



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS

ARIEL VALENTE BEZERRA

**EFEITO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROLIFERAÇÃO, VIABILIDADE E
ATIVAÇÃO DE OSTEOBLASTOS MURINOS *IN VITRO***

FORTALEZA

2016

ARIEL VALENTE BEZERRA

EFEITO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROLIFERAÇÃO, VIABILIDADE E
ATIVÇÃO DE OSTEOLASTOS MURINOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfologia

Orientador: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B469e Bezerra, Ariel Valente.

O efeito do ranelato de estroncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos in vitro / Ariel Valente Bezerra. – 2016.
49 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho Leitão.

1. Osteoblastos. 2. Cultura de células. 3. Ranelato de Estrôncio. I. Título.

CDD 611

ARIEL VALENTE BEZERRA

EFEITO DO RANELATO DE ESTRÔNCIO NA PROLIFERAÇÃO, VIABILIDADE E
ATIVACÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfologia

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Renata de Carvalho Leitão (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Gerly Anne de Castro Brito
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Abrahão Carvalho Gomes de Souza Carvalho
Universidade Christus (UniChristus)

À Deus, principalmente, por ter agraciado-me com saúde e sabedoria para enfrentar as dificuldades da vida diariamente. Por sempre me fortalecer com esperança e perseverança nos objetivos mais difíceis e por nunca deixar nada faltar-me nesta vida.

Aos meus pais, Ana Silvia e José Fernando, por terem me guiado nos bons caminhos e por todos os ensinamentos de dignidade, responsabilidade, humildade e respeito ao próximo.

AGRADECIMENTOS

À minha professora e orientadora Renata Ferreira de Carvalho Leitão, sempre dedicada e solícita em ajudar, pelos valiosos ensinamentos e direcionamentos essenciais para esse trabalho e por ter depositado sua confiança em mim, quando me aceitou como aluno e orientando.

À professora Gerly Anne de Castro Brito, por sempre atender a nossas necessidades no laboratório, tornando a execução desse trabalho viável.

À minha colega de mestrado e amiga Cíntia de Melo Braga, por ter me ajudado em vários experimentos laboratoriais sendo indispensável para o desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Rosemayre Souza Freire pela ajuda de excelência, disponibilidade e colaboração na Central Analítica.

Às colegas de laboratório Josy e Deize por uma dedicação digna de elogios ao laboratório NEMPI e a todos os colegas e por estarem sempre pronta para ajudar.

À Dra. Beatriz pela organização e preocupação em sempre melhorar e zelar pela sala de cultura de células e nos ajudar com seus válidos conhecimentos.

A todos os professores que ministraram disciplinas e passaram o máximo de conhecimentos com excelentes aulas.

Ao Dr. Abrahão Carvalho Gomes de Souza Carvalho que, prontamente, aceitou o convite para compor essa banca e adicionar conhecimentos à esse trabalho.

À Dra. Andrea Silva Walter de Aguiar por ter me orientado, ao final da residência, em iniciar o mestrado em Ciências Morfofuncionais na UFC e por ter prestado toda a ajuda necessária quando solicitado.

À estudante de iniciação científica, Eduarda, que me ajudou em vários momentos em que necessitei, não importando o dia da semana.

A todos os funcionários do departamento de Morfologia da UFC, que mesmo de forma indireta, contribuíram para a realização desse trabalho.

“No meio de toda dificuldade existe
sempre uma oportunidade”

(Albert Einstein)

RESUMO

INTRODUÇÃO: O tecido ósseo é classificado como um tecido conjuntivo especializado composto por matriz orgânica e inorgânica, osteoclastos e células da linhagem osteoblástica. Nos processos patológicos, a homeostasia do tecido ósseo pode ser reestabelecida com algumas terapias farmacológicas como o Ranelato de estrôncio, já largamente utilizado para tratamento da osteoporose pós-menopausa, devido seus efeitos inibitórios sobre os osteoclastos e ativação de osteoblastos. Os mecanismos envolvidos, no entanto, ainda não foram completamente esclarecidos.

OBJETIVOS: Este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito direto do ranelato de estrôncio na proliferação e ativação de osteoblastos murinos, e os possíveis mecanismos envolvidos.

METODOLOGIA: Para a avaliação da viabilidade e proliferação celular foram realizados os ensaios de MTT e imunomarcação com Ki67, respectivamente, após 24 e 48 horas de incubação dos osteoblastos com ranelato de estrôncio. Para o MTT foram utilizadas diferentes concentrações de ranelato (0,01; 0,1; 1; 10; 100 e 1000 mM), e a partir dos resultados obtidos, duas concentrações (0,01 e 0,1 mM) foram selecionadas para os ensaios posteriores: imunomarcação com Ki67, Western Blot para investigar a expressão proteica de BMP2, SMAD2/3, OPG, RANKL e fosfatase alcalina (FAO) . Foi realizado, ainda, a quantificação dos níveis de FAO no meio de cultura, utilizando “kits” específicos da LABTEST®, após 24, 48, 72 e 120h de incubação com ranelato de estrôncio. A mineralização foi avaliada pelo teste de Von Kossa nos períodos de 7, 14 e 21 dias.

RESULTADOS: Um aumento significativo na viabilidade de osteoblastos foi observado após a incubação dessas células com 0,01 e 0,1mM de ranelato de estrôncio por 24h, assim como um aumento importante na proliferação celular com a dose de 0,01 mM no período de 24h. A BMP2 aumentou de forma significativa nas duas concentrações da droga utilizadas no período de 24 pelo ensaio de Western Blot. No ensaio para a dosagem de FAO no meio de cultura, foi observado aumento significativo de FAO após a incubação com 0,1mM de ranelato em 24 horas. No ensaio de Von Kossa foi observada aumento e aceleração da mineralização nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM.

CONCLUSÃO: Os resultados sugerem um efeito positivo do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos, uma vez que aumentou a expressão de BMP e FAO pelos osteoblastos. Desse modo, estudos promissores podem ser realizados com o

anelato de estrôncio com o seu emprego na regeneração de defeitos ósseos.

Palavras-chave: Osteoblastos. Cultura de células. Ranelato de Estrôncio.

ABSTRACT

Introduction: The bone tissue is classified as a specialized connective tissue composed by organic and inorganic matrix, osteoclasts and osteoblastic lineage cells. In pathologic procedures, the bone tissue's homeostasis can be reestablished with some pharmacological therapies, as strontium ranelate, widely used to treat osteoporosis post menopause, because of its inhibitory effects over the osteoclasts and the activation of the osteoblasts. The mechanisms involved, however, are still not completely clarified. **OBJECTIVES:** This paper has as objective to evaluate the direct effect of strontium ranelate in murine proliferation and activation of osteoblasts, and the possible mechanisms involved. **METHODOLOGY:** To evaluate the viability and cell proliferation were performed trials of MTT and immunolabeling with Ki67, respectively, after 24 and 48 hours of osteoblasts' incubation with strontium ranelate. For the MTT, it was used different concentrations of ranelate (0,01; 0,1; 1; 10; 100 and 1000 mM), and by the obtained results, two concentrations (0,01 and 0,1 mM) were selected for the next trials: immunolabeling with Ki67, Western Blot to investigate the protein expression of BMP2, SMAD2/3OPG, RANKL, and alkaline phosphatase (FAO). It was still performed the quantification of the levels of FAO in a culture medium, using specific kits of LABTEST®, after 24, 48, 72 and 120 hours of incubation with strontium ranelate. The mineralization was evaluated by the von Kossa Staining Protocol for Calcium among 7, 14, and 21 days. **RESULTS:** A significant increase of the viability of osteoblasts was observed after these cells incubation with 0,01 and 0,1 mM of strontium ranelate for 24 hours. BMP2 increased significantly in these two concentrations of the drug used in the period of 24 hours by the Western Blot trial. In the trial to measure the FAO in culture medium, it was observed a significant increase of FAO after incubation with 0,1mM of ranelate for 24 hours. In the von Kossa trial, it was observed an increase and acceleration of mineralization in concentrations of 0,01 and 0,1 mM. **CONCLUSION:** The results suggest a positive effect of the strontium ranelate in proliferation, viability, and activation of osteoblasts, possibly because of the higher expression of BMP and FAO by osteoblasts. Therefore, promising studies can be performed with the strontium ranelate with its application in regenerating bone defects.

Key-words: Osteoblasts. Cell culture. Strontium ranelate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Aumento da formação óssea através da interação de BMP e TGF β /SMAD e ativação do gene Osterix.....	15
Figura 2 -	Papel do sistema RANKL/RANK/OPG na remodelação óssea.....	16
Figura 3 -	Estrutura química do ranelato de estrôncio.....	17
Figura 4 -	Papel do íon estrôncio sobre osteoblastos e osteoclastos.....	18
Figura 5 -	Efeito do ranelato de estrôncio no metabolismo ósseo.....	19
Figura 6 -	Efeito do ranelato de estrôncio sobre a viabilidade e proliferação celular de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 (A) e 48h (B) de cultivo celular.....	30
Figura 7 -	Efeito de ranelato de estrôncio sobre a proliferação celular de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 (A) e 48h (B) de incubação.....	31
Figura 8 -	Efeito do ranelato de estrôncio na expressão de Ki67 em osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24h de incubação. Imunomarcção para ki-67 em osteoblastos incubados com ou sem ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM adicionado ao meio de cultura.....	32
Figura 9 -	Efeito do ranelato de estrôncio na expressão de Ki67 em osteoblastos murinos (OFCOL II) após 48h de incubação. Imunomarcção para ki-67 em osteoblastos incubados com ou sem ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM adicionado ao meio de cultura.....	33
Figura 10 -	Efeito do ranelato de estrôncio na expressão protéica da BMP2	

	(A), SMAD2/3 (B), OPG (C), RANKL (D) e FAO (C) após 24 h de incubação	35
Figura 11 -	Efeito do ranelato de estrôncio na expressão protéica da BMP2 (A), SMAD2/3 (B), OPG (C), RANKL (D) e FAO (C) após 48 h de incubação	36
Figura 12 -	Efeito do ranelato de estrôncio nos níveis de Fosfatase Alcalina óssea nos meios de cultura de osteoblastos murinos (FCOL II) incubados com ranelato de estrôncio durante 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 120 (D) horas.....	37
Figura 13 -	Efeito do ranelato de estrôncio no processo de mineralização pelo ensaio de Von Kossa em osteoblastos murinos (OFCOL II) após os períodos de 7, 14 e 21 dias de incubação com RE nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM adicionado ao meio de cultura.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μmol	Micromol
ANOV	Análise de variância
AKT	Proteínaquinase B
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Albumina sérica bovina
Ca^{2+}	Cálcio
Sr^{2+}	Estrôncio
CO_2	Dióxido de carbono
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	Erro padrão da média
<i>et al</i>	E colaboradores
mg	Miligrama
Min	Minuto
mL	Mililitro
N	Número
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
P	Página
PBS	Tampão fosfato-salino
pH	Potencial hidro
RPM	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Proteínas em gel de poliacrilamida-SDS
TBST	Tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20
Zn^{2+}	Zinco
BMP	Proteína morfogenética óssea
OPG	Osteoprotegerina
RANKL	Ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B

FAO	Fosfatase alcalina óssea
CaRS	Receptor Sensível de Cálcio
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
OCN	Osteocalcina
OP	Osteopontina
WB	Western Blot
RE	Ranelato de estrôncio
PKC	Proteína quinase C
TEV	Trombo embolismo venoso
Osx	Osterix
CTM	Célula troncomesenquimal
Col.I	Colágeno tipo I
Wnt	Via Wingless
GSK3	Quinase3 da Glicogênio Sintase - atua na transcrição e translocação celular juntamente com a β - catenina
BSP	Sialoproteína óssea

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
1.1	Tecido ósseo.....	13
1.2	Ranelato de estrôncio e reparo ósseo.....	16
2	JUSTIFICATIVA.....	20
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivo geral.....	22
3.2	Objetivos específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Cultura de osteoblastos OFCOL II.....	23
4.2	Teste de citotoxicidade pelo método direto (MTT).....	23
4.3	Imunofluorescencia.....	25
4.4	Western Blot.....	25
4.4.1	<i>Expressão protéica de BMP-2, SMAD2/3, OPG, RANK-L e FAO.....</i>	25
4.4.2	<i>Extração de proteínas.....</i>	26
4.4.3	<i>Dosagem de proteína.....</i>	26
4.4.4	<i>Western Blot.....</i>	27
4.5	Dosagem de fosfatase alcalina (FAO).....	28
4.6	Mineralização.....	28
5	RESULTADOS.....	30
5.1	Avaliação de viabilidade pelo método direto MTT e proliferação celular.....	30
5.2	Expressão protéica de BMP-2, SMAD 2/3, OPG, RANKL e FAO.....	33
5.3	Fosfatase Alcalina no meio.....	37
5.4	Mineralização.....	37
6	DISCUSSÃO.....	39
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tecido ósseo, remodelação e reparo

O osso é uma forma especializada de tecido conjuntivo e um dos mais adaptáveis do corpo humano. Sua principal função é proteger e sustentar os órgãos, alojar e proteger a medula óssea e suportar os músculos, possibilitando um sistema de alavancas que potencializam o movimento e as forças geradas durante a contração muscular (DOWNEY; SIEGEL, 2006; MARTA, PEDRO, ARANCHA, 2016). Ademais, o tecido ósseo é o maior depósito de cálcio, fósforo e outros íons que participam do metabolismo e bom funcionamento do organismo. O cálcio é essencial para várias funções do corpo, incluindo contração muscular, condução nervosa e funcionamento apropriado de várias enzimas. A regulação dos níveis de cálcio no sangue é desempenhada por processos de formação e reabsorção óssea (HARADA; RODAN, 2003; HUAN *et al.* 2016).

