

**ESTUDO DOS EFEITOS DOS BIFOSFONATOS NA  
ANGIOGÉNESE/OSTEOGÉNESE DO TECIDO  
ÓSSEO: AVALIAÇÃO *IN VITRO* EM  
CO-CULTURAS DE OSTEOLASTOS E CÉLULAS  
ENDOTELIAIS**

*Dissertação para obtenção de grau de Mestre*

Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial

**VIVIANA PINTO RIBEIRO**



UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO DOURO

VILA REAL, 2011

*“ Só sabemos com exactidão quando sabemos pouco.*

*À medida que vamos adquirindo conhecimentos, instala-se a dúvida.”*

Johann Goethe

## AGRADECIMENTOS

Após a realização desta dissertação de mestrado, gostaria de agradecer a todos aqueles que directa ou indirectamente influenciaram e contribuíram para a sua realização.

À Professora Doutora Ana Cristina Sampaio, Directora do Mestrado em Biologia Clínica Laboratorial, agradeço a dedicação ao Mestrado e a oportunidade que tive em frequentá-lo, que de diversas formas contribuiu para a minha formação académica, científica e pessoal.

À *Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto*, em especial ao *Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular*, instituição científica onde este projecto foi realizado, agradeço por todas as facilidades disponibilizadas para a realização desta tese de mestrado.

Ao Professor Doutor Bruno Colaço, o meu sincero agradecimento por ter aceitado ser meu orientador neste projecto. Muito obrigado pela revisão cuidada desta dissertação de mestrado, por ter acreditado nas minhas capacidades, pela total disponibilidade, interesse, preocupação, profissionalismo, amizade e simpatia que sempre demonstrou.

À Professora Doutora Maria Helena Fernandes, expresse o meu sincero agradecimento pela co-orientação da minha tese, por permitir a integração e realização deste projecto no seu grupo de investigação, pelos conhecimentos científicos, críticas e sugestões que me proporcionou durante a realização deste trabalho. Agradeço também pela confiança em mim depositada, pelo profissionalismo, competência, total disponibilidade e interesse demonstrados em todas as fases deste projecto.

À Mónica Garcia e aos restantes membros da equipa de investigação, um especial muito obrigado pelos bons momentos passados ao longo deste ano, pelo incentivo que sempre me deram, exemplo de trabalho, ensinamentos prestados, total disponibilidade, paciência e compreensão cedidos ao longo do meu estágio.

À Raquel Oliveira e Raquel Castelo Branco, não há palavras que descrevam o meu agradecimento pelo trabalho em equipa, pelas conversas, rizadas nos momentos de relaxamento e lágrimas nos momentos difíceis, pelo companheirismo, paciência e compreensão, pela grande AMIZADE já construída e agora descoberta. Por tudo, muito obrigado!

Aos meus amigos de licenciatura e mestrado, agradeço por todos os momentos bons e menos bons partilhados, pela entreaajuda, espírito de grupo e recordações para toda a vida.

Aos amigos de longa data, sempre presentes, preocupados e compreensivos quanto às minhas frustrações e alegrias, um muito obrigado pelo carinho e amizade de sempre.

Ao Vitor, um agradecimento muito especial por todo o carinho, apoio, paciência, amizade, força e confiança incondicional. Obrigado por tudo!

A toda a minha família, à minha irmã e cunhado, um enorme muito obrigado pelo apoio, disponibilidade, preocupação e atenção. À minha mãe um especial agradecimento pela força, compreensão, paciência, apoio incondicional, confiança e pela possibilidade da minha formação académica. Peço desculpa pela ausência e falta de paciência que a ansiedade me trouxe. Aquilo que hoje sou a ti o devo, por isso, a ti dedico este trabalho.

## RESUMO

A relação entre os processos de osteogénese e angiogénese, regulada pelas interacções existentes entre as células osteoblásticas e as células endoteliais, respectivamente, é crucial para a manutenção da integridade do tecido ósseo. A formação óssea é sempre precedida pela invasão vascular, uma vez que a osteogénese ocorre na proximidade dos vasos sanguíneos recentemente formados. Desta forma, as propriedades anti-angiogénicas dos bifosfonatos (BPs) podem ter efeitos directos na actividade das células osteoblásticas, contribuindo para a diminuição da formação óssea. No entanto, o exacto mecanismo pelo qual os bifosfonatos afectam as interacções existentes entre estes dois processos no tecido ósseo é desconhecido.

No presente estudo, analisamos os efeitos do alendronato e do zoledronato no comportamento de células osteoblásticas e de células endoteliais humanas, em sistema de monocultura e co-cultura.

As células da linha osteoblástica humana MG63 e as células endoteliais humanas, provenientes da microvascularização dérmica (HDMECs), foram cultivadas durante 14 dias, em meio de cultura específico, na ausência (controlo) e na presença do alendronato e do zoledronato, nas concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M. Avaliou-se a viabilidade/proliferação celular pelo ensaio colorimétrico MTT, o impacto dos compostos nas características fenotípicas celulares foi avaliado pela visualização celular, utilizando uma coloração imunofluorescente específica, seguida de análise por microscopia laser confocal (CLSM). Recorrendo à técnica de RT-PCR fez-se a caracterização das culturas quanto à expressão génica dos marcadores osteoblásticos ALP, BMP-2 e OPG, e dos marcadores endoteliais CD31 e CAD-VE.

Os resultados obtidos demonstram que as células MG63 em monocultura apresentaram uma proliferação gradual e expressaram os marcadores associados ao fenótipo osteoblástico. As monoculturas de células endoteliais apresentaram um padrão de crescimento típico, com expressão da molécula de adesão CD31. As células MG63 e HDMECs em co-cultura apresentaram uma proliferação crescente e expressaram os marcadores associados ao fenótipo osteoblástico e endotelial. O alendronato e o zoledronato, em todas as concentrações testadas, não interferiram com a proliferação das células MG63, estimulando para as concentrações testadas ( $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M), a expressão dos marcadores osteoblásticos. O mesmo padrão foi observado para a

proliferação das células endoteliais, no entanto, estes compostos causaram uma inibição da expressão dos seus marcadores. Em sistema de co-cultura, o alendronato e o zoledronato, causaram efeitos similares aos obtidos para as células osteoblásticas e para as células endoteliais, cultivadas individualmente.

Assim, através da realização deste estudo, pode concluir-se que a inibição da expressão dos marcadores endoteliais estabelecidos, na presença de concentrações altas e baixas de alendronato e de zoledronato, pode constituir um mecanismo contributivo para a inibição da angiogénese, com eventuais repercussões no processo de formação óssea. Além disso, a exposição destes compostos em sistema de co-cultura de células osteoblásticas e células endoteliais, pode ser importante para clarificar os efeitos dos bifosfonatos na relação entre os processos de osteogénese e angiogénese, *in vivo*.

## ABSTRACT

The interplay between osteogenesis and angiogenesis, regulated by the interactions between osteoblastic and endothelial cells, respectively, is extremely important to maintain skeletal integrity. Bone formation is always preceded by vascular invasion and osteogenesis occurs in the vicinity of the new blood vessels. Thus, the anti-angiogenic properties of bisphosphonates may have direct effects on osteoblastic cells activity, decreasing bone formation events. However, the exact mechanism as bisphosphonates affect the interplay between these two processes in bone tissue is unknown.

This study describes the effects of alendronate and zoledronate on human osteoblastic and endothelial cells behavior, in monoculture and co-culture system.

MG63 osteoblastic-like cells and human dermal microvascular endothelial cells (HDMECs), were cultured for 14 days, in specific culture medium, in the absence (control) and in the presence of alendronate and zoledronate,  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M. Cell viability/proliferation was evaluated by the MTT colorimetric assay, the impact on phenotypic characteristics was assessed by cell visualization, using a specific immunofluorescent staining followed by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and the gene expression characterization of osteoblast and endothelial-associated markers, ALP, BMP-2, OPG, CD31 and CAD-VE, was made by RT-PCR.

The results show that monocultures of MG63 cells proliferated gradually and expressed osteoblast-associated markers. Monocultures of endothelial cells presented a typical pattern of cell growth and expressed the adhesion molecule CD31. Co-cultures of MG63 and HDMECs showed an increased proliferation and expressed osteoblast and endothelial-associated markers. Alendronate and zoledronate, at all tested concentrations did not interfere with MG63 cells proliferation, however, at concentrations of  $10^{-12}$  and  $10^{-6}$  M stimulated the osteoblastic markers expression. The same pattern was observed for endothelial cells proliferation, however, these compounds caused inhibition of the endothelial markers expression. In co-culture system, alendronate and zoledronate caused similar effects to those obtained for osteoblastic and endothelial cells in individual cultures.

Thus, it can be concluded that the inhibition of the endothelial markers expression, in the presence of low and high concentrations of alendronate and

zoledronate, might be a contributing mechanism to an impairment of the angiogenesis, with an eventual repercussion in the bone formation process. Furthermore, these compounds exposure in co-culture system of osteoblastic and endothelial cells may be important to clarify the effects of bisphosphonates in the interplay between osteogenesis and angiogenesis *in vivo*.

# ÍNDICE GERAL

|  |             |
|--|-------------|
| <b>Agradecimentos</b> .....  | <b>iii</b>  |
| <b>Resumo</b> .....  | <b>v</b>    |
| <b>Abstract</b> .....  | <b>vii</b>  |
| <b>Índice Geral</b> .....  | <b>ix</b>   |
| <b>Índice de Figuras</b> .....   | <b>xi</b>   |
| <b>Índice de Tabelas</b> .....   | <b>xiii</b> |
| <b>Lista de Abreviaturas e Símbolos</b> .....                                    | <b>xiv</b>  |
| <br>   |             |
| <b>1. Introdução</b> .....   | <b>1</b>    |
| 1.1. Estrutura e desenvolvimento do osso.....                                    | 1           |
| 1.1.1. Classificação dos ossos.....  | 1           |
| 1.1.2. Anatomia do osso .....  | 2           |
| 1.1.3. Histologia do tecido ósseo .....  | 3           |
| 1.1.3.1. Osso compacto e trabecular.....   | 3           |
| 1.1.3.2. Células do tecido ósseo .....   | 5           |
| 1.1.3.3. Matriz extracelular óssea.....  | 8           |
| 1.1.3.3.1. Matéria orgânica.....   | 9           |
| 1.1.3.3.2. Matéria inorgânica.....   | 12          |
| 1.1.4. Remodelação/reparação óssea .....   | 12          |
| 1.1.4.1. Reguladores de remodelação/reparação óssea .....                        | 14          |
| 1.1.4.2. Angiogénese .....   | 17          |
| 1.2. Bifosfonatos .....  | 19          |
| 1.2.1. Efeitos dos bifosfonatos nos osteoblastos e nas células endoteliais ..... | 22          |
| 1.2.2. Efeitos adversos associados ao uso de bifosfonatos .....                  | 26          |
| <b>2. Objectivos</b> .....   | <b>30</b>   |
| <b>3. Material e Métodos</b> .....   | <b>31</b>   |
| 3.1. Preparação do alendronato e do zoledronato .....                            | 31          |
| 3.2. Cultura de células.....   | 31          |
| 3.2.1. Células da linha osteoblástica humana MG63.....                           | 31          |
| 3.2.2. Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas .....                | 31          |

|  |           |
|--|-----------|
| 3.2.3. Efeitos do alendronato e do zoledronato no comportamento de células MG63 e HDMECs .....                   | 32        |
| 3.2.4. Efeitos do alendronato e do zoledronato na expressão génica de células MG63 e HDMECs .....                | 33        |
| 3.3. Avaliação do comportamento e da expressão génica celular .....  | 35        |
| 3.3.1. Ensaio colorimétrico MTT .....  | 35        |
| 3.3.2. Coloração por imunofluorescência dos filamentos do citoesqueleto de F-actina, CD31 e núcleos .....        | 35        |
| 3.3.3. Extração do RNA total e análise por Reacção em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR)..... | 36        |
| 3.4. Análise estatística .....   | 37        |
| <b>4. Resultados .....</b>   | <b>38</b> |
| 4.1. Efeitos do alendronato e do zoledronato no comportamento de células MG63 e HDMECs .....                     | 38        |
| 4.1.1. Monoculturas de células da linha osteoblástica humana MG63.....   | 38        |
| 4.1.2. Monoculturas de células endoteliais microvasculares dérmicas humanas... ..                                | 40        |
| 4.1.3. Co-culturas de células MG63 e HDMECs.....   | 42        |
| 4.2. Efeitos do alendronato e do zoledronato na expressão génica de células MG63 e HDMECs .....                  | 44        |
| 4.2.1. Monoculturas de células da linha osteoblástica humana MG63.....   | 44        |
| 4.2.2. Monoculturas de células endoteliais microvasculares dérmicas humanas... ..                                | 47        |
| 4.2.3. Co-culturas de células MG63 e HDMECs.....   | 49        |
| <b>5. Discussão .....</b>  | <b>51</b> |
| <b>6. Conclusões e Perspectivas Futuras .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>7. Referências Bibliográficas .....</b>   | <b>63</b> |
| <b>8. Anexos.....</b>  | <b>73</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1.1-</b> Esquema representativo da classificação morfológica dos ossos.....  | 2  |
| <b>Figura 1.2-</b> Estrutura característica do osso longo demonstrando as epífises e a diáfise. Com o corte transversal, é possível visualizar as placas epifisárias de crescimento, osso trabecular, osso compacto, cavidade medular, periosteio, endosteio e a cartilagem articular.....   | 3  |
| <b>Figura 1.3-</b> Anatomia detalhada do osso compacto e trabecular. No osso compacto é possível visualizar o osteônio, formado por lamelas, lacunas contendo osteócitos, e um canal central com vasos sanguíneos, e o canal de Volkman, orientado perpendicularmente ao canal central. No osso trabecular são observadas as trabéculas com a sua estrutura desorganizada.....   | 5  |
| <b>Figura 1.4-</b> Esquema ilustrativo da linhagem osteoblástica. As células osteoprogenitoras dão origem aos osteoblastos que depositam em torno de si a matriz óssea convertendo-se em osteócitos.....   | 7  |
| <b>Figura 1.5-</b> Imagem ilustrativa de uma célula osteoclástica multinucleada demonstrando o seu domínio membranar específico – <i>ruffled border</i> .....  | 8  |
| <b>Figura 1.6-</b> Estrutura bioquímica representativa das moléculas pirofosfato e bifosfonato .....   | 20 |
| <b>Figura 1.7-</b> Estruturas bioquímicas representativas da classe de compostos bifosfonatos, apresentando-se alinhados em ordem crescente de afinidade aos cristais de hidroxiapatite da superfície óssea e de potencial inibitório de reabsorção óssea pelos osteoclastos: clodronato < etidronato < tiludronato < pamidronato < alendronato < ibandronato < risedronato < zoledronato.....   | 21 |
| <b>Figura 3.1-</b> Esquema ilustrativo da disposição de monoculturas de células MG63, monoculturas de HDMECs e co-culturas de células MG63 e HDMECs, em placas de 96 poços, indicando as diferentes concentrações de alendronato (AL) e zoledronato (Zn) testadas e a condição controlo - ausência dos compostos. São também representados os poços relativos ao ensaio MTT, em que cada placa é representativa para o dia 2, 7 e 14 de cultura, e os poços relativos às colorações imunofluorescentes para visualização por CLSM, sendo cada placa representativa para o dia 7 e 14 de cultura..... | 33 |
| <b>Figura 3.2-</b> Esquema ilustrativo da disposição de monoculturas de células MG63, monoculturas de HDMECs e co-culturas de células MG63 e HDMECs, em placas de 6 poços, para as duas concentrações de alendronato (AL) e zoledronato (Zn) testadas e na ausência dos compostos (controlo). Cada placa é representativa para o dia 7 e 14 de cultura.....  | 34 |
| <b>Figura 4.1-</b> Viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) de células MG63, monocultivadas na ausência (controlo) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), em concentrações de $10^{-12}$ , $10^{-10}$ , $10^{-8}$ e $10^{-6}$ M. * $p \leq 0.05$ , significativamente diferente do controlo .....  | 39 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 4.2-</b> Imagens CLSM de monoculturas de células MG63 (200×), na ausência dos compostos (A e J), na presença de alendronato às concentrações de $10^{-12}$ (B e K), $10^{-10}$ (C e L), $10^{-8}$ (D e M) e $10^{-6}$ M (E e N), e na presença de zoledronato às concentrações de $10^{-12}$ (F e O), $10^{-10}$ (G e P), $10^{-8}$ (H e Q) e $10^{-6}$ M (I e R). Culturas coradas para o citoesqueleto de F-actina (verde) e núcleos (vermelho)..... | 40 |
| <b>Figura 4.3-</b> Viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) de HDMECs, monocultivadas na ausência (controle) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), em concentrações de $10^{-12}$ , $10^{-10}$ , $10^{-8}$ e $10^{-6}$ M. * $p \leq 0.05$ , significativamente diferente do controle .....  | 41 |
| <b>Figura 4.4-</b> Imagens CLSM de monoculturas de HDMECs (200×), na ausência dos compostos (A e J), na presença de alendronato às concentrações de $10^{-12}$ (B e K), $10^{-10}$ (C e L), $10^{-8}$ (D e M) e $10^{-6}$ M (E e N), e na presença de zoledronato às concentrações de $10^{-12}$ (F e O), $10^{-10}$ (G e P), $10^{-8}$ (H e Q) e $10^{-6}$ M (I e R). Culturas coradas para a CD31 (verde) e núcleos (vermelho).....                            | 42 |
| <b>Figura 4.5-</b> Viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) de células MG63 e HDMECs, co-cultivadas na ausência (controle) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), em concentrações de $10^{-12}$ , $10^{-10}$ , $10^{-8}$ e $10^{-6}$ M. * $p \leq 0.05$ , significativamente diferente do controle .....  | 43 |
| <b>Figura 4.6-</b> Imagens CLSM de co-culturas de células MG63 e HDMECs (100×), na ausência dos compostos (A e J), na presença de alendronato às concentrações de $10^{-12}$ (B e K), $10^{-10}$ (C e L), $10^{-8}$ (D e M) e $10^{-6}$ M (E e N), e na presença de zoledronato às concentrações de $10^{-12}$ (F e O), $10^{-10}$ (G e P), $10^{-8}$ (H e Q) e $10^{-6}$ M (I e R). Culturas coradas para a CD31 (verde) e núcleos (vermelho).....              | 44 |
| <b>Figura 4.7-</b> Caracterização molecular de monoculturas de células MG63, na ausência (controle) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), às concentrações de $10^{-12}$ e $10^{-6}$ M. Análise por RT-PCR da expressão gênica para o ALP, BMP-2 e OPG (A e C). Análise densitométrica dos produtos de RT-PCR (B e D) .....  | 46 |
| <b>Figura 4.8-</b> Caracterização molecular de monoculturas de HDMECs, na ausência (controle) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), às concentrações de $10^{-12}$ e $10^{-6}$ M. Análise por RT-PCR da expressão gênica para o CD31 e CAD-VE (A e C). Análise densitométrica dos produtos de RT-PCR (B e D) .....   | 48 |
| <b>Figura 4.9-</b> Caracterização molecular de co-culturas de células MG63 e HDMECs, na ausência (controle) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), às concentrações de $10^{-12}$ e $10^{-6}$ M. Análise por RT-PCR da expressão gênica para o ALP, BMP-2, OPG, CD31 e CAD-VE (A e C). Análise densitométrica dos produtos de RT-PCR (B e D).....   | 50 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.1-</b> Factores de crescimento, citocinas, hormonas e vitaminas envolvidas na síntese do colagénio tipo I e produção da matriz extracelular óssea.....                                   | 11 |
| <b>Tabela 1.2-</b> Proteoglicanos e glicoproteínas que induzem a formação das fibrilhas de colagénio responsáveis pelo desenvolvimento de “scaffolds” de suporte dos cristais de hidroxiapatite .... | 12 |
| <b>Tabela 1.3-</b> Mediadores de remodelação/reparação óssea.....  | 15 |
| <b>Tabela 1.4-</b> Marcadores fenotípicos de células endoteliais .....   | 18 |
| <b>Tabela 3.1-</b> <i>Primers</i> utilizados na análise por RT-PCR de monoculturas de células MG63, monoculturas de HDMECs e co-culturas de células MG63 e HDMECs .....                              | 36 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**ATCC** – *American Type Culture Collection*

**ATP** – Adenosina Trifosfato

**AL** - Alendronato

**ALP** – Fosfatase Alcalina

**AMV-RT** - *Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*

**BM-EPC** – Célula Progenitora Endotelial derivada da Medula Óssea

**BMP** – Proteína Morfogenética Óssea

**BP**– Bifosfonato

**BSA** – Albumina Sérica Bovina

**BSP** – Sialoproteína Óssea

**C** – Carbono

**Ca<sup>2+</sup>** - Cálcio

**CAD-VE** – Caderina do Endotélio Vascular

**cDNA** – DNA complementar

**CD31** – Molécula de adesão celular endotelial/plaquetária

**Cl** – Cloro

**CLSM** – *Confocal Laser Scanning Microscopy*

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DNA** – Ácido Desoxirribonucleico

