. (2005) analisaram camundongos Fabp4-Wnt10b, nos quais o transgene Wnt10b foi inserido sob o controle do promotor adipocítico Fabp4 em

células do estroma da MO. Os autores observaram que os fêmures destes camundongos apresentavam quase quatro vezes mais osso nas metáfises distais e eram mais fortes mecanicamente. Além disso, eles eram resistentes à perda óssea característica da idade e da deficiência de estrógeno. Assim, os autores demonstraram que a sinalização canônica de Wnt estimula a osteoblastogênese e inibe a adipogênese dos precursores mesenquimais bipotentes da MO. Wnt10b mudou o destino das células na direção da linhagem osteoblástica através da indução dos fatores de transcrição osteoblásticos Runx2, Dlx5 e Osterix e da supressão dos fatores transcrição adipogênicos C/EBP α e PPAR γ . Finalmente, os camundongos Wnt10b^{-/-} apresentam diminuição do osso trabecular e da osteocalcina sérica, confirmando que o Wnt10b é um regulador endógeno da formação óssea.

Uma vez secretadas, as proteínas Wnt permanecem associadas à superfície celular ou matriz extracelular e estão envolvidas nos mecanismos de sinalização autócrinos e parácrinos. Conseqüentemente, as células-alvo para as proteínas Wnt expressas pelas MSC podem ser estas próprias. Uma vez que as MSC expressam tanto diversas Wnt, como seus receptores, incluindo alguns pares previamente identificados (tais como Wnt5a/Fz5), sustenta-se a hipótese de que nas MSC a sinalização seja, pelo menos em parte, autócrina. Wnt5a é expressa pelas MSC no final do crescimento exponencial e nas fases estacionárias em cultura, sugerindo um papel para esta Wnt em particular no controle da proliferação da MSC. Portanto, esses achados indicam que a sinalização autócrina de Wnt opera nas populações de MSC primitivas e sustenta evidências prévias de que esta via regula a especificação da linhagem mesenquimal (ETHERIDGE et al., 2004).

Resumindo, vários são os exemplos do papel de Wnt na formação óssea, que incluem: 1) evidências de que β -catenina, um componente essencial desta via, é encontrada nos núcleos das células precursoras dos osteoblastos no periósteo. E tem sido proposto que a concentração de β -catenina deve ser elevada para permitir a diferenciação em osteoblastos e a estimulação do fator de comprometimento final Osterix; 2) observações de que mutações que envolvem o gene LRP5, que codifica um co-receptor da via canônica de Wnt, são responsáveis por diferentes fenótipos ósseos anormais, incluindo desde quadros osteoporóticos até massa óssea elevada; 3) resultados de vários experimentos que sustentam a noção de que a ativação da via de Wnt leva ao aumento pós-natal da massa óssea, tais como o camundongo transgênico expressando Wnt10b no tecido adiposo e medula óssea sob o controle do promotor Fabp4 e os camundongos nos quais o antagonista de Wnt sFRP1 está ausente. Também, a perda de Axin2 (regulador negativo da β -catenina) leva a proliferação aumentada dos progenitores osteoblásticos nas suturas do crânio e acelera a maturação e mineralização dos osteoblastos *in vitro*; 4) Camundongos deficientes em β -catenina desenvolvem osteopenia. Inversamente, a ativação da β -catenina em osteoblastos resulta em massa óssea aumentada. Surpreendentemente, ambos os fenótipos (com aumento ou perda de função) foram causados mais por mudanças na reabsorção óssea do que na formação óssea, como poderia ser esperado baseado no fenótipo do mutante em LRP5, o qual afeta a proliferação e maturação dos osteoblastos, mas não a diferenciação de osteoclastos. A reabsorção óssea alterada foi causada por desregulação da osteoprotegerina (OPG). Observou-se que a expressão de OPG foi estimulada pela sinalização canônica de Wnt em uma linhagem celular mesenquimal multipotente. A

Opg é também um gene-alvo direto do complexo β -catenina/ *TCF* nos osteoblastos (HARTMANN, 2006).

1.4 AÇÃO DOS GLICOCORTICÓIDES SOBRE A DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E SEU EFEITO NA VIA DE WNT

Os glicocorticóides (GC) são hormônios que influenciam a atividade de quase todas as células do corpo, modulam a expressão de aproximadamente 10% de nossos genes e são essenciais para a vida, embora estejam implicados na patogênese de doenças (hipertensão, obesidade, diabetes tipo II, depressão) e produzam efeitos indesejáveis quando usados terapêuticamente (osteoporose, etc.). Os principais glicocorticóides endógenos são o cortisol e a corticosterona, os quais são sintetizados a partir do colesterol nas células da zona fasciculada do córtex da glândula adrenal. Sua liberação na circulação obedece a um ciclo circadiano de 24h e são essenciais para a homeostase e para capacitar o organismo a responder ao estresse físico e emocional. Eles promovem a degradação de carboidratos e proteínas, exercem efeitos complexos no metabolismo lipídico e regulam os processos imune e inflamatório, além de muitas outras ações. O controle da secreção desses hormônios é realizado pelo eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), começando pela liberação dos neurohormônios hipotalâmicos CRH (hormônio liberador da corticotropina) e AVP (vasopressina arginina) do núcleo paraventricular, os quais, via vasos porta-hipofisários, alcançam a hipófise anterior, onde provocam a liberação do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico ou corticotropina) na circulação, o qual atinge o córtex da adrenal e dispara a síntese e liberação dos glicocorticóides na corrente sanguínea. Esse eixo HPA é modulado por

feedback negativo pelo próprio nível de glicocorticóides no sangue. Os glicocorticóides atuam basicamente através de 2 tipos de receptores intracelulares pertencentes à superfamília de receptores nucleares que regulam a transcrição dos genes-alvo: o receptor mineralocorticóide (MR) e o receptor glicocorticóide (GR). Em concentrações baixas, os glicocorticóides ativam somente os MRs. No entanto, quando os níveis de glicocorticóides se elevam, como no estresse, os MRs ficam saturados e há ativação dos GRs, o que produz os efeitos biológicos observados nestes casos (revisado em BUCKINGHAM, 2006).

Devido às suas propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras, os glicocorticóides também representam uma classe de drogas freqüentemente usada no tratamento de processos inflamatórios crônicos e reações adversas do sistema imunológico, mas que apresenta inúmeros efeitos adversos. A osteoporose é a complicação iatrogênica mais observada no tratamento crônico com doses farmacológicas desses esteróides, sendo estes a causa mais freqüente de osteoporose secundária. A gravidade da perda óssea e o risco de fratura relacionam-se com a dose e o tempo de duração da terapia. A perda óssea acomete principalmente o osso trabecular e é maior nos primeiros seis meses de tratamento (EBELING et al., 1999; LANNA et al., 2003; MAZZIOTTI et al., 2006).

Ebeling et al. (1999) demonstraram claras diferenças na densidade mineral óssea (BMD) de pacientes submetidos a transplante alogênico de MO (TMO) num período médio de 30 meses, com aumento do risco de desenvolvimento de osteoporose numa idade relativamente precoce. Entre as possíveis causas, (a doença subjacente, amenorréia, e quimioterapia), o tratamento da DEVH com glicocorticóides foi apontada em função da perda óssea ser praticamente ausente no transplante autólogo. A perda óssea na vértebra, fêmur e corporal total foi fortemente

relacionada à exposição cumulativa aos glicocorticóides usados como parte da quimioterapia pré-TMO ou para tratamento da DEVH (4%/10g de prednisolona na coluna e 9%/10g do medicamento no fêmur).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a ocorrência de osteoporose induzida pelos glicocorticóides. Dentre eles, estão: (i) a ação direta dos glicocorticóides nas paratireóides (promovendo hiperplasia) e nas células ósseas, (ii) a diminuição da absorção intestinal e renal de cálcio com conseqüente elevação dos níveis plasmáticos do hormônio paratireóideo (PTH, *parathyroid hormone*) e (iii) as alterações na produção dos esteróides gonadais (há hipogonadismo no hipercortisolismo) (LANNA et al., 2003). Além disso, o aumento da reabsorção óssea induzida por ativação dos osteoclastos também tem sido proposto (HOFBAUER et al., 1999; KIM et al., 2006).

O aumento dos níveis de PTH tem sido apontado como a causa da osteoporose induzida por glicocorticóide (OIG), mas alguns indícios sugerem que este não é o caso. Por exemplo, a osteoporose secundária ao PTH só é observada quando há aumento significativo e persistente da secreção deste hormônio. Além disso, o padrão histomorfométrico presente na OIG difere significativamente do apresentado por pacientes com hiperparatireoidismo primário (HPTP). No HPTP, ocorre principalmente redução da espessura cortical óssea e observa-se manutenção do volume do osso trabecular. Na OIG, observa-se redução tanto da espessura da cortical óssea quanto do volume do osso trabecular. A histomorfometria dinâmica revelou que o HPTP caracteriza-se por aumento da atividade de formação e principalmente de reabsorção óssea, enquanto que na OIG o padrão dominante é de redução de atividade osteoblástica, sendo que o aumento

da perda óssea ocorre principalmente na fase inicial de exposição ao esteróide (RUBIN & BILEZIKIAN, 2002).

O aumento da reabsorção óssea induzida por glicocorticóides parece envolver ativação de osteoclastos. Foi demonstrado que glicocorticóides induzem a redução de transcrição do gene OPG, ao mesmo tempo em que aumentam a expressão de seu ligante (OPG-L) em osteoblastos. OPG inibe a maturação e ativação de osteoclastos ao bloquear os efeitos de OPG-L e, conseqüentemente, o efeito final dos glicocorticóides é de estímulo da osteoclastogênese e reabsorção óssea (HOFBAUER et al., 1999). Mais recentemente, foi sugerido que o efeito de glicocorticóides sobre osteoclastos é inibidor de sua atividade e que a perda óssea se deveria a uma diminuição do remodelamento ósseo. Utilizando camundongos em que o receptor de glicocorticóides foi inativado em células da linhagem osteoclástica (camundongos GR^{oc -/-}), Kim et al (2006) observaram que estes eram protegidos da perda óssea induzida por estes esteróides, uma vez que seus osteoclastos não respondiam ao efeito inibidor dos glicocorticóides sobre a organização do citoesqueleto induzida por M-CSF, via enzimas RhoA, Rac e Vav3, e apresentavam-se espalhados e com atividade de reabsorção óssea preservada.

No entanto, apesar se seus efeitos sobre osteoclastos, acredita-se que o principal mecanismo subjacente à perda óssea de longo prazo induzida por glicocorticóide é o prejuízo da função osteoblástica e da formação óssea (SMITH & FRENKEL, 2005).

As células ósseas apresentam receptores para os glicocorticóides. Em concentrações fisiológicas, estes esteróides são importantes para a diferenciação e função destas células. Em doses farmacológicas, porém, alteram a atividade dessas células, favorecendo a perda de massa óssea através da supressão da função

osteoblástica, inibindo a replicação celular, a síntese de colágeno e de proteínas não-colágenas (LANNA et al., 2003).

Os glicocorticóides suprimem a diferenciação e proliferação osteoblástica por meio de múltiplos efeitos. Um bem conhecido é a inibição da expressão de *RUNX2/CBFA1*, um fator transcricional crucial para a diferenciação osteoblástica. Ao mesmo tempo em que inibem a expressão de *CBFA1*, os glicocorticóides estimulam a expressão do fator de transcrição adipocítico *PPAR γ 2*, desfavorecendo a osteogênese e favorecendo a adipogênese. Além disso, reduzem a angiogênese através da supressão do fator de crescimento do endotélio vascular (*VEGF*, *vascular endothelial growth factor*), o que pode levar à morte das células ósseas (osteonecrose) (LI et al., 2005b). Outro efeito é a anulação da via das BMP, proteínas envolvidas na regulação da massa óssea (LECLERC et al., 2004). Ainda, alguns trabalhos mostraram evidências de que os glicocorticóides suprimem a via canônica de Wnt, em parte por aumento da produção de um de seus antagonistas, o DKK -1 (OHNAKA et al., 2005).

Um trabalho minucioso demonstrou que os glicocorticóides (Dexametasona) inibem a proliferação e a diferenciação de uma linhagem celular, MC3T3-E1, para a linhagem osteoblástica de maneira dependente e independente de Wnt. Foi observado anteriormente que a progressão para a diferenciação osteogênica destas células envolve um ciclo de proliferação no estágio de comprometimento para a linhagem osteoblástica, na fase de confluência, que é inibida pelos GC. Esta inibição foi associada a uma diminuição dos níveis de β -catenina e da transcrição mediada por *TCF/LEF1*. Este efeito se deveu a dois mecanismos paralelos (Fig. 5): 1) estimulação da HDAC1 (Histona Deacetilase-1), um co-repressor de *LEF/TCF*; e 2) inibição da via de PI3K/Akt com conseqüente ativação de GSK3 β e diminuição dos

níveis de β -catenina. Ambos os mecanismos contribuem para a supressão da atividade transcricional de *LEF/TCF* e para a atenuação da transição entre as fases G1-S do ciclo celular (SMITH & FRENKEL, 2005).