Além de células como osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células mesenquimais indiferenciadas, o tecido ósseo também é composto por uma matriz, que possui componentes orgânicos, inorgânicos e água (DOWNEY; SIEGEL, 2006). A matriz orgânica é composta por colágeno, predominantemente do tipo I, e proteínas não-colágenas. A matriz inorgânica é mineralizada e composta principalmente por íons cálcio na forma de cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (HUAN *et al.* 2016).

O alto grau de remodelação é uma das principais características do tecido ósseo. Esse processo ocorre a partir das interações entre as células que compõem o tecido, e resulta no equilíbrio fisiológico entre reabsorção e formação óssea. Esse processo de remodelação permite a reparação de fraturas ou de defeitos ósseos resultando em um novo tecido formado e é necessária para a homeostase do cálcio (DALLAS *et al.*, 2013). A remodelação ocorre de forma coordenada entre osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras (ANDERSEN *et al.*, 2009; FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Defeitos ósseos extensos, gerados por trauma ou patologias, podem necessitar de técnicas cirúrgicas associadas à biomateriais para que ocorra a reparação óssea. Nesses casos, a utilização de arcabouços biodegradáveis é essencial, visto que esses biomateriais funcionam como suportes temporários, estimulando a regeneração do tecido ósseo perdido,

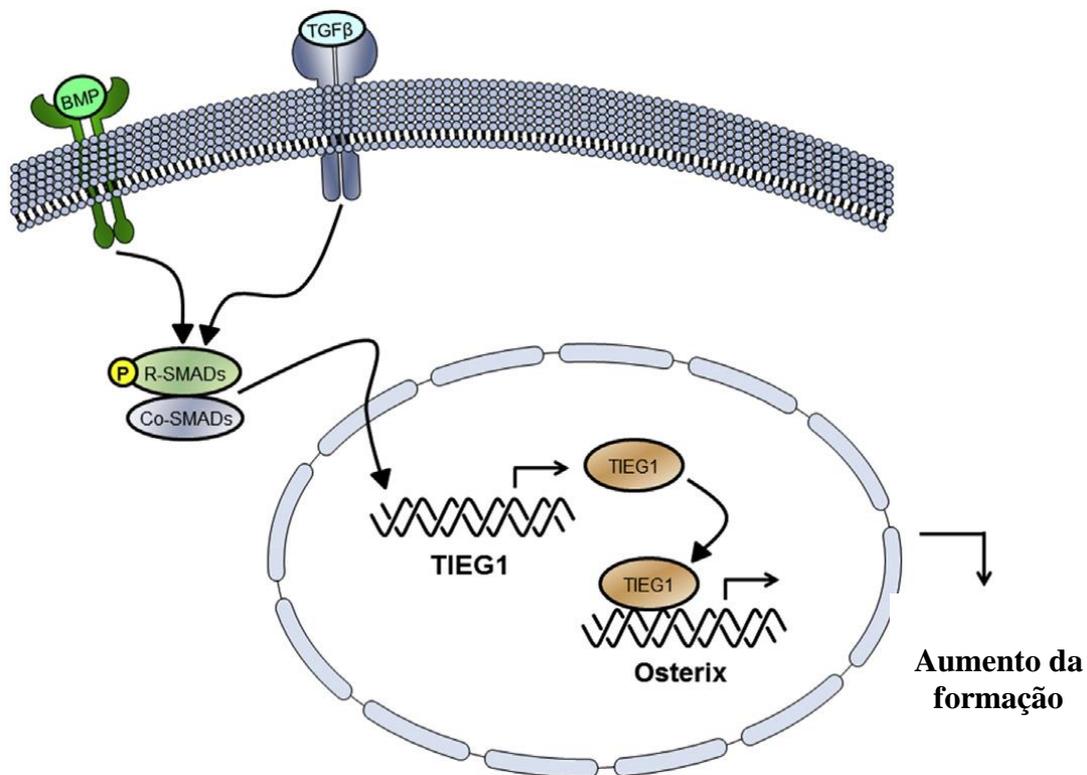
sofrendo reabsorção gradual à medida que ocorre a neoformação óssea.

O processo de remodelamento do tecido ósseo ocorre, ainda, de forma complexa. A matriz óssea antiga é substituída por uma nova matriz, ocorrendo em três fases: (1) iniciação da reabsorção óssea pelo osteoclasto (2) transição entre a reabsorção e formação óssea e (3) formação óssea pelo osteoblasto (MATSUO; IRIE, 2008; SIMS; GOOI, 2008).

Por outro lado, o desequilíbrio entre a reabsorção e a formação óssea resulta em doenças ósseas graves, como a osteoporose que ocorre a partir da reabsorção óssea excessiva pelos osteoclastos, sem a ocorrência da devida formação óssea (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). Esse desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea depende de vários fatores locais ou sistêmicos, incluindo hormônios, citocinas, quimiocinas e estimulação biomecânica (CROCKETT *et al.*, 2011).

As células responsáveis pelo processo de formação óssea são os osteoblastos. Essas células estão localizadas ao longo da superfície óssea compreendendo de 4 a 6% do total de células residentes do tecido ósseo e mostram características morfológicas de células sintetizadoras de proteínas, incluindo abundante retículo endoplasmático rugoso e proeminente complexo de Golgi, bem como diversas vesículas secretoras (CAPULLI; PAONE; RUCCI, 2014). Osteoblastos são derivados das células tronco mesenquimais (CTM). A diferenciação de CTM na linhagem de células osteoprogenitoras, evento fundamental no processo de formação óssea, requer a expressão de genes específicos, incluindo a síntese de proteína morfogenéticas ósseas (BMPs) e membros da via Wingless (Wnt) (FLORENCIO-SILVA *et al.*, 2015). Esses fatores são produzidos e liberados pelos próprios osteoblastos já diferenciados e se ligam em receptores presentes na membrana de outras células (parácrina) que regulam a expressão de genes envolvidos na formação óssea por ativar SMADs que se translocam para o núcleo aonde estimulam a expressão do gene precoce induzido de TGF β -1 (TIEG1), que por sua vez, estimula o fator de transcrição Osterix, que regulam a expressão de osteoprotegerina (OPG), colágeno do tipo I, osteopontina (OP), sialoproteína óssea (BSP), osteocalcina (OCN) e fosfatase alcalina óssea (FAO) (figura 1). (SUBRAMANIAM *et al.*, 2016).

Figura 1 -Aumento da formação óssea através da interação de BMP e TGF β /SMAD e ativação do gene Osterix



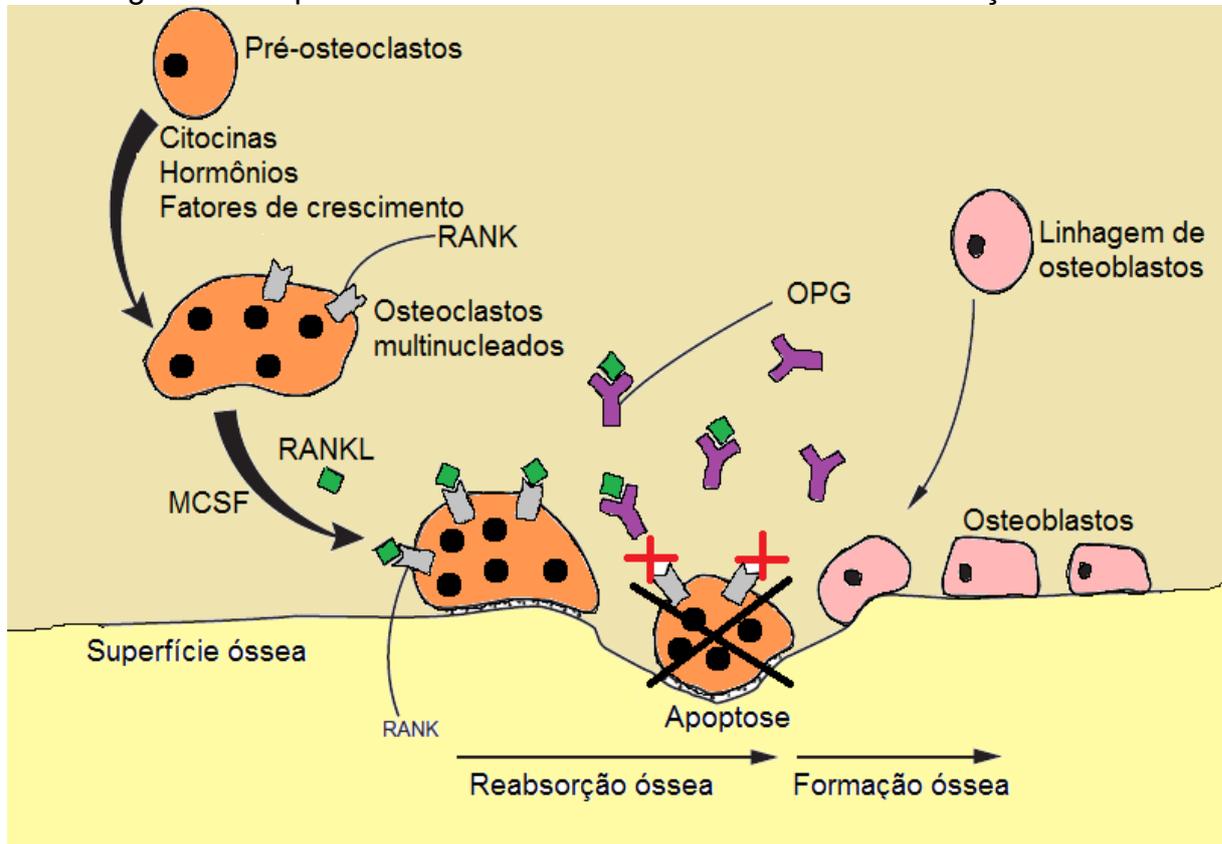
Fonte: Subramaniam *et al.*, (2016).

Os osteoblastos também produzem RANKL e osteoprotegerina (OPG), membros da família do TNF. RANKL é sintetizado em forma membranosa ou solúvel pelas células de linhagem osteoblástica (WITTKOWSKIE *et al.* 2016). Este fator liga-se ao receptor de superfície osteoclastos, RANK, e estimula a reabsorção óssea através da formação de osteoclastos, a partir de precursores da medula óssea, e da ativação de osteoclastos maduros (SILVA; BRANCO, 2011).

RANKL, também é conhecido como TNFSF11, TRANCE, OPGL, ODF ou CD25. A sua forma solúvel, ao ligar-se à OPG liberada por osteoblastos, resulta na inibição da osteoclastogênese. Por outro lado, a ligação de RANKL ao receptor RANK, presente na membrana de células precursoras de osteoclastos ou em osteoclastos maduros, estimula a formação e atividade dessas células e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (CAETANO-LOPES; CANHÃO; FONSECA, 2007). Dessa forma OPG previne os efeitos de RANKL em osteoclastos, apresentando importante efeito protetor contra a perda óssea (CAETANO-LOPES;

CANHÃO; FONSECA, 2007; SIMONET *et al.*, 1997; TROUVIN; GOËB, 2010) (Figura 2).

Figura 2 – Papel do sistema RANKL/RANK/OPG na remodelação óssea



Fonte: Trouvin e Goëb (2010, adaptado).

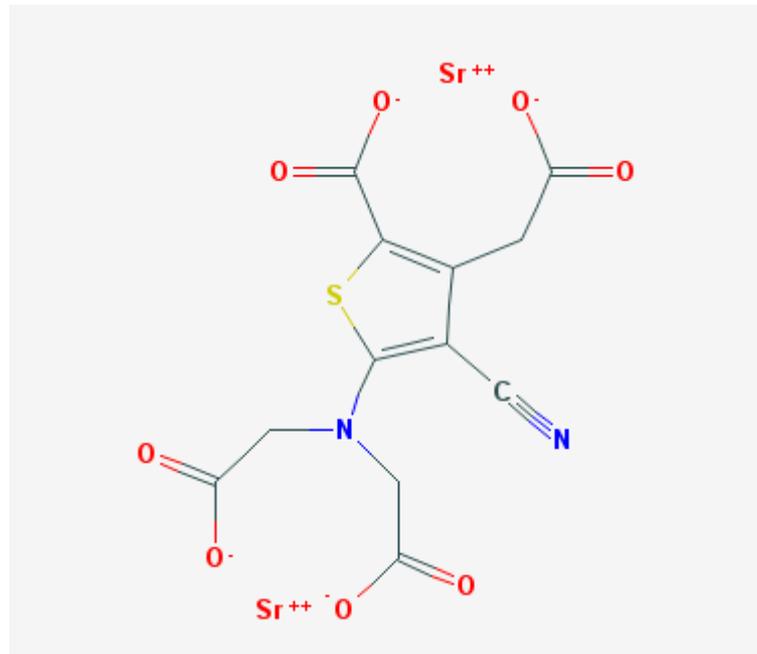
1.2 Ranelato de estrôncio e reparo ósseo

O ranelato de estrôncio tem sido utilizado em mulheres, desde o início do ano 2000, aproximadamente, pós-menopausa para tratar ou prevenir a osteoporose (MEUNIER *et al.*, 2004; QUERIDO; ROSSI; FARINA, 2016). Diferente de outros fármacos utilizados na clínica, o ranelato de estrôncio tem duplo papel na remodelação óssea, estimulando a formação óssea e inibindo a sua reabsorção (NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014).