**dNTP** - *Deoxynucleoside Triphosphate*

**DTT** - *DL-Dithiothreitol*

**ECGS** – Suplemento para crescimento de células endoteliais

**ECM** – Meio basal para cultura de células endoteliais

**EDTA** – Ácido Etilenodiaminatetraacético

**EG-VEGF** – Factor de Crescimento do Endotélio Vascular derivado de Glândulas Endócrinas

**ELISA** – *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**FBS** – Soro Bovino Fetal

**EGF** – Factor de Crescimento Epidérmico

**FGF** – Factor de Crescimento Fibroblástico

**FPP** – Farnesil Difosfato

**GADPH** - *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*  
**GTPase** – Guanosina Trifosfatase  
**HBMSC** – Célula do Estroma da Medula Óssea Humana  
**HDMEC** – Célula Endotelial Microvascular Dérmica Humana  
**HFOB** – Célula Osteoblástica Fetal Humana  
**HIF** – Factor Induzido por Hipoxia  
**HOB** – Célula Osteoblástica Humana  
**HOP** – Célula Progenitora Osteoblástica Humana  
**HOS** – Linha Celular Osteoblástica Humana derivada de Osteossarcoma  
**HRE** – Elemento Sensível à Hipoxia  
**HUVEC** – Célula Endotelial da Veia Umbilical Humana  
**IGF** – Factor de Crescimento do tipo Insulina  
**IL** – Interleucina  
**LIF** – Factor Inibidor de Leucemia  
**M** – Concentração Molar  
**M-CSF** – Factor Estimulador de Colónias Macrofágicas  
**mg** - miligrama  
**min** – minutos  
**ml** - mililitro  
**MEC** – Matriz Extracelular  
**MG63** – Linha Celular Osteoblástica Humana derivada de Osteossarcoma  
**nm** - nanometros  
**MPM** – Mataloproteínases da Matriz  
**MSC** – Célula Estaminal Mesenquimatososa  
**MTT**- *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*  
**N-BP** – Bifosfonato Nitrogenado  
**NN-BP** – Bifosfonato Não-Nitrogenado  
**O** – Oxigénio  
**OC** – Osteocalcina  
**OH** – Grupo Hidroxilo  
**ON** – Osteonectina  
**ONJ** – Osteonecrose da Mandíbula  
**OPG** – Osteoprotegerina  
**OPN** – Osteopontina

**p** – Significância estatística  
**P** - Fósforo  
**P/S** – Solução Penicilina/Estreptomicina  
**PBS** – *Phosphate Buffered Saline*  
**PDGF** – Factor de Crescimento Derivado de Plaquetas  
**PLGF** – Factor de Crescimento Placentário  
**PPi** - Pirofosfatos  
**PTH** – Hormona Paratiroide  
**PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>** - Fosfato  
**RANK** – Receptor Activador do factor Nuclear KB  
**RANKL** – Ligante do Receptor Activador do factor Nuclear KB  
**RGD** – Arginina; Glicina; Aspargina  
**RNA** – Ácido Ribonucleico  
**RNase** - Ribonuclease  
**RT-PCR** – Reacção em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa  
**SaOS-2** – Linha Celular Osteoblástica Humana derivada de Osteossarcoma  
**SPSS** - *Statistical Package for the Social Sciences*  
**TA** – Temperatura Ambiente  
**TGF-β** – Factor de Crescimento e Transformação Beta  
**TIMPS** – Inibidores de Metaloproteínases  
**TNF-α** – Factor de Necrose Tumoral Alfa  
**TRAP** – Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato  
**TX** – Triton X  
**UEO** – Unidade Estrutural Óssea  
**UI** – Unidade Internacional  
**UMO** – Unidade Multicelular Óssea  
**URO** – Unidade de Remodelação Óssea  
**VEGF** – Factor de Crescimento do Endotélio Vascular  
**VPF**- Factor de Permeabilidade Vascular  
**vWF** – Factor Von Willebrand  
**Zn** - Zoledronato  
**α-MEM** - *α-Minimum Essential Medium*  
**%** - Percentagem  
**<** - Menor

≤ - Menor ou igual  
°C – Graus Célsius  
μg - Micrograma  
μl - Microlitro  
± - Mais ou menos  
® - Marca registada



# 1. INTRODUÇÃO



O tecido ósseo é um tecido conjuntivo que sofre processos de mineralização e calcificação, através da produção de uma matriz óssea formada pela deposição de minerais. Este tipo de tecido não é o único constituinte de formação óssea, sendo necessários para este processo o desenvolvimento de vasos sanguíneos, medula óssea, cartilagem, tecido adiposo, tecido nervoso e tecido conjuntivo fibroso (Saladin, 2003).

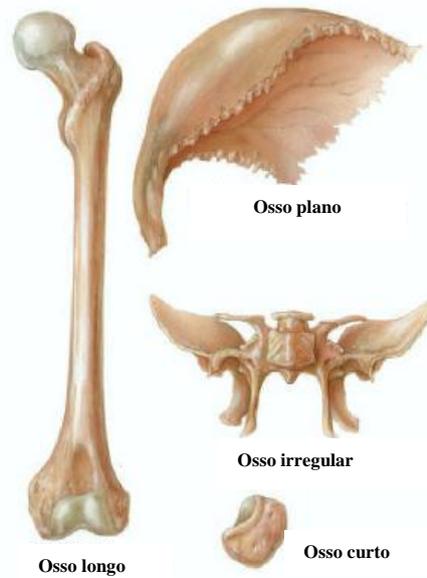
O osso desempenha funções de protecção, de suporte, de armazenamento de minerais e outras de substâncias utilizadas como fonte de energia e funções hematopoiéticas (Van de Graaf and Rhees, 2001; Seeley *et al.*, 2004).

Pretendemos nesta breve revisão elucidar o estado da arte quanto à estrutura e desenvolvimento do osso. Nomeadamente, a sua classificação morfológica, anatomia, tecidos, células e matriz que o constituem, e o processo de remodelação e reparação a que tem de ser sujeito. Além disso, pretende-se compreender os efeitos dos bifosfonatos, fármacos utilizados no tratamento de doenças ósseas, na actividade das células ósseas e consequências nos processos de angiogénese e osteogénese.

## **1.1. ESTRUTURA E DESENVOLVIMENTO DO OSSO**

### **1.1.1. Classificação dos ossos**

De acordo com a sua morfologia, os ossos podem ser classificados em 4 grupos: ossos longos, curtos, planos e irregulares (Figura 1.1) (Seeley *et al.*, 2004). Os ossos longos têm uma estrutura longa mas fina, actuando como suporte muscular para os movimentos corporais. Os ossos curtos exibem uma forma regular, com as mesmas dimensões em comprimento e largura, encontrando-se nas zonas do corpo onde se realizam movimentos rotacionais. Os ossos planos, como o próprio nome indica, são ossos achatados e em muitos casos curvados, envolvem órgãos mais sensíveis e macios garantindo a sua protecção. Por fim, existem os ossos irregulares, que contrariamente aos outros grupos não apresentam uma estrutura característica (Saladin, 2003).



**Figura 1.1-** Esquema representativo da classificação morfológica dos ossos (Adaptado de Seeley *et al.*, 2004).

### 1.1.2. Anatomia do osso

O osso longo é o melhor exemplo para ilustrar os princípios fundamentais da anatomia do osso. Cada osso longo em crescimento é constituído por três componentes principais, epífises, diáfise e placas epifisárias de crescimento (Figura 1.2) (Seeley *et al.*, 2001; Mader, 2004).

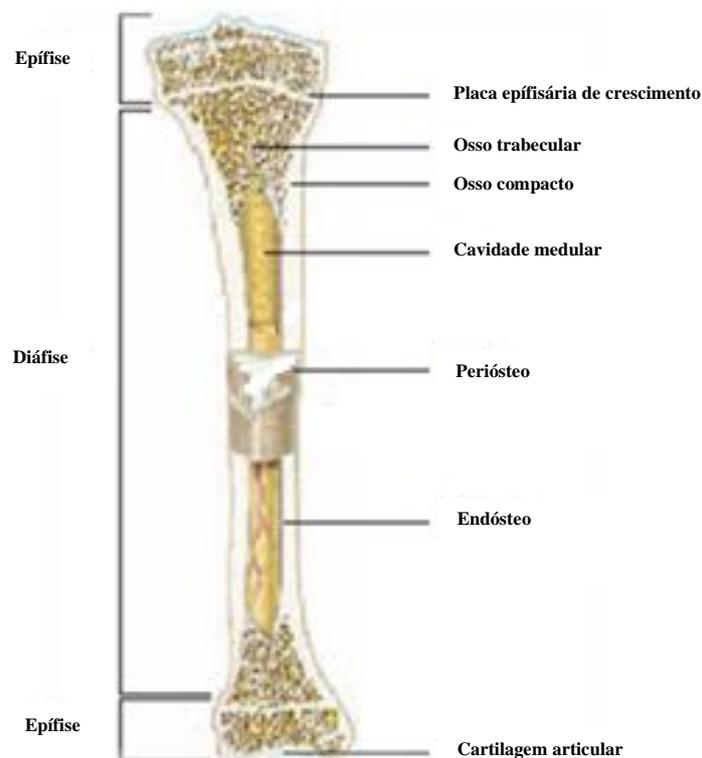
As epífises constituem as extremidades dos ossos longos. A superfície externa deste componente é formada por tecido ósseo compacto, podendo verificar-se a presença de cartilagem se for uma zona articulada. Internamente, as epífises são formadas por tecido ósseo trabecular, sendo as suas cavidades rodeadas por matriz óssea (Seeley *et al.*, 2001; Tartaglia e Waugh, 2005).

A diáfise compreende toda a parte central do osso longo, entre as epífises, e é formada por uma cavidade medular central, preenchida por medula óssea e delimitada por tecido ósseo compacto (Seeley *et al.*, 2001; Tartaglia e Waugh, 2005).

Estas cavidades existentes na superfície interna do osso, a cavidade medular da diáfise e pequenas cavidades do osso compacto e trabecular, são revestidas por uma fina camada de tecido conjuntivo, denominado de endóstio. Por sua vez, toda a superfície externa do osso, excepto as zonas com cartilagem, é revestida por um tipo especializado

de tecido conjuntivo disposto em dupla camada, denominado de periósteo (Seeley *et al.*, 2001; Tartaglia e Waugh, 2005).

Para além das epífises e diáfise, os ossos em crescimento apresentam outro componente elementar, as placas epífisárias de crescimento. Estas localizam-se entre a epífise e diáfise, e são formadas por cartilagem hialina. O crescimento em comprimento desta cartilagem leva ao crescimento do osso. Quando este processo está concluído, ocorre a calcificação das placas de crescimento que passam a denominar-se de linhas epífisárias, também conhecidas como metáfises (Seeley *et al.*, 2001; Tartaglia e Waugh, 2005).



**Figura 1.2-** Estrutura característica do osso longo demonstrando as epífises e a diáfise. Com o corte transversal, é possível visualizar as placas epífisárias de crescimento, osso trabecular, osso compacto, cavidade medular, periósteo, endósteo e a cartilagem articular (Adaptado de Saladin, 2003).

### 1.1.3. Histologia do tecido ósseo

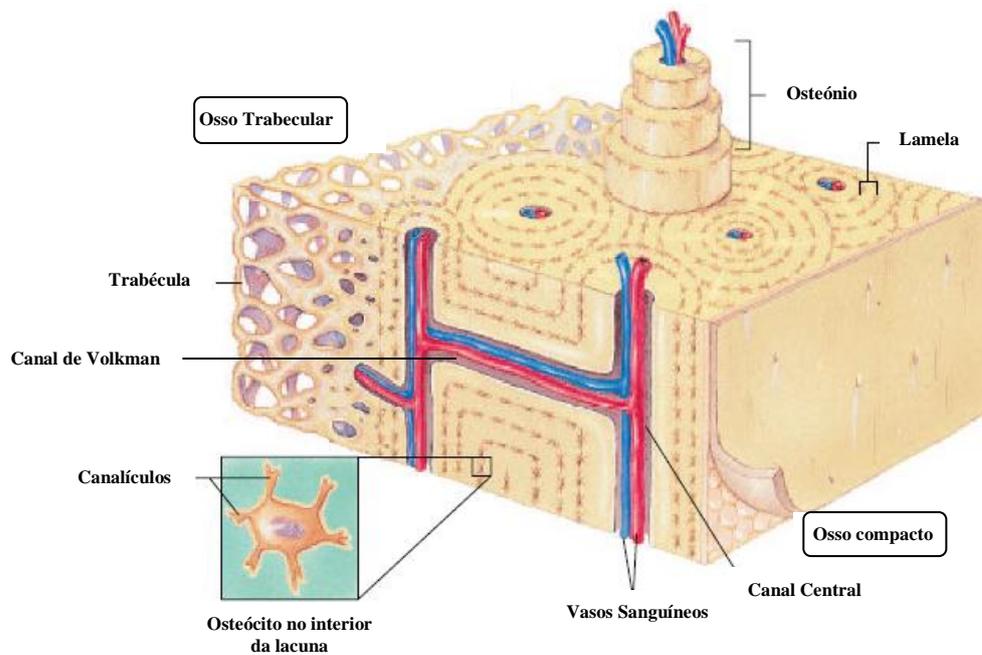
#### 1.1.3.1. Osso compacto e trabecular

O tecido ósseo é composto por dois tipos de tecidos principais, o compacto e o trabecular. O osso compacto (Figura 1.3) constitui cerca de  $\frac{3}{4}$  do esqueleto e está localizado na superfície externa do osso (Saladin, 2003; Tartaglia e Waugh, 2005). Este

tecido é formado por fibrilhas de colagénio e de minerais, incluindo o cálcio e o fosfato, densamente compactados, que formam camadas concêntricas da matriz óssea denominadas de lamelas. Entre as lamelas, formam-se lacunas onde se depositam os osteócitos (células do tecido ósseo) que comunicam entre si por canalículos que se estendem até ao canal central. Este complexo formado por lamelas e lacunas, constitui uma unidade cilíndrica denominada de osteónio ou sistema haversiano, em que o conjunto de várias unidades osteónicas forma o osso compacto. Em cada uma destas unidades, existe um canal central, também denominado de canal haversiano, por onde passam os vasos sanguíneos e os nervos que provêm do perióstio e se deslocam até este canal através dos canais de Volkman, cuja orientação é perpendicular ao canal central (Mader, 2004; Tartaglia e Waught, 2005).

O osso trabecular (Figura 1.3) constitui apenas  $\frac{1}{4}$  do esqueleto e localiza-se na extremidade final dos ossos longos e no interior dos ossos irregulares e dos ossos planos (Saladin, 2003; Tartaglia e Waught, 2005). Este tipo de tecido, como o próprio nome indica, é formado por trabéculas, que são placas ósseas interligadas formadas por uma matriz óssea pobre e pouco organizada. As superfícies trabeculares, são rodeadas por uma camada de células ósseas (constituída por osteoblastos e alguns osteoclastos) e compostas por lamelas e lacunas contendo osteócitos, no entanto, os vasos sanguíneos não penetram nas trabéculas, levando a que a nutrição dos osteócitos seja exclusivamente realizada pelos canalículos. Ainda assim, as cavidades trabeculares são preenchidas por vasos sanguíneos e medula óssea (Seeley *et al.*, 2004; Tartaglia e Waught, 2005).

As diferenças estruturais apresentadas por estes dois tipos de tecido, a nível da distribuição espacial das células, da densidade da matriz mineralizada, da distribuição dos vasos sanguíneos e da área ocupada pela medula óssea, são responsáveis pelas diferenças funcionais que cada um desempenha. O osso compacto exerce funções mecânicas e de protecção, enquanto o osso trabecular é responsável pelas funções metabólicas, auxiliando também o osso compacto nas suas funções de suporte, uma vez que este tem a capacidade de orientar a direcção das linhas de tensão ósseas responsáveis pelo suporte do peso corporal (Vieira, 1999, Marks e Hermay, 1996; Seeley *et al.*, 2001; Tortora e Derrickson, 2009).



**Figura 1.3-** Anatomia detalhada do osso compacto e trabecular. No osso compacto é possível visualizar o osteónio, formado por lamelas, lacunas contendo osteócitos, e um canal central com vasos sanguíneos, e o canal de Volkman, orientado perpendicularmente ao canal central. No osso trabecular são observadas as trabéculas com a sua estrutura desorganizada (Adaptado de Mader, 2004).

### 1.1.3.2. Células do tecido ósseo

O tecido ósseo seja ele trabecular ou compacto, é composto por células e matriz extracelular (MEC) óssea.

Existem quatro tipos diferentes de células do tecido ósseo: os osteoblastos, os osteoclastos, as células de revestimento, presentes na superfície dos ossos, e os osteócitos, presentes no interior da matriz mineralizada (Marks e Hermey, 1996). Cada uma destas células apresenta diferentes funções e origens. Os osteoblastos, os osteócitos e as células de revestimento têm origem em células indiferenciadas, denominadas de células osteoprogenitoras ou células osteogénicas (Figura 1.4), que se localizam no interior do perióstio, endóstio e canais centrais dos osteónios que formam o osso compacto. Estas células têm uma grande capacidade de diferenciação, podendo diferenciar-se em várias linhas celulares do estroma da medula óssea, incluindo em osteoblastos (Saladin, 2003; Mader, 2004). Para tal, existem sistemas reguladores, como os factores de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ) e proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), que estimulam a sua diferenciação em osteoblastos (Dos Santos *et al.*, 2005; Iwata *et al.*, 2010).

Os **osteoblastos** apresentam uma estrutura característica de células responsáveis por síntese proteica, com um retículo endoplasmático bem desenvolvido, muitos ribossomas e um complexo de Golgi proeminente (Mader, 2004; Seeley, 2004; Aubin, 2008). Estas células dispõem-se de forma alinhada no endóstio e na superfície interna do perióstio, e aquelas que se localizam na superfície do osso mostram uma estrutura semelhante ao endotélio cuboide (Saladin, 2003).

Os osteoblastos são células de extrema importância no desenvolvimento e na reparação do osso, uma vez que são responsáveis pela osteogénese (Seeley *et al.*, 2004; Tartaglia e Waugh, 2005). Produzem colagénio tipo I e outras proteínas não colagénicas, armazenadas em vesículas do complexo de Golgi, formando a matéria orgânica do osso ou osteóide, que é depois libertada para o exterior celular por exocitose. Além disso, estas células também contêm vesículas que acumulam iões de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), fosfato ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) e outras enzimas, que vão originar a matéria inorgânica, igualmente libertada para o exterior por exocitose. Os componentes do osteóide intervêm na cristalização da matéria inorgânica, levando à formação dos cristais de hidroxiapatite. Como resultado deste processo, ocorre a formação da matriz extracelular óssea, onde os osteoblastos são os principais promotores de calcificação (Seeley *et al.*, 2004; Aubin, 2008; Tortora e Derrickson, 2009).

Quando a matriz extracelular óssea é depositada em torno dos osteoblastos activos, estes são convertidos em **osteócitos** (Figura 1.4) (Tortora e Derrickson, 2009). Os osteócitos são células diferenciadas que não têm capacidade de divisão celular, no entanto, quando necessário estas retomam a forma osteoblástica para reparação óssea. São denominados de osteoblastos maduros e vistos como as principais células do osso maduro, uma vez que são responsáveis pela manutenção da matriz óssea formada (Tartaglia e Waugh, 2005; Klein-Nulend e Bonewald, 2008).

Ultraestruturalmente os osteócitos, são células arredondadas, com um núcleo oval, com pouco citoplasma, um complexo de Golgi pequeno, um retículo endoplasmático pouco rugoso e apresentam mais lisossomas que os osteoblastos, devido à sua actividade fagocítica (Klein-Nulend e Bonewald, 2008). Estas células alojam-se em cavidades denominadas de lacunas que se estendem umas às outras através de canaliculos. Cada osteócito contém prolongamentos citoplasmáticos que se deslocam nessas lacunas, permitindo a comunicação celular e partilha de informação entre osteócitos vizinhos. Através deste processo, os osteócitos tornam-se capazes de repartir nutrientes e minerais, nomeadamente cálcio e fosfato, bem como eliminar

resíduos e recolher substâncias dos vasos sanguíneos mais próximos, garantindo a manutenção da matriz (Saladin, 2003; Tartaglia e Waugh, 2005; Tortora e Dirrickson, 2009).

Os osteócitos também funcionam como sensores que detectam a ocorrência de danos no tecido ósseo, comunicando através dos seus filamentos citoplasmáticos com os osteoblastos de superfície óssea, para que estes iniciem o processo de formação óssea e simultaneamente, sinalizam os osteoclastos para o processo de reabsorção (Saladin, 2003).



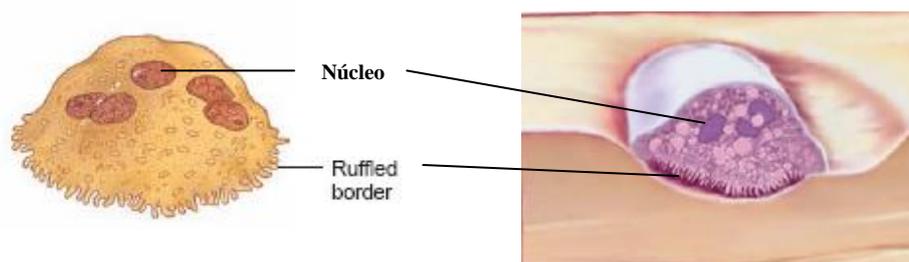
**Figura 1.4-** Esquema ilustrativo da linhagem osteoblástica. As células osteoprogenitoras dão origem aos osteoblastos que depositam em torno de si a matriz óssea convertendo-se em osteócitos (Adaptado de Saladin, 2003).

A partir das células osteoprogenitoras também são originadas as **células ósseas de revestimento**. Estas células, de estrutura lisa e alongada, estão localizadas nas superfícies ósseas que não estão sob processos activos de formação ou reabsorção óssea, sendo consideradas células inactivas, facto que leva a que ultraestruturalmente apresentem poucos organelos citoplasmáticos (Marks e Hermey, 1996).

No entanto, num estudo *in vitro* realizado por Everts *et al.*, verificaram a capacidade destas células mediarem e conduzirem a actividade dos osteoblastos e osteoclastos. Após ocorrer o processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos, as lacunas de reabsorção (lacunas de Howship) permaneciam com restos de colagénio não mineralizado que não havia sido digerido. Esse colagénio não mineralizado era então digerido na membrana plasmática das células de revestimento, com intervenção das metaloproteínases de matriz (MPMs), permitindo a limpeza do local de reabsorção. De seguida, as células de revestimento produziam as chamadas “placas de cimento” onde depositavam novos filamentos colagénicos, permitindo o desencadeamento da formação de nova matriz óssea pelos osteoblastos. Após concluída a sua actividade, as células de revestimento restabeleciam a sua localização original (Everts *et al.*, 2002).