Vale lembrar que a ativação da via de Wnt resulta na redução da atividade intrínseca da GSK3 β e interrupção do complexo de destruição da β -catenina, levando ao acúmulo e translocação desta para o núcleo, com indução de proliferação celular, uma vez que MYC e ciclina D1 são genes cuja transcrição é ativada pelo complexo β -catenina / *TCF-LEF* (SMITH et al., 2002). Por outro lado, GSK3 β pode inibir os fatores reguladores do ciclo celular, MYC e ciclina D1, por fosforilação direta, seguida de ubiquitinação e degradação proteossômica e sua fosforilação e degradação é também induzida por ativação da via de PI3K/Akt. Assim, a inibição da fosforilação e conseqüente degradação de GSK3 β por ação dos GC, culmina em redução dos níveis de β -catenina e de MYC. Portanto, o efeito inibitório dos GC sobre a diferenciação das células MC3T3-E1 para a linhagem osteogênica ocorrerá quase que exclusivamente no momento de seu comprometimento e progressão do ciclo celular, que ocorre no momento da confluência (Fig. 5) (SMITH & FRENKEL, 2005).

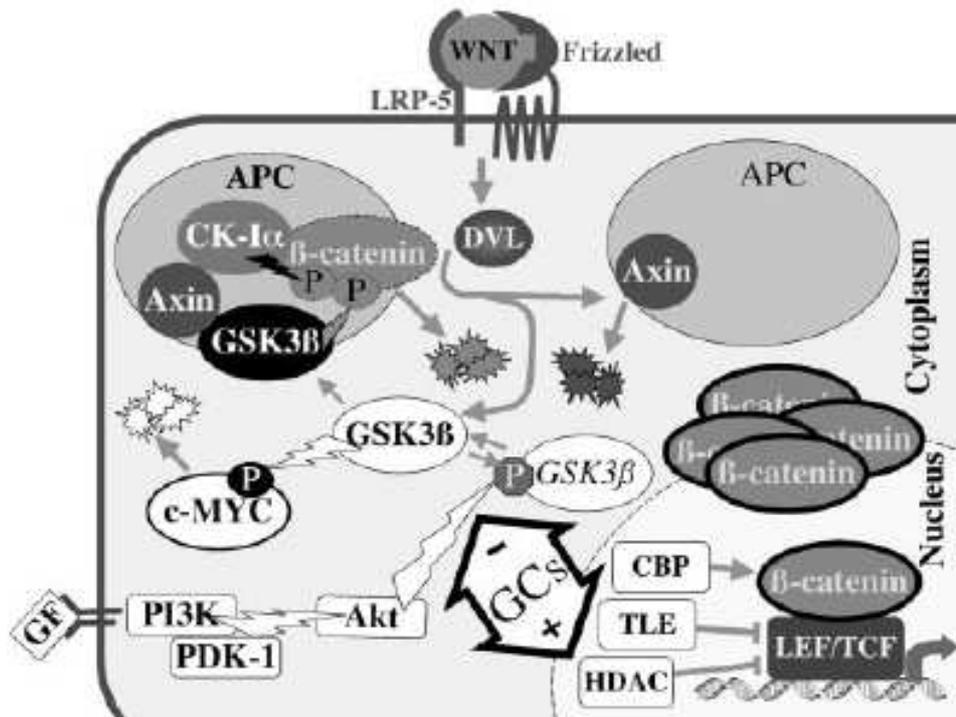


Figura 5. Efeito inibitório de glicocorticóides sobre a via de Wnt, através de HDAC e eixo PI3K/Akt/GSK3β/β-catenina. A ligação de Wnt com seu receptor Frizzled e o co-receptor LRP5 leva a degradação de GSK3β com acúmulo de β-catenina e ativação da transcrição de genes, como c-Myc, induzida pelo complexo β-catenina / TCF-LEF. Os glicocorticóides (GCs) ativam HDAC e inibem a fosforilação e degradação de GSK3β, com conseqüente inibição da transcrição dependente de TCF-LEF. (Fonte: SMITH & FRENKEL, 2005).

Além da inibição da diferenciação osteogênica, o tratamento com glicocorticóides pode levar ao aumento paralelo da diferenciação adipogênica. Na osteonecrose induzida por esteróides, encontra-se comumente a hipertrofia e hiperplasia das células gordurosas, bem como a deposição de lipídios nos osteócitos da cabeça do fêmur. Yin et al. (2006) demonstraram que a dexametasona pode induzir diretamente a diferenciação das MSC em grande número de adipócitos e inibir a diferenciação osteogênica, o que foi comprovado com a redução dos níveis de fosfatase alcalina e osteocalcina e da expressão do gene osteogênico para colágeno tipo I nas células tratadas com dexametasona, e aumento da expressão do gene específico de adipócitos 422 (aP2).

Por outro lado, numerosos trabalhos demonstraram que concentrações fisiológicas de glicocorticóides, na presença de ácido ascórbico e β -glicerofosfato, induzem a diferenciação de células do estroma da MO humana em células com fenótipo de osteoblastos maduros, capazes de mineralização (PITTINGER et al., 1999; PROCKOP, 1997). Resultados de um trabalho realizado por Cheng et al. em 1994, indicaram que o tratamento destas células com 10^{-7} M de dexametasona induziu a transformação morfológica destas células de um formato alongado para um mais cuboidal, aumentou sua atividade de fosfatase alcalina e sua resposta ao PTH e prostaglandina E_2 e foi essencial para a mineralização da matriz extracelular. Este efeito da dexametasona na diferenciação foi mantido mesmo após a sua retirada.

No entanto, na presença de 10^{-8} M de dexametasona e soro fetal bovino em células do estroma da MO de ratos, ocorre tanto a diferenciação de células osteogênicas quanto adipocíticas. Se, além da dexametasona, é também adicionada a 1,25-dihidroxitamina D3 à essas culturas, a diferenciação para adipócitos é inibida enquanto a de células osteogênicas é aumentada. Estes achados demonstram um relacionamento inverso entre a diferenciação para as linhagens adipogênica e osteogênica neste sistema de cultura e é consistente com a hipótese de que a regulação desses processos tem importante implicação na etiologia de diversas patologias ósseas e medulares (BERESFORD et al., 1992).

Na linhagem pré-osteoblástica murina MC3T3-E1, a dexametasona na concentração de 10^{-8} M estimulou a osteogênese, enquanto a dose de 10^{-6} M inibiu. No entanto, este efeito dependeu da densidade celular. A exposição da cultura à dexametasona antes da confluência tornou-a resistente ao efeito inibitório da droga, o mesmo ocorrendo quando esta era adicionada após a confluência – quando as células já se comprometeram com a diferenciação para a linhagem osteogênica

(LECLERC et al., 2004). Isto sugere que não somente a dose, como também o estágio de diferenciação celular interfere no efeito final do glicocorticóide.

Em concordância com esses dados, Wang et al., 2005, mostraram que a dexametasona na concentração de 10^{-8} M aumentou significativamente a atividade da fosfatase alcalina, o nível de osteocalcina e a formação de nódulos ósseos, enquanto que na concentração de 10^{-6} M a dexametasona aumentou a expressão de sFRP1 seguido de aumento da apoptose e redução da atividade osteogênica de células mesenquimais isoladas da MO de ossos longos de ratos. Os autores verificaram que a expressão de LRP5 nestas células não foi significativamente afetada pelo glicocorticóide, sugerindo que sFRP1 seja o principal modulador da perda óssea induzida por glicocorticóide. Assim, foi proposto que a alteração da expressão de sFRP1 em osteoblastos, condrócitos e células mesenquimais esteja por trás dos efeitos promotores dos glicocorticóides na osteoporose e necrose avascular, embora a possibilidade de que outros inibidores de Wnt no microambiente ósseo possam estar alterados após o tratamento com glicocorticóide não tenha sido excluída.

Nota-se que os glicocorticóides podem exercer vários efeitos sobre as células ósseas, dependendo do estado de diferenciação celular, da espécie animal, e da dose e duração do tratamento (LI et al., 2005b). Acrescenta-se à isto o estágio de confluência celular no momento de sua administração (LECLERC et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

- Verificar o efeito de glicocorticóide sobre a diferenciação *in vitro* de células mesenquimais do estroma de medula óssea humana para a linhagem osteoblástica e seu impacto na via de Wnt.

2.2 ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de glicocorticóide na diferenciação de células mesenquimais do estroma de medula óssea humana para a linhagem osteoblástica
- Verificar a expressão de diferentes genes da via de Wnt em células mesenquimais do estroma de medula óssea humana durante a diferenciação para a linhagem osteoblástica
- Verificar o efeito de diferentes concentrações de glicocorticóide na modulação da expressão de diferentes genes da via de Wnt durante a diferenciação de células mesenquimais do estroma de medula óssea humana para a linhagem osteoblástica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS MESENQUIMAIS DE ESTROMA DE MEDULA ÓSSEA HUMANA

Foram utilizadas amostras de aspirado de medula óssea de doadores voluntários da Unidade de Transplante de Medula Óssea do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF-UFRJ). Após hemossedimentação com Hespan[®] (hidroxietil de amido, McGaiy, Irvine, CA, USA), as células foram quantificadas em hemocítmetro com líquido de Turck e distribuídas em frascos de cultura de 25 cm² na concentração de $1-1,5 \times 10^6$ células/mL em meio Iscove's ou DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (penicilina G sódica 100 U/mL e estreptomicina 100 mg/mL) e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 3 – 4 dias. Após este período, as células não aderentes foram removidas e a monocamada de células aderentes, enriquecida em MSC, foi lavada com solução salina tamponada (PBS, *phosphate buffered saline*) e mantida em cultura até atingir a confluência. Após a confluência, as células foram removidas enzimaticamente com solução de tripsina (Sigma, St. Louis, MI, EUA) a 0,125% com 78mM de EDTA, quantificadas em hemocítmetro, sendo a viabilidade determinada pelo método de exclusão de corante com Azul de Trypan 0,4% e expandidas. Cada procedimento deste foi denominado passagem. Todos os procedimentos foram realizados no laboratório de Biologia Celular Aplicada à

Medicina da UFRJ e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica do HUCFF.

3.2 INDUÇÃO DE DIFERENCIAÇÃO PARA A LINHAGEM OSTEOBLÁSTICA E EFEITO DE GLICOCORTICÓIDE

As células foram distribuídas na concentração de $5,2 \times 10^3$ a $2,6 \times 10^4$ células/cm² em placas de cultura em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina). Após três a quatro dias, o meio foi trocado, adicionando-se meio osteoindutor, ou seja, DMEM suplementado com 10% de SFB, antibióticos, 10 mM de β -glicerofosfato, 50 μ g/mL de ácido ascórbico e 10^{-8} M de dexametasona (Decadron). A fim de observar a influência do glicocorticóide sobre a diferenciação osteoblástica das MSC, o meio osteoindutor foi suplementado com 10^{-6} M de dexametasona, constituindo, assim, dois grupos que diferiram quanto à concentração do corticóide. Para verificar o efeito de altas doses de glicocorticóide sobre as MSC já comprometidas para a linhagem osteoblástica (pré-osteoblasto), as células foram mantidas em meio osteoindutor com 10^{-8} M de dexametasona por uma ou duas semanas e então o meio foi trocado, continuando-se a indução na presença de 10^{-6} M de dexametasona. As células foram mantidas por até 21 dias em estufa com 5% de CO₂ à 37°C, com troca de meio a cada três dias. Como controle, as células foram mantidas por igual período de tempo em meio DMEM contendo somente 10% de SFB e antibióticos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA PELA IDENTIFICAÇÃO DE DEPÓSITOS DE CÁLCIO

Após 21 dias de cultura, a monocamada de células foi lavada com PBS e fixada com formol tamponado a 10% por 12 h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS e coradas pelo método de Von Kossa modificado (REYES et al., 2001), para observação de áreas de calcificação, aqui referidas como nódulos de mineralização. Resumidamente, as placas foram incubadas com solução de nitrato de prata a 2% à temperatura ambiente e deixadas sob luz até focos de coloração castanha escura serem observados na monocamada. Neste ponto, a reação foi interrompida com retirada da solução de nitrato de prata e lavagem da monocamada com água destilada. As placas foram observadas em microscópio invertido (Leika) equipado com câmera digital.

Em alguns experimentos, a análise da deposição de cálcio foi realizada com a coloração Nuclear Fast Red. Após fixadas com formol 10% por 2h, as células foram lavadas com PBS e cobertas com o corante por cerca de 30-40 minutos. Em seguida, procedeu-se à lavagem com água destilada e secagem à temperatura ambiente.

3.4 REAÇÃO DE RT-PCR (*REVERSE TRANSCRIPTASE POLYMERASE CHAIN REACTION*) PARA ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE mRNA DE MEMBROS DA VIA WNT E DA LINHAGEM OSTEOBLÁSTICA.

Amostras das células mantidas em meio controle e meio osteoindutor com diferentes concentrações de dexametasona (10^{-8} M ou 10^{-6} M) foram retiradas

enzimaticamente, como descrito anteriormente, em diferentes intervalos de tempo após o início da indução de diferenciação, a saber: 6, 12 (overnight) e 24 horas e 7, 14 e 21 dias. As células foram lavadas em meio sem soro, ressuspensas em TRIZOL™ Reagent (Gibco BRL, Rockville, MD) e mantidas a -20°C até a extração do RNA.