O ranelato de estrôncio é constituído por dois cátions de estrôncio, representando o seu composto ativo, e uma molécula de ácido ranélico que atua como carreador (figura 3) (MARIE, 2005; MOBASHERI, 2013). Após a administração oral, a droga é totalmente dissociada no baixo pH do estômago, absorvida no

intestino e distribuída para todo o corpo. O estrôncio será incorporado e acumulado nas matrizes mineralizadas de ossos e dentes em mineralização (QUERIDO; ROSSI; FARINA, 2016).

Figura 3 – Estrutura química do ranelato de estrôncio

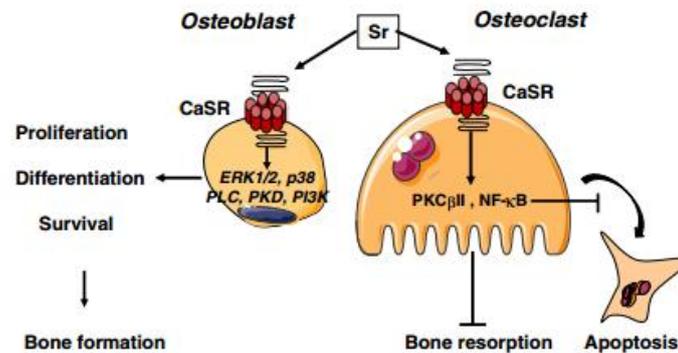


Fonte: RANELATO de estrôncio (2017). Molécula de ácido ranélico associado a dois íons de estrôncio em suas extremidades.

Além de desempenhar um papel importante na melhoria da força óssea, a presença do estrôncio na matriz óssea promove formação do tecido ósseo e diminuição da reabsorção da matriz mineralizada, com a participação de mecanismos relacionados aos receptores sensíveis ao cálcio (CaRs), um importante receptor acoplado a proteína G que é ativado por cátions divalentes, como o cálcio e o estrôncio. O CaR é expresso em todos os tecidos relacionados à manutenção da homeostase do cálcio (paratireoide, células C tiroidianas, rins e ossos) (SAIDAK, MARIE, 2012).

Estudos sugerem que a ativação de CaRs está relacionada aos efeitos proliferativos e apoptóticos do estrôncio, em osteoblastos e osteoclastos, respectivamente (figura 4) (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2007; CAUDRILLIER *et al.*, 2010, SAIDAK; MARIE, 2012; HURTEL-LEMAIRE *et al.*, 2009). Entretanto, outros mecanismos independentes desses canais tem mostrado estar envolvido na diferenciação de osteoblastos (FROMIGUÉ *et al.*, 2009).

Figura 4 – Papel do íon estrôncio sobre osteoblastos e osteoclastos



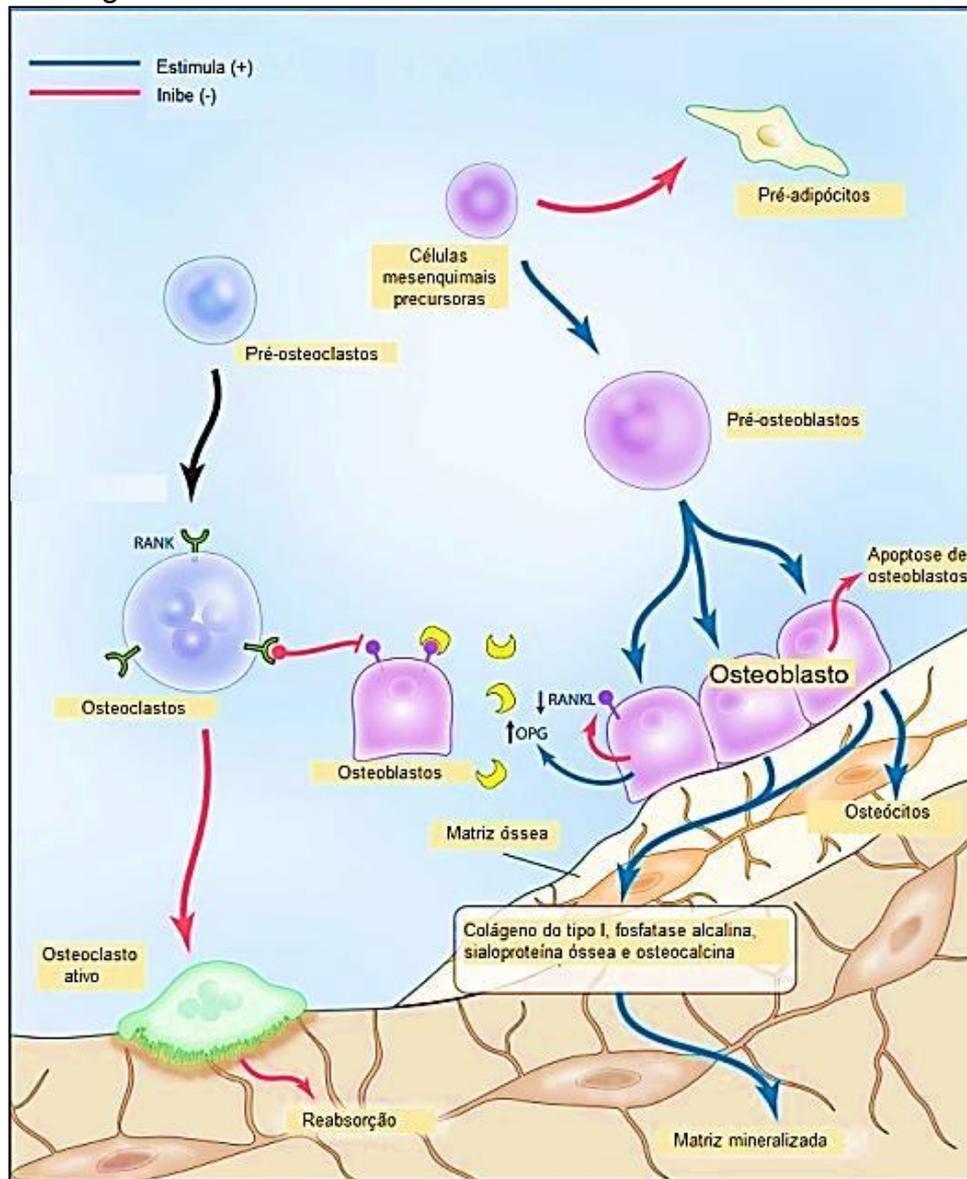
Fonte: Saidak; Marie (2012). Interação do íons estrôncio nos CaRS dos osteoblastos e osteoclastos.

O ranelato de estrôncio foi apontado como indutor da expressão gênica de OPG e da atividade de fosfatase alcalina, e infrarregulador da expressão de RANKL em osteoblastos humanos, de forma dose-dependente. O mecanismo proposto para esse efeito foi dependente de CaR, uma vez que esses efeitos do ranelato de estrôncio foram abolidos em animais nocautes para esse receptor (BRENNAN *et al.*, 2009).

Os osteoblastos têm sido considerados um dos maiores alvos diretos desse composto (BRENNAN *et al.* 2009). Desde os seus efeitos na proliferação de pré-osteoblastos, ao aumento da atividade osteoblástica, evidenciada pelo aumento na síntese de colágeno do tipo I, FAO, sialoproteína óssea e osteocalcina, e maior mineralização da matriz óssea (CANALIS *et al.*, 1996; CHOUDHARY *et al.*, 2007; BRENNAN *et al.*, 2009). Além disso, o ranelato de estrôncio inibe a apoptose de osteoblastos e induz a diferenciação final de osteoblastos em osteócitos (ATKINS *et al.*, 2009; CIANFEROTTI; D'ASTA; BRANDI, 2013).

O efeito duplo do ranelato de estrôncio no metabolismo ósseo encontra-se representado na figura 4 (CIANFEROTTI; D'ASTA; BRANDI, 2013).

Figura 5 – Efeito do ranelato de estrôncio no metabolismo ósseo



Fonte: Cianferotti, D'Asta e Brandi (2013). O ranelato de estrôncio desempenha papel duplo no metabolismo ósseo. Ele estimula a diferenciação de osteoblastos, acompanhado por aumento da liberação de componentes orgânicos da matriz óssea (colágeno do tipo I, fosfatase alcalina, sialoproteína óssea e osteocalcina), aumenta a liberação de OPG e inibe a de RANKL, incluindo a inibição da apoptose de osteoblastos. Em osteoclastos, o ranelato de estrôncio inibe a ativação de osteoclastos.

Considerando o papel indiscutível do osteoblasto na formação do tecido ósseo, o presente estudo investiga o efeito direto do ranelato de estrôncio na proliferação e ativação de osteoblastos murinos. Os resultados obtidos poderão direcionar estudos futuros, visando a aplicação de ranelato de estrôncio diretamente no local de reparo ósseo.

2 JUSTIFICATIVA

O tratamento de defeitos ósseos na área médica e odontológica é um desafio, especialmente quando se trata de defeitos extensos, que demandam grande período de tempo para o reparo, diminuindo as chances de sucesso. Por esse motivo, é crescente a busca por novos materiais e fármacos que auxiliem nos processos de regeneração óssea. O uso sistêmico e continuado de fármacos com estrôncio, como o ranelato de estrôncio, tem demonstrado ser promissor na terapia regenerativa óssea. Devido aos mecanismos celulares duais, sabe-se que o estrôncio pode atuar diretamente na sinalização celular em osteoblastos e ao mesmo tempo inibir a ação de osteoclastos. O ranelato de estrôncio é prescrito, atualmente, para o tratamento da osteoporose pós-menopausa com risco de fratura óssea. As concentrações exatas do estrôncio, administrado cronicamente, por via oral, que alcançam o microambiente ósseo não são ainda plenamente conhecidas e não está bem estabelecido se os possíveis efeitos benéficos no osso são observados em curto prazo. O risco de um evento adverso raro, mas, grave, como tromboembolismo venoso, incluindo embolia pulmonar, foi associado ao uso crônico de ranelato de estrôncio. Baseado nesses achados, acreditamos que o uso local dessa droga, diretamente na lesão óssea, apresenta grande potencial terapêutico.

O presente estudo consiste na etapa inicial de um amplo trabalho de pesquisa, que busca desenvolver um sistema de entrega local de estrôncio, diretamente no defeito ósseo, reduzindo o risco de efeitos adversos indesejáveis. A avaliação dos efeitos diretos do ranelato de estrôncio na proliferação e ativação de osteoblastos em cultura é fundamental para o estabelecimento de concentrações viáveis para futuros testes *in vivo*, além de investigar os mecanismos envolvidos. A próxima etapa, portanto, será a avaliação do efeito da associação do ranelato de estrôncio a esponjas de colágeno, desenvolvidas e caracterizadas por nosso grupo, na cicatrização de defeitos ósseos de tamanho crítico, que não tem a capacidade de regenerar-se por completo sem enxertia óssea. Essas esponjas, posicionadas no local da lesão, funcionam como arcabouços biocompatíveis e biodegradáveis que atuam como nicho de colonização para as células osteogênicas. Acreditamos que a incorporação do ranelato de estrôncio ao colágeno viabilizará a liberação lenta do

fármaco, favorecendo a diminuição do tempo de cicatrização óssea. Esperamos com este trabalho contribuir substancialmente com o desenvolvimento de novos materiais para o reparo ósseo, objetivando maior eficácia e diminuição de custos em um tema relevante para a saúde pública.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do Ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos *in vitro*.

3.2 Objetivos específicos

1. Investigar a viabilidade e proliferação de osteoblastos incubados com ranelato de estrôncio através do ensaio de MTT e imunomarcação para ki-67.
2. Avaliar o efeito do Ranelato de estrôncio na ativação de osteoblastos a partir da expressão proteica e dos níveis de fosfatase alcalina óssea, através de Western Blotting e Elisa, respectivamente, e do ensaio de mineralização.
3. Investigar a ação do Ranelato de estrôncio no metabolismo de osteoblastos murinos através da expressão proteica de BMP-2, SMAD2/3, OPG e RANKL.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cultura de osteoblastos OFCOL II

Foram utilizados osteoblastos murinos (OFCOL II) adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ), mantidos em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) contendo 10 % de soro fetal bovino na presença de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina) a 37°C em estufa umidificada, incubada em atmosfera de 5% de CO₂. Neste estudo, as células foram utilizadas entre as passagens 16-30 e mantendo células estocadas em nitrogênio líquido. A partir do estoque, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm³, contendo 1ml de células, adicionando-se 4 ml de meio de cultura, DMEM, enriquecido com 10% SFB. As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C e pressão de CO₂. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100).