Os **osteoclastos** (Figura 1.5) são as células ósseas responsáveis pelo processo de reabsorção óssea, podendo ser encontrados nas superfícies ósseas e no endóstio (Tartaglia e Waugh, 2005; Tortora e Derrickson, 2009). Estas originam-se a partir de células precursoras da medula óssea, as mesmas células que originam os monócitos sanguíneos, e é a fusão de múltiplas células estaminais descendentes que leva à formação de osteoclastos gigantes e multinucleados (cerca de 150  $\mu\text{m}$  de diâmetro), geralmente com 3 a 4 núcleos, podendo no entanto, apresentar mais de 50. O facto de estas serem células de reabsorção, faz com que apresentem múltiplos lisossomas e vacúolos fagocíticos. A superfície osteoclástica que contacta com a superfície óssea a ser reabsorvida é formada por uma membrana plasmática, denominada de “*ruffled border*”, com muitas projecções que aumentam a superfície de contacto com o osso. Através destas projecções são libertados iões de hidrogénio e enzimas lisossomais, que desenvolvem um ambiente ácido que promove a descalcificação da matriz óssea seguida pela sua digestão proteica. Alguns dos produtos degradados são então endocitados e transportados pelos osteoclastos (Van de Graaff e Rhees, 2001; Saladin, 2003; Seeley *et al.*, 2004; Tortora e Derrickson, 2009).

Os osteoblastos também podem auxiliar os osteoclastos no processo de reabsorção, pela produção de proteínas que quebram a matriz, permitindo aos osteoclastos acederem directamente à matriz mineralizada e promoverem uma reabsorção por contacto mais eficiente (Seeley *et al.*, 2004).



**Figura 1.5-** Imagem ilustrativa de uma célula osteoclástica multinucleada demonstrando o seu domínio membranar específico – *ruffled border* (Adaptado de Bartl *et al.*, 2007a e Tortora e Derrickson, 2009).

### **1.1.3.3. Matriz extracelular óssea**

O osso é formado por uma matriz extracelular abundante que rodeia e separa as células do tecido ósseo. Esta é constituída por 1/3 matéria orgânica e por 2/3 matéria inorgânica (Saladin, 2003; Tortora e Derrickson, 2009).

A componente orgânica é conhecida como osteóide e inclui o colagénio e outros complexos proteicos não colagénicos, glicoproteínas, proteoglicanos, factores de crescimento, citocinas, hormonas e vitaminas. A componente inorgânica é formada por sais minerais, principalmente cálcio e fosfato, que se combinam para formar cristais de hidroxiapatite. É da combinação da componente orgânica com a componente inorgânica do osso que se definem as suas características funcionais. As substâncias orgânicas, principalmente o colagénio, contribuem para a estrutura e flexibilidade do osso, através da formação de linhas de tensão que conferem elasticidade óssea. Os sais inorgânicos são responsáveis pelo desenvolvimento da dureza e da resistência do osso que lhe permite a realização do suporte corporal (Marieb e Hoehn, 2007).

#### ***1.1.3.3.1. Matéria orgânica***

O principal constituinte orgânico da matriz óssea é o colagénio. Inicialmente, julgava-se que o processo de calcificação ocorria apenas devido à presença de quantidade suficiente de sais minerais que cristalizavam. No entanto, actualmente é reconhecido o papel fundamental desempenhado pelas fibrilhas de colagénio. Estas fibrilhas proteicas são formadas com o objectivo de desenvolver as estruturas onde os sais minerais inorgânicos se depositam para cristalizar. Quando estas estruturas estão totalmente preenchidas os cristais começam a acumular-se em torno das fibrilhas, formando a matriz extracelular óssea. As fibrilhas de colagénio resultam da acção conjunta de vários tipos de colagénio, o colagénio tipo I, II, III, V, XI, XXIV e XXVII, que se organizam em fibrilhas cuja principal característica é a de conferir elasticidade ao tecido tornando o osso menos denso. De todos os tipos de colagénio fibrilhar, aquele que é mais abundante na matriz óssea, é o colagénio tipo I, tornando-o um importante marcador de diferenciação das células osteoblásticas (Bou-Gharios e Crombrughe, 2008; Tortora e Derrickson, 2009; Notarnicola *et al.*, 2011).

Como parte integrante da matéria orgânica, existem os complexos proteicos não colagénicos. Constituintes de uma pequena porção da fracção orgânica da matriz, estas proteínas são responsáveis por promover e controlar a actividade das fibrilhas de colagénio bem como o processo de cristalização dos minerais inorgânicos (Prasad *et al.*, 2010).

Os factores de crescimento, as citocinas, as hormonas e as vitaminas (Tabela 1.1) actuam na regulação da síntese do colagénio tipo I pelas células osteoblásticas.

Estas proteínas podem intervir directamente na síntese colagénica, ou indirectamente, actuando na secreção de factores que por sua vez afectam directamente essa síntese.

Os factores de crescimento são produzidos e secretados pelas células osteoblásticas e estimulam a sua diferenciação, proliferação e migração. Estes factores aumentam e regulam a síntese e expressão do colagénio tipo I, estimulando a formação da matriz extracelular óssea (Feres-Filho *et al.*, 1995; Kawase *et al.*, 2003; Salgado, *et al.*, 2004; Jeong *et al.*, 2009; Rey-Rico *et al.*, 2011).

As citocinas são maioritariamente produzidas e libertadas por células inflamatórias, mas também podem ser libertadas pelos osteoblastos. Inibem as funções osteoblásticas e estimulam as funções osteoclásticas, favorecendo a destruição da matriz (Pischon *et al.*, 2004; Tanabe *et al.*, 2004; Koyama *et al.*, 2008).

As hormonas e vitaminas apresentam receptores nas células osteoblásticas e inibem a produção do colagénio tipo I pelos osteoblastos (Bedalov *et al.*, 1998; Bogdanovic *et al.*, 2000; Van Driel *et al.*, 2006).

**Tabela 1.1-** Factores de crescimento, citocinas, hormonas e vitaminas envolvidas na síntese do colagénio tipo I e produção da matriz extracelular óssea.

| Proteínas não-colagénicas |  | Funções /Efeitos  | Autores   |
|---------------------------|--|---|---|
| Factores de Crescimento   | TGF- $\beta$   | Inibe a acção de colagenases que degradam o colagénio;<br>Estimula a síntese de inibidores de metaloproteinases (TIMPS), diminuindo a degradação da matriz;<br>Estimula a actividade da enzima lisil-oxidase que promove a ligação das fibrilhas de colagénio;<br>Activa e controla a expressão génica do colagénio tipo I durante o desenvolvimento embrionário; | Niederreither <i>et al.</i> , 1992; Feres-Filho <i>et al.</i> , 1995; Leask e Abraham, 2004; Iwata <i>et al.</i> , 2010 |
|                           | BMP-2/7  | Aumentam a expressão de outras proteínas não colagénicas envolvidas na formação da matriz óssea;  | Granjeiro, 2005; Hu <i>et al.</i> , 2010; Prasad <i>et al.</i> , 2010; Rey-Rico <i>et al.</i> , 2011                    |
|                           | Factor de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2)            | Acumula-se na matriz extracelular óssea;  | Shionoaka <i>et al.</i> , 2002; Ko e Kay, 2005; Jeong <i>et al.</i> , 2009; Li <i>et al.</i> , 2011                     |
|                           | Factores de crescimento do tipo insulina-I/II (IGF-I/II) | Constituem os factores de crescimento mais abundantes da matriz, regulando a densidade mineral;   | Salgado, <i>et al.</i> , 2004; Notarnicola <i>et al.</i> , 2011   |
|                           | Factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)       | Acumula-se na matriz extracelular óssea;  | Kawase <i>et al.</i> , 2003; Young <i>et al.</i> , 2010   |
| Citocinas                 | Factor de necrose tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )     | Inibe a produção de colagénio tipo I e outros componentes da matriz;<br>Aumenta a produção de colagenases;<br>Inibe ou degrada a produção da enzima lisil-oxidase;  | Iraburu <i>et al.</i> , 2000; Pischon <i>et al.</i> , 2004; Koyama <i>et al.</i> , 2008                                 |
|                           | Interleucina-1 (IL-1)                                    | Diminui a produção do colagénio tipo I nos osteoblastos, inibindo a formação da matriz;   | Tanabe <i>et al.</i> , 2004; Koyama <i>et al.</i> , 2008  |
| Hormonas                  | Hormona paratiroide (PTH)                                | Diminui os níveis do mRNA pró-colagénico;   | Bogdanovic <i>et al.</i> , 2000; Shinoda <i>et al.</i> , 2010   |
| Vitaminas                 | Vitamina D3 (1,23(OH) $_2$ D $_3$ )                      | Inibe a transcrição do colagénio tipo I;  | Bedalov <i>et al.</i> , 1998; Van Driel <i>et al.</i> , 2006  |

As glicoproteínas e os proteoglicanos (Tabela 1.2) são as proteínas não colagénicas mais abundantes da matéria orgânica óssea. Estes complexos proteicos actuam na formação das fibrilhas de colagénio, que servem de base para a deposição dos cristais de hidroxapatite, permitindo desta forma a formação da matriz extracelular óssea.

**Tabela 1.2-** Proteoglicanos e glicoproteínas que induzem a formação das fibrilhas de colagénio responsáveis pelo desenvolvimento de “scaffolds” de suporte dos cristais de hidroxiapatite.

| Proteínas não-colagénicas |   | Funções /Efeitos   | Autores   |
|---------------------------|---|--|---|
| Proteoglicanos            | Decorina  | Proteoglicanos presentes em maior quantidade na formação da matriz;  | Schonherr <i>et al.</i> , 1995; Corsi <i>et al.</i> , 2002; Waddington <i>et al.</i> , 2003; Milan <i>et al.</i> , 2004; Bonewald, 2006 |
|                           | Biglicano   | Regulados pelas células de linhagem osteoblástica; Ligam-se ao colagénio actuando na formação fibrillar; Participam como nucleadores na precipitação dos cristais de hidroxiapatite; |   |
| Glicoproteínas            | Fosfatase alcalina (ALP)  | Segregadas pelas células osteoblásticas;   | Stubbs <i>et al.</i> , 1997; Vieira, 1999; Ramstad <i>et al.</i> , 2003 Hu, 2010  |
|                           | Osteocalcina (OC)   | Capacidade de ligação aos iões de cálcio, sendo seus possíveis transportadores;  |   |
|                           | Osteonectina (ON)   | Grande afinidade para os cristais de hidroxiapatite, actuando como mediadores da sua deposição para formação da matriz;  |   |
|                           | Glicoproteínas RGD:<br>- Osteopontina (OPN/BSP-I);<br>- Sialoproteína óssea (BSP-II); | Apresentam um aumento da actividade quando se produz a matriz colagénica e se inicia o processo de mineralização;  |   |

### 1.1.3.3.2. Matéria inorgânica

A matéria inorgânica da matriz óssea é maioritariamente formada por sais minerais que cristalizam. Os minerais mais abundantes são o cálcio e o fósforo, que juntamente com uma pequena percentagem de hidróxido de cálcio, se combinam formando cristais de hidroxiapatite ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) densamente empacotados. Em torno destes cristais, forma-se uma camada de hidratação, através da qual ocorre a troca de iões entre os cristais inorgânicos e os fluidos corporais. Para além dos cristais de hidroxiapatite, também os minerais bicarbonato de cálcio, citrato, magnésio, potássio e sódio se juntam na formação da matriz inorgânica, a qual é depositada no interior e em torno da matriz colagénica, resultando na formação da matriz extracelular óssea (Tortora e Derrickson, 2009; Mescher, 2010).

### 1.1.4. Remodelação/reparação óssea

Quando o organismo completa a fase de crescimento e entra na fase de envelhecimento, o tecido ósseo vai perdendo a sua rigidez e flexibilidade, devido a

alterações na matriz óssea e perda de minerais, que tornam o osso mais susceptível a fracturas e lesões. No entanto, devido à sua capacidade de auto-remodelação, estes efeitos podem ser contrariados, tornando-se apto a reparar lesões como o desgaste ósseo e macro/microfracturas. Assim, o processo de remodelação/reparação óssea, permite regular e reparar o esqueleto, preservando a sua integridade e funcionalidades (Perez-Amodio *et al.*, 2004; Bartl *et al.*, 2007a).

Cada processo fisiológico de remodelação óssea tem um princípio e fim definidos, que consiste em remover o tecido ósseo danificado e substituí-lo por novo tecido elástico ósseo em iguais proporções, sendo os principais intervenientes deste processo os osteoclastos (células de reabsorção óssea), os osteoblastos (células de formação óssea) e as células endoteliais (células de formação dos vasos sanguíneos). A actividade combinada destas células forma as unidades de remodelação óssea (UROs) ou unidades multicelulares ósseas (UMOs), responsáveis pela manutenção diária do osso (Migliorati *et al.*, 2005a; Bartl *et al.*, 2007a).

Os dois eventos responsáveis pela remodelação/reparação óssea, estão intimamente interligados, pois os produtos proteicos resultantes do processo de osteoblastogénese determinam a ocorrência do processo de osteoclastogénese, assim como os produtos osteoclásticos de reabsorção óssea determinam o volume ósseo a ser formado pelos osteoblastos (Seeman, 2008).

Os produtos proteicos dos osteócitos também desempenham um papel pivô na iniciação do ciclo de remodelação/reparação óssea, actuando na actividade das células precursoras osteoblásticas e osteoclásticas para a sua diferenciação em osteoblastos e osteoclastos respectivamente, e como sinalizadores para a finalização do ciclo quando fagocitados pelos osteoclastos que reabsorvem a matriz (Seeman, 2008).

O ciclo de remodelação óssea ocorre em duas mineralizações. A primeira mineralização ocorre em cerca de 10 dias e inicia-se após a diferenciação das células precursoras em osteoclastos activos, que são recrutados para o local de reabsorção onde reabsorvem o osso danificado formando uma cavidade ou fissura de reabsorção. Quando a sua actividade está completa, ocorre regressão ou apoptose osteoclástica e os detritos que permanecem na cavidade são captados pelas células de revestimento. Seguidamente, as células osteoprogenitoras diferenciam-se em osteoblastos activos que produzem o osteóide e o depositam na cavidade de reabsorção. Os minerais inorgânicos concentram-se então no interior das fibrilhas de colagénio cristalizando. Entretanto, os osteoblastos tornam-se quiescentes, podendo morrer por apoptose ou converterem-se em

osteócitos ou células de revestimento. A segunda mineralização prolonga-se por cerca de 6 meses e diz respeito à deposição dos restantes minerais na matriz. Cada ciclo de remodelação/reparação óssea, formado por milhões de células ósseas em constante actividade, é denominado de unidade estrutural óssea (UEO) e é a actividade diária de milhões destas unidades que mantêm a integridade e a estrutura do esqueleto ao longo da vida (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.*, 2006; Bartl *et al.*, 2007a).

#### **1.1.4.1. Reguladores de remodelação/reparação óssea**

Os processos coordenados de osteoblastogénese e osteoclastogénese responsáveis pela remodelação óssea são regulados e mediados pela actividade de factores de crescimento, citocinas, hormonas, vitaminas e minerais (Tabela 1.3). No entanto, ainda muito falta descobrir sobre todos os mecanismos moleculares que coordenam a actividade destes dois processos durante a remodelação (Bartl *et al.*, 2007a).

As hormonas e vitaminas sistémicas actuam na remodelação óssea regulando a síntese e actividade de factores locais, nomeadamente, factores de crescimento e citocinas, que intervêm directamente no metabolismo celular ósseo, com efeitos endócrinos e parácrinos. Estes factores de crescimento e citocinas podem ser libertados pelas células do tecido ósseo e é a ligação aos seus receptores nestas células que lhes permite regular o crescimento, a diferenciação, a proliferação celular e fundamentalmente as funções que estas células desempenham (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil *et al.*, 2006).

O processo de remodelação óssea é regulado pelo sistema de citocinas RANKL/RANK/OPG que desempenha um papel fundamental na diferenciação osteoclástica e na regulação da reabsorção óssea (Bartl *et al.*, 2007a).

O ligante do receptor activador do factor nuclear KB (RANKL) é uma proteína de ligação membranar produzida pelos osteoblastos, pertencente à família TNF. Esta citocina é o principal estímulo de maturação osteoclástica, quando reconhecida pelo seu receptor activador do factor nuclear KB (RANK), localizado na superfície dos precursores das células osteoclásticas. Esta ligação leva à activação de vias de sinalização críticas que convertem os pré-osteoclastos mononucleados em osteoclastos maduros multinucleados, estimulando a expressão de marcadores fenotípicos

osteoclásticos como a fosfatase ácida resistente ao tártaro (TRAP) (Perez-Amodio *et al.*, 2004; Bartl *et al.*, 2007a; Costa-Rodrigues *et al.*, 2010; Heinemann *et al.*, 2011).

A osteoprotegerina (OPG) é uma citocina produzida pelas células osteoblásticas, pertencente à família TNF, que actua como um receptor antagonista da RANKL, impedindo a sua ligação à RANK e consequentemente inibindo e bloqueando a diferenciação e activação osteoclástica e a reabsorção óssea (Bartl *et al.*, 2007a; Masuki *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2002);

É devido à relação entre a actividade da RANKL e da OPG que o processo de reabsorção óssea é balanceado. Para tal, existem agentes osteotrópicos, TGF- $\beta$ , PTH, vitamina D e K e hormonas sexuais, que estimulam/inibem a actividade destas citocinas balanceando as suas actividades na remodelação óssea (Bartl *et al.*, 2007a).

**Tabela 1.3-** Mediadores de remodelação/reparação óssea.

| Reguladores |   | Funções /Efeitos   |
|-------------|---|--|
| Hormonas    | PTH   | Importante regulador da homeostase do cálcio no sangue – É libertada na corrente sanguínea quando os níveis de cálcio no sangue diminuem, aumentando a actividade dos osteoclastos que aumentam a reabsorção óssea e libertam o cálcio para o sangue (Marieb e Hoehn, 2007; Tortora e Derrickson, 2009);<br>Induz o alongamento dos osteoblastos da superfície óssea aumentando os espaços intercelulares onde os osteoclastos se ligam para promoverem reabsorção óssea (Perez-Amodio <i>et al.</i> , 2004);<br>Estimula a síntese da IGF-I e TGF- $\beta$ , favorecendo a nova formação óssea pelos osteoblastos (Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil <i>et al.</i> , 2006); |
|             | Calcitonina   | Importante regulador da homeostase do cálcio no sangue – Segregada quando os níveis de cálcio no sangue aumentam, estimula a actividade dos osteoblastos que aumentam a formação óssea e absorvem e depositam o cálcio sanguíneo na matriz (Marieb e Hoehn, 2007; Tortora e Derrickson, 2009);   |
| Vitaminas   | Vitamina D - Calcitriol   | Regula a homeostase do cálcio no sangue – A hormona PTH estimula a sua produção quando os níveis de cálcio no sangue estão diminuídos. Esta por sua vez promove a absorção de cálcio no trato gastro-intestinal (Tortora e Derrickson, 2009);  |
| Minerais    | Os minerais cálcio e fósforo são necessários em grande quantidade durante todo o processo de remodelação óssea. Além destes, apesar de em menor quantidade, também os minerais magnésio, flúor e manganês são requeridos durante o processo (Tortora e Derrickson, 2009); |  |

**Tabela 1.3 (continuação)**- Mediadores de remodelação/reparação óssea.

| Reguladores             |   | Funções /Efeitos  |
|-------------------------|---|---|
| Factores de Crescimento | TGF- $\beta$  | Libertado pelos osteoblastos no local de reparação óssea (Issa <i>et al.</i> , 2006); Estimula a actividade osteoblástica para formação do novo calo ósseo (Salgado, <i>et al.</i> , 2004; Dos Santos <i>et al.</i> , 2005); Actua nos osteoblastos e nas células de revestimento da superfície óssea, promovendo o seu afastamento para a formação de espaços intercelulares onde os osteoclastos se ligam para reabsorção óssea (Perez-Amadio <i>et al.</i> , 2004);  |
|                         | BMPs  | As BMP-2, 4, 5, 6 e 7 têm actividade osteogénica na reparação óssea. Recrutam as células osteoprogenitoras osteoblásticas para o local de reparação óssea, estimulando a sua diferenciação em osteoblastos, bem como a sua actividade para a formação do novo osso (Salgado, <i>et al.</i> , 2004; Dos Santos <i>et al.</i> , 2005; Issa <i>et al.</i> , 2006); Induzem a maturação osteoclástica, estimulando as suas funções de reabsorção óssea (Granjeiro, 2005);   |
|                         | FGF-2   | Factor libertado pelas células osteoblásticas no local de remodelação óssea, estimula o início do processo de reabsorção e a formação de novo osso (Dos Santos <i>et al.</i> , 2005; Issa <i>et al.</i> , 2006); Ajuda a balancear a actividade das células osteoblásticas e osteoclásticas no processo de remodelação (Salgado, <i>et al.</i> , 2004); Potente estimulador da maturação das células progenitoras osteoclásticas, efeito mediado pela RANKL, bem como dos osteoclastos maduros, influenciando a reabsorção óssea mediada por estas células (Shimoaka <i>et al.</i> , 2002); |
|                         | IGF-I   | Expresso durante a reparação óssea, actua como um factor autócrino/parácrino que potencia este processo (Issa <i>et al.</i> , 2006);  |
|                         | PDGF  | Estimula a diferenciação das células precursoras osteoblásticas em osteoblastos, induzindo a formação do novo osso (Dos Santos <i>et al.</i> , 2005; Issa <i>et al.</i> , 2006; Young <i>et al.</i> , 2010); Induz a migração das células precursoras osteoclásticas para os locais de remodelação (Salgado, <i>et al.</i> , 2004);   |
|                         | Factor de crescimento do endotélio vascular (VEGF)  | Factor pró-angiogénico produzido predominantemente pelas células osteoblásticas (Clarkin <i>et al.</i> , 2008); Apresenta receptores nos osteoblastos e nos osteoclastos, induzindo a sua actividade (Maes <i>et al.</i> , 2010); Regula positivamente a remodelação óssea, estabelecendo a comunicação entre as células endoteliais, os osteoblastos e os osteoclastos, sendo o elo de ligação entre a angiogénese e a osteogénese (Salgado, 2004; Clarkin <i>et al.</i> , 2008; Kanczler e Oreffo, 2008; Maes <i>et al.</i> , 2010);  |
| Citocinas               | Interleucinas                                       | As interleucinas-1, 6, 11 e o factor inibidor de leucemia (LIF) são importantes factores osteotrópicos produzidos pelos osteoblastos, que em resposta a agentes de reabsorção óssea, estimulam a actividade dos osteoclastos no processo de remodelação (Heinemann <i>et al.</i> , 2011);   |
|                         | Factor estimulador de colónias macrófágicas (M-CSF) | É sintetizado pelas células da linhagem osteoblásticas e desempenha um papel importante na sobrevivência, na proliferação e na migração dos precursores osteoclásticos (Costa-Rodrigues <i>et al.</i> , 2010; Heinemann <i>et al.</i> , 2011); Induz a expressão de genes, como a TRAP, que tipificam a linhagem osteoclástica (Heinemann <i>et al.</i> , 2011);  |

### **1.1.4.2. Angiogénese**

Os processos de formação e reparação do tecido ósseo implicam uma proximidade entre os vasos sanguíneos, distribuidores dos precursores das células ósseas, e as células do tecido ósseo, sendo necessária uma interacção directa entre o processo de angiogénese e osteogénese, o que implica conexões entre as células endoteliais e as células do tecido ósseo (Clarkin *et al.*, 2008; Grellier *et al.*, 2009).