A extração de RNA foi feita como recomendado pelo fabricante. Resumidamente, adicionou-se 200µL de clorofórmio às células em 1mL de Trizol e, em seguida, centrifugou-se a 1200 g, por 15 min a 4°C. Após a centrifugação, a fase aquosa superior contendo o RNA foi retirada e acrescentou-se álcool isopropílico. Após centrifugação como descrito, o RNA foi lavado com etanol 70% e secado à temperatura ambiente por 10 min, sendo o pellet ressuspenso em 10 µL de água bidestilada DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma Chemical Co.). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro na faixa do ultra-violeta (UV, 260 e 280 nm) e a relação RNA/proteína foi calculada.

Para a síntese de cDNA, foram utilizadas 2µg de RNA total. Foi adicionado 0,5µg de oligo-dT primer (oligo-dT primer 500 µg/mL, Gibco BRL) e a mistura foi incubada à 68°C por 4 minutos. Após este período, adicionou-se 0,01 M de DTT (DTT 0,1M, Invitrogen) e 0,5 mM de uma mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM, Invitrogen) e 200 U da enzima de Transcrição Reversa (M-MLV RT 200 U/mL; Invitrogen). A mistura foi incubada a 39°C por 2 h. Em seguida, foi colocada a 90°C por 10 minutos e armazenada a -20°C.

A reação de PCR foi realizada com 2µL de cDNA, ao qual foram adicionados uma solução contendo 0,4 pM/µL dos primers específicos (Tab. 1), 1,5U de Taq Polimerase (Cenbiot Enzimas) e tampão da enzima contendo 2mM de MgCl₂ e 0,1mM de uma mistura de nucleotídeos (dNTPs 25mM, Invitrogen). A reação foi

realizada em máquina de PCR (Biômetra T gradient) da seguinte forma: após 60 segundos a 96°C, foram realizados 34 ciclos de 96°C por 30 segundos, seguidos de 45 segundos à temperatura média de anelamento (T_m) para cada primer (Tab. 1) e 72°C por 1 minuto para alongamento. Ao final, um ciclo a 75°C por 5 minutos foi realizado. O controle negativo da reação foi realizado adicionando-se todos os reagentes, mas na ausência do cDNA.

Os produtos da reação de RT-PCR foram aplicados em gel horizontal de agarose à 1,2% e corados com Brometo de Etídio para visualização em Transiluminador com lâmpada UV. Os géis foram fotografados com máquina digital Kodak.

Tabela 1. Características dos primers usados nas reações de RT-PCR

Gene	Seqüência de nucleotídeos	Temperatura média de anelamento (T_m)	Tamanho do amplificado (pares de base)
CBFA1	5' CTC ACT ACC ACA CCT ACC TG 3'	57° C	319 pb
	3' TCA ATA TGG CCA AAC AGA TTC 5'		
WNT5A	5' TTT TTC TCC TTC GCC CAG GTT GT3'	57,5°C	358 pb
	3' GGC TCA TGG CGT TCA CCA C 5'		
FZ3	5' GCT GTA CTC ACA GTT AAC ATG 3'	56°C	455 pb
	3' GCT AAA ATA CCC TTG CTG ATT T 5'		
DKK1	5'TGG TCC AAG ATC TGT AAA CCT GTCC3'	67,5°C	149 pb
	3'CTG GCT TGA TGG TGA TCT TTC TGT A5'		
GAPDH	5' ATC ACC ATC TTC CAG GAG CG 3'	57,5°C	573 pb
	3' CCT GCT TCA CCA CCT TCT TG 5'		
LEF1	5' CCA GCT ATT GTA ACA CCT CA 3'	57,5°C	420 pb
	3' TTC AGA TGT AGG CAG CTG TC 5'		
SFRP1	5' CCA GTT TGC ATT TGG ATG TG 3'	57,5°C	187 pb
	3' GGT CAG AAC GGC CAG TAT GT 5'		
SFRP2	5' GCC TCG ATG ACC TAG ACG AG 3'	57,5°C	152 pb
	3' GAT GCA AAG GTC GTT GTC CT 5'		

4 RESULTADOS

Inicialmente, observou-se que a diferenciação das MSC para a linhagem osteogênica, avaliada pela coloração de Von Kossa para identificação de deposição de cálcio, ocorreu nas duas concentrações de dexametasona, 10^{-8} M e 10^{-6} M (Fig.6). Portanto, não houve efeito inibitório da dexametasona na maior concentração utilizada, de 10^{-6} M. As análises por RT-PCR da expressão de genes envolvidos na diferenciação osteoblástica (Fig. 7) e na via de Wnt (Fig. 8-12) mostraram que as MSC expressam constitutivamente diversos destes fatores, não tendo sido observadas modificações na expressão ao longo da indução. Ou seja, *CBFA1* (Fig.7) (gene máster da diferenciação osteoblástica), *WNT5A* (Fig.8), *FZ3* (Fig. 9), *DKK1* (Fig. 10), *sFRP1*, *sFRP2* (Fig.11) e *LEF1* (Fig. 12) (genes da sinalização Wnt) são constitutivamente expressos pelas MSC de MO humana. Diferenças qualitativas na expressão destes genes entre o grupo tratado com 10^{-8} M de dexametasona e o tratado com 10^{-6} M não foram observadas.

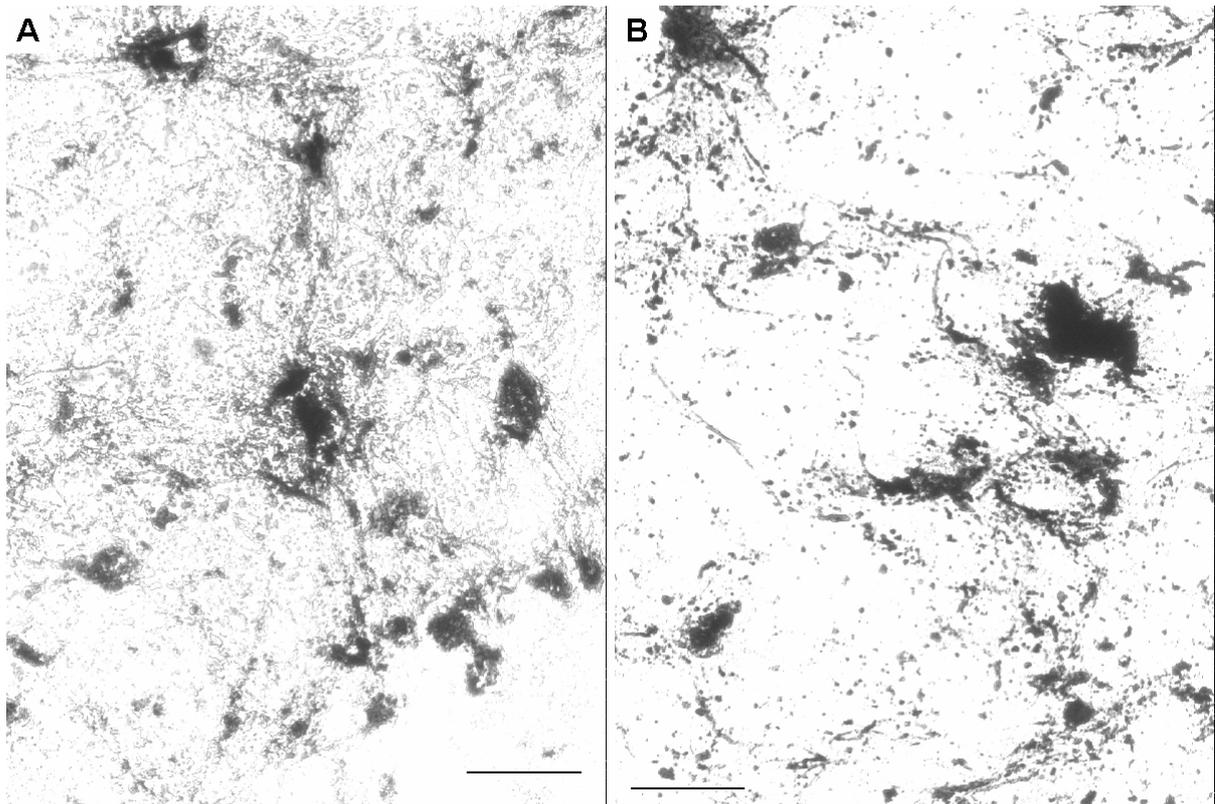


Figura 6. Efeito da dexametasona na diferenciação de MSC para a linhagem osteoblástica. As células na quarta passagem foram tratadas por 21 dias com 10^{-6} M (A) ou 10^{-8} M (B) de dexametasona. Os focos de mineralização foram identificados por coloração de Von Kossa. Microscopia de contraste de fase. Barra = 100 μ m

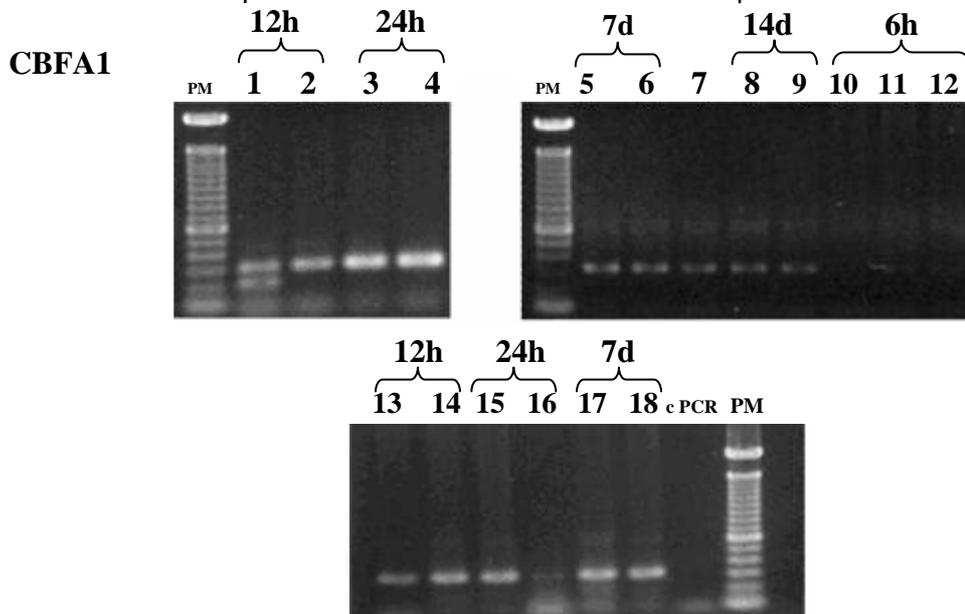


Figura 7. Expressão de mRNA de CBFA1 em MSC durante a indução osteogênica na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As MSC foram cultivadas na presença de meio osteoindutor contendo 10^{-8} M (linhas 1, 4, 5, 8, 10, 11, 13, 15 e 17) ou 10^{-6} M (linhas 2, 3, 6, 9, 12, 14, 16 e 18) de dexametasona após 12h (linhas 1-2 e 13-14), 6h (linhas 10-12), 24h (linhas 3-4 e 15-16), 7 dias (linhas 5-6 e 17-18) e 14 dias (linhas 8-9) de indução. MSC não induzidas (linha 7) foram utilizadas como controle. PM = padrão de peso molecular e cPCR = controle de reação de PCR. A figura mostra o resultado de dois experimentos independentes, com duplicata.

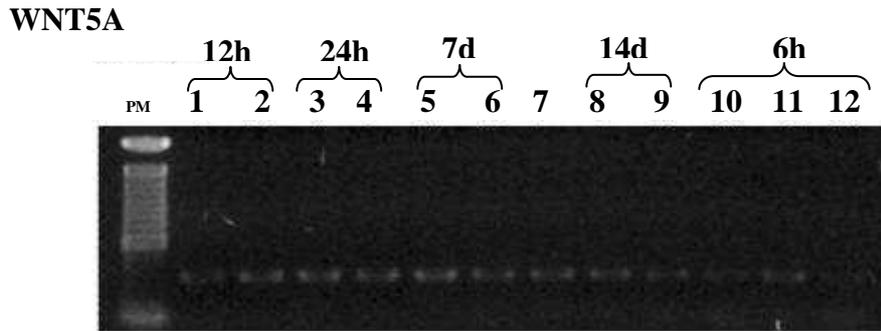


Figura 8. Expressão de mRNA de Wnt-5a em MSC durante a indução osteogênica na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As MSC foram cultivadas na presença de meio osteoindutor contendo 10^{-8} M (linhas 1, 4, 5, 8, 10 e 11) ou 10^{-6} M (linhas 2, 3, 6, 9 e 12) de dexametasona após 12h (linhas 1-2), 6h (linhas 10-12), 24h (linhas 3-4), 7 dias (linhas 5-6) e 14 dias (linhas 8-9) de indução. MSC não induzidas (linha 7) foram utilizadas como controle. PM = padrão de peso molecular. A figura mostra o resultado de um experimento representativo de dois experimentos independentes, com duplicata.