Estas células foram subcultivadas após tripsinização quando formada uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2ml de tripsina a 0,05%, as células foram retiradas, adicionando-se 6 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, utilizou-se jato forte com o auxílio de pipetador automático. Em seguida as células foram transferidas para um falcon de 15ml, centrifugadas (SOLAB SL-701) a 2000rpm, 4°C por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante é removido e as células ressuspensas com adição de um 4ml de meio completo. Deste volume serão retiradas alíquotas de, no mínimo, 1 ml e passadas para novas garrafas. As trocas de meio foram realizadas a cada 48hrs

4.2 Teste de viabilidade celular pelo método direto (MTT)

O teste de citotoxicidade tem como objetivo avaliar os efeitos letais ou subletais de uma substância ou produto a nível celular. Para esse trabalho, foi utilizado o teste de citotoxicidade pelo método direto com MTT.

Esse teste avalia de forma quantitativa a função mitocondrial através da redução do tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl

tetrazoliumbromide; Sigma) em cristais de formazana (MOSMANN,1983; LOBNER,2000). Essa reação de redução ocorre dentro da mitocôndria através da enzima succinatodesidrogenase, portanto, a quantidade de cristais de formazana está diretamente relacionada com o potencial de redução do tetrazolium MTT nas mitocôndrias.

Para a realização dos testes utilizou-se células OFCOLL II em placas de 96 poços em uma quantidade de 100µl de meio de cultura com 3.000 células por poço nos períodos de 24 e 48 horas. Todos os poços extremos das placas foram descartados de forma que foram utilizados apenas 60 poços e preenchidos com 150 µl de PBS (Sigma).

Depois de 24 horas do plaqueamento das células, todo o volume de meio de cultura foi removido dos poços e adicionou-se 100µl em cada poço das diluições das doses utilizadas nesse teste. As amostras foram divididas em grupo controle contendo apenas meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (meio completo) e nas concentrações de ranelato de estrôncio de 0,01, 0,1, 1 e 10 mM. O ranelato foi diluído com o meio de cultura completo.

Passado os períodos de interesse de incubação das drogas para análises das amostras, 24 e 48 horas, todo o conteúdo dos poços foi retirado e adicionou-se 100µl por poço de MTT diluído com o meio de cultura completo em uma concentração de 1mg/ml. O MTT foi incubado por 3 horas em uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. Passado esse período, todo o conteúdo foi removido novamente e foi adicionado 100 µl DMSO em cada poço sob agitação de 30 segundos para solubilizar os cristais de formazana.

As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek) no comprimento de onda de 570nm. Os valores das absorbâncias de cada amostra foram submetidos a seguinte equação:

$$\%viabilidade\ celular = \frac{Absorbância\ da\ amostra\ x\ 100}{média\ das\ absorbâncias\ dos\ controles}$$

As duas melhores concentrações de ranelato de estrôncio (0,01 e 0,1mM) foram utilizadas nos teste subsequentes.

4.3 Imunofluorescência

Os osteoblastos foram cultivados na concentração de 9×10^3 células por poço em placas de 24 poços com meio de cultura DMEM à temperatura de 37°C e na concentração de 5% de CO₂. Lamínulas de 13mm foram utilizadas como superfície para fixação de células, colocadas previamente na placa de cultura.

O meio de cultura foi removido após 24h da semeadura e as células foram incubadas com ranelato de estrôncio de acordo com os grupos: Controle (DMEM + SBF 10%); 0,01mM e 0,1mM durante os períodos de 24h e 48h.

Após este período de exposição, o meio foi removido e as células fixadas com 500µL de paraformaldeído (PFA) 4% por poço durante 30 minutos. Em seguida, foi utilizada 500µL solução de bloqueio por 1h, seguida da incubação com o anticorpo primário diluído mantido por um período de overnight em refrigeração. Terminado este período, foi adicionado 100µL do anticorpo secundário diluído em solução de lavagem por 1h. Para concluir o ensaio o núcleo das células foi corado com DAPI (1:2000) diluído em PBS 1x por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. Os preparados foram observados em um microscópio confocal (LM710-Confocal-Zeiss), usando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com a câmara integrada e processador de imagem, usando uma objetiva de 20x. Para quantificar o número de células positivas marcadas para Ki67, utilizou-se o programa Image J para obter o número de células imunomarcadas por campo. Foram fotografadas 12 campos por lâmina sendo um total de 4 lâminas por grupo no Photoshop.

4.4 Western Blotting

4.4.1 Expressão protéica de *BMP-2*, *SMAD2/3*, *OPG*, *RANK-L* e *FAO*

Para avaliar a expressão protéica de BMP-2, OPG, RANK-L, Fosfatase alcalina óssea nos osteoblastos, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

4.4.2 Extração de proteínas

As células foram cultivadas na concentração de 1.000 células/poço em placas de 6 poços com meio de cultura completo à temperatura de 37 °C e 5% de CO₂. Após 48h de semeadura, o meio foi trocado e as células incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM + SBF 10%) e RE na concentração 0,01mM. O período de incubação do fármaco foi de 48h. Ao final desse período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente.

Colocou-se 100ml de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mMNaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA) em cada poço da placa. Em seguida, com um raspador de células, as amostras foram removidas e colocadas em microtubos devidamente identificadas, vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

4.4.3 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinonínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (*ThermoScientific*, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras reduzem o cobre da sua forma cúprica (Cu²⁺) para a cuprosa (Cu¹⁺). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinonínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinonínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

4.4.4 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mercaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Foi utilizado um número de seis amostras para o experimento. Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (S100β, NFκB p65, RAGE e β-actina) ou 8% (iNOS e β-actina) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol). Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-BMP-2 (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-6895, 1:200), anti-SMAD2/3 (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8332, 1:200), anti-RANK-L (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-7628, 1:200), anti-OPG (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8468, 1:100), anti-fosfatase alcalina (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-271431, 1:50) ou anti-α-tubulina (Santa Cruz *Biotechnology*, SC-8035, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goatanti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000), ou HRP-goatanti-mouse (Invitrogen, 626520, 1:500) ou HRP-rabbitanti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, *Clarity western ECL blotting substrate*) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad,

EUA).

A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA).

4.5 Dosagem de fosfatase alcalina no meio de cultura

A dosagem de fosfatase alcalina óssea foi realizada com intuito de avaliar a atividade dos osteoblastos. Para avaliação deste parâmetro, amostras de meio completo foram coletadas das placas de cultura de 96 poços após 24, 48, 72 e 120 horas de exposição ao RE nas concentrações 0,01mM e 0,1mM. Após a coleta, As amostras foram utilizadas para a dosagem de Fosfatase Alcalina Total (FAT), utilizando um “Kit” específico, cuja metodologia segue orientação do laboratório fabricante (LABTEST®). Posteriormente, uma amostra do material foi aquecida para obtenção da atividade da fosfatase alcalina óssea (FAO). O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Alíquotas de 100 µL da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 °C por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 °C com leitura das absorbâncias em 405 nm, tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975)

4.6 Mineralização

Com o intuito de investigar o efeito do RE no processo de mineralização pelos osteoblastos, observou-se também a formação de nódulos mineralizados através do ensaio de Von Kossa. Nesse ensaio, as trocas do meio de cultura aconteciam a cada 48 horas com a adição do RE nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM. No grupo controle não foi adicionado RE ao meio de cultura. Os grupos analisados foram semeados em quadruplicata em placas de 12 poços, a uma concentração de 10^3 células/poço, mantidos em meio de cultura padrão. As análises de mineralização foram realizadas nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Ao final de cada

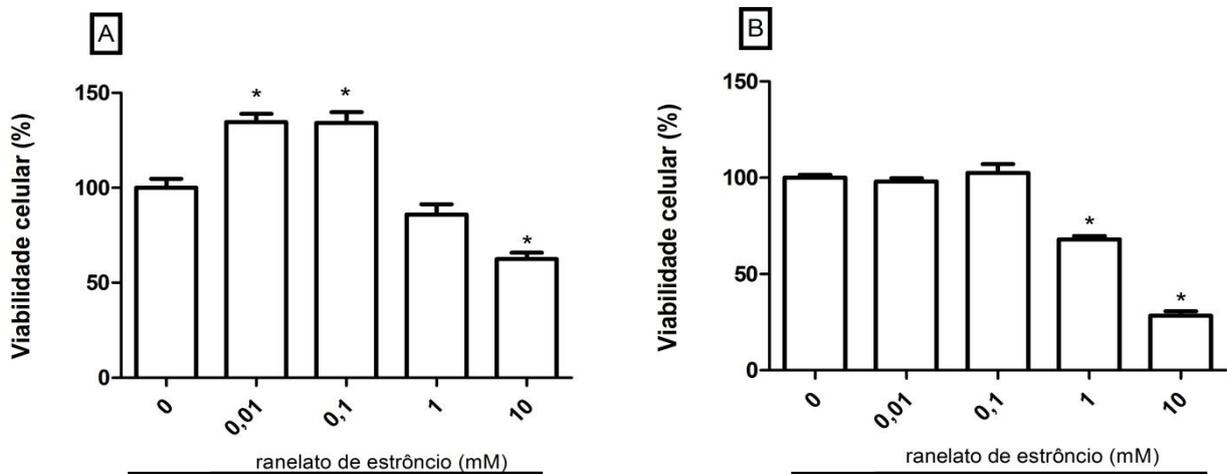
período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, por 5 minutos em cada solução), e lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, 1mL de solução de 5% de nitrato de prata (AgNO_3) foi colocado em cada poço e as células foram incubadas no escuro por 1 hora. Então, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escurecesse.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação de viabilidade pelo método direto MTT e proliferação celular

Os resultados do teste de viabilidade e proliferação celular através do MTT estão expressos na figura 6. Foi observado, após 24 hs de incubação com ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, maior proliferação de osteoblastos ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle, aonde não foi adicionado o ranelato de estrôncio. Ainda no período de 24 horas, a concentração de 10 mM diminui significativamente a o número de células viáveis em relação ao controle (Figura 6). No período de 48 horas de incubação, foi observado que as concentrações de 1 e 10 mM de ranelato de estrôncio apresentaram diminuição significativa na viabilidade dos osteoblastos, conforme ilustra a figura 6B.

Figura 6 - Efeito do ranelato de estrôncio sobre a viabilidade e proliferação celular de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 (A) e 48h (B) de cultivo celular

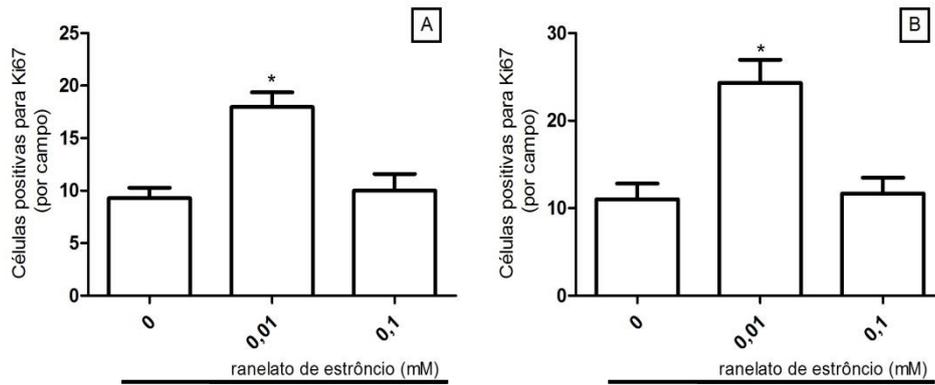


Fonte: da pesquisa. A viabilidade celular foi investigada através do ensaio MTT. Grupo controle consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição de ranelato de estrôncio (0). * $P < 0,05$ em relação ao controle. ANOVA, Bonferroni.