A angiogénese consiste no desenvolvimento de novas redes vasculares (capilares) a partir de vasos sanguíneos pré-existentes. Este processo é complexo e compreende várias fases que envolvem a formação de ramificações dos vasos pré-existentes, o rompimento das ligações entre as células endoteliais e destas com a matriz extracelular do vaso, a migração e a proliferação das mesmas, bem como das suas células progenitoras, e o restabelecimento das ligações célula-célula e célula-matriz, permitindo a maturação capilar (DeLisser, 1997; Schmidt e Carmeliet, 2010). Estes acontecimentos são mediados por vias de sinalização e ligações célula-moléculas, sendo as moléculas implicadas no processo os VEGFs, os seus receptores nas células endoteliais e nas moléculas de adesão (Breier e Risau, 1996; DeLisser, 1997).

Os VEGF's constituem uma família de glicoproteínas diméricas, conhecidas pelo papel fundamental desempenhado no crescimento e na diferenciação das células endoteliais e do próprio endotélio vascular, bem como pelo facto de serem factores de permeabilidade vascular (VPFs) evitando assim a ocorrência de hipoxia e isquemia (Ferrara, 2001; Tjwa *et al.*, 2003; Semenza, 2007). A família dos VEGFs é composta por 7 membros: VEGF ou VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, factor de crescimento placentário (PLGF) e factor de crescimento do endotélio vascular derivado de glândulas endócrinas (EG-VEGF). O VEGF é o mediador crítico da invasão vascular, existindo em 5 possíveis isoformas: VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>183</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>206</sub> e VEGF<sub>165</sub> (isoforma mais proeminente). Estes factores medeiam os seus efeitos através da ligação a 3 receptores nas células endoteliais, o VEGFR-1, VEGFR-2 e VEGFR-3. Sendo que, apesar de o VEGF apresentar uma alta afinidade para o VEGFR-1, o VEGFR-2 é considerado o principal transdutor de sinal deste factor (Tjwa *et al.*, 2003; Kowanz e Ferrara, 2006; Schipani *et al.*, 2009).

A actividade do VEGF e seus receptores é regulada por diferentes mecanismos como a hipoxia, os factores de crescimento, as hormonas e as vitaminas.

A hipoxia é o primeiro e maior desencadeador de angiogénese, o défice de oxigénio no sangue é detectado por sensores das células endoteliais que interagem com os factores induzidos por hipoxia (HIFs) e estes com os elementos sensíveis à hipoxia (HREs), localizados nas células osteoblásticas promotoras do VEGF. Este acontecimento induz a expressão deste factor nas células endoteliais (Tjwa *et al.*, 2003; Fraisl *et al.*, 2009; Schipani *et al.*, 2009).

A expressão e actividade do VEGF são também reguladas pela actividade de factores pró-angiogénicos, nomeadamente, factores de crescimento, citocinas, hormonas e vitaminas. Entre eles estão os factores de crescimento PDGF, IGF-I, TGF- $\beta$ , BMP-2 e factor de crescimento epidérmico (EGF), as citocinas TNF- $\alpha$ , RANKL M-CSF, OPG, ILs, e as hormonas e vitaminas PTH, vitamina D e estrogénios (Breier e Risau, 1996; Tjwa *et al.*, 2003; Clarkin *et al.*, 2008; Schipani *et al.*, 2009). Além de estes factores induzirem a expressão do VEGF, este também tem actividade indutora sobre estes factores osteopromotores. Assim, a capacidade destes factores induzirem a remodelação óssea é em parte mediada pelo factor de crescimento endotelial (Carano e Filvaroff, 2003).

As células endoteliais expressam marcadores fenotípicos (Tabela 1.4), característicos desta linhagem, que actuam como mediadores de adesão celular, contribuindo de forma fundamental para uma angiogénese bem sucedida.

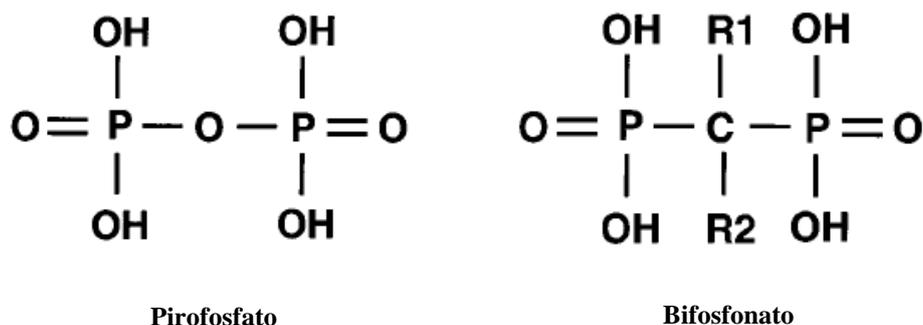
**Tabela 1.4-** Marcadores fenotípicos de células endoteliais.

| Marcadores   | Funções /Efeitos  |
|--|---|
| CD34   | Selectivamente expresso pelas células progenitoras hematopoiéticas e células endoteliais, estando envolvido nas suas interacções celulares (Delia <i>et al.</i> , 1993; Vieira <i>et al.</i> , 2005); Marcador de diferenciação das células endoteliais (Vieira <i>et al.</i> , 2005);                          |
| CD105  | Desempenha um papel importante na angiogénese; Predominantemente activo em células endoteliais em proliferação; Actividade induzida por hipoxia (Duff <i>et al.</i> , 2003);  |
| Molécula de adesão celular endotelial/plaquetária (CD31_PECAM-1) | Maior promotor de adesão celular endotelial (Newman, 1997); Medeia a adesão hemofílica e heterofílica entre as células endoteliais; Localiza-se em posições basais, ao longo da membrana plasmática lateral (DeLisser, 1997);   |
| Caderina do endotélio vascular (CD144_CAD-VE)                    | Proteína transmembranar encontrada em locais subapicais (DeLisser, 1997; Alva <i>et al.</i> , 2006); Medeia a adesão hemofílica entre as células endoteliais (DeLisser, 1997; Schmidt e Carmeliet, 2010);   |
| Factor Von Willebrand (vWF)                                      | Promove a ligação das plaquetas ao subendotélio quando ocorrem danos vasculares (Wang <i>et al.</i> , 2011); Proteína de fase aguda, segregada quando o equilíbrio das células endoteliais é afectado, regressando a níveis normais quando as funções endoteliais são repostas (Patapova <i>et al.</i> , 2010); |

## 1.2. BIFOSFONATOS

Os bifosfonatos (BPs) constituem um grupo de agentes farmacológicos utilizados no tratamento de doenças ósseas e anomalias no metabolismo do cálcio, originadas no aumento da reabsorção óssea devido à actividade osteoclástica. Actuam como agentes anti-reabsortivos da matriz óssea, afectando o metabolismo e as funções das células osteoclásticas e impedindo a dissolução dos cristais de hidroxiapatite, pela forte ligação aos iões de cálcio na superfície da matriz óssea mineralizada em processo de reabsorção (Green, 2004; Bukowski *et al.*, 2005; Roelofs *et al.*, 2006; Bartl *et al.*, 2007b; Lobato *et al.*, 2008). Assim, os bifosfonatos são os fármacos de eleição para o tratamento de doenças osteológicas e ortopédicas, nomeadamente, osteoporose, osteoporose pós-menopausa, doença de Paget, osteogénese imperfeita e fibrodisplasia ossificante progressiva. Além disso, estudos indicam que estes fármacos também podem ser utilizados na área da oncologia e hematologia, sendo utilizados no tratamento de mielomas múltiplos, metástases ósseas, osteosarcomas, osteólises induzidas por tumores e hipercalcemia (Roelofs *et al.*, 2006; Russell *et al.*, 2008).

Os bifosfonatos são análogos sintéticos dos pirofosfatos (PPi) (Figura 1.6), que são moléculas inorgânicas fisiológicas reguladoras de mineralização óssea, formadas por dois grupos fosfato ligados a um oxigénio central (P-O-P). As ligações nesta molécula são muito instáveis, tornando-a facilmente hidrolisada pelo trato gastrointestinal quando administrada por via oral. Este facto levou ao interesse no desenvolvimento dos bifosfonatos (Figura 1.6), que apresentam na sua estrutura bioquímica dois grupos fosfato ligados covalentemente a um carbono central (P-C-P). Esta estrutura torna a molécula estável, resistente e não hidrolisável, adquirindo uma grande afinidade para os iões de cálcio na superfície da matriz óssea. O carbono central da molécula liga-se também a duas cadeias laterais, R1 e R2, que apresentam diferentes funções mas igual importância na actividade molecular (Castro *et al.*, 2004; Roelofs *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2007; Nicolin *et al.*, 2007; Coxon *et al.*, 2008).



**Figura 1.6-** Estrutura bioquímica representativa das moléculas pirofosfato e bifosfonato (adaptado de Russell *et al.*, 1999).

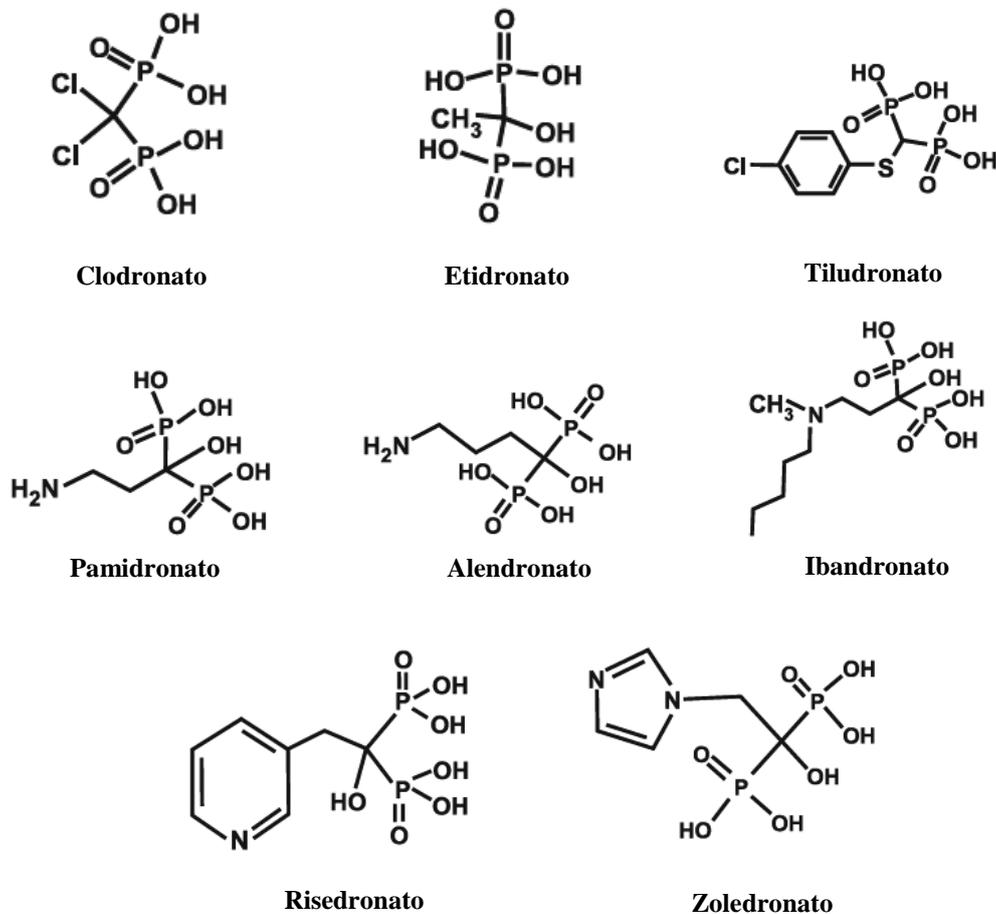
A cadeia lateral R1 é uma cadeia curta, responsável pela farmacodinâmica dos bifosfonatos, tendo uma particular afinidade para os cristais de hidroxiapatite da superfície óssea. Dependendo dos grupos de substituição que constituem esta cadeia, os bifosfonatos formados, apresentam diferentes afinidades para a matriz óssea cristalizada. Na presença do grupo de substituição OH, a afinidade da molécula para o osso é maior, ao contrário do grupo de substituição Cl que diminui essa afinidade da ligação, independentemente do grupo de ligação R2 (Figura 1.7) (Castro *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2007; Bartl *et al.*, 2007b; Russell *et al.*, 2008).

A estrutura da cadeia longa lateral R2 é a maior determinante da capacidade anti-reabsortiva e anti-proliferativa dos bifosfonatos. A introdução de um átomo de azoto no grupo de substituição R2 aumenta o potencial anti-reabsortivo da molécula, potenciado se o átomo se apresentar num anel heterocíclico (Figura 1.7). Este facto permite dividir os bifosfonatos em dois grupos, com diferentes mecanismos moleculares de acção (Bartl *et al.*, 2007b).

Os bifosfonatos não nitrogenados (NN-BPs) são considerados bifosfonatos de primeira geração e incluem o clodronato, o etidronato e o tiludronato (Figura 1.7). Estas moléculas são internalizadas pelos osteoclastos, que por vias celulares, as metabolizam para a formação de análogos citotóxicos de ATP não-hidrolisados. Estes metabolitos acumulam-se em elevadas quantidades no citosol dos osteoclastos, inibindo a actividade de enzimas dependentes de ATP, desencadeando disfunções celulares que resultam em morte celular por apoptose (Roelofs *et al.*, 2006; Schindeler e Little, 2007; Idris *et al.*, 2008; D'Amelio *et al.*, 2008).

Os bifosfonatos nitrogenados (N-BPs) incluem o pamidronato, o alendronato, o ibandronato, o risedronato e o zoledronato (Figura 1.7). Estas moléculas ao serem internalizadas pelos osteoclastos inibem a enzima farnesil difosfato (FPP) sintetase, uma

enzima chave da via do mevalonato, necessária para a síntese de lípidos isoprenoides que induzem a prenilação de pequenas proteínas GTPases (Ras, Rho, Rab) envolvidas na proliferação, sobrevivência e organização do citoesqueleto celular. A inibição da via do mevalonato bloqueia a prenilação destas proteínas que se acumulam no citoplasma dos osteoclastos, desencadeando vias de sinalização impróprias que alteram as funções das células osteoclásticas e induzem a ocorrência de apoptose celular (Green, 2004; Schindeler e Little, 2007; Coxon *et al.*, 2008; Idris *et al.*, 2008).



**Figura 1.7-** Estruturas bioquímicas representativas da classe de compostos bifosfonatos, apresentando-se alinhados em ordem crescente de afinidade aos cristais de hidroxiapatite da superfície óssea e de potencial inibitório de reabsorção óssea pelos osteoclastos: clodronato < etidronato < tiludronato < pamidronato < alendronato < ibandronato < risedronato < zoledronato (adaptado de Russell *et al.*, 2008).

Além dos bifosfonatos afectarem a estrutura e funcionalidades dos osteoclastos pela intervenção nos seus mecanismos moleculares, estes também afectam as células osteoclásticas intervindo nos seus mecanismos celulares, impedindo o recrutamento

osteoclástico, através da inibição das suas células precursoras, e dispendo-se em camada sobre a superfície óssea de reabsorção, o que impede a adesão e actividade dos osteoclastos e impossibilita o desenvolvimento de um meio ácido necessário para reabsorção. Além disso, uma vez internalizados pelos osteoclastos, estas moléculas induzem a produção de ácidos e enzimas que alteram a estrutura do citoesqueleto e dos microtubulos celulares, e provocam a retracção da membrana “*ruffled border*”, estritamente necessária para o processo reabsortivo (Suzuki *et al.*, 2006; Bartl *et al.*, 2007b; Lobato *et al.*, 2008).

Os osteoblastos também podem ser mediadores indirectos da actividade dos bifosfonatos nos osteoclastos. A actividade destas moléculas nas células osteoblásticas estimula a produção e a secreção de factores inibidores de reabsorção osteoclástica que actuam nos osteoclastos e nos seus precursores inibindo o seu recrutamento, activação, actividade e sobrevivência (Suzuki *et al.*, 2006; Bartl *et al.*, 2007b; Ponader *et al.*, 2008). Este facto foi comprovado em estudos realizados *in vitro*, através dos quais se verificou que a actividade dos N-BPs, zoledronato e pamidronato, nas células osteoblásticas induzia o aumento da expressão e secreção da OPG, podendo ser um importante mecanismo parácrino pelo qual estas moléculas reduzem a reabsorção óssea (Viereck *et al.*, 2002; Greiner *et al.*, 2007).

### **1.2.1. Efeitos dos bifosfonatos nos osteoblastos e nas células endoteliais**

Apesar do principal alvo dos bifosfonatos *in vivo* ser a inibição da actividade e da formação das células osteoclásticas, existem evidências crescentes de que estas moléculas também podem exercer efeitos directos nas células osteoblásticas e nas suas células progenitoras.

Num ensaio clínico realizado por Recker e seus colaboradores, observou-se que pacientes tratados com zoledronato, administrado intravenosamente, apresentavam uma preservação da arquitectura óssea, com um aumento das funções osteoblásticas de mineralização, mesmo quando ocorreu uma diminuição na remodelação óssea (Recker *et al.*, 2008). Noutro estudo mais recente também se demonstraram os efeitos anabólicos do zoledronato na formação óssea durante o processo de reparação de fracturas (Matos *et al.*, 2010).

Em contrapartida, outros estudos *in vivo* realizados em ratos fêmeas e pacientes humanos, indicaram que o tratamento prolongado com alendronato provocava uma

dupla supressão, nos processos de formação e reabsorção óssea, conduzindo à excessiva diminuição da remodelação óssea e conseqüentemente à acumulação de microdanos fisiológicos (Cao *et al.*, 2002; Odvina *et al.*, 2005).

Estes resultados contraditórios também foram verificados em estudos *in vitro*, envolvendo diferentes sistemas experimentais, com diferentes modelos celulares.

Num estudo realizado por Xiong *et al.*, constatou-se que o tratamento de células da linha celular osteoblástica humana derivada de osteossarcoma, MG63, com alendronato ( $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M), estimulava a proliferação celular e regulava positivamente a expressão de marcadores osteoblásticos, suportando a hipótese de que os bifosfonatos têm efeitos anabólicos nos osteoblastos (Xiong *et al.*, 2009). Também Im e seus colaboradores verificaram que o risedronato ( $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M) e o alendronato ( $10^{-11}$  a  $10^{-5}$  M) aumentavam a proliferação das células MG63 (Im *et al.*, 2004).

Outros trabalhos têm demonstrado que o tratamento de células osteoblásticas humanas com zoledronato, em elevadas concentrações, aumenta a expressão de marcadores de diferenciação osteoblásticos, estimulando a diferenciação destas células e o seu potencial de mineralização (Pan *et al.*, 2004; Greiner *et al.*, 2007; Koch *et al.*, 2010).

Von Knoch e colaboradores, num estudo realizado em 2005, verificaram que o zoledronato, o risedronato e o alendronato, aplicados na concentração de  $10^{-8}$  M, aumentavam a proliferação de células osteoprogenitoras e estimulavam a sua diferenciação. Em concordância com estes resultados está o estudo realizado por Duque e colaboradores, através do qual demonstraram os efeitos anabólicos do alendronato nestas células quando administrado às concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  M (Duque *et al.*, 2007).

Naidu *et al.*, observaram que o alendronato e o zoledronato, quando administrados em concentrações micromolares definidas para terapêutica, estimulavam a expressão dos marcadores de diferenciação osteoblástica, confirmando os seus efeitos terapêuticos benéficos. No entanto, estes autores verificaram que a administração destes fármacos em doses superiores às definidas para terapêutica desencadeava efeitos citotóxicos na viabilidade e funções osteoblásticas, podendo conduzir à morte celular e osteonecrose (Naidu *et al.*, 2008).

Outras pesquisas indicaram que a exposição contínua de células osteoblásticas de calvário de rato ao zoledronato, em concentrações nanomolares, reduzia o número de osteoblastos e inibia a mineralização óssea, enquanto o pamidronato e o clodronato

desencadeavam estes efeitos em concentrações micromolares. Em contrapartida, verificaram que por períodos curtos ou intermitentes, o zoledronato e o pamidronato inibiam a mineralização óssea em concentrações micromolares (Orriss *et al.*, 2009). Idris e colaboradores demonstraram que a exposição das mesmas células ao alendronato e ao pamidronato, por períodos longos e intermitentes, inibia a diferenciação celular e a mineralização óssea em concentrações nanomolares e inibia a viabilidade celular, induzindo apoptose, em concentrações micromolares (Idris *et al.*, 2008). Em culturas de células MG63 e da linha celular osteoblástica humana derivada de osteossarcoma (SaOS-2), também se verificou que o tratamento destas células com zoledronato, em concentrações micromolares, desencadeava efeitos citotóxicos nas células, diminuindo a expressão de marcadores osteoblásticos, a proliferação, a actividade e a viabilidade celular (Tenta *et al.*, 2006; Simon *et al.*, 2008).

Desta análise bibliográfica, verifica-se que os bifosfonatos podem ter actividade estimuladora e inibidora na diferenciação e na actividade das células osteoblásticas, sendo que existem um conjunto de factores que determinam o tipo de actividade desempenhada por estas moléculas nos diversos estudos, nomeadamente, os modelos celulares em estudo, o sistema experimental utilizado, o potencial farmacológico de cada bifosfonato, o seu período de administração e as doses/concentrações utilizadas (Schindeler e Little, 2007).