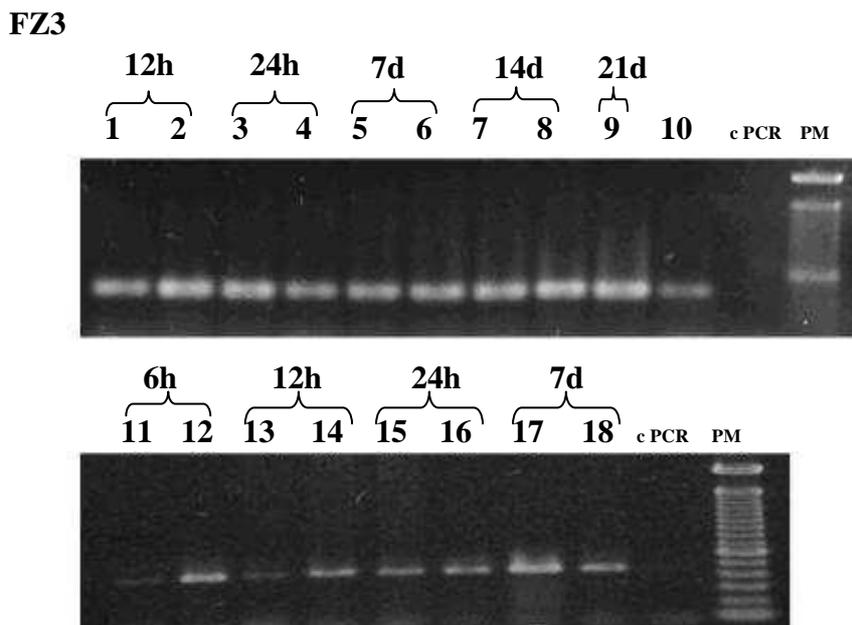


Figura 9. Expressão de mRNA de FZ3 em MSC durante a indução osteogênica na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As MSC foram cultivadas na presença de meio osteoindutor contendo 10^{-8} M (linhas 1, 4, 5, 7, 11, 13, 15 e 17) ou 10^{-6} M (linhas 2, 3, 6, 8, 9, 12, 14, 16 e 18) de dexametasona após 6h (linhas 11-12), 12h (linhas 1-2 e 13-14), 24h (linhas 3-4 e 15-16), 7 dias (linhas 5-6 e 17-18), 14 dias (linhas 7-8) e 21 dias (linha 9) de indução. MSC não induzidas (linha 10) foram utilizadas como controle. PM = padrão de peso molecular e cPCR = controle de reação de PCR. A figura mostra o resultado de dois experimentos independentes, com duplicata.

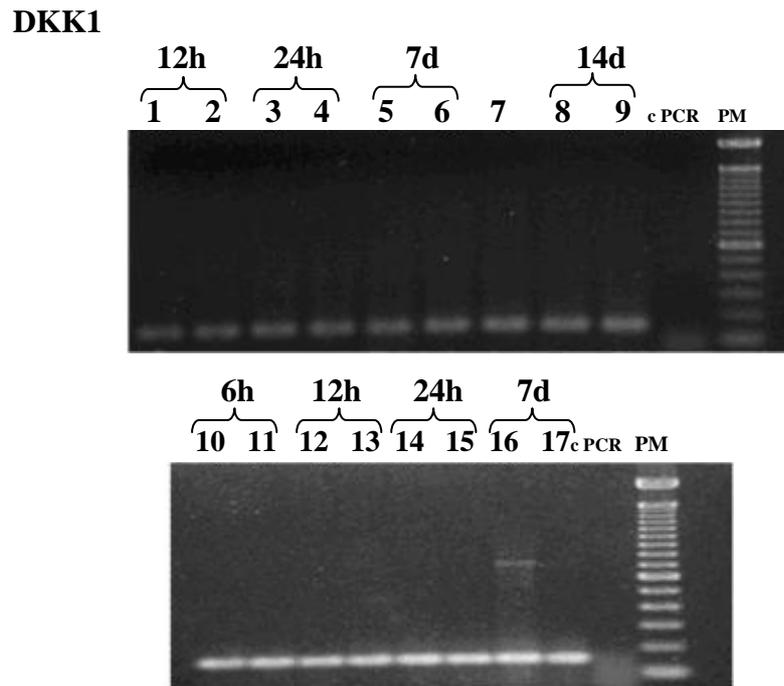
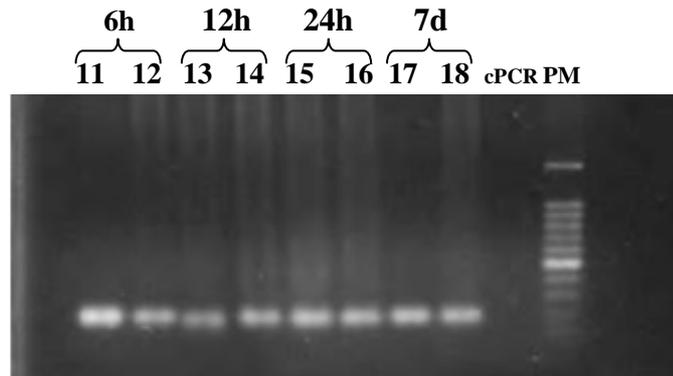
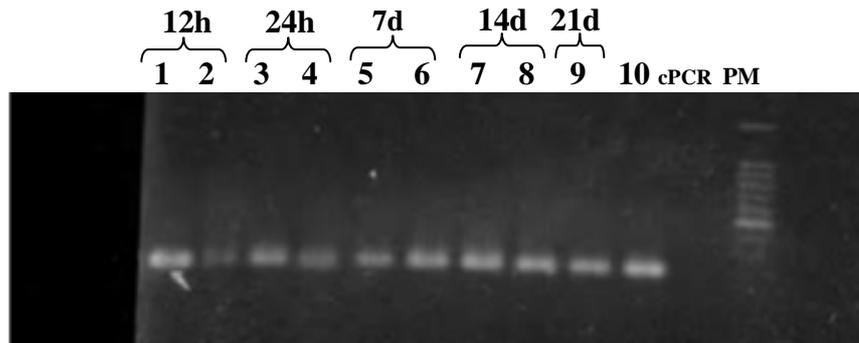


Figura 10. Expressão de mRNA de Dkk-1 em MSC durante a indução osteogênica na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As MSC foram cultivadas na presença de meio osteoindutor contendo $10^{-8}M$ (linhas 1, 4, 5, 8, 10, 12, 14 e 16) ou $10^{-6}M$ (linhas 2, 3, 6, 7, 9, 11, 13, 15 e 17) de dexametasona após 6h (linhas 10-11), 12h (linhas 1-2 e 12-13), 24h (linhas 3-4 e 14-15), 7 dias (linhas 5-6 e 16-17) e 14 dias (linhas 8-9) de indução. MSC não induzidas (linha 7) foram utilizadas como controle. PM = padrão de peso molecular e cPCR = controle de reação de PCR. A figura mostra o resultado de dois experimentos independentes, com duplicata.

sFRP1



sFRP2

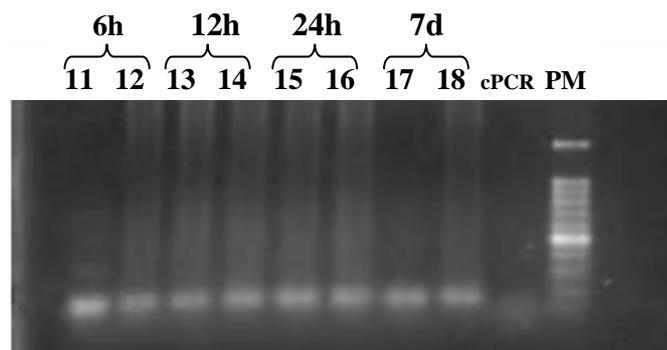
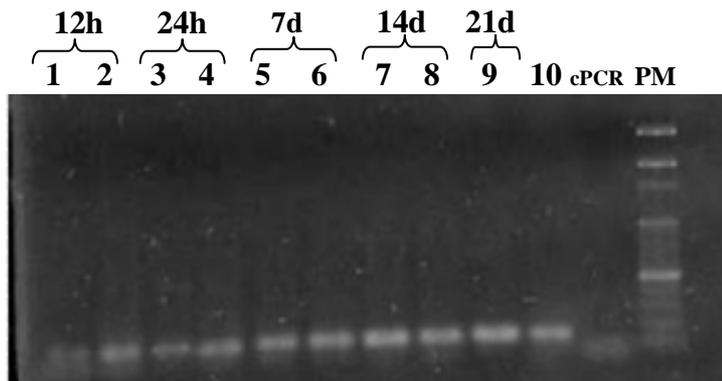


Figura 11. Expressão de mRNA de receptores solúveis sFRP-1 e de sFRP-2 em MSC durante a indução osteogênica na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As MSC foram cultivadas na presença de meio osteoindutor contendo 10^{-8} M (linhas 1, 4, 5, 7, 11, 13, 15 e 17) ou 10^{-6} M (linhas 2, 3, 6, 8, 9, 12, 14, 16 e 18) de dexametasona após 6h (linhas 11-12), 12h (linhas 1-2 e 13-14), 24h (linhas 3-4 e 15-16), 7 dias (linhas 5-6 e 17-18), 14 dias (linhas 7-8) e 21 dias (linha 9) de indução. MSC não induzidas (linha 10) foram utilizadas como controle. PM = padrão de peso molecular e cPCR = controle de reação de PCR. A figura mostra o resultado de dois experimentos independentes, com duplicata.

Estes resultados levantaram algumas hipóteses: 1) o efeito inibidor dos glicocorticóides ocorreria somente em osteoblastos; 2) a expansão *in vitro* das MSC mudaria o seu potencial de diferenciação e sua resposta aos glicocorticóides; e 3) o efeito indutor ou inibidor dos glicocorticóides sobre a diferenciação das MSC seria dependente do contato célula-célula, portanto do grau de confluência celular no momento da indução.

A fim de testar estas hipóteses, inicialmente verificou-se se a resposta ao glicocorticóide ocorreria somente em um estágio de diferenciação osteoblástica mais avançado, ou seja, na fase de pré-osteoblasto. Para tanto, as MSC foram induzidas por uma ou duas semanas com meio osteoindutor contendo 10^{-8} M de dexametasona. Posteriormente, adicionou-se meio osteoindutor com 10^{-6} M de dexametasona e as culturas foram mantidas por 21 dias, sendo a deposição de cálcio avaliada pela coloração de *Nuclear Fast Red*. Após 21 dias na presença de 10^{-6} M de dexametasona, não se observou diferença no grau de mineralização entre os dois grupos (Fig. 13), sugerindo que a resposta aos glicocorticóides, nessas condições, independe do estágio de diferenciação das MSC.

Com o intuito de verificar o efeito da expansão *in vitro* das MSC sobre a resposta a diferentes concentrações de dexametasona, MSC na segunda e na quarta passagens foram induzidas para a linhagem osteoblástica na presença de 10^{-8} M ou 10^{-6} M de dexametasona. Contudo, o grupo tratado com 10^{-6} M de dexametasona apresentou igual ou maior grau de mineralização do que o grupo tratado com 10^{-8} M (Fig. 14), consistente com os resultados anteriores. Portanto, a expansão *in vitro* das MSC até a quarta passagem não influenciou sua resposta ao tratamento com dexametasona em altas doses.

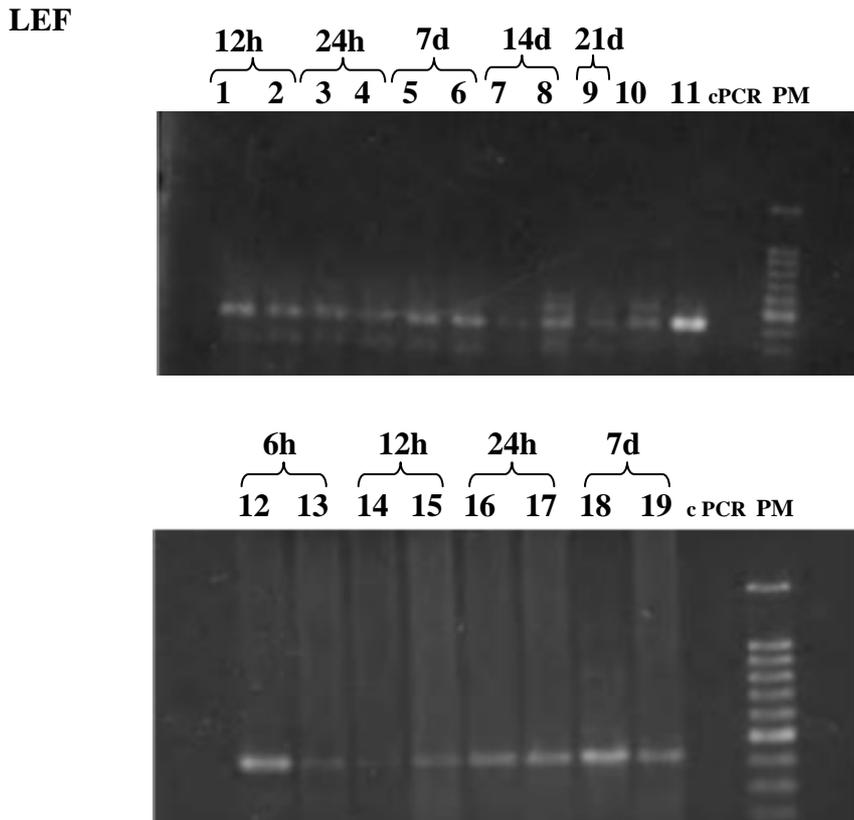


Figura 12. Expressão de mRNA de LEF em MSC durante a indução osteogênica na presença de diferentes concentrações de dexametasona. As MSC foram cultivadas na presença de meio osteoindutor contendo 10^{-8} M (linhas 1, 4, 5, 7, 12, 14, 16 e 18) ou 10^{-6} M (linhas 2, 3, 6, 8, 9, 13, 15, 17 e 19) de dexametasona após 6h (linhas 12-13), 12h (linhas 1-2 e 14-15), 24h (linhas 3-4 e 16-17), 7 dias (linhas 5-6 e 18-19), 14 dias (linhas 7-8) e 21 dias (linha 9) de indução. MSC não induzidas (linha 10) e linhagem celular Jurkat que expressa constitutivamente LEF (linha 11) foram utilizadas como controles. PM = padrão de peso molecular e cPCR = controle de reação de PCR. A figura mostra o resultado de dois experimentos independentes, com duplicata.