A proliferação celular foi avaliada, ainda, através da marcação de Ki-67, um antígeno nuclear presente em células em proliferação. Para este ensaio, os osteoblastos foram incubados, por 24 e 48 h, com ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM.. A quantificação das células imunomarcadas demonstram o efeito proliferativo ($p < 0,01$) de 0,01 mM de ranelato de estrôncio nos

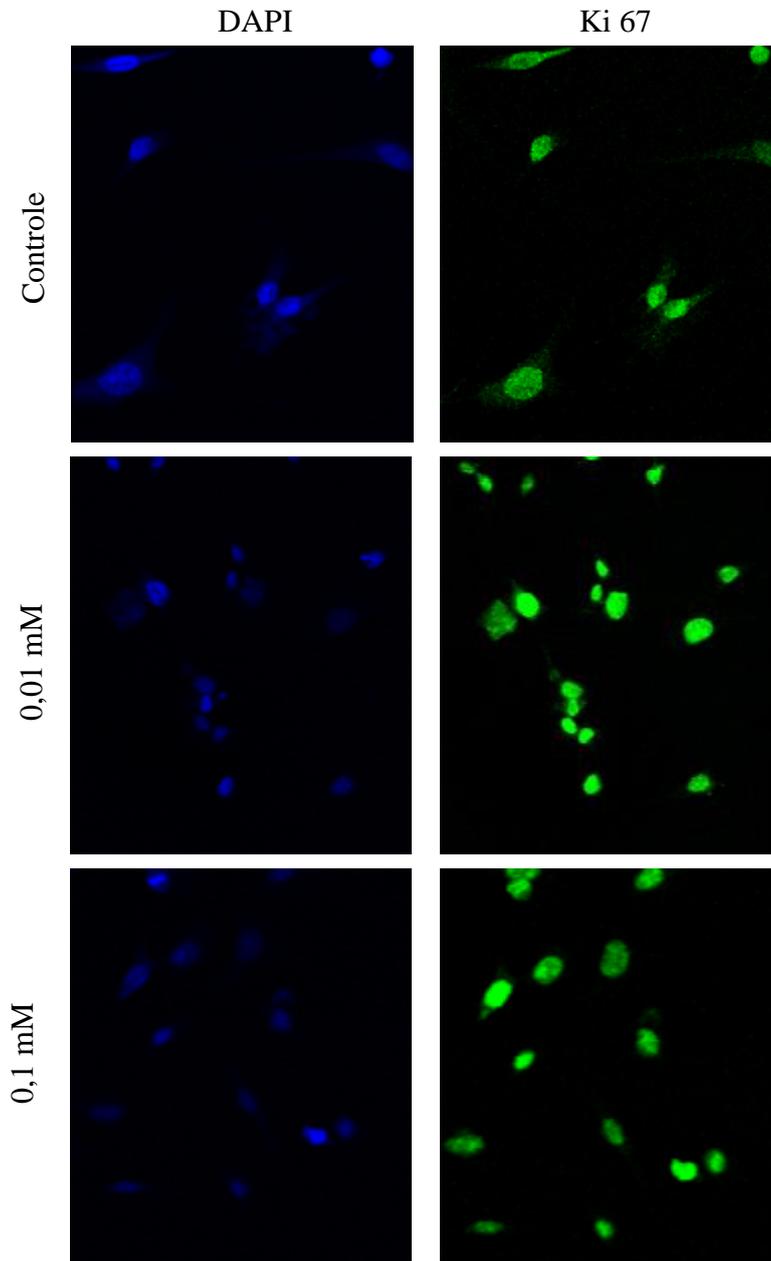
osteoblastos, após 24 (Fig. 7A) e 48 h (Fig. 7B) de incubação, quando comparado ao grupo controle, sem a adição de ranelato de estrôncio ao meio de cultura. O mesmo efeito não foi observado na concentração de 0,1 mM de ranelado de estrôncio (Figura 7). As figuras 8 e 9 ilustram esses resultados, aonde se observa os núcleos celulares marcados em azul e a imunomarcacão de ki-67 em verde.

Figura 7 - Efeito de ranelato de estrôncio sobre a proliferaçãocelular de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24 (A) e 48h (B) de incubação



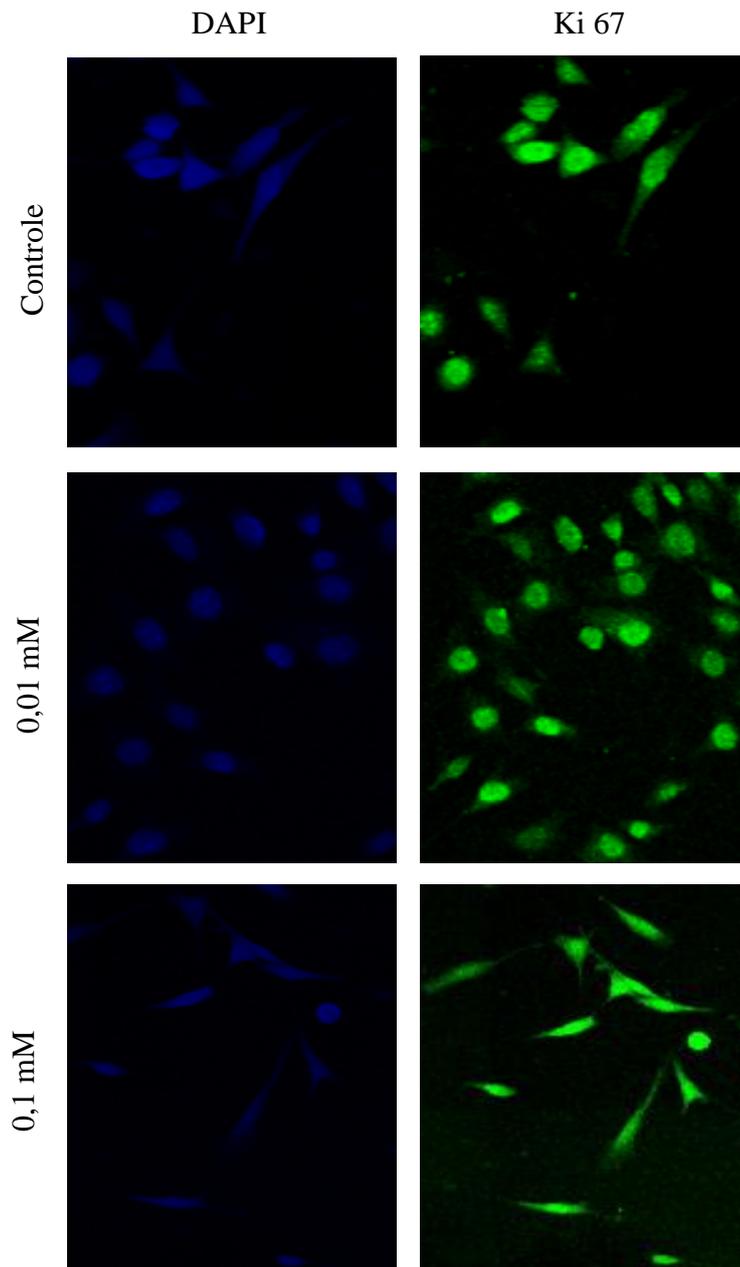
Fonte: da pesquisa. Quantificação da imunomarcacão para Ki67 em osteoblastos incubados com ou sem ranelato de estrôncio (0) adicionado ao meio de cultura. * $P < 0,05$ em relaçãao controle. ANOVA, Bonferroni.

Figura 8 - Efeito do ranelato de estrôncio na expressão de Ki67 em osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24h de incubação. Imunomarcação para ki-67 em osteoblastos incubados com ou sem ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM adicionado ao meio de cultura



Fonte: da pesquisa. As células foram imunocoradas utilizando DAPI (azul) e Ki67 (verde).

Figura 9 - Efeito do ranelato de estrôncio na expressão de Ki67 em osteoblastos murinos (OFCOL II) após 48h de incubação. Imunomarcação para ki-67 em osteoblastos incubados com ou sem ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM adicionado ao meio de cultura



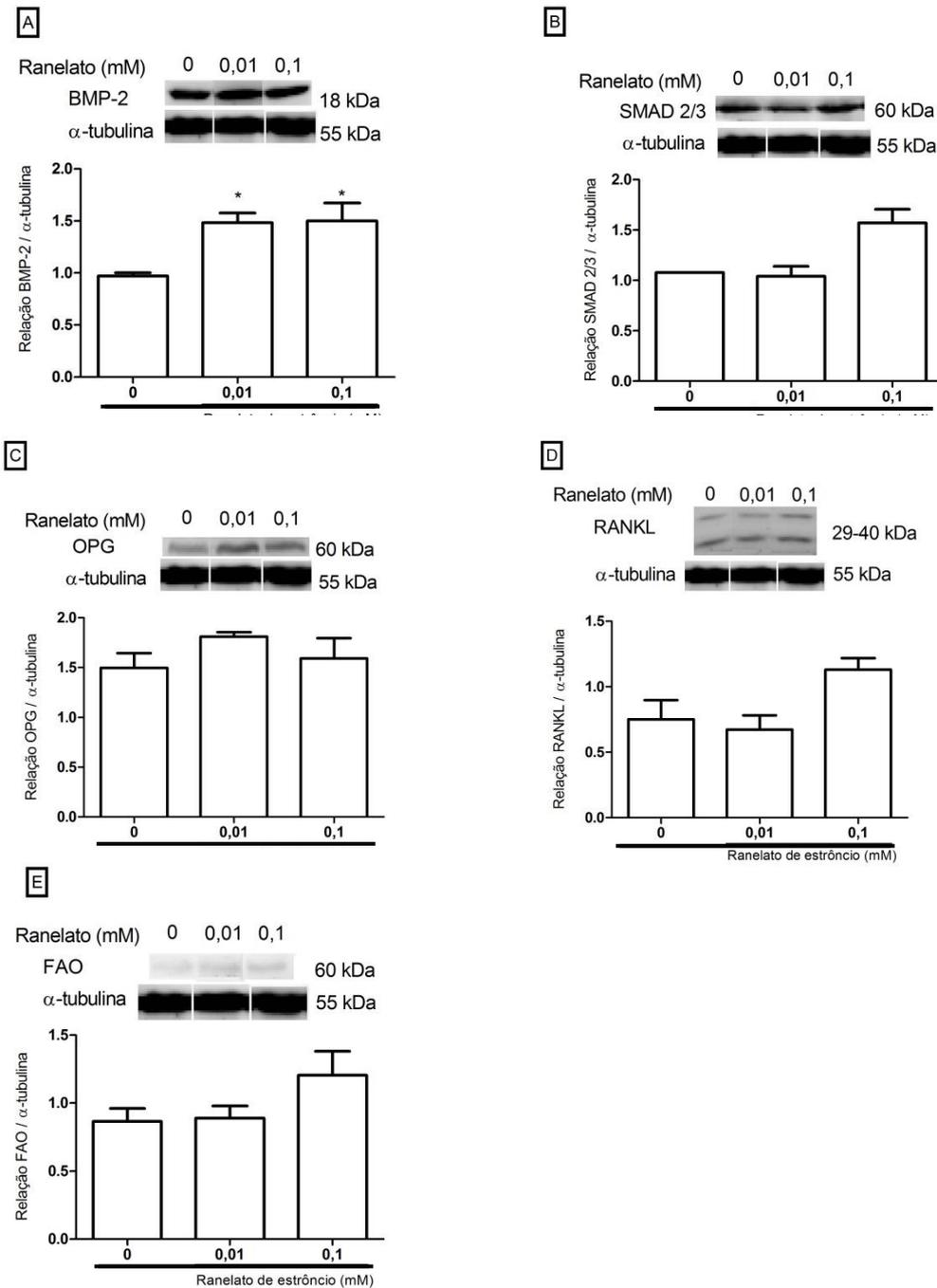
Fonte: da pesquisa. As células foram imunocoradas utilizando DAPI (azul) e Ki67 (verde).

5.2 Expressão proteica de BMP-2, SMAD 2/3, OPG, RANKL e FAO

As expressões protéicas de BMP-2, SMAD2/3, OPG, RANKL e FAO em osteoblastos murinos tratados com ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, foram investigadas através de Western Blot, e encontram-se representadas nas figuras 10 e 11, que mostram os resultados obtidos após o período de 24 e 48 h de incubação, respectivamente. A figura 10A mostra que a incubação dos osteoblastos, por 24 h, com 0,01 ou 0,1 mM de ranelato de estrôncio resultou no aumento significativo da expressão protéica de BMP-2 ($p < 0.05$). Efeito oposto foi encontrado quando essas células foram incubadas com ranelato de estrôncio (0,01 ou 0,1 mM) por 48 h, o que resultou na diminuição da expressão de BMP-2 (Figura 10B).

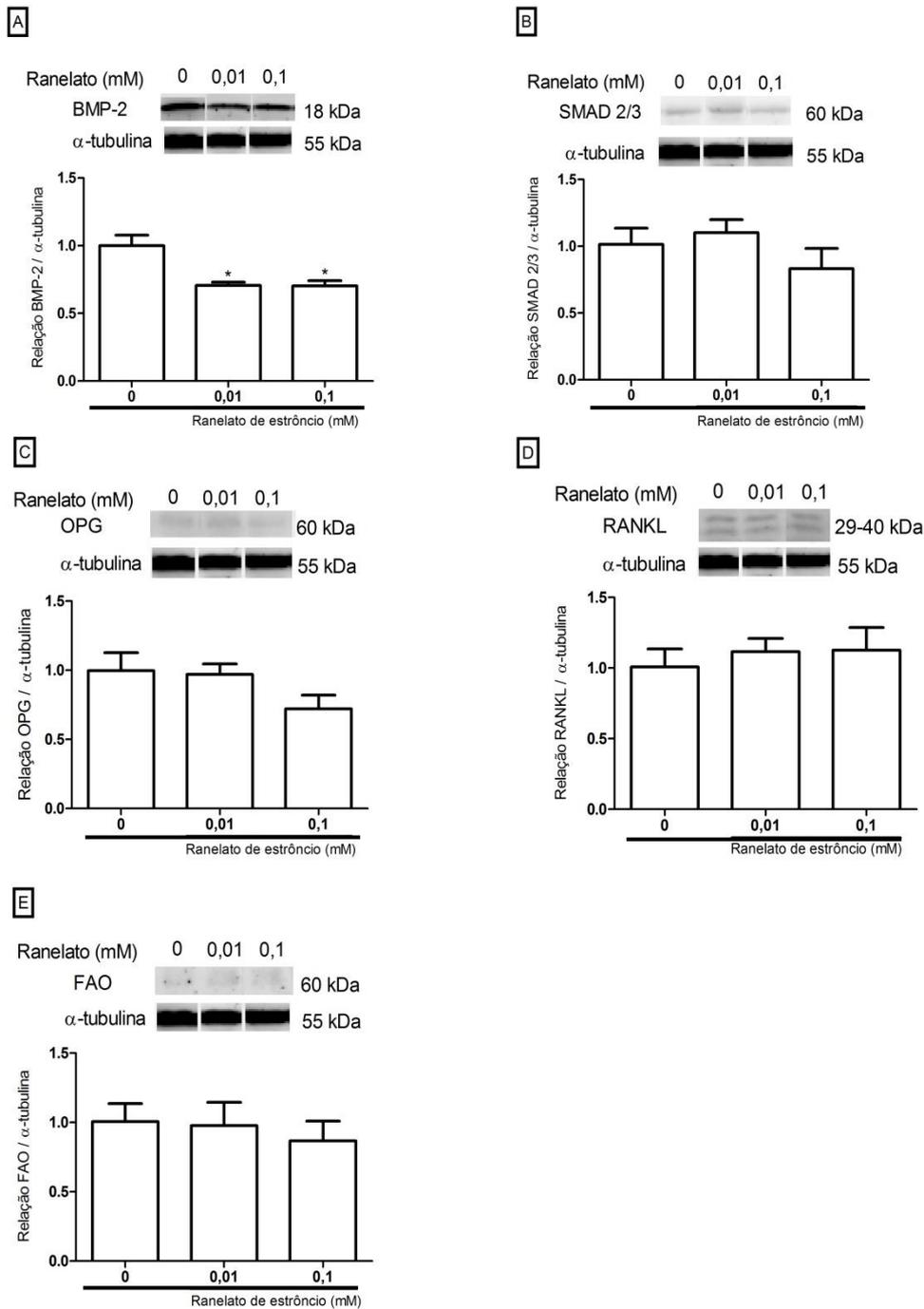
A incubação de osteoblastos com ranelato de estrôncio, por 24 ou 48 h, não induziu nenhuma alteração na expressão protéica de SMAD2/3 (10B, 11B), OPG (10C, 11C), RANKL (10D, 11D) ou FAO (10E, 11E), quando comparada aos respectivos grupos controles.