Diversos estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, demonstraram que os bifosfonatos também têm propriedades anti-angiogénicas. Num ensaio clínico realizado por Santini e colaboradores, observou-se que a administração de zoledronato, por períodos intermitentes e em baixas doses, levava à diminuição dos níveis do factor VEGF, sugerindo o potencial anti-angiogénico deste fármaco em pacientes com cancro (Santini *et al.*, 2007). Também Allegra e colaboradores demonstraram que a administração do zoledronato e do pamidronato inibia a síntese deste factor, condicionando a diferenciação e a proliferação das células progenitoras endoteliais em pacientes com osteonecrose da mandíbula (ONJ) (Allegra *et al.*, 2007).

Outros autores constataram que a aplicação do zoledronato e do alendronato em ratos fêmeas *in vivo*, induzia efeitos anti-angiogénicos pela acção inibidora directa nas células endoteliais, contribuindo para o tratamento e disseminação de tumores. Além disso, demonstraram que a acção destes fármacos *in vitro*, inibia a proliferação, a migração e a adesão das células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) e em

concentrações mais elevadas induzia a apoptose celular (Wood *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2007).

Num estudo realizado por Michailidou e seus colaboradores em 2010, observou-se que a aplicação do zoledronato em concentrações micromolares, não causava efeitos adversos na microvasculatura de ratos machos CD1 *in vivo*. Em contrapartida, demonstrou-se que *in vitro* as mesmas concentrações micromolares de zoledronato, reduziam a proliferação, a migração e a prenitação de proteínas de HDMECs. Também Yamada e colaboradores demonstraram que o tratamento *in vitro* com zoledronato, em concentrações micromolares, desencadeava efeitos anti-angiogénicos, inibindo a actividade proliferativa e a diferenciação de células progenitoras endoteliais, e induzindo apoptose celular com a concentração mais alta testada (Yamada *et al.*, 2009).

Outros autores verificaram que diferentes bifosfonatos têm diferentes actividades anti-angiogénicas *in vitro*. O tratamento de HUVECs com clodronato, ibandronato, pamidronato e zoledronato, em concentrações micromolares, demonstrou que os N-BPs provocavam maiores efeitos inibitórios nas células endoteliais que o NN-BP (clodronato). Além disso, observou-se que os N-BPs, zoledronato e pamidronato, provocavam maior impacto inibidor nas funções celulares, inibindo a sua migração e induzindo apoptose, comparativamente com o N-BP ibandronato (Walter *et al.*, 2010; Ziebart *et al.*, 2011).

É conhecido que os processos de formação e reparação óssea são coordenados pela relação íntima, física e bioquímica, entre as células endoteliais e os osteoblastos, regulada pela participação activa de factores de crescimento parácrinos, citocinas, hormonas e vitaminas sistémicas, presentes no microambiente ósseo (Carano e Filvaroff, 2003). Esta regulação recíproca entre os osteoblastos e as células endoteliais já foi demonstrada em diversos estudos.

Alguns autores verificaram que o contacto directo entre células progenitoras osteoblásticas humanas (HOPs) e HUVECs (Grellier *et al.*, 2009), e entre células osteoblásticas humanas (HOBs) e HDMECs (Santos *et al.*, 2009), em co-culturas, desencadeava uma estimulação recíproca entre si, mediada pelo aumento da secreção do factor VEGF, a nível da actividade, da expressão, da migração e da diferenciação celular (Grellier *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). Além disso, verificaram a formação de canais intercelulares “gap” de proteínas *connexin 43*, entre as células em contacto directo, que permitiam a comunicação celular e o transporte molecular (Santos *et al.*, 2009). Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Clarkin e

colaboradores, através dos quais demonstraram que em co-culturas de HOBs e HUVECs, sem contacto directo, ocorria uma estimulação recíproca igualmente mediada pelo aumento da secreção deste factor (Clarkin *et al.*, 2008).

A estimulação das células osteoblásticas mediada pelas células endoteliais, foi também demonstrada em outros estudos *in vitro*, onde se verificou que as HUVECs estimulavam a proliferação e a expressão de marcadores de diferenciação das células MG63 (Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). Villars e colaboradores demonstraram em diferentes estudos, que o contacto directo de células do estroma da medula óssea humana (HBMSCs) e HUVECs, em co-cultura, desencadeava a estimulação da diferenciação das células progenitoras osteoblásticas, por parte das células endoteliais (Villars *et al.*, 2000; Villars *et al.*, 2002), mediada pela formação de canais intercelulares “gap” de proteínas *connexin 43*, que estabeleciam a comunicação molecular entre as células (Villars *et al.*, 2002).

A influência inversa foi também demonstrada em outros sistemas de co-cultura *in vitro*, onde Hofmann e colaboradores verificaram que as células HOBs estimulavam a sobrevivência, a proliferação e a neovascularização das HUVECs (Hofmann *et al.*, 2008) e Unger *et al.*, demonstraram que as células MG63 e da linha celular osteoblástica humana derivada de osteossarcoma (HOS) estimulavam a actividade, a sobrevivência e a expressão das HDMECs, com efeitos mediados pelo aumento da produção do factor VEGF (Unger *et al.*, 2007).

Apesar de existirem diversos estudos que comprovam a existência de interacções entre as células osteoblásticas e as células endoteliais durante o processo de osteogénese, a influência que os bifosfonatos têm nesta relação nunca foi estudada.

### **1.2.2. Efeitos adversos associados ao uso de bifosfonatos**

Os efeitos benéficos do uso dos bifosfonatos no tratamento de doenças ósseas são actualmente bem conhecidos. No entanto, além dos seus efeitos benéficos, estes fármacos também têm efeitos adversos associados. Entre eles, estão os efeitos adversos inespecíficos, nomeadamente, efeitos gastrointestinais, efeitos renais e reacções de fase aguda. Recentemente foi descrita a osteonecrose dos maxilares como um efeito adverso específico do uso de bifosfonatos, tendo-se tornado o principal alvo de estudos desde então (Ruggiero *et al.*, 2004; Ruggiero *et al.*, 2009).

Esta patologia é caracterizada pela dificuldade na cura e cicatrização de lesões na região maxilofacial quando ocorre exposição óssea. Manifesta-se pelo surgimento de alterações na integridade da mucosa oral, como infecções, tecido necrótico, trauma, diminuição óssea e formação de granulócitos na área afectada. Quando esta patologia é desenvolvida de modo espontâneo, formam-se rugosidades internas que traumatizam os tecidos moles em torno da área necrótica (Migliorati *et al.*, 2005a; Migliorati *et al.*, 2005b; Bedogni *et al.*, 2010; Ziebart *et al.*, 2011).

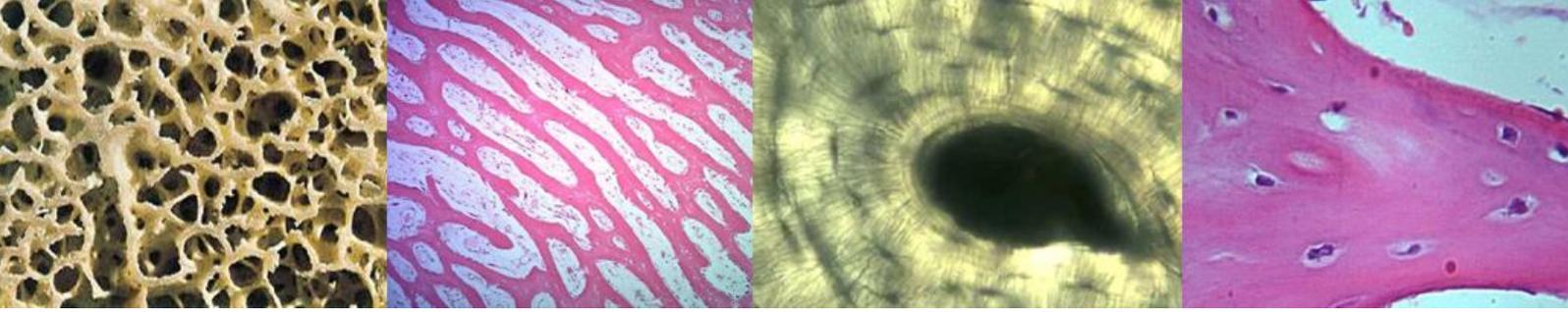
Os bifosfonatos são considerados o principal factor de risco associados ao desenvolvimento da osteonecrose maxilofacial, sendo que o seu grau de influência no desenvolvimento da patologia é marcado pela sua potência e duração da terapia. No entanto, existem outros factores de risco locais associados, nomeadamente, procedimentos cirúrgicos dentários que incluem extracções e implantes, cirurgias periapicais e periodontais que envolvam lesões ósseas, as características anatómicas mandibulares e maxilares dos pacientes, bem como o historial de doenças dentárias inflamatórias. A idade, raça, tabaco, álcool, obesidade, diabetes, problemas renais e tratamentos com agentes quimioterapêuticos e esteróides, constituem os factores de risco sistémicos (Ruggiero *et al.*, 2009).

Até a data, o desenvolvimento de osteonecrose associada ao uso de bifosfonatos é um acontecimento exclusivo da mandíbula e da maxila. Este acontecimento é devido à elevada actividade diária da cavidade bucal, devido às forças da mastigação, que levam ao constante surgimento de microdanos e microfracturas, que implicam uma necessidade acrescida de remodelação/reparação óssea e um fornecimento sanguíneo mais elevado, tornando-a o principal alvo de concentração e actividade dos bifosfonatos (Marx *et al.*, 2005; Lehrer *et al.*, 2008). No entanto, os tratamentos dentários invasivos que levam à exposição óssea na cavidade oral conduzem a uma perda da capacidade de reparação óssea, isto porque as concentrações elevadas de bifosfonatos no local inibem a actividade das células osteoblásticas e osteoclásticas de remodelação óssea (Ruggiero *et al.*, 2004; Walter *et al.*, 2010; Koch *et al.*, 2011), bem como as células endoteliais angiogénicas, induzindo hipovascularização (Ruggiero *et al.*, 2004; Allegra *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2010; Ziebart *et al.*, 2011), que como consequência leva ao desenvolvimento de osteonecrose no local lesado. Actualmente já está comprovado que as lesões osteonecróticas têm uma maior incidência na mandíbula comparativamente com a maxila (Ruggiero *et al.*, 2004; Marx *et al.*, 2005; Migliorati *et al.*, 2005b).

Diversos autores já relataram casos de pacientes que desenvolveram osteonecrose da mandíbula associada ao tratamento de tumores, como mieloma múltiplo e metastases ósseas de cancro de mama e da próstata, com os bifosfonatos intravenosos pamidronato e zoledronato (Marx, 2003; Ruggiero *et al.*, 2004; Migliorati *et al.*, 2005b; Lehrer *et al.*, 2008; Lobato *et al.*, 2008; Cetiner *et al.*, 2009; Lehrer *et al.*, 2009). Adicionalmente, também já foram demonstrados casos de pacientes que desenvolveram osteonecrose da mandíbula resultante da administração oral do alendronato para o tratamento de osteoporose e osteopenia (Ruggiero *et al.*, 2004; Marx *et al.*, 2005; Migliorati *et al.*, 2005b; Lehrer *et al.*, 2008; Lehrer *et al.*, 2009; Bedogni *et al.*, 2010). Em alguns casos os pacientes foram também tratados com agentes quimioterapêuticos e esteróides (Ruggiero *et al.*, 2004; Marx *et al.*, 2005; Migliorati *et al.*, 2005b). Como factor comum em todos os estudos, verificou-se que a grande maioria dos pacientes tinha sido submetida a intervenções dentárias, que implicaram a exposição óssea mandibular com dificuldades na cura e cicatrização do tecido exposto. A incidência de osteonecrose da mandíbula em pacientes tratados com bifosfonatos intravenosos para o tratamento de tumores, é mais elevada que nos pacientes que tomam bifosfonatos orais para o tratamento de osteoporose (Cetiner *et al.*, 2009; Ruggiero *et al.*, 2009).

Actualmente já são conhecidas algumas estratégias que podem ser utilizadas como tratamento revertível da osteonecrose da mandíbula, entre eles está o tratamento com antibióticos, terapia com oxigénio hiperbárico, desbridamento cirúrgico, tratamento de infecções secundárias, curetagem óssea, irrigação do local com anti-corpos e a descontinuidade do tratamento com bifosfonatos. Em alguns casos verificou-se que o tratamento com antibióticos, o desbridamento cirúrgico e a descontinuidade do tratamento com bifosfonatos, apresentaram alguma eficácia, tendo permitido uma recuperação parcial das lesões (Migliorati *et al.*, 2005b; Lobato *et al.*, 2008; Cetiner *et al.*, 2009; Scoletta *et al.*, 2010). No entanto, a eficácia destes tratamentos nem sempre se verificou (Ruggiero *et al.*, 2004; Migliorati *et al.*, 2005b; Bedogni *et al.*, 2010), sugerindo que as melhores medidas a tomar são as preventivas, recomendando-se no caso do tratamento com bifosfonatos intravenosos, o seu uso limitado, diferentes regimes e doses ao longo do período de tratamento, evitar cirurgias dentárias durante período de administração do fármaco, avaliar continuamente a saúde oral do paciente, optar por intervenções dentárias antes de iniciar o tratamento e apenas proceder a intervenções não invasivas pelo menos 3 meses após interromper o tratamento com os fármacos. No caso dos pacientes tratados com bifosfonatos orais, além de ser

fundamental uma boa higiene e saúde oral, qualquer intervenção dentária realizada durante o tratamento com estes fármacos deve incluir o uso de antibióticos 3 semanas antes do procedimento (Marx, 2003; Marx *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2008; Cetiner *et al.*, 2009; Ruggiero *et al.*, 2009; Rizzoli *et al.*, 2011).



## 2. OBJETIVOS



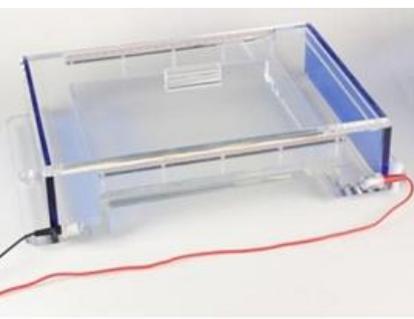
Os efeitos anti-reabsortivos dos bifosfonatos no processo de remodelação óssea são actualmente bem conhecidos, no entanto, tem vindo a desenvolver-se um interesse crescente em determinar os efeitos destes fármacos na acção coordenada entre os processos de osteogénese e angiogénese, implicados na formação óssea.

Com base nas interacções existentes entre as células osteoblásticas e as células endoteliais, o principal objectivo do presente estudo é analisar o perfil dose-efeito de dois bifosfonatos representativos e muito utilizados na terapêutica clínica, o alendronato e zoledronato, no comportamento de células humanas osteoblásticas e endoteliais, MG63 e HDMECs respectivamente, em sistema de monocultura e co-cultura.

Pretendeu-se assim, avaliar o efeito destes compostos na viabilidade/proliferação celular, nas características fenotípicas e na expressão génica, em células MG63 e HDMECs, de modo a obter informações que simulem a relação íntima existente *in vivo* entre os processos de angiogénese e osteogénese, durante a formação óssea e compreender a relevância das interacções entre estes dois processos nos efeitos dos bifosfonatos no tecido ósseo.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS



### 3.1. PREPARAÇÃO DO ALENDRONATO E DO ZOLEDRONATO

O alendronato foi adquirido à empresa Sigma-Aldrich®, na forma de pó seco. Foi dissolvido em PBS (*phosphate buffered saline*) e dividido em várias alíquotas stock de 1 ml com uma concentração de  $10^{-2}$  M. As soluções testadas foram preparadas a partir de uma das soluções stock diluída em PBS.

O zoledronato (Aclasta®, 5mg/100ml) foi adquirido à empresa Novartis Farma® em frasco estéril na forma líquida, a partir do qual se prepararam directamente varias soluções stock com uma concentração de  $1,84 \times 10^{-4}$  M em alíquotas de 1 ml. As soluções testadas foram preparadas a partir de uma das soluções stock diluída em PBS.

As concentrações de bifosfonatos testadas tiveram por base informações obtidas em estudos dose-efeito semelhantes, através dos quais se excluíram os níveis que causam uma rápida morte celular (Garcia-Moreno *et al.*, 1998; Wood *et al.*, 2002; Im *et al.*, 2004; Hashimoto *et al.*, 2007; Naidu *et al.*, 2008; Xiong *et al.*, 2009; Michailidou *et al.*, 2010).

### 3.2. CULTURA DE CÉLULAS

#### 3.2.1. Células da linha osteoblástica humana MG63

As células da linha osteoblástica humana MG63 (ATCC® - *American Type Culture Collection*) foram cultivadas em meio  $\alpha$ -Minimum Essential Medium ( $\alpha$ -MEM, Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco®), 2,5  $\mu$ g/ml de fungizona (Gibco®), 100 UI/ml de penicilina (Gibco®), 2,5  $\mu$ g/ml de estreptomicina (Gibco®) e 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico (Sigma®). As culturas foram feitas em placas de cultura padrão e mantidas em atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>/ar, a 37°C, até atingirem a confluência de 70-80%. Nesta fase, as células foram libertadas enzimáticamente (tripsina 0,04% em 0,25% EDTA).

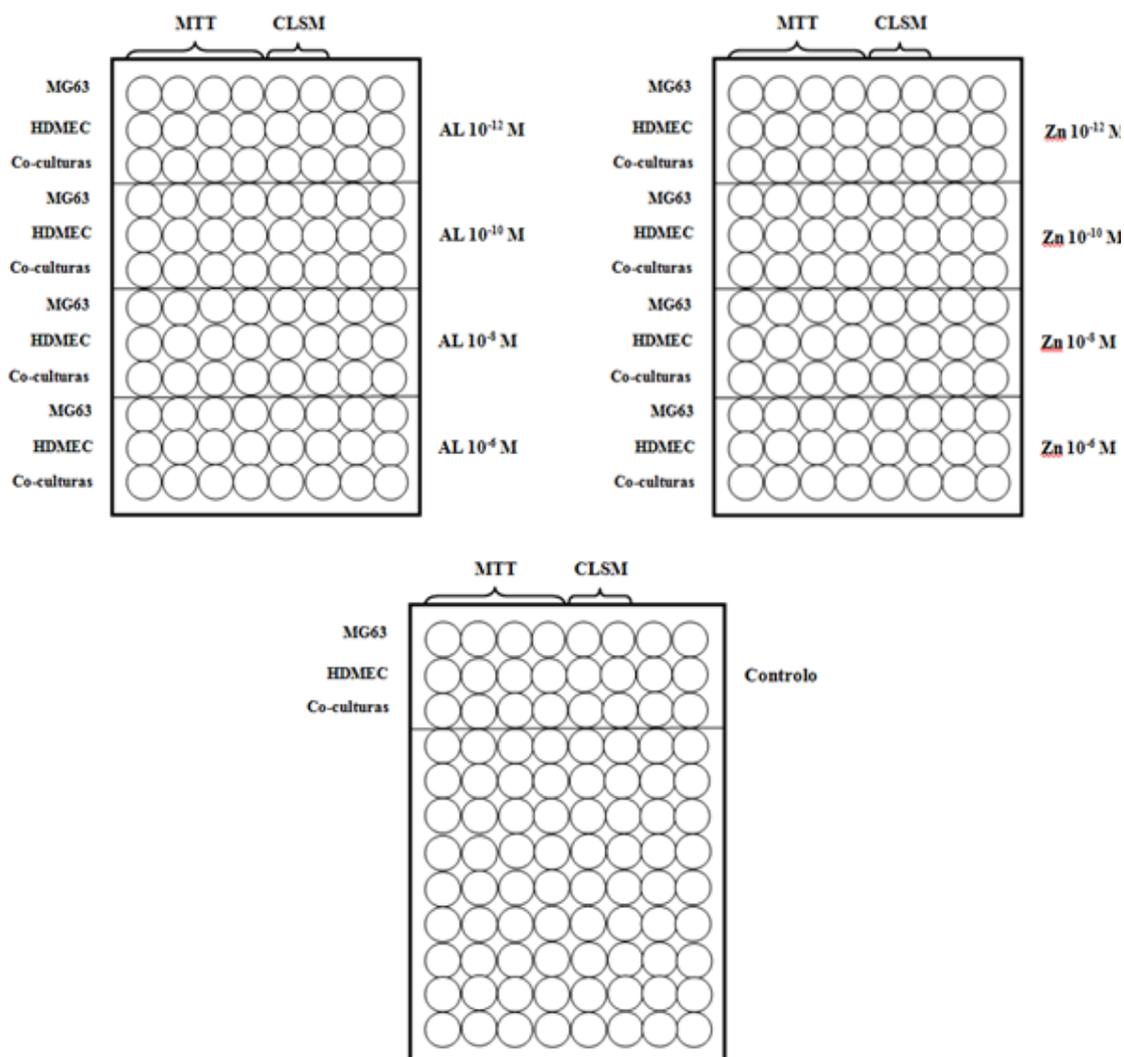
#### 3.2.2. Células endoteliais microvasculares dérmicas humanas

As células endoteliais microvasculares dérmicas humanas, adquiridas na empresa ScienCell®, foram cultivadas em meio basal para cultura de células endoteliais (ECM, ScienCell®), suplementado com 5% de soro bovino fetal (FBS, ScienCell®), 10

UI/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina (solução P/S, Sciencell®) e suplemento para crescimento de células endoteliais (ECGS, Sciencell®). As culturas foram feitas em frascos de cultura padrão, previamente revestidos com fibronectina, e mantidas em atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>/ar, a 37°C, até atingirem a confluência de 70-80%, fase em que as células foram libertadas enzimaticamente (tripsina 0,04% em 0,25% EDTA).