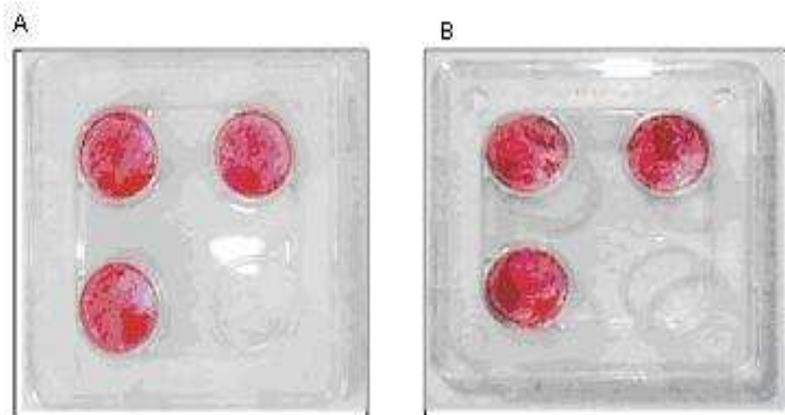


Figura 13. Efeito de doses altas de dexametasona sobre a diferenciação de MSC previamente induzidas para a linhagem osteoblástica. As MSC foram induzidas por uma (A) ou duas (B) semanas com meio osteoindutor contendo 10^{-8} M de dexametasona e, posteriormente, mantidas com 10^{-6} M de dexametasona por até 21 dias. Coloração *Nuclear Fast Red*.

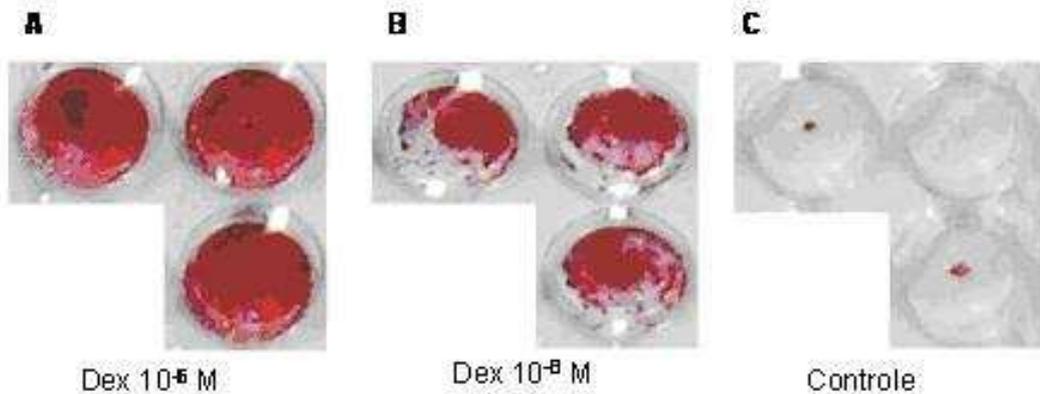


Figura 14. Efeito da dexametasona sobre a diferenciação de MSC na segunda passagem *in vitro* para a linhagem osteoblástica. As MSC expandidas até a segunda passagem *in vitro* foram induzidas para a linhagem osteoblástica na presença de 10^{-6} M (A) ou 10^{-8} M (B) de dexametasona. (C) Controle não induzido. Coloração *Nuclear Fast Red*.

Para avaliar o papel da confluência celular sobre a diferenciação das MSC para a via osteogênica, as células foram induzidas no momento em que atingiram a confluência (ou seja, três dias após o início da cultura). Assim, o meio indutor contendo 10^{-6} M ou 10^{-8} M de dexametasona foi adicionado no terceiro dia após a distribuição das MSC nas placas de cultura e estas foram mantidas por 21 dias. A mineralização foi avaliada pela coloração *Nuclear Fast Red*. Contrariamente aos resultados anteriores, observou-se inibição da diferenciação para a linhagem osteoblástica, evidenciada pela ausência de focos de mineralização (Fig. 15), das MSC tratadas com 10^{-6} M de dexametasona. Mais, verificou-se o aparecimento de células contendo vacúolos citoplasmáticos característicos de acúmulo lipídico (Fig. 16). Portanto, o grau de confluência das MSC no momento da indução tem forte influência na sua sensibilidade ao glicocorticóide e na sua diferenciação osteogênica.

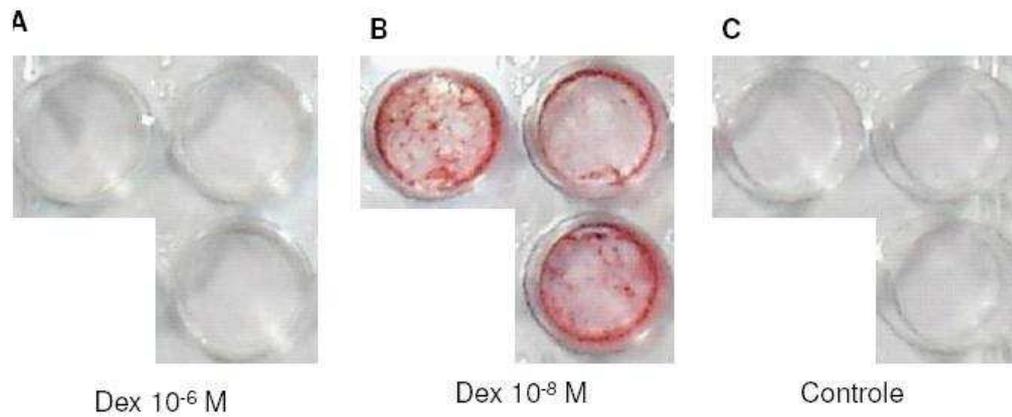


Figura 15. Influência da confluência celular na resposta a diferentes concentrações de dexametasona durante a diferenciação osteogênica de MSC de medula óssea. As MSC foram induzidas com meio osteoindutor contendo 10⁻⁶M (A) ou 10⁻⁸M (B) de dexametasona no momento da confluência e mantidas por 21 dias. (C) MSC não induzidas (controle). Coloração *Nuclear Fast Red*.

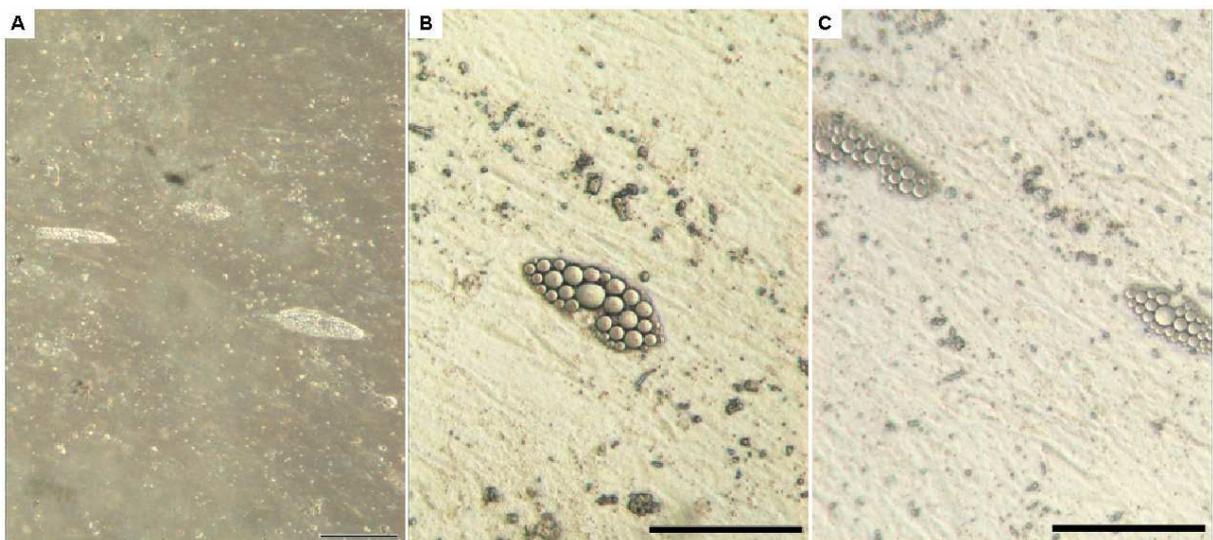


Figura 16. Concentrações elevadas de dexametasona induzem acúmulo lipídico intracitoplasmático em MSC de medula óssea. As MSC foram induzidas com meio osteoindutor contendo 10⁻⁶ M de dexametasona no momento da confluência e mantidas por 21 dias. Contraste de fase. Barra = 100 μ m.

5 DISCUSSÃO

As células-tronco são definidas como aquelas que têm capacidade de autorenovação e de originar pelo menos um tipo celular diferenciado. Os tecidos pós-natais possuem reservas de células-tronco tecido-específicas, que contribuem para sua manutenção e regeneração, tais como células-tronco epiteliais na epiderme e cristas intestinais, células-tronco neurais no sistema nervoso central e células satélites no músculo esquelético. A medula óssea adulta abriga pelo menos dois diferentes tipos de células-tronco, as hematopoiéticas e as mesenquimais. As recentes observações de que as MSC de medula óssea e de outros tecidos apresentam capacidade de se diferenciar em linhagens celulares mesodermas, ectodermas e endodermas caracterizam as MSC como células pluripotentes e desperta enorme interesse pela possibilidade de aplicação em protocolos de terapia celular (BAPTISTA et al., 2007; SILVA-MEIRELLES et al., 2006). No entanto, pouco se sabe sobre a biologia destas células na medula óssea. Acredita-se que elas sejam responsáveis pela manutenção da população celular não hematopoiética que constitui o estroma da MO, incluindo osteoblastos e células acumuladoras de gordura (GREGORY et al., 2005a; PROCKOP, 1997). Neste contexto, a manutenção do tecido ósseo dependeria de proliferação e diferenciação das MSC da MO para a linhagem osteogênica e, como os mecanismos envolvidos na determinação destas células para esta linhagem ainda não foram esclarecidos, é possível que a redução da massa óssea, como a observada na osteoporose, esteja relacionada a alterações destes fatores.

O tratamento de longa duração com glicocorticóides está frequentemente associado ao desenvolvimento de osteoporose devido principalmente a uma diminuição da função osteoblástica e da formação óssea (EBELING et al., 1999; LANNA et al., 2003; MAZZIOTTI et al., 2006). Curiosamente, *in vitro*, os glicocorticóides, como a dexametasona, são necessários para a indução de mineralização, mas as concentrações que apresentam efeito estimulador máximo (entre 10^{-7} M e 10^{-8} M) parecem ser similares aos níveis circulantes deste hormônio em mamíferos (PURPURA et al., 2004) e a ocorrência de osteoporose em pacientes com síndrome de Cushing (MAZZIOTTI et al., 2006), parece reforçar a idéia de que concentrações elevadas deste hormônio levam a uma inibição da atividade osteoblástica. De fato, o tratamento da linhagem osteoblástica MC3T3-E1 com doses mais elevadas (10^{-6} M) de dexametasona foi capaz de inibir a diferenciação terminal destas células (LECLERC et al., 2004). Este efeito inibidor tem sido atribuído, dentre outros mecanismos, à inibição da via canônica de Wnt por aumento da produção de DKK-1 (OHNAKA et al., 2005) ou por estimulação de HDAC1, que é um co-repressor de *LEF/TCF* (SMITH & FRENKEL, 2005).

A ativação da via de Wnt parece ser fundamental na determinação do destino das MSC de MO para a diferenciação osteogênica ou adipogênica (BARON & RAWADI, 2007; DE BOER et al., 2004; NUTTALL & GIMBLE, 2004), no entanto, não está claro se, nestas células, glicocorticóides em altas doses teriam também um efeito inibitório sobre a via de Wnt, com conseqüente redução da diferenciação para a linhagem osteoblástica, o que poderia resultar em alterações clínicas da massa óssea. Uma evidência nesse sentido é a elevação dos níveis de sFRP1 (proteína inibidora da via de Wnt) que se segue ao tratamento com glicocorticóide em alta concentração (10^{-6} M e 10^{-5} M) nas células mesenquimais do estroma de MO de

ratos, com conseqüente redução dos processos osteogênicos nestas células (WANG et al., 2005).