Figura 10 - Efeito do ranelato de estrôncio na expressão protéica da BMP2 (A), SMAD2/3 (B), OPG (C), RANKL (D) e FAO (E) após 24 h de incubação



Fonte: da pesquisa. Grupo controle (0) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição de ranelato de estrôncio (0) . *P<0,05 em relação ao controle. ANOVA. As células foram incubadas por 24h em meio contendo RE a 0,01 e 0,1 mM. Os asteriscos indicam diferença

Figura 11 - Efeito do ranelato de estrôncio na expressão protéica da BMP2 (A), SMAD2/3 (B), OPG (C), RANKL (D) e FAO (E) após 48 h de incubação.

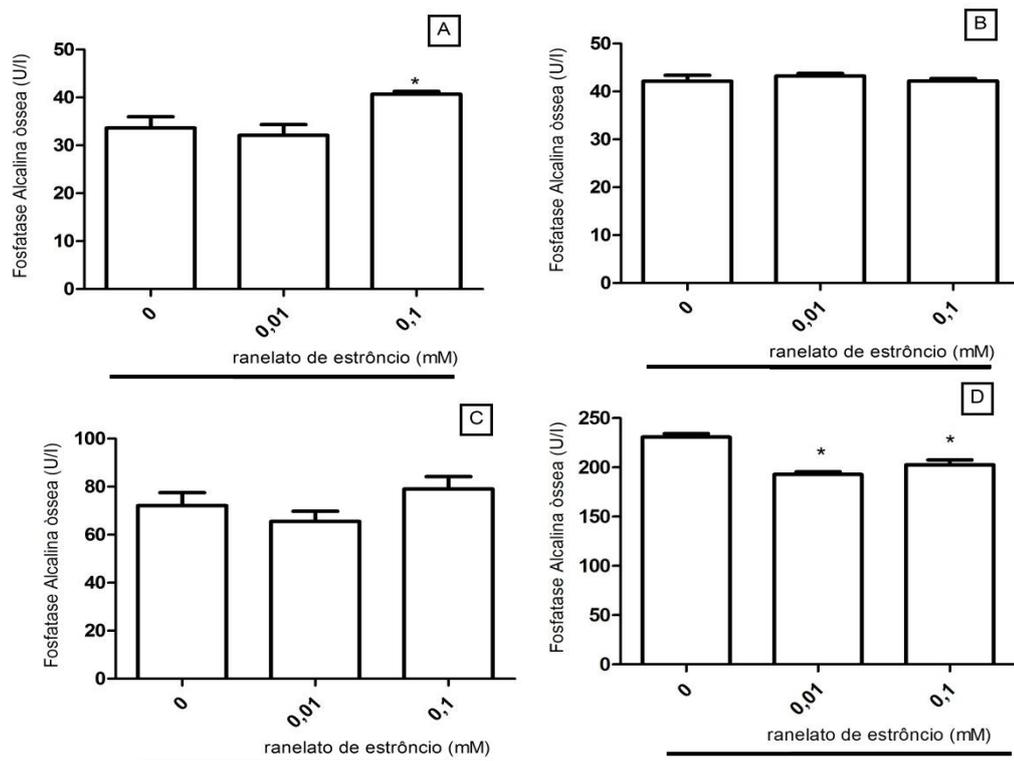


Fonte: da pesquisa. Grupo controle (0) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição de ranelato de estrôncio (0) . * $P < 0,05$ em relação ao controle. ANOVA. As células foram incubadas por 48h em meio contendo RE a 0,01 e 0,1 mM. Os asteriscos indicam diferença significativa do respectivo controle ($p < 0,05$).

5.3 Atividade de Fosfatase Alcalina no meio de cultura

A figura 12 ilustra a quantificação, por ELISA, da atividade de fosfatase alcalina óssea (FAO), no meio de cultura de osteoblastos incubados com ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 01 mM, por 24, 48, 72 e 120h. Observou-se um aumento significativo ($P<0,05$) da atividade de FAO no grupo de células tratadas com 0,1 mM de ranelato de estrôncio por 24h (figura 12A), quando comparado ao grupo controle. Não se observou alteração na atividade de fosfatase alcalina, detectada no meio de cultura, quando os osteoblastos foram incubados com ranelato de estrôncio por 48 (B), 72 (C) ou 120 h (D), em relação aos respectivos controles.

Figura 12 - Efeito do ranelato de estrôncio nos níveis de Fosfatase Alcalina óssea nos meios de cultura de osteoblastos murinos (FCOL II) incubados com ranelato de estrôncio durante 24 (A), 48 (B), 72 (C) e 120 (D) horas.

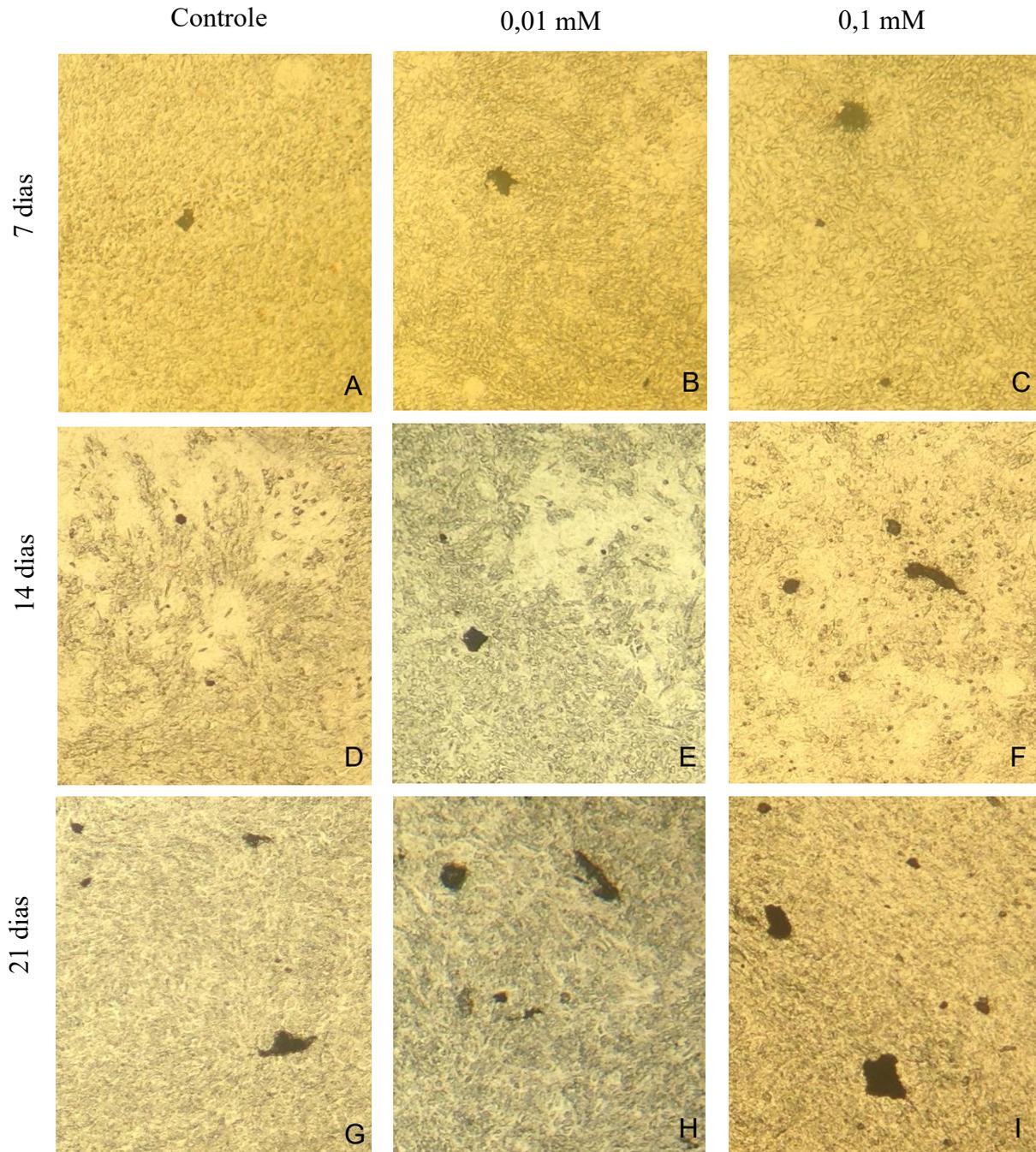


Fonte: da pesquisa. Grupo controle (0) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição de ranelato de estrôncio (0). * $P<0,05$ em relação ao controle. ANOVA, Bonferroni

5.4 Mineralização

A figura 13 ilustra os nódulos de mineralização presentes nas culturas de osteoblastos incubados com ranelato de estrôncio, evidenciados por coloração de Von Kossa. Observou-se que a incubação de osteoblastos murinos com ranelato de estrôncio, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, por 7 (Figuras 13B e 13C) , 14 (Figuras 13E e 13F) ou 21 dias (Figuras 13H e 13I), resultou na maior formação de nódulos minerais, quando comparado aos respectivos grupos controles (Figuras 13A, 13D E 13G), sugerindo maior atividade dessas células, especialmente nos períodos de 14 e 21 dias, sendo a concentração de 0,1 mM a que apresentou maior efeito neste ensaio de mineralização (Figuras 13A, 13D e 13G).

evidenciado por coloração de Von Kossa em osteoblastos murinos (OFCOL II) após os períodos de 7, 14 e 21 dias de incubação com RE nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM adicionado ao meio de cultura.



Fonte: da pesquisa. Coloração por Von Kossa o incremento na presença de nódulos de fosfato (em reto) nas amostras tratadas com ranelato de estrôncio em relação aos controles (apenas meio de cultura). Aumento original de 40x.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo faz parte de um extenso trabalho de pesquisa que busca o desenvolvimento de biomateriais para o reparo ósseo, trazendo novo enfoque nas perspectivas de tratamento para 1. acidentes com fraturas ósseas, 2. doenças degenerativas e congênitas, que resultam em sequelas ósseas, que comprometem a função /ou estética, ou ainda 3. em enxertos ósseos para colocação de implantes dentários ou para o reparo de defeitos faciais. Em grandes defeitos ósseos, faz-se importante a utilização de fármacos que atuem positivamente no metabolismo do tecido ósseo, acelerando o reparo tecidual. Nessas situações, a terapia local, com implantação de arcabouços biodegradáveis associados a estes fármacos, é fundamental para diminuir o tempo de cicatrização e permitir o reparo ósseo de forma completa. O ranelato de estrôncio (RE) é um forte candidato para esse tipo de terapia, tendo em vista seus efeitos sistêmicos positivos observados no tecido ósseo. Acreditamos no potencial terapêutico da associação do RE a esponjas de colágeno, desenvolvidas e caracterizadas por nosso grupo (VERÍSSIMO et al., 2010; VERÍSSIMO et al., 2015). A utilização desse biomaterial permitirá a liberação gradativa e local do fármaco, com menos efeitos adversos indesejáveis, além de conferir proteção física para a área do defeito, contra a proliferação e invasão de tecidos moles circundantes, delimitando a osteogênese no contorno ósseo desejado. Ademais, dados da literatura demonstram que arcabouços de colágeno estimulam a adesão e proliferação de osteoblastos (CHEN et al., 2006). Baseado nestes achados, decidimos investigar no presente trabalho, o efeito direto do RE na proliferação e ativação de osteoblastos em cultura.