### **3.2.3. Efeitos do alendronato e do zoledronato no comportamento de células MG63 e HDMECs**

As células MG63 em suspensão foram monocultivadas à densidade de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> e a suspensão de HDMECs à densidade de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Fizeram-se co-culturas de células MG63 e HDMECs utilizando as mesmas densidades celulares que nas respectivas monoculturas, nomeadamente na proporção de 1:2. As culturas foram feitas em placas de 96 poços, previamente recobertos com fibronectina. Foram mantidas em meio ECM e em atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>/ar, a 37°C. Após uma noite de incubação mudou-se o meio às culturas aplicando-se os bifosfonatos testados em concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M. As culturas foram mantidas durante 14 dias, com renovação do meio com alendronato e zoledronato nos dias 3, 7 e 10. Em paralelo foram feitas monoculturas e co-culturas controlo, sem alendronato e zoledronato. Fez-se a caracterização das culturas quanto à viabilidade/proliferação celular pelo ensaio MTT, nos dias 2, 7 e 14 de cultura. Através de coloração imunofluorescente seguida de análise por CLSM, avaliou-se a organização do citoesqueleto de F-actina nas células MG63, a expressão da CD31 nas HDMECs e o padrão de crescimento celular e núcleos nas células MG63 e HDMECs, no dia 7 e dia 14 de cultura (Figura 3.1).

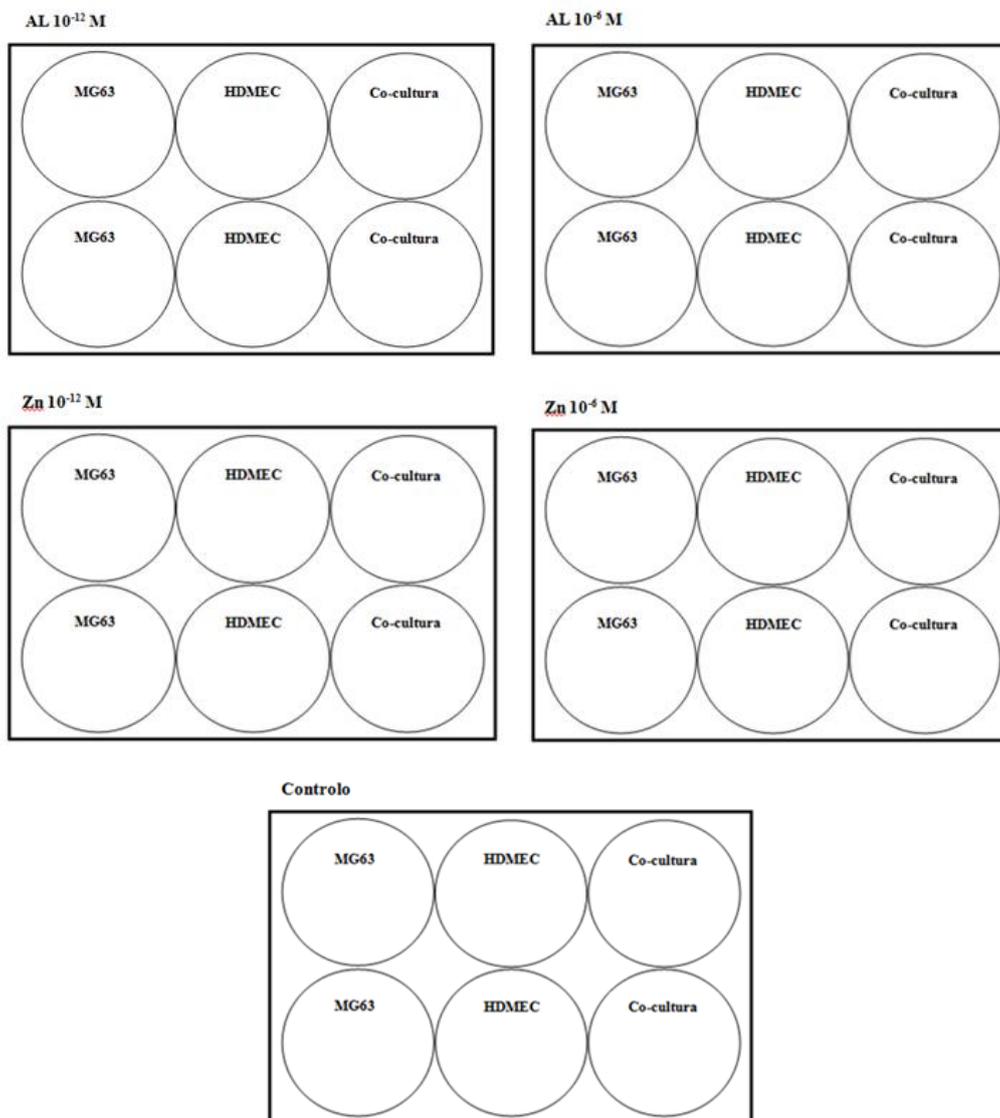


**Figura 3.1-** Esquema ilustrativo da disposição de monoculturas de células MG63, monoculturas de HDMECs e co-culturas de células MG63 e HDMECs, em placas de 96 poços, indicando as diferentes concentrações de alendronato (AL) e zoledronato (Zn) testadas e a condição controlo - ausência dos compostos. São também representados os poços relativos ao ensaio MTT, em que cada placa é representativa para o dia 2, 7 e 14 de cultura, e os poços relativos às colorações imunofluorescentes para visualização por CLSM, sendo cada placa representativa para o dia 7 e 14 de cultura.

### 3.2.4. Efeitos do alendronato e do zoledronato na expressão génica de células MG63 e HDMECs

Monocultivaram-se as células MG63 em suspensão à densidade de  $10^3$  células/cm<sup>2</sup> e a suspensão de HDMECs à densidade de  $10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Fizeram-se co-culturas de células MG63 e HDMECs utilizando as mesmas densidades celulares que nas respectivas monoculturas, nomeadamente na proporção de 1:10. As culturas foram feitas em placas de 6 poços, previamente revestidos com fibronectina, em meio ECM.

Mantiveram-se as culturas em atmosfera húmida de 5% de CO<sub>2</sub>/ar, a 37°C, e após uma noite de incubação mudou-se o meio às culturas aplicando-se os bifosfonatos testados em concentrações de 10<sup>-12</sup> e 10<sup>-6</sup> M. As culturas foram mantidas durante 14 dias, com renovação do meio nos dias 3, 7 e 10. Em paralelo foram feitas monoculturas e co-culturas controlo, sem alendronato e zoledronato. Fez-se a caracterização das culturas quanto à expressão génica por RT-PCR, no dia 7 e dia 14 de cultura, para os genes ALP, BMP-2 e OPG nas células MG-63, e CD31 e CAD-VE nas HDMECs. Nas co-culturas foram analisados todos os genes (Figura 3.2).



**Figura 3.2-** Esquema ilustrativo da disposição de monoculturas de células MG63, monoculturas de HDMECs e co-culturas de células MG63 e HDMECs, em placas de 6 poços, para as duas concentrações de alendronato (AL) e zoledronato (Zn) testadas e na ausência dos compostos (controlo). Cada placa é representativa para o dia 7 e 14 de cultura.

### **3.3. AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO E DA EXPRESSÃO GÉNICA CELULAR**

#### **3.3.1. Ensaio colorimétrico MTT**

Este ensaio consiste na redução do *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT, Sigma®) num produto de reacção formazan de cor púrpura que se acumula no citoplasma das células viáveis, permitindo identificar a viabilidade/proliferação celular. Para tal, as culturas foram incubadas durante 3 horas com reagente MTT (0,5 mg/ml). Aspirou-se o meio dos poços e dissolveram-se os sais cristalinos de formazan em dimetilsulfóxido (DMSO - 100µl por poço). Determinou-se a absorvância a um comprimento de onda de 550 nm num leitor de ELISA.

#### **3.3.2. Coloração por imunofluorescência dos filamentos do citoesqueleto de F-actina, CD31 e núcleos**

Após duas lavagens com PBS não-estéril, as culturas foram fixadas com 4% de formaldeído (isento de metanol) durante 15 minutos, permeabilizadas em 0,1% de triton (TX-100) (5 min, TA) e incubadas em 10 mg/ml de albumina sérica bovina (BSA)/(PBS) com 100 µg/ml RNase (1h, TA).

Os filamentos de F-actina das monoculturas de células MG63 foram corados com Alexa-Fluor conjugada com faloidina diluída em 1% de BSA/PBS (1:100, 1h, TA).

As monoculturas de HDMECs e co-culturas foram incubadas com o anti-corpo primário CD31 diluído em 1% BSA/PBS (1:100, 45 min, TA), seguido da aplicação do anti-corpo secundário anti-murganho Alexa-Fluor diluído em 1% BSA/PBS (1:1000, 45 min, TA).

Os núcleos das células em monocultura e co-cultura foram contrastados com 10 µg/ml de iodeto de propídeo diluído em PBS (10 min, TA).

Lavaram-se todos os poços com PBS e adicionou-se meio de montagem *Vectashield*®. As culturas fluorescentes foram observadas e analisadas por microscopia laser confocal (CLSM, Leica® TCP SP2 AOBS). Toda a execução deste procedimento foi efectuada de modo rápido e no escuro.

### 3.3.3. Extração do RNA total e análise por Reacção em Cadeia da Polimerase por Transcrição Reversa (RT-PCR)

O RNA total foi extraído usando o kit *NucleoSpin® RNA II* (Macherey-Nagel) seguindo as instruções do fabricante. A concentração e pureza do RNA total em cada amostra foram determinadas por espectrometria U.V. a 260 nm e calculando a razão de absorvência a 260nm/280nm, respectivamente.

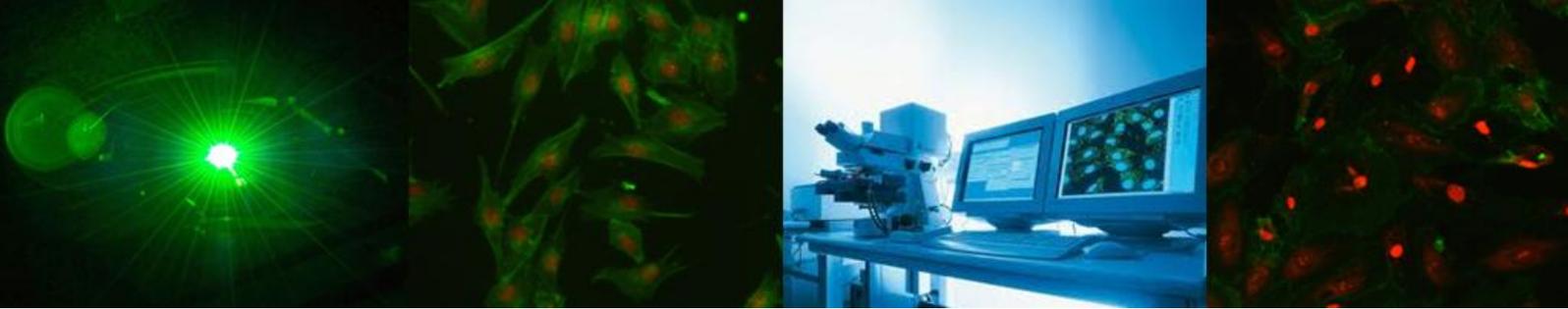
O RNA total de cada amostra foi amplificado por RT-PCR utilizando o sistema *Titan One Tube RT-PCR* (Roche® Applied Science), em 30 ciclos. Cada mistura de reacção a amplificar consistiu no RNA total extraído, *Titan RT-PCR buffer*, *DL-dithiothreitol* (DTT), *deoxynucleoside triphosphate* (dNTP), *primers forward e reverse* para cada gene testado, *avian myeloblastosis virus RT* (AMV-RT) e água, num volume total de 25µl. O RNA total de cada amostra foi pela transcriptase reversa AMV convertido em cDNA (30 minutos a 50°C), que foi depois amplificado por PCR através da enzima Taq DNA polimerase recombinante a diferentes temperaturas de emparelhamento. Para os genes GADPH, ALP, CAD-VE e CD31 a temperatura de emparelhamento foi de 55°C e para os genes OPG e BMP-2 foi de 60°C. Os *primers* utilizados estão listados na tabela 3.1. Após obter os produtos de PCR, estes foram analisados por electroforese em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídeo e semi-quantificados por densitometria através do software Image J®. Os resultados foram expressos como média normalizada e o GADPH foi utilizado para a normalização dos valores de densidade integrada obtidos para cada gene.

**Tabela 3.1-** *Primers* utilizados na análise por RT-PCR de monoculturas de células MG63, monoculturas de HDMECs e co-culturas de células MG63 e HDMECs.

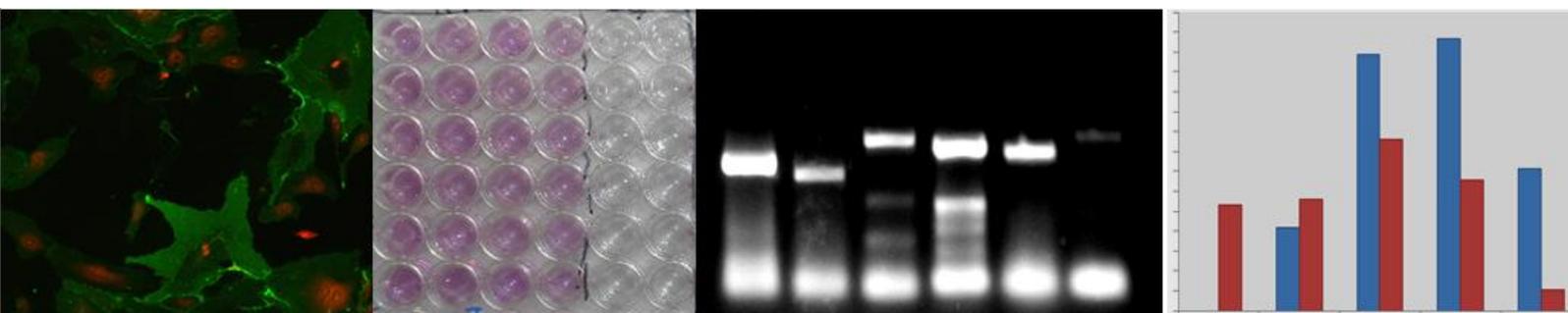
| Gene   | 5' Primer                             | 3' Primer                              |
|--------|---------------------------------------|--|
| GADPH  | 5'- GGA AGG TGA AGG TCG GAG TCA AC-3' | 5'- GTG GCA GTG ATG GCA TGG ACT GT- 3' |
| ALP    | 5'- ACG TGG CTA AGA ATG TCA TC-3'     | 5'- CTG GTA GGC GAT GTC CTT A-3'       |
| BMP-2  | 5'- GAC GAG GTC CTG AGC GAG TT- 3'    | 5'- GCA ATG GCC TTA TCT GTA AC-3'      |
| OPG    | 5'- AAG GAG CTG CAG TAG GTC AA-3'     | 5'- CTG CTC GAA GGT GAG GTT AG-3'      |
| CAD-VE | 5'- GAG TCG CAA GAA TGC CAA GT-3'     | 5'- TAC TTG GTC ATC CGG TTCTG-3'       |
| CD31   | 5'- ATG AAG AGC CTG CCG GAC TG-3'     | 5'- TTC CGT CAC GGT GAC CAG TT-3'      |

### **3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Para realizar a análise estatística utilizamos o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS®) v.19.0. No ensaio quantitativo MTT foram realizadas 4 réplicas e os resultados obtidos foram expressos com a média  $\pm$  o desvio padrão. Foi também realizado a análise de variância por uma via e o teste estatístico de comparação múltipla de Dunnett®. Os valores obtidos que apresentaram um  $p \leq 0.05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## 4. RESULTADOS

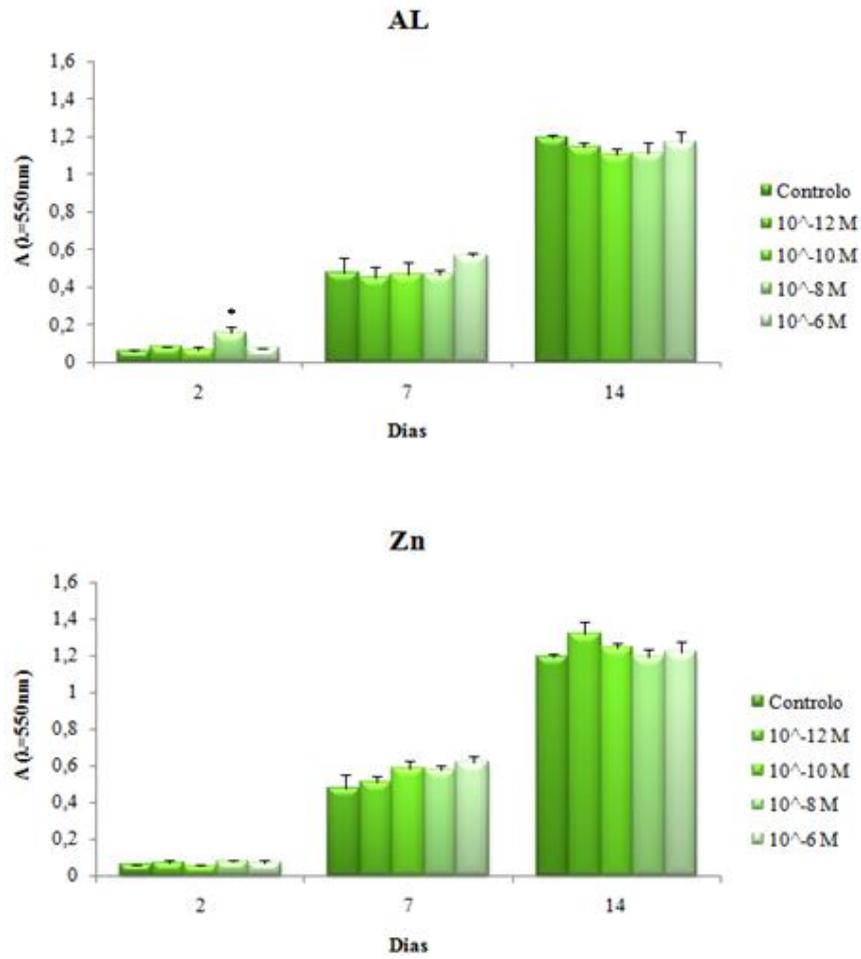


#### **4.1. EFEITOS DO ALENDRONATO E DO ZOLEDRONATO NO COMPORTAMENTO DE CÉLULAS MG63 E HDMECS**

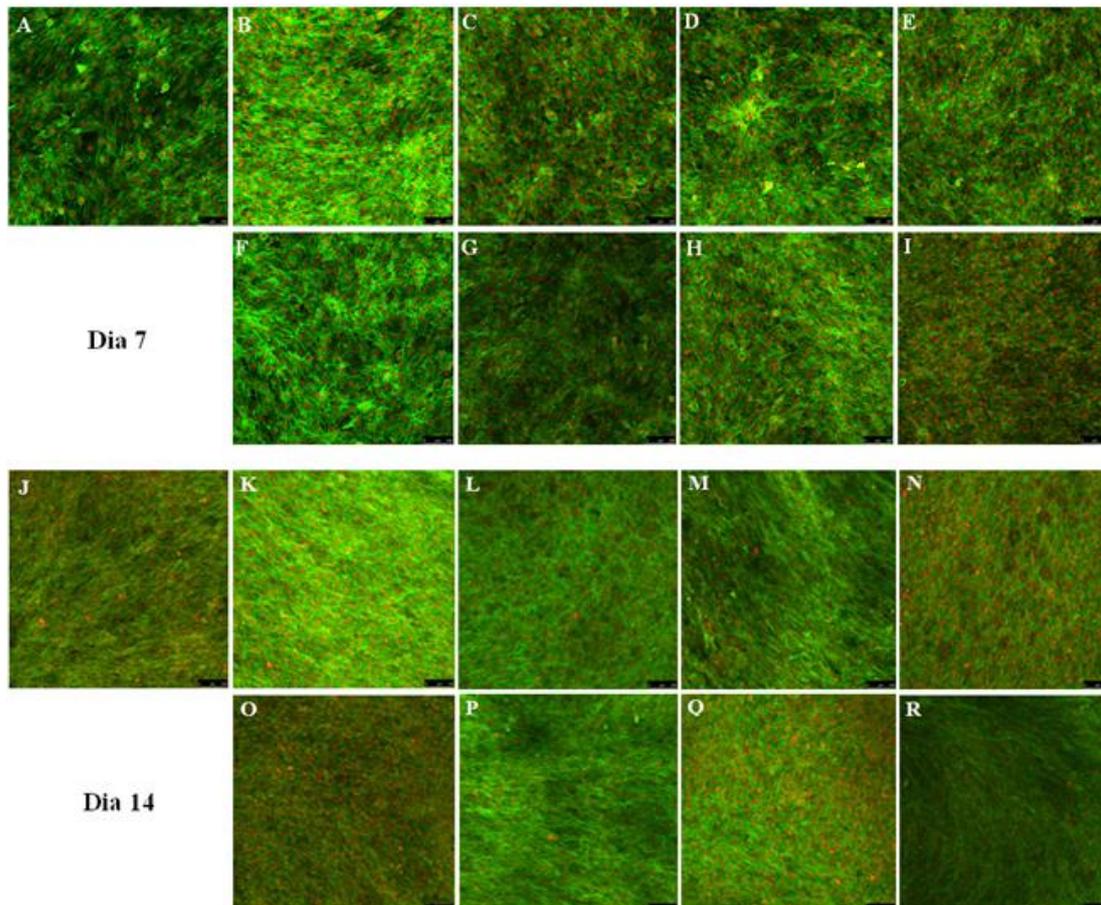
As células MG63 e HDMECs em monoculturas e em co-culturas foram expostas ao alendronato e zoledronato durante 14 dias, em concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M, para caracterização do comportamento celular, nomeadamente: a viabilidade/proliferação, a morfologia, o padrão de crescimento celular e a actividade funcional.

##### **4.1.1. Monoculturas de células da linha osteoblástica humana MG63**

A exposição ao alendronato e ao zoledronato nas concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M, induziu um comportamento celular semelhante à condição controlo, no que diz respeito à viabilidade/proliferação celular, analisadas pelo ensaio MTT (Figura 4.1), tendo-se verificado que as células MG63 cresceram activamente ao longo dos 14 dias de cultura. No entanto, ao dia 2, verificou-se que a administração da concentração de  $10^{-8}$  M de alendronato conduziu a uma taxa de proliferação celular significativamente diferente do controlo. No estudo realizado para observar a morfologia das células por CLSM (Figura 4.2), verificamos que as células coradas para o citoesqueleto de F-actina e para os núcleos demonstraram ao dia 7 uma morfologia alongada, núcleos bem definidos e proeminentes, uma organização do citoesqueleto de F-actina normal e a presença de contactos célula-célula, com um padrão de crescimento aleatório e bem distribuído. Ao dia 14, o padrão de crescimento celular apresentado foi típico, em que as células demonstraram uma morfologia fibroblástica, espalhando-se progressivamente por toda a superfície de cultura e com uma orientação paralela.