Verificamos inicialmente que as MSC isoladas de MO humana expressam constitutivamente *CBFA1*, sugerindo que, *in vitro*, estas células possam se diferenciar preferencialmente para a linhagem osteogênica, em acordo com observações anteriores, onde verificou-se que a maioria dos clones de MSC de MO humana tem potencial osteogênico (MURAGLIA et al., 2000). Além disto, verificamos ainda, que, na fase de confluência, as MSC expressam mRNA de diversos membros da via de Wnt, como descrito anteriormente (ETHERIDGE et al., 2004), sendo que a expressão de TCF/LEF sugere que esta via esteja ativada.

Embora não possa ser descartada a ocorrência de alterações quantitativas na expressão destes genes, não foram observadas diferenças consistentes durante a indução para a linhagem osteogênica na presença das diferentes concentrações de glicocorticóides utilizadas neste trabalho, apesar de algumas bandas como, por exemplo, de *CBFA1* (Fig. 7, linhas 10-12) e de *FZ3* (Fig. 9, linhas 11 e 13) em células tratadas por 6h com 10^{-8} M de dexametasona sugerirem uma menor expressão gênica. No entanto, isto não foi confirmado por análises semi-quantitativas. No presente trabalho, a avaliação da expressão de mRNA de membros da via de Wnt e fatores osteogênicos foi realizada por RT-PCR com o objetivo de verificar, inicialmente, se as células mesenquimais isoladas da MO de doadores brasileiros apresentavam o padrão de expressão descrito anteriormente (ETHERIDGE et al., 2004), o que foi confirmado. Assim, análises quantitativas (qPCR, PCR quantitativo ou em tempo real) devem ser desenvolvidas em seguida para verificar a ocorrência de modulação na expressão destes genes, nas diferentes condições estudadas. No entanto, os resultados obtidos estão em acordo com a

observação de que em ambas as concentrações (10^{-8} M e 10^{-6} M) verificou-se deposição de cálcio na monocamada após 21 dias. Portanto, a inibição induzida por dexametasona seria dependente ou do grau de expansão celular, ou de diferenciação das MSC, ou seja, ocorreria somente em células já comprometidas e mais diferenciadas para a linhagem osteogênica, ou, ainda, do grau de confluência celular, como tem sido sugerido (PURPURA et al., 2004). Tanto a primeira, quanto a segunda hipótese foram descartadas pelos resultados dos nossos experimentos com as MSC expandidas até a segunda ou quarta passagens e com as MSC pré-induzidas para a linhagem osteogênica (Fig. 6, 13 e 14), em que se observou mineralização, sem diferenças significativas entre os grupos.

Em 2004, Purpura et al. observaram que o efeito de dexametasona, na concentração de 10^{-8} M, sobre a expansão e diferenciação de osteoblastos isolados de calvária de ratos era dependente da densidade celular, com o maior efeito sendo observado quando as células foram cultivadas em alta densidade.

Já, Leclerc et al. (2004) verificaram que o tratamento da linhagem osteoblástica MC3T3-E1 com dexametasona na concentração de 10^{-6} M somente inibia a diferenciação osteogênica, quando esta administração iniciava-se no momento em que as células atingiam a confluência. Segundo o autor, o efeito inibitório máximo da dexametasona na concentração de 10^{-6} M sobre a diferenciação de osteoblastos somente ocorre neste curto período de tempo, sendo que o tratamento prévio ou posterior à confluência não exerce efeito inibitório na diferenciação.

Ratificando essa observação, segundo Smith e Frenkel (2005), para que ocorra o efeito inibitório dos glicocorticóides, o tratamento com dexametasona deve começar no exato dia em que as células atingem a confluência. Isto porque, neste

estágio, as células entram no último ciclo celular da fase proliferativa, que antecede o início da diferenciação. Dessa forma, as células somente são responsivas ao tratamento com glicocorticóides neste curto intervalo de tempo. Passando-se este estágio, as células disparam as cascatas de sinalização que medeiam o processo de diferenciação, tornando-se resistentes ao tratamento com glicocorticóides. Em outras palavras, após terem iniciado o processo de diferenciação, altas concentrações de dexametasona não são mais capazes de inibir a diferenciação, passando, ao contrário, a estimular o processo.

Tal fato é consistente com os resultados obtidos até o momento em nossos experimentos, já que observou-se que a dexametasona na concentração de 10^{-6} M inibiu a diferenciação das MSC para a linhagem osteogênica somente quando administrada no momento da confluência. Além disto, embora não tenha sido realizada uma quantificação dos focos de mineralização, os resultados sugerem que o processo é estimulado pela maior dose de dexametasona, resultando em um grau de mineralização maior, quando a indução osteogênica é iniciada após a confluência.

Assim, parece que a confluência celular é o fator primordial para a resposta das MSC aos glicocorticóides, não estando claro como isto ocorre.

Curiosamente, foi demonstrado que a expressão de inibidores da via de Wnt, como DKK-1, (GREGORY et al., 2005b), bem como outras moléculas de sinalização desta via (ETHERIDGE et al., 2004), são moduladas durante a expansão *in vitro* destas células. Em acordo com Smith e Frenkel (2005), que propuseram que a diferenciação se inicia após o último ciclo celular, foi observado que durante a fase de expansão as MSC de MO humana secretam DKK-1, que inibe a via canônica de Wnt. Uma vez entrando na fase estacionária, há diminuição da síntese deste inibidor

da via de Wnt e ativação da diferenciação osteogênica (GREGORY et al., 2005a; GREGORY et al., 2005b). Portanto, parece haver modulação dependente da densidade celular e, provavelmente, de contato célula-célula, da via de Wnt em células mesenquimais de MO. Ao nível de expressão gênica, esta modulação pode ser sutil e, portanto, somente detectável com análises quantitativas. Além disto, neste trabalho as análises moleculares foram realizadas em células cuja indução foi iniciada após a confluência.

As interações célula-célula e célula-matriz são eventos-chave na embriogênese e diferenciação dos tecidos e são mediadas por uma variedade de moléculas de adesão celular. As caderinas são proteínas integrais de membrana com um grande domínio extracelular que fornece uma adesão célula-célula homofílica cálcio-dependente, um único domínio transmembrana, e uma pequena cauda intracelular ligada à actina do citoesqueleto através de interações com outras proteínas, as cateninas, incluindo β -catenina. As caderinas fornecem sinais de reconhecimento que são importantes para a distribuição e agregação celular durante o desenvolvimento dos tecidos. Atualmente, mais de uma dúzia de caderinas já foram identificadas, todas elas produtos de diferentes genes (SHIN et al., 2000).

Em adição ao seu papel estrutural nas junções aderentes, existem evidências de que as caderinas podem também modular a sinalização intracelular através de sua associação citoplasmática com a β -catenina, podendo interferir com a via de Wnt (CASTRO et al., 2004; NELSON & NUSSE, 2004). Essa modulação da β -catenina pela caderina é complexa. Por um lado, as β -cateninas ligadas às caderinas não são destruídas pelo complexo GSk3 β e podem representar um “pool” disponível para translocação nuclear, assim favorecendo a sinalização de Wnt. Por

outro lado, enquanto ligadas às caderinas na superfície celular não podem ser translocadas para o núcleo antagonizando, assim, a via canônica de Wnt.

Portanto, a β -catenina exerce um papel central no destino celular, tanto devido a sua participação nas junções aderentes, quanto pela sua habilidade em ativar diretamente a transcrição de genes-alvo específicos tais como MYC, ciclina D1, JUN e PPAR δ . O fator crítico nesta via parece ser a regulação da estabilidade e da disponibilidade de β -catenina no citoplasma. (CASTRO et al., 2004; NELSON & NUSSE, 2004).

Existem evidências, em diversos sistemas, de interação entre caderinas e a via de Wnt, devido a função mutuamente exclusiva de β -catenina na sinalização após ativação de Wnt e estrutural, através da ligação da porção intracitoplasmática de caderinas ao citoesqueleto. Por exemplo, o aumento na formação de junções aderentes mediadas por N-caderina, com conseqüente redução da translocação de β -catenina para o núcleo, resultou em aumento da miogênese evidenciada pela expressão de miogenina e formação de miotubos (GOICHBURG et al., 2001). O aumento da expressão de E-caderina em células epiteliais tumorais foi capaz de reverter o fenótipo maligno por inibição da sinalização de Wnt, sendo curioso que este fenômeno era independente da formação de junções celulares, mas dependia da ligação com a porção citosólica da E-caderina, uma vez que moléculas com deleção da porção extracelular eram efetivas, mas não aquelas com deleção da porção intracelular (GOTTARDI et al., 2001). Foi ainda, recentemente demonstrado, que N-caderina bloqueia a migração de células da crista neural por inibição da via canônica de Wnt e da sinalização via β -catenina. Assim, o efeito estimulador de BMP-4 na migração destas células se deveu à indução de clivagem de N-caderina

pela metaloproteinase com domínio desintegrina, ADAM-10, e conseqüente ativação da sinalização dependente de β -catenina (SHOVAL et al., 2007).

Estas observações sugerem que a expressão diferencial de caderina possa ter influência na diferenciação de células mesenquimais via formação de junções celulares e modulação da via de Wnt.

De fato, já em 1994, Tsonis et al., ao investigarem a diferenciação espontânea para a linhagem condrogênica quando células mesenquimais de embrião de galinha são cultivadas em alta densidade, observaram que a expressão de N-caderina variava durante a diferenciação, sendo expressa no início e desaparecendo mais tardiamente. Mais recentemente, tem-se verificado que a expressão das diversas caderinas se modifica durante a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas de camundongo para as linhagens osteogênica, adipogênica e miogênica. Por exemplo, a expressão de caderina-11 e N-caderina está aumentada durante a diferenciação osteogênica e miogênica, mas uma inibição consistente de todas as caderinas estudadas foi observada durante a adipogênese (SHIN et al., 2000). Em 2004, Kii et al. demonstraram que a interação célula-célula mediada pela caderina-11 regula diretamente a diferenciação de células mesenquimais para as linhagens osteogênica e condrogênica. Os autores transfectaram células-tronco embrionárias (ES, *embryonic stem cells*) com caderina-11 e verificaram que os teratomas gerados por estas células apresentavam predominantemente tecido ósseo e cartilaginoso, sugerindo que esta molécula de adesão estivesse diretamente envolvida na diferenciação de células mesenquimais para estes tecidos. Além disto, ao transfectarem diferentes linhagens celulares com caderina 11 ou N-caderina, os pesquisadores observaram que cada uma destas moléculas era responsável por uma organização tridimensional específica e que a

co-expressão destas moléculas era capaz de induzir a expressão de fosfatase alcalina e FGFR2 (receptor 2 do fator de crescimento de fibroblasto, *fibroblast growth factor receptor 2*), regulando a diferenciação destas células para as linhagens osteogênica e condrogênica. Além disso, a transfecção de uma forma dominante negativa de N-caderina associada a um promotor expresso especificamente em osteoblastos acarretou uma redução da massa óssea (CASTRO et al., 2004), reforçando a idéia de que as caderinas têm papel fundamental na diferenciação osteocondrogênica.

Curiosamente, a distribuição de caderinas na membrana plasmática de células da linhagem osteoblástica apresenta características próprias, dependendo do estado de confluência. Nas culturas subconfluentes, a expressão de caderinas era restrita a áreas de contato entre membranas de células vizinhas e esta expressão não era afetada pela adição de hormônios osteogênicos (vitamina D3 e triiodotironina). Já nas culturas confluentes, a expressão era observada não somente nas margens das células, mas também em regiões onde havia sobreposição celular, com aparentemente co-localização de diversos tipos de caderinas. Esta expressão era drasticamente modificada pela adição dos hormônios osteogênicos, havendo o aparecimento de grandes agrupamentos celulares caderina-negativos (LUEGMAYR et al., 2000).

Deve ser lembrado que a diferenciação condrogênica, induzida por BMP-2, de células mesenquimais mantidas em alta densidade está associada a uma diminuição significativa da β -catenina associada à membrana e redução da adesão célula-célula (ZHANG & SCOTT, 2004), o que está em acordo com a hipótese de que a diferenciação osteoblástica mediada por BMP-2 seja dependente da ativação da sinalização de β -catenina (BAIN et al., 2003; CHEN et al., 2007; HARTMANN, 2006;

RAWADI et al., 2003). Além disso, ao menos em células da crista neural, a ativação da via de Wnt, induzida por BMP-4, envolve a clivagem enzimática da porção extracelular de N-caderina (SHOVAL et al., 2007).

Portanto, é de se supor que os glicocorticóides, comumente utilizados no meio osteoindutor, modifiquem a expressão de caderinas, por exemplo, por clivagem via aumento da expressão de metaloproteinases (LECLERC et al., 2004).

A literatura sobre o papel de glicocorticóides na regulação da expressão de caderinas é escassa e controvérsias são patentes, possivelmente, relacionadas aos diferentes tipos de tecido estudados. Em células mesenquimais, poucos relatos investigando o efeito de glicocorticóides sobre a expressão de caderinas existem (LECANDA et al., 2000; LIU et al., 2005).