O uso do RE para o tratamento da osteoporose, administrado por via oral, já é bem estabelecido. O RE é um sal de ácido ranélico (parte inativa, importante para a sua absorção) com dois átomos de estrôncio em cada molécula, que correspondem à parte biologicamente ativa. O estrôncio é um elemento químico muito semelhante ao cálcio e ao magnésio (Souza et al., 2010). Estas semelhanças fazem o organismo confundi-los tanto na absorção intestinal quanto em sua participação no cristal de hidroxiapatita. Além de incorporar-se aos cristais ósseos, evidências apontam para um duplo mecanismo de ação do RE, que consiste no aumento da diferenciação e atividade dos osteoblastos e diminuição da formação e ativação de osteoclastos (NARDONE; D'ASTA; BRANDI, 2014). Ademais, efeitos apoptóticos do RE tem sido demonstrados em osteoclastos (CAUDRILLIER *et al.*,

2010). Em um estudo recente, Karakan *et al.* (2017) pesquisaram o efeito do RE sistêmico no tratamento de periodontite induzida em ratos. Utilizaram doses compatíveis com as utilizadas em humanos, 300, 625 e 900 mg/Kg, e verificaram que houve uma redução da atividade de osteoclastos, constatada pela menor perda do osso alveolar, efeito provavelmente mediado pela diminuição de RANKL. No entanto, os dados obtidos não permitiram relacionar os efeitos benéficos do RE a ativação de osteoblastos.

Estudos recentes de Milat e Ebeling (2016) sugerem que o efeito benéfico do RE no reparo ósseo não é predominantemente mediado por osteoblastos. Demonstramos no presente trabalho, no entanto, efeitos positivos do RE em osteoblastos murinos, evidenciados pelo aumento na proliferação e atividade dessas células. Para avaliação da citotoxicidade do RE, concentrações entre 0,01 e 10 mM foram selecionadas. Apenas as maiores concentrações de RE testadas no presente estudo mostraram-se citotóxicas no ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio, MTT, normalmente utilizado para determinar a viabilidade celular, quantificando o quanto de MTT presente no meio foi reduzido pela atividade metabólica celular ligada ao NADP e NADPH, formando cristais de formazan, de cor azul. Dessa maneira, a quantidade de formazan, medido por espectrofotometria, é diretamente proporcional ao número de células viáveis (MOSMANN,1983; LOBNER,2000). Este teste permite avaliar, ainda, a taxa de proliferação celular, aonde alta taxa de absorvância, maior do que o controle, sugere um crescimento na proliferação das células. No presente estudo, observamos o efeito proliferativo do RE, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM, em osteoblastos, após 24 horas de cultivo. Por esse motivo, selecionamos estas concentrações para os demais ensaios realizados em nosso trabalho. Vale ressaltar que o efeito proliferativo do RE não foi observado no ensaio MTT, após 48 h de cultivo celular, apesar das células se manterem viáveis em relação ao controle. Recentemente, um estudo *in vitro* utilizando osteoblastos murinos (linhagem diferente da utilizada no presente estudo), realizado por Almeida e colaboradores (2016), demonstrou, através do MTT, que concentrações de 0,05 e 0,1 mM de RE não são tóxicas para os osteoblastos, resultado semelhante aos nossos. No entanto, ao contrário de nossos achados, essas mesmas concentrações de RE, não foram capazes de induzir a proliferação dos osteoblastos, em nenhum dos tempos avaliados (24, 48, ou 72 h). Observaram, ainda, diminuição na viabilidade e proliferação dessas células, quando incubadas

com a concentração de 0,5 mM de RE, efeito não encontrado no nosso estudo na concentração 0,1mM. O nosso trabalho também não corrobora com os trabalhos relatados na literatura, que apontam efeito positivo do RE, nas concentrações de 1 a 10 mM, na proliferação de osteoblastos (Caverzasio, 2008; Caverzasio, Thouverey, 2011; Querido et al., 2015). Ao contrário, observamos no presente estudo que a incubação de osteoblastos com essas concentrações de RE resultaram em diminuição significativa da viabilidade celular em relação do controle. Acreditamos que essas diferenças devam-se à linhagens celulares diferentes.

A fim de confirmar os achados do MTT relacionados com a proliferação celular, realizamos o ensaio de imunomarcação para Ki-67, um marcador estabelecido de proliferação celular, em osteoblastos incubados por 24 e 48 h com RE, nas concentrações de 0,01 e 0,1 mM. Os resultados obtidos confirmam o efeito proliferativo da concentração de 0,01 mM, mas não da concentração de 0,1mM.

Caverzasio (2008) estudou o mecanismo do RE em cultura de células MC3T3-E1, pré-osteoblastos, e C3H10T1/2, células mesenquimais pluripotentes pelo ensaio de Western Blot. Concluiu que o RE aumenta a proliferação celular e sugeriu que o efeito da droga relacionado a este efeito poderia ser por dois mecanismos: devido a interação do RE com os receptores sensíveis de cálcio (CaSR), que possui uma ação mais rápida, ou por liberação de fator de crescimento autócrino regulado pelas vias PKC / PKD ou p38, que possui uma ação mais retardada. Em outro estudo mais recente realizado por Caverzasio e Thouverey (2011) em células MC3T3-E1 e osteoblastos primários, foi sugerido que a maior parte dos efeitos do RE sobre essas células foram através da ativação dos Receptores de Fator de Crescimento de Fibroblastos (FGFRs) pelo íon estrôncio, porém, independente da ativação dos CaRS, indicando assim, um novo mecanismo para a ativação para a estimulação e formação óssea.

A fim de avaliar o efeito do RE na ativação de osteoblastos, o presente estudo investigou, por Western Blot, seu efeito na expressão protéica de fosfatase alcalina óssea (FAO) em osteoblastos, além de dosar, por ELISA, os níveis desta proteína no meio de cultura. A FAO, marcador da atividade de osteoblastos, é uma enzima importante no processo de mineralização óssea e está envolvida, principalmente, na primeira fase desse processo (WITTKOWSKE *et al.* 2016). Observamos que a incubação de osteoblastos com o RE, nas concentrações de 0,01 e 0,1mM, resultou no aumento significativo dos níveis de FAO no meio de

cultura, após 24 h de incubação. Ao contrário do esperado, não observamos um aumento significativo da expressão de FAO nos osteoblastos tratados com RE em relação ao controle nos outros períodos. As associações destes dados nos levam a especular que possíveis diferenças na expressão protéica de FAO entre as células tratadas com RE e as células controle, possivelmente seriam detectadas por Western Blot, realizados em um período inferior a 24 h, considerando os níveis significantes de FAO, mensurados no meio de cultura neste período. De acordo com nosso estudo, uma pesquisa *in vitro* recente, realizada com osteoblastos, linhagem MC3T3E1, constatou que o íon estrôncio aumentou a produção de colágeno e FAO (FERNANDEZ *et al.* 2014).

O aumento dos níveis de FAO, observado apenas no período de 24 h, associado aos dados de proliferação, obtidos no presente estudo, reforçam a necessidade da liberação lenta e contínua de RE como uma abordagem terapêutica para o reparo ósseo. Baseado nessa hipótese, decidimos avaliar o efeito do RE na ativação de osteoblastos, por coloração de Von Kossa para a identificação de depósitos de sais de cálcio nas culturas, após 7, 14 e 21 dias de cultivo celular. Neste ensaio, no entanto, ao contrário dos demais realizados no presente trabalho, o meio de cultura (com ou sem RE) era trocado a cada 48h, para mimetizar a entrega local constante de RE ao osso em processo de reparo. Observamos um aumento importante no processo de mineralização nos grupos de células tratadas com RE. Observamos, ainda, que o RE acelera esse processo, uma vez que nódulos de calcificação estão presentes em maior número nas células incubadas com RE, principalmente na concentração de 0,1 mM, em relação ao grupo controle de células, incubadas apenas com o meio, sem RE. Ao término do 21º dia, observou-se também que as duas concentrações de RE induziram aumento expressivo da mineralização quando comparados aos respectivos grupos controles. O RE, localizado na região extra celular pode interagir diretamente com a FAO, presente no interior de vesículas ou não, expressa pelos osteoblastos e influenciar o processo de mineralização (FERNANDEZ *et al.* 2014). De acordo com nossos dados, o estudo realizado por Querido e Farina (2013) em cultura de osteoblastos de camundongos, demonstrou que 0,5 mM de RE aumentou o processo de mineralização e que a incorporação do íon estrôncio na matriz mineralizada é dose dependente. Os autores sugerem que, sobre a superfície mineralizada, possam ocorrer trocas iônicas do cálcio pelo estrôncio e este último passe a ser incorporado pela matriz

mineralizada. Essa incorporação pode levar a algumas mudanças nas propriedades da matriz óssea, como na maturação e no tamanho dos cristais. De fato, estudos clínicos em humanos sugerem a atuação do estrôncio, proveniente do RE, na estimulação óssea, com aumento do número, espessura e volume trabecular, sem prejudicar a qualidade óssea e a mineralização, por isso não deixa defeito no conteúdo mineral. Além da formação de osso endosteal, este fármaco estimula a produção de osso periosteal, o que melhora a macroarquitetura e a resistência do osso (ARLOT et al., 2008). A preservação da arquitetura óssea e aumento da resistência mecânica óssea após 6 ou 12 meses de tratamento com RE foi demonstrada em estudos com biópsias ósseas por meio de histomorfometria e microtomografia óssea (CHAVASSIEUX et al., 2011; REGINSTER et al., 2009). Em estudos mais recentes, com a tomografia computadorizada quantitativa periférica de alta resolução, foi observado que o RE foi mais eficaz na formação de osso novo cortical e trabecular do que o alendronato (RIZZOLI, 2010).

Vale ressaltar, que estudos em cultura primária de osteoblastos oriundos da calvária de ratos e de células percussoras de osteoclastos da medula óssea, mostraram que a oferta constante de estrôncio, nas concentrações de 10 μ M, 100 μ L e 1mM, reduziu os níveis de mineralização, em aproximadamente 59, 98 e 100%, respectivamente, após 3, 7, 10 e 14 dias de incubação (WORNHAM *et al.* 2014). Por outro lado, a oferta de estrôncio inibiu o número de osteoclastos, sugerindo um efeito anti-reabsortivo, via osteoclastos.

Em nosso trabalho, o efeito do RE na expressão de BMP2 por osteoblastos foi avaliado por Western Blot, que demonstrou o aumento da expressão protéica de BMP2, de forma significativa, em células incubados com RE por 24 horas, não sendo observado o mesmo efeito nos tempos mais prolongados de incubação, o que reforça a necessidade da entrega constante do fármaco.

Huizhen *et. al* (2013) investigaram os efeitos do RE no processo de diferenciação de osteoblastos, a partir de células mesenquimais indiferenciadas, isoladas do fêmur e tíbia de ratos. Os resultados apontam para um efeito positivo do RE na diferenciação dessas células, com a participação importante de BMP2, pela via SMAD1/5 e RUNX2, fator de transcrição que desencadeia a expressão dos genes relacionados à produção de grande parte das proteínas da matriz óssea e promove diferenciação celular (SUBRAMANIAM *et al.*, 2016). Em outras palavras, a via BMP/SMAD1/5 é importante para a ativação do gene RUNX2 promovendo,

assim, a diferenciação e a formação óssea (Zheng *et al* 2017). Concluíram também que as doses entre 0,1 e 5 mM aumentaram de forma significativa a expressão desse gene. Esse trabalho corrobora com nossos achados, pois a dose de 0,1 mM de RE também aumentou de forma significativa a expressão de BMP2 em osteoblastos. Diferente deste estudo, avaliamos o efeito do RE na ativação de osteoblastos já diferenciados, sugerindo a participação de BMP2 na ativação dessas células. A associação desses resultados aponta novamente para o potencial terapêutico da liberação local de RE, diretamente no defeito ósseo, devido seu efeito dual 1. na diferenciação de células indiferenciadas, presentes no perióstio e endóstio e/ou 2. nos osteoblastos já existentes e diferenciados, liberando BMP2 e potencializando o processo de reparo ósseo.

Drogas que estimulam a liberação de BMP2 pelas células já existentes no tecido ósseo podem ser uma alternativa com menor custo para futuros tratamentos de defeitos ósseos, pois a BMP2 na forma recombinante humana (rhBMP2), que está sendo utilizadas em tratamentos de defeitos ósseos de coluna vertebral, ossos longos e ossos da face, já apresentam resultados excelentes, porém, com um custo muito elevado. Em uma revisão sistemática realizada por Freitas *et al.* (2015) na utilização de rhBMP2 para aumento de rebordo ósseo alveolar e enxerto em seios maxilares, foi concluído que a BMP parece ser uma alternativa muito promissora aos enxertos autógenos que causam mais morbidades.

A via TGF- β /SMAD2/3 também é uma sinalização importante em osteoblastos. Estudos apontam que essa via ativa e aumenta a produção de matriz, promove a diferenciação celular em osteoblastos e reduz a liberação de RANKL pelos osteoblastos (CHEN; DENG; LI, 2012). Em nosso trabalho, o RE não promoveu mudanças significativas na expressão protéica de SMAD2/3 e de RANKL. Nesse contexto, podemos sugerir que a via TGF- β /SMAD2/3 não sofre influência do RE em monocultura de osteoblastos. A BMP e TGF- β estão relacionadas com a ativação do gene TIEG1, a partir das ativações e translocações das SMADs1/5 e 2/3, respectivamente, para o núcleo, que, por sua vez, modula a expressão do gene Osterix, induzindo o processo de formação óssea (SUBRAMANIAM *et al.*, 2016).