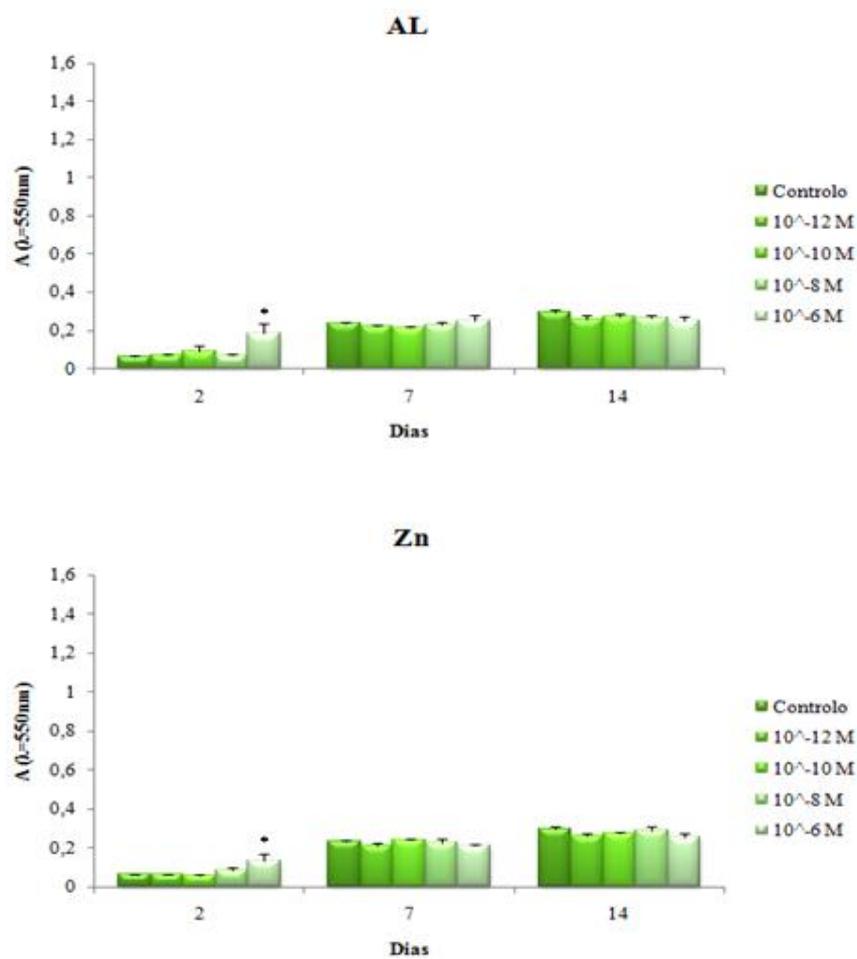
**Figura 4.1-** Viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) de células MG63, monocultivadas na ausência (controlo) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), em concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M. \*  $p \leq 0.05$ , significativamente diferente do controlo.



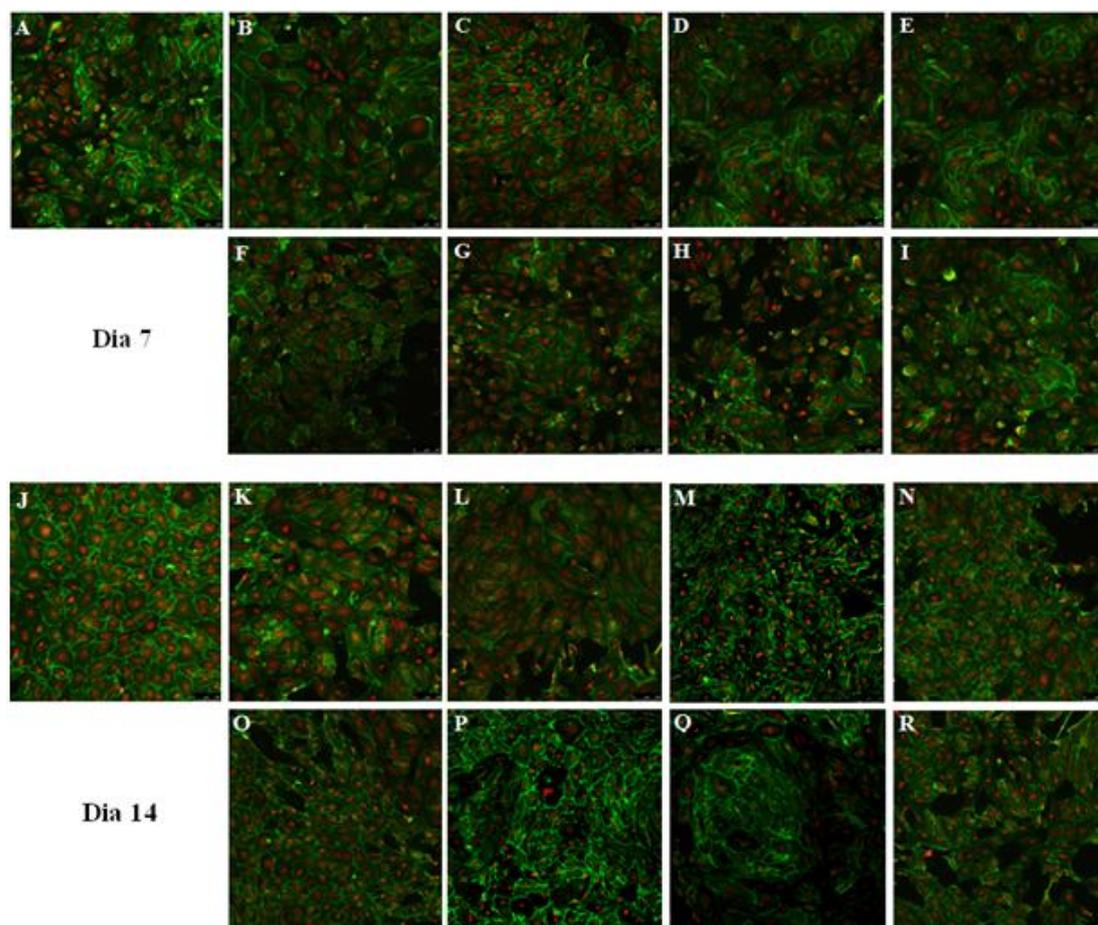
**Figura 4.2-** Imagens CLSM de monoculturas de células MG63 (200×), na ausência dos compostos (A e J), na presença de alendronato às concentrações de  $10^{-12}$  (B e K),  $10^{-10}$  (C e L),  $10^{-8}$  (D e M) e  $10^{-6}$  M (E e N), e na presença de zoledronato às concentrações de  $10^{-12}$  (F e O),  $10^{-10}$  (G e P),  $10^{-8}$  (H e Q) e  $10^{-6}$  M (I e R). Culturas coradas para o citoesqueleto de F-actina (verde) e núcleos (vermelho).

#### 4.1.2. Monoculturas de células endoteliais microvasculares dérmicas humanas

Através do ensaio MTT verificou-se que o alendronato e o zoledronato, a baixas e altas concentrações, não causaram alterações na viabilidade/proliferação celular das HDMECs ao longo dos 14 dias de cultura, excepto à concentração mais elevada dos compostos, que ao dia 2 foi significativamente diferente do controlo (Figura 4.3). Pelas imagens representativas CLSM, demonstrou-se que as monoculturas de HDMECs coradas para a CD31 e para os núcleos apresentaram uma morfologia normal, com tendência para uma forma circular, núcleos bem definidos, extensões citoplasmáticas e a presença de contactos célula-célula. O marcador fenotípico endotelial, CD31, manteve a sua expressão ao longo do período de cultura e para todas as condições testadas, excepto à concentração mais alta de zoledronato, onde a sua expressão diminuiu ao longo do tempo (Figura 4.4).



**Figura 4.3-** Viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) de HDMECs, monocultivadas na ausência (controlo) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), em concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M. \*  $p \leq 0,05$ , significativamente diferente do controlo.

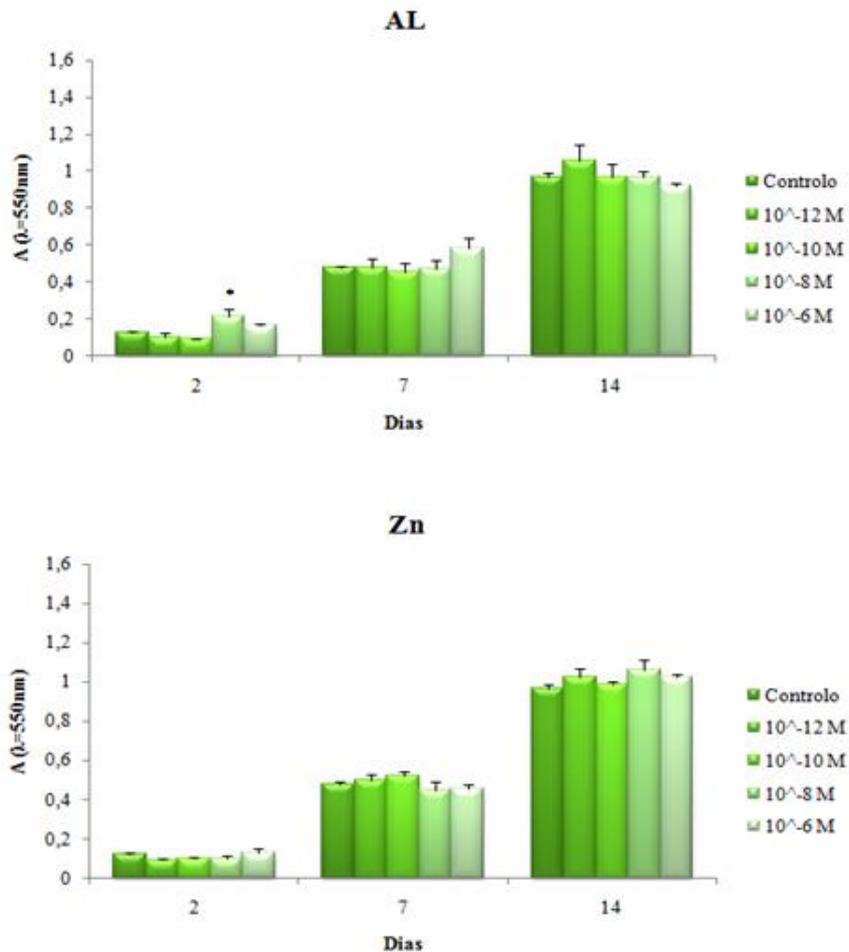


**Figura 4.4-** Imagens CLSM de monoculturas de HDMECs (200×), na ausência dos compostos (A e J), na presença de alendronato às concentrações de  $10^{-12}$  (B e K),  $10^{-10}$  (C e L),  $10^{-8}$  (D e M) e  $10^{-6}$  M (E e N), e na presença de zoledronato às concentrações de  $10^{-12}$  (F e O),  $10^{-10}$  (G e P),  $10^{-8}$  (H e Q) e  $10^{-6}$  M (I e R). Culturas coradas para a CD31 (verde) e núcleos (vermelho).

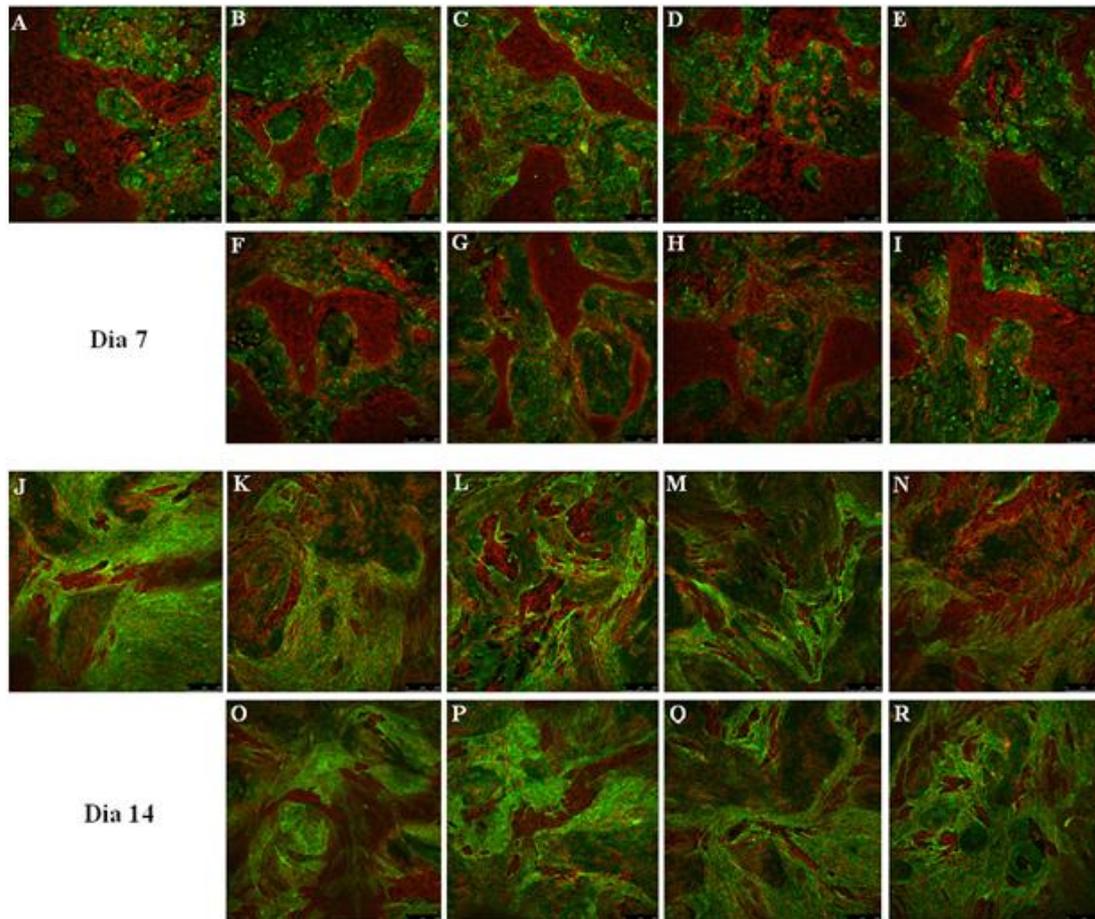
#### 4.1.3. Co-culturas de células MG63 e HDMECs

As células MG63 e HDMECs co-cultivadas numa proporção de 1:2, demonstraram, através do ensaio MTT, um aumento da viabilidade/proliferação celular desde o dia 2 até ao dia 14 de cultura, na ausência e na presença das diferentes concentrações de alendronato e de zoledronato. Ao dia 2, verificou-se que à concentração de  $10^{-8}$  M de alendronato, a taxa de proliferação celular foi significativamente diferente do controlo (Figura 4.5). Através das imagens representativas CLSM, verificou-se que as células MG63 e HDMECs apresentaram uma morfologia característica. Ao dia 7 as células osteoblásticas apresentaram-se em clusters rodeadas pelas células endoteliais, demonstrando a presença de contactos célula-célula, no entanto, ao dia 14 este padrão foi substituído por uma mistura das duas populações celulares. Este comportamento celular foi observado em todas as condições testadas. As

co-culturas foram coradas para a CD31 e para os núcleos, demonstrando que o marcador CD31 manteve a sua expressão ao longo dos 14 dias de cultura, na ausência e na presença dos compostos (Figura 4.6).



**Figura 4.5-** Viabilidade/proliferação celular (ensaio MTT) de células MG63 e HDMECs, co-cultivadas na ausência (controlo) na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), em concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M. \*  $p \leq 0.05$ , significativamente diferente do controlo.



**Figura 4.6-** Imagens CLSM de co-culturas de células MG63 e HDMECs (100×), na ausência dos compostos (A e J), na presença de alendronato às concentrações de  $10^{-12}$  (B e K),  $10^{-10}$  (C e L),  $10^{-8}$  (D e M) e  $10^{-6}$  M (E e N), e na presença de zoledronato às concentrações de  $10^{-12}$  (F e O),  $10^{-10}$  (G e P),  $10^{-8}$  (H e Q) e  $10^{-6}$  M (I e R). Culturas coradas para a CD31 (verde) e núcleos (vermelho).

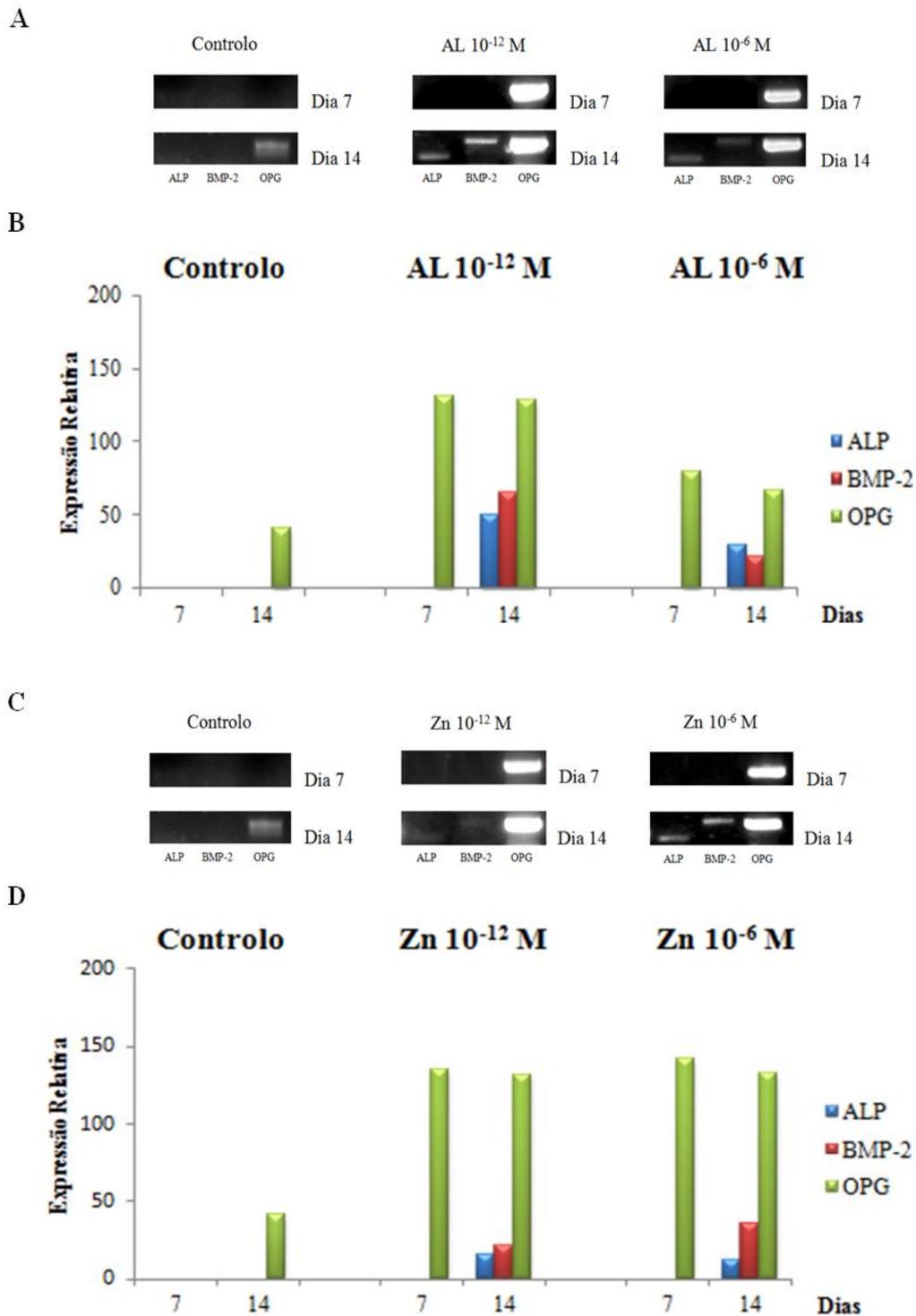
## 4.2. EFEITOS DO ALENDRONATO E DO ZOLEDRONATO NA EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS MG63 E HDMECS

As células MG63 e HDMECs em monoculturas e co-culturas foram expostas ao alendronato e zoledronato durante 14 dias, em concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M, para caracterização da expressão gênica de marcadores osteoblásticos e de células endoteliais.