O repertório e a modulação da expressão de caderinas por ação de glicocorticóides em osteoblastos trabeculares e células de estroma de MO de humanos foi investigado por Lecanda et al. (2000), tendo sido observado que a expressão de mRNA das principais caderinas osteoblásticas, N-caderina e caderina 11, é inibida por dexametasona na concentração de 10^{-7} M. O mesmo foi descrito por Liu et al. (2005), que observaram, confirmando estes resultados e anteriores, que dexametasona e vitamina D inibem a expressão de diversas caderinas na membrana de osteoblastos e células de estroma de MO, enquanto TGF- β e FGF aumentam essa expressão.

Em conjunto, estes resultados levantam a hipótese de que a expressão de caderinas seja modulada diferentemente durante a diferenciação celular em função do estado de confluência das culturas, com conseqüente modulação da ativação da via de Wnt. Ou seja, a abundante formação de junções celulares, mediadas por caderinas, que se estabelece nas culturas confluentes, seria responsável pela

manutenção de um pool de β -catenina indisponível para degradação. Neste cenário, a adição de doses maiores de dexametasona, induziria uma grande redução da expressão de caderinas e, conseqüentemente, disponibilizaria β -catenina para translocação nuclear, potencializando a ativação da via de Wnt. *In vivo*, a condensação do mesênquima, que precede a diferenciação osteocondrogênica, poderia estar associada a um aumento da expressão de caderinas com posterior modulação negativa destas, liberação de β -catenina, ou seja, ativação da sinalização canônica de Wnt. Portanto, a regulação temporal da expressão de caderina e ativação da via de Wnt seria crucial na diferenciação osteogênica e antecipar a regulação negativa da expressão de caderina com liberação de β -catenina na presença de níveis elevados de inibidores da via de Wnt, como DKK-1, poderia levar a degradação da β -catenina disponível, com conseqüente bloqueio da sinalização e da diferenciação celular.

O conhecimento acerca da integração de diferentes vias de sinalização em uma rede compreensiva que leve a um melhor entendimento clínico de suas funções coletivas e interações na osteogênese, é um desafio futuro. Muitas são as evidências da plasticidade entre as células fibroblastóides, adipocíticas e osteogênicas, que possuem um precursor mesenquimal comum na medula óssea adulta. Portanto, muito poderia ser aprendido acerca das desordens ósseas considerando a adipogênese e osteogênese como eventos interdependentes (BERESFORD et al., 1992).

Podemos concluir que a resposta das MSC de MO humana a diferentes concentrações de glicocorticóides, durante a diferenciação osteogênica, é dependente do grau de confluência, ou seja, do contato célula-célula. No entanto, como isto se estabelece ainda não está claro. Portanto, como perspectiva, pretende-

se investigar a ocorrência de diferenças na modulação da expressão de caderinas nas culturas confluentes e subconfluentes de MSC de MO durante a indução osteogênica e se estas diferenças afetam o grau de ativação da via de Wnt.

6 CONCLUSÕES

- As células mesenquimais do estroma da medula óssea humana são capazes de se diferenciar na linhagem osteogênica *in vitro*, na presença de meio osteoindutor, mesmo após expansão até a quarta passagem.
- As células mesenquimais do estroma da medula óssea humana expressam constitutivamente genes de diferenciação osteogênica (*CBFA1*) e diversos membros da via de Wnt (*WNT5A*, *FZ3*, *DKK1*, *sFRP1*, *sFRP2* e *LEF*) e sua expressão não foi modificada qualitativamente durante a diferenciação osteogênica.
- A resposta das células mesenquimais do estroma de medula óssea humana a diferentes concentrações de glicocorticóide durante a diferenciação osteogênica parece depender da densidade celular no momento da indução.

REFERÊNCIAS

1. AUSTIN, T.W.; SOLAR, G.P.; ZIAGLER, F.C.; LIEM, L.; MATTHEWS, W. A role for the wnt gene family in hematopoiesis: expansion of multilineage progenitor cells. **Blood**, v. 89, p. 3624-3635, 1997.
2. BAIN, G.; MULLER, T.; WANG, X.; PAPKOFF, J. Activated β -catenin induces osteoblast differentiation of C3H10T1/2 cells and participates in BMP2 mediated signal transduction. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 301, p. 84-91, 2003.
3. BAKER, K.S.; GURNEY, J.G.; NESS, K.K.; BHATIA, R.; FORMAN, S.J.; FRANCISCO, L.; MCGLAVE, P.B.; ROBISON, L.L; SNYDER, D.S.; WEISDORF, D.J.; BHATIA, S. Late effects in survivors of chronic myeloid leukemia treated with hematopoietic cell transplantation: results from the Bone Marrow Transplant Survivor Study. **Blood**, v. 104, p. 1898-1906, 2004.
4. BALDUINO, A.; HURTADO, S.P.; FRAZÃO P.; TAKIA, C.M.; ALVES, L.M.; NASCIUTTI, L-E.; EL-CHEIKH, M.C.; BOROJEVIC, R. Bone marrow subendosteal microenvironment harbours functionally distinct haemosupportive stromal cell populations. **Cell Tissue Res.**, v. 319, p. 255–266, 2005.
5. BAPTISTA, L.S.; PEDROSA, C.S.G.; SILVA, K.R.; OTAZÚ, I.B.; TAKIYA, C.M.; DUTRA, H.S.; CLÁUDIO-DA-SILVA, C.; BOROJEVIC, R.; ROSSI, M.I.D. Bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: How close are they? **J. Stem Cells**, v. 2, 2007. In press.
6. BARON, R.; RAWADI, G. Minireview: Targeting the Wnt/ β -catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton. **Endocrinology**, v. 148, p. 2635-2643, 2007.
7. BECK Jr, G.R. Inorganic Phosphate as a signaling molecule in osteoblast differentiation. **J. Cell Biochem.**, v. 90, p. 234-243, 2003.
8. BENNET, C. N.; LONGO, K.A.; WRIGHT, W.S.; SUVA, L.J.; LANE, T.F.; HANKENSON, K.D.; MacDOUGALD, O.A. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 102, n.9, p. 3324-3329, 2005.
9. BERESFORD, J.N.; BENNETT, J.H.; DEVLIN, C.; LEBOY, P.S.; OWEN, M.E. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. **J. Cell Sci.**, v. 102, p. 341-351, 1992.
10. BIANCO, P.; COSSU, G. Uno, nessuno e centomila: searching for the identity of mesodermal progenitors. **Exp. Cell Res.**, v. 251, p. 257-263, 1999.
11. BIANCO, P.; RIMINUCCI, M.; GRONTHOS, S.; ROBEY, P.G. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. **Stem Cells**, v. 19, p.180-192, 2001.

12. BIANCO, P.; ROBEY, P.G. Marrow stromal stem cells. **J. Clin. Invest.**, v. 105, n. 12, p. 1663-1668, 2000.
13. BODINE, P.V.N.; KOMM, B.S. Wnt signaling and osteoblastogenesis. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, 2006.
14. BONAB, M.M.; ALIMOGHADDAM, K.; TALEBIAN, F.; GHAFFARI, S.H.; GHAVAMZADEH, A.; NIKBIN, B. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro*. **BMC Cell Biol.**, v. 7, n.14, 2006. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-2121/7/14>. Acesso em: 08 maio 2007.
15. BUCKINGHAM, J.C. Glucocorticoids: exemplars of multi-tasking. **Br. J. Pharmacol.**, v. 147, p. 258-268, 2006.
16. CALVI, L.M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, v. 425, n. 23, p. 841-846, 2003.
17. CASTRO, C.H.M.; SHIN, C.S.; STAINS, J.P.; CHENG, S.; SHEIKH, S.; MBALAVIELE, G.; SZEJNFELD, V.L.; CIVITELLI, R. Targeted expression of a dominant-negative N-cadherin *in vivo* delays peak bone mass and increases adipogenesis. **J. Cell Sci.**, v. 117, p. 2853-2864, 2004.
18. CHARBORD, P.; TAVIAN, M.; HUMEAU, L.; PÉAULT, B. Early ontogeny of the human marrow from long bones: an immunohistochemical study of hematopoiesis and its microenvironment. **Blood**, v. 87, n.10, p. 4109-4119, 1996.
19. CHEN, Y.; WHETSTONE, H.C.; YOUN, A.; NADESAN, P.; CHOW, E.C.; LIN, A.C.; ALMAN, B.A. Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 526-533, 2007.
20. CHENG, S.; YANG, J.W.; RIFAS, L.; ZHANG, S.; AVIOLI, L.V. Differentiation of human bone marrow osteogenic stromal cells *in vitro*: induction of the osteoblast phenotype by dexamethasone. **Endocrinology**, v. 134, n.1, p. 277-286, 1994.
21. DE BOER, J.; WANG, H.J.; VAN BLITTERSWIJK, C. Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells. **Tissue Eng.** v. 10, p. 393-401, 2004.
22. DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; KRAUSE, D.S.; DEANS, R.J.; KEATING, A.; PROCKOP, D.J.; HORWITZ, E.M. THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.
23. EBELING, P.R.; THOMAS, D.M.; ERBAS, B.; HOPPER, J.L.; SZER, J.; GRIGG, A.P. Mechanisms of bone loss following allogeneic and autologous hemopoietic stem cell transplantation. **J. Bone Miner. Res.**, v.14, n.3, p. 342-350, 1999.

24. ETHERIDGE, S.L.; SPENCER, G.J.; HEATH, D.J.; GENEVER, P.G. Expression profiling and functional analysis of Wnt signaling mechanisms in mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 22, p. 849-860, 2004.
25. GAUR, T. et al. Canonical Wnt signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n.39, p. 33132-33140, 2005.
26. GOICHBERG, P.; SHTUTMAN, M.; BEN-ZE'EV, A.; GEIGER, B. Recruitment of β -catenin to cadherin-mediated intercellular adhesions is involved in myogenic induction. **J. Cell Sci.**, v. 114, p. 1309-1319, 2001.
27. GOTTARDI, C.J.; WONG, E.; GUMBINER, B.M. E-cadherin suppresses cellular transformation by inhibiting beta-catenin signaling in an adhesion-independent manner. **J. Cell Biol.**, v. 153, p. 1049-1060, 2001.
28. GREGORY, C.A.; GUNN, W.; REYES, E.; SMOLARZ, A.J.; MUNOZ, J.; SPEES, J.L.; PROCKOP, J. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1049, p. 97-106, 2005a.
29. GREGORY, C.A.; YLOSTALO, J.; PROCKOP, D.J. Adult bone marrow stem/progenitor cells (MSCs) are preconditioned by microenvironmental "niches" in culture: a two-stage hypothesis for regulation of MSC fate. **Science's Stake**, vol. 294, p. 1-4, 2005b.
30. GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A.C.W.; HAY, S.J.; SHI, S.; GRAVES, S.E.; KORTESIDIS, A.; SIMMONS, P.J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **J. Cell Sci.**, v. 116, p. 1827-1835, 2003.
31. HARTMANN, C. A. Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. **Trends Cell Biol.**, v. 16, n. 3, p. 151-158, 2006.
32. HOFBAUER, L.C.; GORI, F.; RIGGS, B.L.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; SPELSBERG, T.C.; KHOSLA, S. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. **Endocrinology**, v. 140, n.10, p. 4382-4389, 1999.
33. HORWITZ, E.; LE BLANC, K.; DOMINICI, I.; MUELLER, I.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.C.; DEANS, R.J.; KRAUSE, D.S.; KEATING, A. THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR CELLULAR THERAPY. Clarification of the nomenclature for MSC: the International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 7. p. 393-395, 2005.
34. JACENKO, O.; ROBERTS, D.W.; CAMPBELL, M.R.; McMANUS, P.M.; GRESS, C.J.; TAO, Z. Linking hematopoiesis to endochondral skeletogenesis through analysis of mice transgenic for collagen X. **Am. J. Pathol.**, v.160, p. 2019-2034, 2002.

35. JACOBSEN, K.; OSMOND, D.G. Microenvironment organization and stromal cell associations of B lymphocyte precursor cells in mouse bone marrow. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, p. 2395-2404, 1990.
36. KASSEM, M.; KRISTIANSEN, M.; ABDALLAH, B.M. Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. **Pharmacology & Toxicology**, v.95, p. 209-214, 2004.
37. KII, I.; AMIZUKA, N.; SHIMOMURA, J.; SAGA, Y.; KUDO, A. Cell-cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of osteo-lineage and chondro-lineage. **J. Bone Miner. Res.**, v. 19, n. 11, p. 1840-1849, 2004.
38. KIM, H.; ZHAO, H.; KITaura, H.; BHATTACHARYYA, S.; BREWER, J.A.; MUGLIA, L.J.; ROSS, F.P.; TEITELBAUM, S.L. Glucocorticoids suppress bone formation via the osteoclast. **J. Clin Invest.**, v. 116, n. 8, p. 2152-2160, 2006.
39. LANNA, C.M.M.; MONTENEGRO JR., R.M.; PAULA, F.J.A. Fisiopatologia da osteoporose induzida por glicocorticóide. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 47, n. 1, p. 9-18, 2003.
40. LE BLANC, K.; RINGDÉN, O. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. **Curr. Opin. Immunol.**, v.18, p.586-591, 2006.
41. LECANDA, F.; CHENG, S.; SHIN, C.S.; DAVIDSON, M.K.; WARLOW, P.; AVIOLI, L.V.; CIVITELLI. Differential regulation of cadherins by dexamethasone in human osteoblastic cells. **J. Cell Biochem.**, v. 77, p. 499-506, 2000.
42. LECLERC, N.; LUPPEN, C.A.; HO, V.V.; NAGPAL, S.; HACIA, J.G.; SMITH, E.; FRENKEL, B. Gene expression profiling of glucocorticoid-inhibited osteoblasts. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 33, p. 175-193, 2004.
43. LI, X. et al. Dkk2 has a role in terminal osteoblast differentiation and mineralized matrix formation. **Nat. Genet.**, v. 37, n. 9, p. 945-952, 2005a.
44. LI, X.; JIN, L.; CUI, Q.; WANG, G.; BALIAN, G. Steroid effects on osteogenesis through mesenchymal cell gene expression. **Osteoporos. Int.**, v. 16, p. 101-108, 2005b.
45. LIU, P.; LIN, J.; ZHANG, B. Differential regulation of cadherin expression by osteotropic hormones and growth factors *in vitro* in human osteoprogenitor cells. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 26, n. 6, p. 705-713, 2005.
46. LUEGMAYR, E.; GLANTSCHNIG, H.; VARGA, F.; KLAUSHOFER, K. The organization of adherens junctions in mouse osteoblast-like cells (MC3T3-E1) and their modulation by triiodothyronine and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **Histochem. Cell Biol.**, v. 113, p. 467-478, 2000.