Quando se discute o processo de remodelação óssea, não podemos deixar de falar que a razão OPG/RANKL é o complexo mais importante envolvido e quando essa razão aumenta, favorece a regeneração óssea, porém, quando a razão diminui, favorece a reabsorção óssea (SILVA, BRANCO, 2009). Em uma revisão de

literatura, Querido, Rossi e Farina (2016) afirmaram que, indiretamente, o RE reduz a reabsorção óssea diminuindo a liberação de RANKL e aumentando a liberação de OPG por meio da ativação dos CaRS nos osteoblastos. No entanto, em nosso trabalho, não foi observado mudanças significativas na expressão protéica de RANKL e OPG nos osteoblastos tratados com RE nas concentrações 0,1 e 0,1 mM nos períodos de 24 e 48 horas. Em outras palavras, o RE não influenciou no equilíbrio formação/reabsorção óssea através da sinalização OPG/RANKL. É válido ressaltar que o nosso trabalho foi realizado em monocultura cultura de osteoblastos diferenciados, portanto, as células não estão inseridas dentro de um sistema fisiológico e não sofrem influência de outros tipos celulares.

Utilizar o RE, como um potencial indutor para a liberação de BMP através dos osteoblastos, associado a um biomaterial que promova a osteocondução pode ser uma alternativa no futuro para sua utilização em grandes defeitos ósseos com um custo mais acessível. É nesse contexto que continuaremos os estudos *in vivo* utilizando o RE e associaremos à biomateriais osteocondutores.

7 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem um efeito positivo do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos, possivelmente devido a maior expressão de BMP, FAO e aumento da mineralização pelos osteoblastos. Desse modo, estudos promissores podem ser realizados com o ranelato de estrôncio com o seu emprego na regeneração de defeitos ósseos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. M. *et al.* Strontium ranelate increases osteoblast activity. **Tissue and Cell**, [S.l.], v. 48, n. 3, p. 138-188, jun. 2016.
- ANDERSEN, T. L. *et al.* A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. **American Journal of Pathology**, [S.l.], v. 174, n. 1, p. 239-47, jan. 2009
- APOSTU, D. *et al.* Systemic Drugs That Influence Titanium Implant Osseo integration. **Drug Metabolism Reviews**, United Kingdom, v. 23, p. 1-16, jan. 2017.
- ARLOT, M. E. *et al.* Histomorphometric and microCT analysis of bone biopsies from postmenopausal osteoporotic women treated with strontium ranelate. **Journal of Bone and Mineral Research**, New York, v. 23, n. 2, p. 215-22, 2008.
- ATKINS, G. J. *et al.* Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. **Osteoporis International**, [São Francisco], v. 20, n. 4, p. 653-64, apr. 2009.
- BRENNAN, T. C. *et al.* Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. **British Journal Pharmacology**, [Oxford], v. 157, n. 7, p. 1291-300, aug. 2009.
- CAETANO-LOPES, J.; CANHÃO, H.; FONSECA, J. E. Osteoblasts and bone formation. **Acta Reumatologia Portuguesa**, Algés, v. 32, n. 2, p. 103-10, 2007 apr./jun. 2007.
- CANALIS, E. *et al.* The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell replication and bone formation in vitro. **Bone**, [S.l.], v. 18, n. 6, p. 517-23, jun. 1996.
- CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [Washington], v. 561, p. 3-12, nov. 2014.
- CAUDRILLIER, A. *et al.* Strontium ranelate decreases receptor activator of nuclear factor-KB ligand-induced osteoclastic differentiation in vitro: involvement of the calcium-sensing receptor. **Molecular Pharmacology**, [Washington] v. 78, n. 4, p. 569-76, oct. 2010.
- CAVERZASIO, J. Strontium ranelate promotes osteoblastic cell replication through at least two different mechanisms. **Bone**, [S.l.], v.42, p.1131–1136, 2008.
- CAVERZASIO, J.; THOUVEREY, C. Activation of FGF Receptors is a new Mechanism by which Strontium Ranelate Induces Osteoblastic Cell Growth. **Cellular Physiology and Biochemistry**, Switzerland, v. 27, n. 3/4, p. 243-250, apr. 2011.
- CHATTOPADHYAY, N. *et al.* The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in

strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. **BiochemPharmacol**, [Chicago],v. 74, n. 3, p. 438-47, aug. 2007.

CHAVASSIEUX, P. *et al.* Bone histomorphometry of transiliac paired bone biopsies after 6 or 12 months of treatment with oral strontium ranelate in 387 osteoporotic women: randomized comparison to alendronate. **Journal of Bone and Mineral Research, Washington**, v. 29, n. 3, p. 618-628, 2014.

CHEN, Y.; *et al.* PLLA scaffolds with biomimetic apatite coating and biomimetic apatite/collagen composite coating to enhance osteoblast-like cells attachment and activity. **Surf. Coat. Technol.**, v. 201, n.3- 4, p.575-80, 2006.

CHEN, G.; DENG, C.; LI, Y. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation.**International Journal of Biological Sciences**, Macau,v. 8, n. 2, p. 272-288, 2012.

CHOUDHARY, S.*et al.* Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. **Journal of Bone and Mineral Research**, [Malden], v. 22, n. 7, p. 1002-10, jul. 2007.

CIANFEROTTI, L.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L.A review on strontium ranelate long-term antifracture efficacy in the treatment of postmenopausal osteoporosis.**Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease**, [S./],v. 5, n. 3, p. 127-39, jun. 2013.

CROCKETT, J. C. *et al.* Bone remodelling at a glance. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v. 124, n. Pt 7, p. 991-8, apr. 2011.

DALLAS, S. L. *et al.* The osteocyte: an endocrine cell ... and more. **Endocrine Reviews**, Washington, v. 34, n. 5, p. 658-90, oct. 2013.

DOWNEY, P. A.; SIEGEL, M. I. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis.**Physical Therapy**, [S./], v. 86, n. 1, p. 77-91, jan. 2006.

FERNANDEZ, J.M. *et al.* Strontium ranelate stimulates the activity of bone-specific alkaline phosphatase: interaction with Zn²⁺ and Mg²⁺. **Biomaterials**, [Alemanha], v. 27, p. 601-607, 2014.

FLORENCIO-SILVA, R.*et al.* Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Research International**, [Cairo],v. 2015, p. 421746, 2015.

FROMIGUÉ, O. *et al.* Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate.**Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S./], v. 13, n. 88, p. 2189-99, aug. 2009.

FREITAS, R. M. *et al.* Alveolar ridge and maxillary sinus augmentation using rhBMP-2: a systematic review. **Clinical Implant Dentistry and Related Research**, [S./], v.17, n. S1, p. e192–e201, jan. 2015.

HADJIDAKIS D.J.; ANDROULAKIS, I.I. Bone Remodelin. **Annals of the New York Academy of Sciences**. New York, v. 1092, p. 385-96, dec. 2006.

HARADA, S.; RODAN, G. A. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. **Nature**, [Londres], v. 423, n. 6937, p. 349-55, may. 2003.

HUAN, Y. *et al.* Recent advances in nano scaffolds for bone repair. **Bone Research**, [Shanghai], v. 4, n. 16050, 2016.

HUIZHEN, L. *et al.* Strontium ranelate promotes osteogenic differentiation of rat bone mesenchymal stem cells through bone morphogenetic protein-2/Smad signaling pathway. **Journal Southern Medical University**, [S.I.], v. 33, n. 3, p. 376-381, 2013.

HURTEL-LEMAIRE, A. S. *et al.* The calcium-sensing receptor is involved in strontium ranelate-induced osteoclast apoptosis. New insights into the associated signaling pathways. **Journal of Biological Chemistry**, [Rockville], v. 284, n. 1, p. 575-84, jan. 2009.

KARAKAN, N.C. *et al.* Investigating the Effects of Systemically Administired Strontium Ranelate on Alveolar Bone Loss Histomorphometrically and Histopathologically on Experimental Periodontitis in Rats. **Journal of Periodontology**, [S.I.], v. 88, n. 2, p. e24-e31, feb. 2017.

KHOSLA, S.; OURSLER, M. J.; MONROE, D. G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology Metabolism**, [Rockville], v. 23, n. 11, p. 576-81, nov. 2012.

LOBNER, D. Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis? **Journal of Neuroscience Methods**, [S.I.], n. 96, v. 2, p. 147-52, mar. 2000.

MARIE, P. J. Strontium ranelate: a novel mode of action optimizing bone formation and resorption. **Osteoporis International**, [São Francisco], v. 16 Suppl 1, p. S7-10, jan. 2005.

MARTA, M.; PEDRO, E.; ARANCHA, R. G. Molecular Mechanisms In Bone Mechanotransduction. **Histology and Histopathology**, Spain, v. 16, n. 11858, p. 4-30, dec. 2016.

MATSUO, K.; IRIE, N. Osteoclast-osteoblast communication. **Archives of Biochemistry and Biophys**, Texas, v. 473, n. 2, p. 201-9, may. 2008.

MEUNIER, P. J. *et al.* The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. **New England Journal Medicine**, [Massachusetts], v. 350, n. 5, p. 459-68, jan. 2004.

MILAT, F.; EBELING, P. R. Osteoporosis treatment: a missed opportunity. **Medical Journal Australia**, Australia, v. 205, n. 4, p. 185-90, aug. 2016.

MOSS, D.; WHITBY, ??Alkaline phosphatase isoenzymes. Technical and clinical aspects. **Enzyme**, [S./], v. 20, n. 1, p. 20-34, 1975.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S./], v. 65, v. 1-2, dec. 1983.

NARDONE, V.; D'ASTA, F.; BRANDI, M. L. Pharmacological management of osteogenesis. **Clinics**, [Sao Paulo], v. 69, n. 6, p. 438-46, jun. 2014.

QUERIDO, W.; FARINA, M. Strontium ranelate increases the formation of bone-like mineralized nodules in osteoblast cell cultures and leads to Sr incorporation into the intact nodules. **Cell and Tissue Research**, [Alemanha], v. 354, n. 2, p. 573-80, nov. 2013.

QUERIDO, W.; ROSSI, A. L.; FARINA, M. The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. **Micron**, v. 80, p. 122-134, 2016.

RANELATO de estrôncio. **Pubchem**. Disponível em: <<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=6918182>>. Acesso em 08 fev. 2017.

REGINSTER, J. Y. *et al.* Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis with strontium ranelate: results at 8 years. **Bone**, New York, v. 45, n. 6, p. 1059- 1064, 2009.

RIZZOLI, R. Beneficial effects of strontium ranelate compared to alendronate on bone micro structure: a 2-year study. **Osteoporosis International**, London, v. 21, p. S25-S388, 2010. Suppl. 1.

SAIDAK, Z.; MARIE, P. J. Strontium signaling: molecular mechanisms and therapeutic implications in osteoporosis. **Pharmacol & Therapeutics**, Oxford, v. 136, v. 2, p. 216-26, nov. 2012.

SIMONET, W. S. *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell Press**, Cambridge, v. 89, n. 2, p. 309-19, apr. 1997.

SILVA, I.; BRANCO, J.C. Rank/rankl/opg: literature review. **Acta reumatológica portuguesa**, [Lisboa], v. 36, p. 209-218, 2011

SIMS, N. A.; GOOI, J. H. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. **Seminars in Cell and Developmental**

Biology, [S.I.] v. 19, n. 5, p. 444-51, oct. 2008.

SUBRAMANIAM, M. *et al.* TIEG1 enhances Osterix expression and mediates its induction by TGF β and BMP2 in osteoblasts. **Biochemical Biophysical Research Communications**, [Pádua], v. 470, n. 3, p. 528-33, feb. 2016.

TROUVIN, A. P.; GOËB, V. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand and osteoprotegerin: maintaining the balance to prevent bone loss. **Journal Clinical Interventions Aging**, [Rockville], v. 5, p. 345-54, nov. 2010.

VALENTI, M.T.; CARBONARE, L.D.; MOTTES, M. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. **International Journal Molecular Sciences**, Basel, v. 18, n. 1, p. 41, 2017.

VERÍSSIMO *et al.* Guided bone regeneration produced by new mineralized and reticulated collagen membranes in critical-sized rat calvarial defects. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 240, n. 2, p. 175–184, 2015.

VERÍSSIMO *et al.* Polyanionic collagen membranes for guided tissue regeneration: Effect of progressive glutaraldehyde cross-linking on biocompatibility and degradation. **Acta Biomaterialia** V. 6, n. 10, p. 4011–4018, 2010.

WITTKOWSKE, C. *et al.* *In Vitro* Bone Cell Models: impact of Fluid Shear Stress on Bone Formation. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Switzerland, v. 4, n. 87, nov. 2016.

WORNHAM, D.P. *et al.* Strontium potently inhibits mineralisation in bone-forming primary rat osteoblast cultures and reduces numbers of osteoclasts in mouse marrow cultures. **Osteoporos International**, [S.I.], v. 25, p. 2477-2484, 2014.

ZHENG *et al.* Cystathionine γ lyase-hydrogen sulfide induces RUNX 2 sulhydration thereby increasing osteoblast activity to promote bone fracture healing. **Antioxid Redox Signal**. Beijing, Feb. 2017.