47. LUO, Q. et al. Connective Tissue Growth Factor (CTGF) is regulated by Wnt and Bone Morphogenetic Proteins Signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n.53, p. 55958-55968, 2004.
48. MANKANI, M.H.; KUZNETSOV, S.A.; FOWLER, B.; KINGMAN, A.; ROBEY, P.G. *In vivo* bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 72, n.1, p. 96-107, 2001.
49. MAZZIOTTI, G.; ANGELI, A.; BILEZIKIAN, J.P.; CANALIS, E.; GIUSTINA, A. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update. **Trends Endocrinol. Metab.**, v. 17, n. 4, p. 144-149, 2006.
50. MINGUELL, J.J.; ERICES, A.; CONGET, P. Mesenchymal stem cells. **Exp. Biol. Med.**, v. 226, n.6, p. 507-520, 2001.
51. MOON, R.T.; KOHN, A.D.; DE FERRARI, G.V.; KAYKAS, A. Wnt and β -catenin signaling: diseases and therapies. **Nat. Rev. Genet.**, v. 5, p. 689-698, 2004.
52. MUGURUMA, Y.; YAHATA, T.; MIYATAKE, H.; SATO, T.; UNO, T.; ITOH, J.; KATO, S.; ITO, M.; HOTTA, T.; ANDO, K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. **Blood**, V. 107, p. 1878-1887, 2006.
53. MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate *in vitro* according to a hierarchical model. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 1161-166, 2000.
54. MURDOCH, B.; CHADWICK, K.; MARTIN, M.; SHOJAEI, F.; SHAH, K.V.; GALLACHER, L.; MOON, R.T.; BHATIA, M. Wnt-5a augments repopulating capacity and primitive hematopoietic development of human blood stem cells *in vivo*. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 100, p. 3422-3427, 2003.
55. NELSON, W.J.; NUSSE, R. Convergence of Wnt, β -catenin and cadherin pathways. **Science**, v. 303, p. 1483-1487, 2004.
56. NILSSON, S.K.; DEBATIS, M.E.; DOONER, M.S.; MADRI, J.A.; QUESENBERRY, P.J.; BECKER, P.S. Immunofluorescence characterization of key extracellular matrix proteins in murine bone marrow *in situ*. **J. Histochem. Cytochem.**, v. 46, p. 371-377, 1998.
57. NILSSON, S.K.; JOHNSTON, H.M.; COVERDALE, J.A. Spatial localization of transplanted hematopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. **Blood**, v. 97, p. 2293-2299, 2001.
58. NUTTALL, M.E.; GIMBLE, J.M. Controlling the balance between osteoblastogenesis and adipogenesis and the consequent therapeutic implications. **Cur. Op. Pharmacol.**, v. 4, p. 290-294, 2004.

59. OHNAKA, K.; TANABE, M.; KAWATE, H.; NAWATA, H.; TAKAYANAGI, R. Glucocorticoid suppresses the canonical Wnt signal in cultured human osteoblasts. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 329, p. 177-181, 2005.
60. PITTENGER, M.F.; MACKAY, A.M.; BECK, S.C.; JAISWAL, R.K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J.D.; MOORMAN, M.A.; SIMONETTI, D.W.; CRAIG, S.; MARSHAK, D.R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, p. 143-147, 1999.
61. PROCKOP, D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, v. 276, p. 71-75, 1997.
62. PROCKOP, D.J.; GREGORY, C.A.; SPEES, J.L. One strategy for cell and gene therapy: harnessing the power of adult stem cells to repair tissues. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 100, p. 11917-11923, 2003.
63. PURPURA, K.A.; AUBIN, J.E.; ZANDSTRA, P.W. Sustained *in vitro* expansion of bone progenitors is cell density dependent. **Stem Cells**, v. 22, p. 39-50, 2004.
64. RAWADI, G.; VAYSSIERE, B.; DUNN, F.; BARON, R.; ROMAN-ROMAN, S. BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. **J. Bone Miner. Res.**, v. 18, p. 1842-1853, 2003.
65. REYA, T.; DUNCAN, A.W.; AILLES, L.; DOMEN, J.; SCHERER, D.C.; WILLERT, K.; HINTZ, L.; NUSSE, R.; WEISSMAN, I.L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 423, p. 409-414, 2003.
66. REYES, M.; LUND, T.; LENVIK, T.; AGUIAR, D.; KOODIE, L.; VERFAILLIE, C.M. Purification and *ex vivo* expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. **Blood**, v. 98, p. 2615-2625, 2001.
67. ROSSI, M.I.D.; BARROS, A.P.D.N.; BAPTISTA, L.S.; GARZONI, L.R.; MEIRELLES, M.N.; TAKIYA, C.M.; PASCARELLI, B.M.O.; DUTRA, H.S.; BOROJEVIC, R. Multicellular spheroids of bone marrow stromal cells: a three-dimensional *in vitro* culture system to study migration of hematopoietic cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 1455-1462, 2005.
68. RUBIN, M.R.; BILEZIKIAN, J.P. The role of parathyroid hormone in pathogenesis of glucocorticoid-induced osteoporosis: a re-examination of the evidence. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 9, p. 4033-4041, 2002.
69. SHIN, C.S.; LECANDA, F.; SHEIKH, S.; WEITZMANN, L.; CHENG, S.; CIVITELLI, R. Relative abundance of different cadherins defines differentiation of mesenchymal precursors into osteogenic, myogenic or adipogenic pathways. **J. Cell. Biochem.**, v. 78, p. 566-577, 2000.
70. SHORT, B.; BROUARD, N.; OCCHIODORO-SCOTT, T.; RAMAKRISHNAN, A.; SIMMONS, P. Mesenchymal stem cells. **Arch. Med. Res.**, v. 34, p. 565-571, 2003.

71. SHOVAL, I.; LUDWIG, A.; KALCHEIM, C. Antagonistic roles of full-length N-cadherin and its soluble BMP cleavage product in neural crest delamination. **Development**, v. 134, p. 491-501, 2007.
72. SILVA-MEIRELLES, L.S.; CHAGASTELLES, P.C.; NARDI, N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 2204-2213, 2006.
73. SIMMONS, P.J.; GRONTHOS, S.; ZANNETTINO, A.C.W. **The development of stromal cells**. In: Zon LI (Ed.) Hematopoiesis. A developmental approach. London, UK : Oxford University Press., 2001.
74. SMITH, E.; COETZEE, G.A.; FRENKEL, B. Glucocorticoids inhibit cell cycle progression in differentiating osteoblasts via Glycogen Synthase Kinase-3 β . **J. Biol. Chem.**, v. 277, n.20, p. 18191-18197, 2002.
75. SMITH, E.; FRENKEL, B. Glucocorticoids inhibit the transcriptional activity of LEF/TCF in differentiating osteoblasts in a Glycogen Synthase Kinase-3 β -dependent and independent manner. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n.3, p. 2388-2394, 2005.
76. STAAL, F.J.T.; CLEVERS, H.C. Wnt signalling and haematopoiesis: a wnt-wnt situation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 5, p.21-30, 2005.
77. STERN, J.M.; SULLIVAN, K.M.; OTT, S.M.; SEIDEL, K.; FINK, J.C.; LONGTON, G.; SHERRARD, D.J. Bone density loss after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a prospective study. **Biol. Blood Marrow Transplant.** v. 7, p. 257-264, 2001.
78. TAICHMAN, R.S. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2631-2638, 2005.
79. TAICHMAN, R.S; REILLY, M.J., EMERSON, S.G. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells *in vitro* bone marrow cultures. **Blood**, v. 87, p. 518-524, 1996.
80. TSONIS, P.A.; DEL RIO-TSONIS, K.; MILLAN, J.L.; WHEELLOCK, M.J. Expression of N-cadherin and alkaline phosphatase in chick limb bud mesenchymal cells: regulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3 or TGF-beta 1. **Exp. Cell Res.**, v. 213, p. 433-437, 1994.
81. VAN den BERG, D.J.; SHARMA, A.K.; BRUNO, E.; HOFFMAN, R. Role of members of the Wnt gene family in human hematopoiesis. **Blood**, v. 92, p. 3189-3202, 1998.
82. VISNJIC, D.; KALAJZIC, Z.; ROWE, D.W.; KATAVIC, V.; LORENZO, J.; AGUILA, H.L. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. **Blood**, v.103, n.9, p. 3258-3264, 2004.

83. WANG, F. S.; LIN, C.; CHEN, Y.; WANG, C.; YANG, K.D.; HUANG, Y.; SUN, Y.; HUANG, H. Secreted Frizzled-related protein 1 modulates glucocorticoid attenuation of osteogenic activities and bone mass. **Endocrinology**, v. 146, p. 2415-2423, 2005.
84. WEILBAECHER, K.N. Mechanisms of osteoporosis after hematopoietic cell transplantation. **Biol. Blood Marrow Transplant**, v. 6, p. 165-174, 2000.
85. WEISS, L. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. **Anat. Rec.**, v. 186, p. 161-184, 1976.
86. WESTEN, H.; BAINTON, D.F. Association of alkaline-phosphatase-positive reticulum cells in bone marrow with granulocytic precursors. **J. Exp. Med.**, v. 150, p. 919-937, 1979.
87. WILKINS, B.S. Histology of normal haemopoiesis: bone marrow histology I. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 645-649, 1992.
88. YIN, L.; LI, Y.; WANG, Y. Dexamethasone-induced adipogenesis in primary marrow stromal cell cultures: mechanism of steroid-induced osteonecrosis. **Chin. Med. J.**, v.119, p. 581-588, 2006.
89. YOUNG, B.; HEATH, J.W. **Wheater Histologia Funcional: Texto e Atlas em cores**.4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 415 p.
90. ZHANG, J. et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. **Nature**, v. 425, n. 23, p. 836-841, 2003.
91. ZHANG, W.; SCOTT, N. BMP-2-modulated chondrogenic differentiation *in vitro* involves down-regulation of membrane-bound beta-catenin. **Cell Commun. Adhes.**, v. 11, p. 89-102, 2004.

ANEXO – Soluções e Meios

- PBS (solução salina tamponada):

NaCl	8g
KCl	0,2g
KH ₂ PO ₄	0,2g
Na ₂ HPO ₄ : 7 H ₂ O	2,25g
H ₂ O tri-destilada q.s.p	1000 mL
Ajustar o pH para	7,4

- Solução corante Azul de Trypan:

Azul de Trypan em pó (C ₃₄ H ₂₄ N ₆ Na ₄ O ₁₄ S ₄)	400mg
PBS q.s.p.	100mL
pH	7,2

- Tripsina 0,125%:

Tripsina (Sigma)	125mg
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	0,02g
BSS-CMF q.s.p.	100mL
Ajustar o pH para	7,8

- BSS- CMF (Balanced Saline Solution- Calcium/magnesium free):

Solução A	50mL
Solução C	50mL
Solução D	50mL
H ₂ O tri-destilada q.s.p.	1000mL
Ajustar o pH para	7,4

- Solução A (20x):

NaCl	2,74M
KCl	107,3mM
Na ₂ HPO ₄	6,74mM
KH ₂ PO ₄	8,82mA

H₂O tri-destilada q.s.p. 1000mL

- Solução C (20x):

Glicose (C₆H₁₂O₆) 111mM

H₂O tri-destilada q.s.p. 1000mL

- Solução D (20x):

Vermelho de fenol (C₁₉H₁₄O₅S) 0,62mM

H₂O tri-destilada q.s.p. 1000mL

- Tampão de amostra para eletroforese em gel de agarose (10x)

Azul de bromofenol (C₁₉H₁₀Br₄O₅S) 6,22mM

Xileno cianol FF (C₂₅H₂₇N₂NaO₆S₂) 7,74mM

Glicerol 750μL

H₂O destilada ou TBE 1x q.s.p. 1,5mL

- Água com Dietilpirocarbonato (H₂O DEPC)

DEPC (C₆H₁₀O₅) 6,17mM

H₂O tri-destilada q.s.p. 1000mL

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)