### 4.2.1. Monoculturas de células da linha osteoblástica humana MG63

Pela análise semi-quantitativa dos produtos de RT-PCR realizada em monoculturas de células MG63, avaliou-se a expressão dos marcadores ALP, BMP-2 e

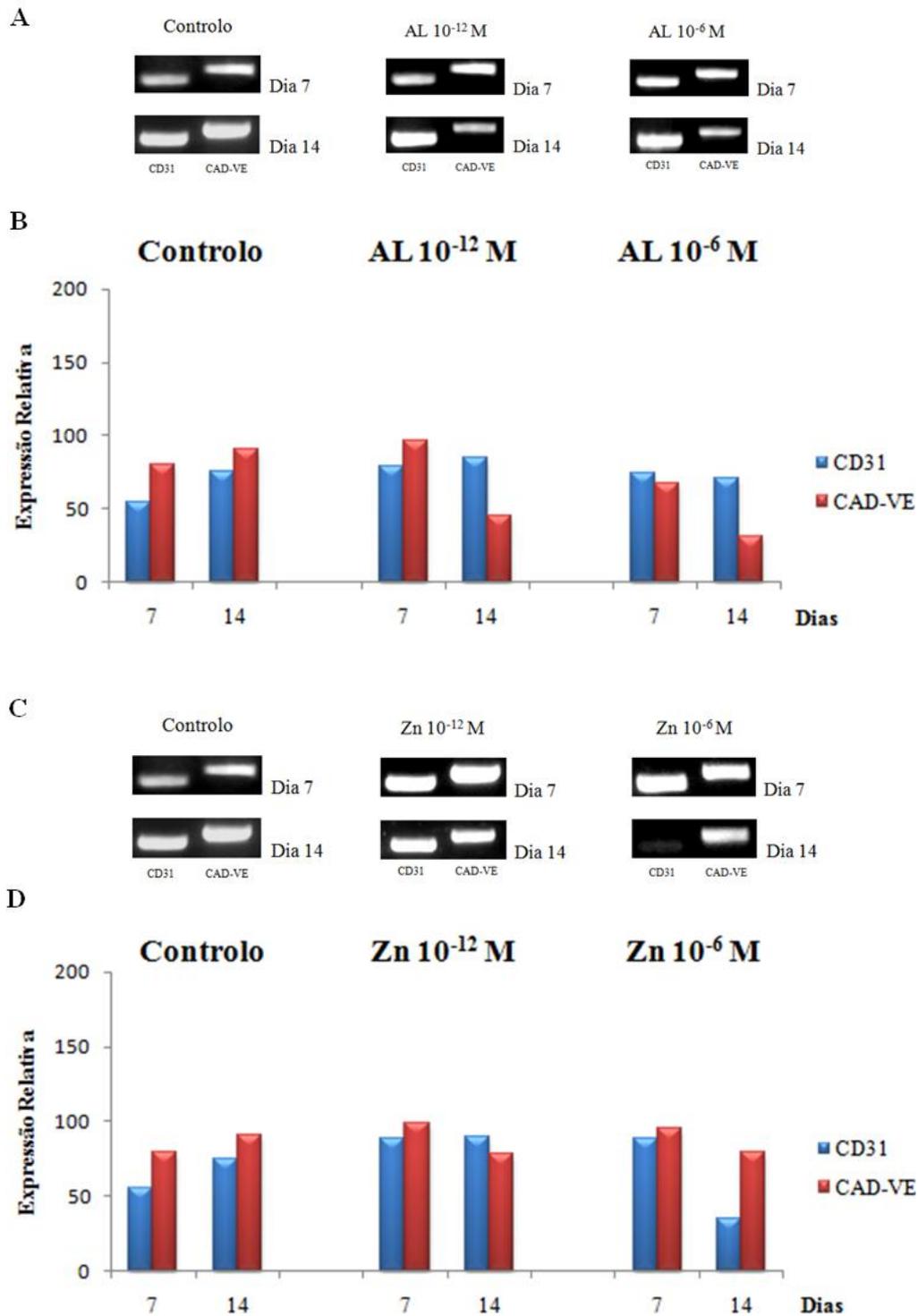
OPG, tipicamente expressos pelas células osteoblásticas. Na condição controlo, verificou-se que as células MG63 não expressaram os marcadores ALP e BMP-2, quer ao dia 7 como ao dia 14 de cultura. No entanto, ao dia 14 verificou-se a expressão do OPG. Este marcador demonstrou elevados níveis de expressão ao dia 7 e ao dia 14, na presença do alendronato e zoledronato, em concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M, assim como os marcadores ALP e BMP-2 se expressaram ao dia 14, nas mesmas condições testadas. Verifica-se então, que a expressão destes marcadores nas células MG63 foi dependente do tempo de cultura e da exposição aos compostos estudados. Os resultados são apresentados na figura 4.7.



**Figura 4.7-** Caracterização molecular de monoculturas de células MG63, na ausência (controlo) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), às concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M. Análise por RT-PCR da expressão génica para o ALP, BMP-2 e OPG (A e C). Análise densitométrica dos produtos de RT-PCR (B e D).

#### **4.2.2. Monoculturas de células endoteliais microvasculares dérmicas humanas**

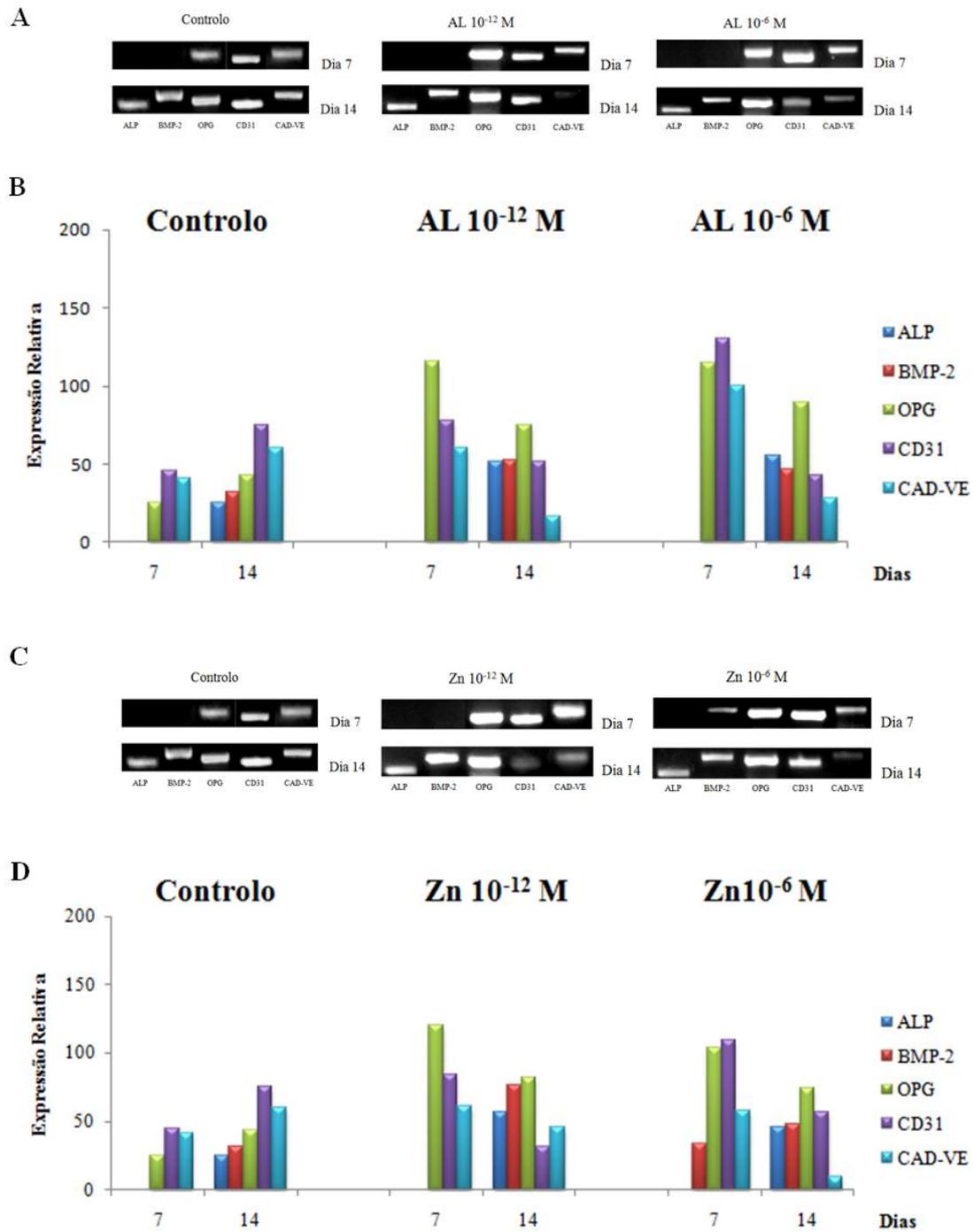
A figura 4.8 apresenta os resultados relativos à análise semi-quantitativa dos produtos de RT-PCR realizada em monoculturas de HDMECs, através da qual se avaliou a expressão de marcadores genéticos característicos das células endoteliais, nomeadamente, o CD31 e CAD-VE. As culturas HDMECs demonstraram para a condição controlo a expressão de ambos os marcadores analisados. Na presença das concentrações de alendronato e zoledronato testadas, verificou-se uma diminuição da expressão do CAD-VE ao dia 14 de cultura. Além disso, também a expressão do marcador CD31 diminuiu ao dia 14, na presença do zoledronato à concentração mais alta testada. Verifica-se então, que a diminuição da expressão destes marcadores endoteliais foi dependente da exposição aos compostos estudados e do tempo de cultura.



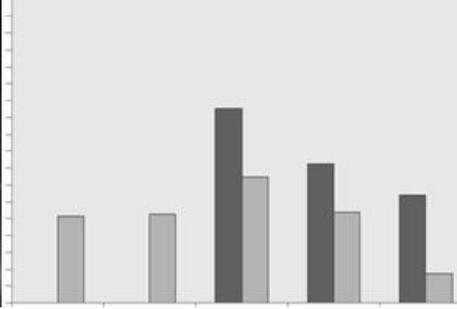
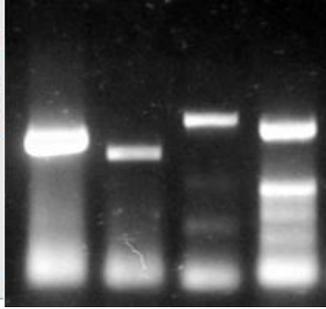
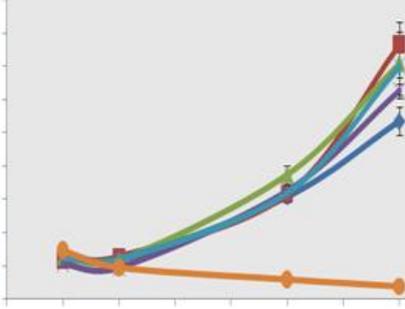
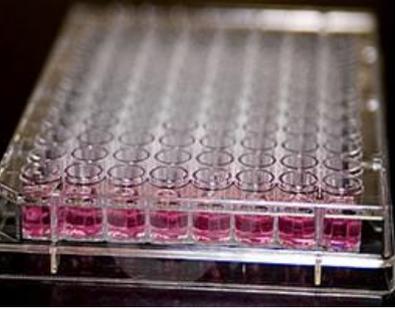
**Figura 4.8-** Caracterização molecular de monoculturas de HDMECs, na ausência (controlo) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), às concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M. Análise por RT-PCR da expressão génica para o CD31 e CAD-VE (A e C). Análise densitométrica dos produtos de RT-PCR (B e D).

### 4.2.3. Co-culturas de células MG63 e HDMECs

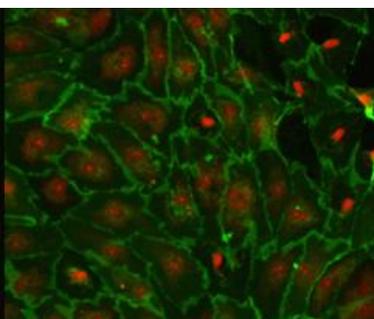
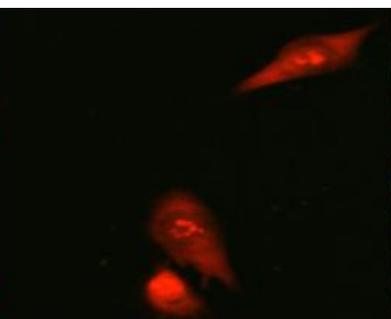
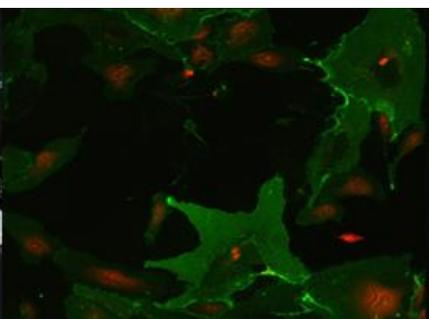
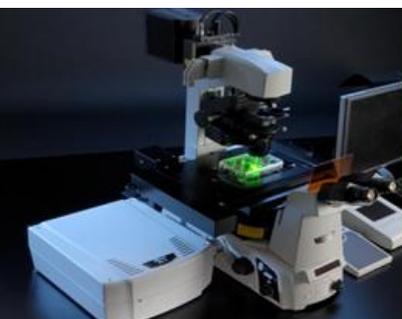
As células MG63 e HDMECs co-cultivadas numa proporção de 1:10, demonstraram diferenças no perfil de expressão dos marcadores osteoblásticos e endoteliais, comparativamente com as células em monoculturas. Na condição controlo, as co-culturas de células osteoblásticas e endoteliais apresentaram um aumento da expressão génica para todos os marcadores testados, comparativamente com as respectivas monoculturas. O alendronato e zoledronato, às concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M, provocaram um aumento da expressão dos marcadores osteoblásticos ALP e BMP-2, ao dia 14 de cultura. Na presença destes compostos, também se verificou um aumento da expressão do OPG, no entanto, os seus níveis máximos de expressão foram verificados ao dia 7. Relativamente aos marcadores endoteliais CD31 e CAD-VE, verificou-se um perfil inverso, uma vez que estes demonstraram uma diminuição da expressão ao dia 14, na presença do alendronato e zoledronato às duas concentrações testadas. Assim, verifica-se que o aumento e a diminuição da expressão destes marcadores osteoblásticos e endoteliais, respectivamente, foram dependentes do tempo de cultura, da exposição aos compostos estudados e dos contactos célula-célula existentes entre as células MG63 e HDMECs. Os resultados estão evidenciados na figura 4.9.



**Figura 4.9-** Caracterização molecular de co-culturas de células MG63 e HDMECs, na ausência (controlo) e na presença de alendronato (AL) e zoledronato (Zn), às concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M. Análise por RT-PCR da expressão génica para o ALP, BMP-2, OPG, CD31 e CAD-VE (A e C). Análise densitométrica dos produtos de RT-PCR (B e D).



# 5. DISCUSSÃO



Os efeitos inibitórios dos bifosfonatos nos osteoclastos, *in vivo* e *in vitro*, estão actualmente bem documentados, no entanto, recentemente tem sido sugerido que estes compostos também afectam os osteoblastos (Im *et al.*, 2004; Von Knoch *et al.*, 2005; Orriss *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2009). Os processos de formação e reparação óssea são coordenados pela acção de diversos factores/citocinas sistémicos e locais que também desempenham um papel pivô no processo de angiogénese. São as interacções directas entre os processos de angiogénese e osteogénese que determinam o sucesso da formação e reparação do tecido ósseo, o que implica uma relação íntima entre as células endoteliais e as células osteoblásticas (Carano e Filvaroff, 2003; Clarkin *et al.*, 2008; Grellier *et al.*, 2009). Existem diversos estudos *in vitro* que demonstram os efeitos dos bifosfonatos na proliferação, na diferenciação, na sobrevivência e na actividade das células osteoblásticas (Reinholz *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2004; Tenta *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007; Greiner *et al.*, 2007; Iguchi *et al.*, 2007; Idris *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008; Boanini *et al.*, 2008; Ory *et al.*, 2008; Stefanik *et al.*, 2008; Bigi *et al.*, 2009; Panzavolta *et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2010; Yoshitani *et al.*, 2011), bem como na proliferação, na migração, na sobrevivência e na actividade das células endoteliais (Wood *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2009; Michailidou *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2010; Ziebart *et al.*, 2011). No entanto, apesar de existirem estudos *in vitro* que demonstram as interacções existentes entre as células endoteliais e as células osteoblásticas, durante os processos de formação e reparação do tecido ósseo (Villars *et al.*, 2000; Villars *et al.*, 2002; Unger *et al.*, 2007; Clarkin *et al.*, 2008; Hofmann *et al.*, 2008; Grellier *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009; Aguirre *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b), a influência que os bifosfonatos têm nesta relação ainda não foi demonstrada pela literatura.

O presente trabalho experimental demonstra o perfil dose-efeito de dois bifosfonatos representativos e muito utilizados na terapêutica clínica, o alendronato e o zoledronato, no comportamento de células da linhagem osteoblástica humana MG63 e HDMECs, em sistema de monocultura e co-cultura, expostas durante 14 dias aos compostos, em condições experimentais similares. As concentrações de alendronato e zoledronato testadas foram de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M, tendo sido baseadas em estudos prévios *in vitro* do mesmo âmbito, envolvendo a exposição de bifosfonatos em células osteoblásticas (Reinholz *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2004; Tenta *et al.*, 2006; Duque *et al.*, 2007; Greiner *et al.*, 2007; Iguchi *et al.*, 2007; Idris *et al.*, 2008; Simon *et al.*, 2008; Boanini *et al.*, 2008; Ory *et al.*, 2008; Stefanik *et al.*, 2008; Bigi *et al.*, 2009; Panzavolta

*et al.*, 2009; Koch *et al.*, 2010; Yoshitani *et al.*, 2011) e em células endoteliais (Wood *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2009; Michailidou *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2010; Ziebart *et al.*, 2011), e também nas concentrações de bifosfonatos de  $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  M, que se estima estarem presentes no microambiente ósseo após a terapia com estes fármacos (Green, 2004; Schindeler e Little, 2007; Bartl *et al.*, 2007b).

Este estudo pretende avaliar os efeitos do alendronato e do zoledronato no comportamento de células humanas osteoblásticas e endoteliais, uma vez que estes são dois bifosfonatos muito utilizados na terapêutica clínica, devido à sua elevada afinidade para a superfície óssea (Bartl *et al.*, 2007b). O alendronato é geralmente administrado via oral, em doses diárias, semanais ou mensais, para o tratamento de doenças no metabolismo ósseo e o zoledronato é geralmente administrado via intravenosa e por períodos intermitentes, para o tratamento de tumores ósseos (Schindeler e Little, 2007; Naidu *et al.*, 2008; Ruggiero *et al.*, 2009).

No presente trabalho experimental, utilizaram-se células da linha osteoblástica humana derivada de osteossarcoma MG63, uma vez que esta linha celular é muito utilizada como modelo das células osteoblásticas, partilhando grande parte das características, inclusivamente a nível da expressão génica. A escolha desta linha celular deveu-se também ao facto de estas células apresentarem propriedades relativamente constantes, independentemente do tipo de pesquisa que se pretenda fazer, do dador das células, ou do método de isolamento utilizado. Além disso, uma vez que se trata de uma linha celular imortalizada altamente proliferativa, acredita-se que possam ser menos sensíveis às acções citotóxicas dos bifosfonatos, permitindo avaliar os seus efeitos em uma gama de concentrações mais ampla (Im *et al.*, 2004; Orriss *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2010b).

A maioria dos estudos *in vitro* envolvendo células endoteliais, são executados com células endoteliais isoladas da macrovascularização humana (Villars *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2002; Villars *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2007; Clarkin *et al.*, 2008; Hofmann *et al.*, 2008; Grellier *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b; Ziebart *et al.*, 2011). No entanto, neste estudo utilizaram-se células endoteliais microvasculares humanas HDMECs, que apesar de serem mais difíceis de isolar, dependendo de mais tempo para o processo (Lang *et al.*, 2003), foi recentemente comprovado que estas células são menos sensíveis aos efeitos dos bifosfonatos que as células do endotélio macrovascular (Michailidou *et al.*, 2010).

A primeira parte deste trabalho experimental consistiu em avaliar o comportamento de células MG63 e HDMECs, em sistema de monocultura e co-cultura, expostas ao alendronato e ao zoledronato em concentrações de  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M, durante 14 dias. Para esse efeito estudou-se a viabilidade/proliferação celular, pelo ensaio colorimétrico MTT e as características fenotípicas celulares, através de imagens representativas CLSM. Os resultados obtidos demonstram que a exposição das células MG63 em monoculturas, ao alendronato e ao zoledronato, em todas as concentrações testadas, induziu um comportamento celular semelhante à condição controlo, no que diz respeito à viabilidade/proliferação celular, tendo-se verificado que as células cresceram activamente ao longo dos 14 dias de cultura. No entanto, ao dia 2, verificou-se que à concentração de  $10^{-8}$  M de alendronato, a taxa de proliferação celular foi significativamente diferente do controlo, o que não se verificou ao dia 7 e ao dia 14 de cultura. Este acontecimento pode ser justificado pela possível adaptação das células aos compostos em fase precoce de cultura. Em concordância com os resultados obtidos, Garcia-Moreno e colaboradores, em 1998 demonstraram que o alendronato em concentrações de  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M não afectou a capacidade proliferativa de células osteoblásticas humanas normais. Também Greiner *et al.*, verificaram que a exposição de osteoblastos humanos ao zoledronato, na concentração de  $5 \times 10^{-5}$  M, não afectou a viabilidade das células (Greiner *et al.*, 2007). Em contrapartida, Xiong e colaboradores, em 2009 demonstraram que o alendronato em concentrações de  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M induziu a proliferação de células MG63. Estes resultados estão em concordância com os obtidos por Im *et al.*, tendo verificado que a exposição destas células ao alendronato em concentrações de  $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M aumentou a proliferação celular. No entanto, estes autores também verificaram que a concentração mais alta testada ( $10^{-4}$  M) inibiu a capacidade proliferativa das células (Im *et al.*, 2004). Num estudo realizado por Tenta e colaboradores, também demonstraram que o zoledronato em concentrações de  $10^{-4}$  a  $25 \times 10^{-4}$  M inibiu a proliferação de células MG63 (Tenta *et al.*, 2006), o que foi consistente com os resultados obtidos por Iguchi *et al.*, em 2007 para o zoledronato em concentrações de  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$  e  $5 \times 10^{-4}$  M. As diferenças nos resultados obtidos no presente estudo em comparação com os estudos previamente mencionados, podem estar relacionadas com as diferenças nas condições de cultura celulares, nomeadamente, o meio de cultura utilizado, a densidade a que as células foram semeadas e as condições de exposição aos compostos. Outros estudos prévios demonstraram a actividade de

diferentes bifosfonatos em vários sistemas de cultura de células osteoblásticas, nomeadamente: os efeitos do zoledronato e do pamidronato em células osteoblásticas de calvário de rato (Orriss *et al.*, 2009), em osteoblastos humanos e células SaOS-2 (Simon *et al.*, 2008), e em osteoblastos fetais humanos (hFOB) (Reinholz *et al.*, 2000), os efeitos do alendronato, do pamidronato, do clodronato e do etidronato em osteoblastos de calvário de rato (Idris *et al.*, 2008) e os efeitos do zoledronato, do ibandronato e do clodronato em osteoblastos humanos (Koch *et al.*, 2010). Estes estudos verificaram uma variedade de perfis dose-efeito a nível das funções e proliferação das células osteoblásticas, dependentes dos modelos celulares estudados, dos sistemas experimentais utilizados, do potencial farmacológico dos bifosfonatos testados e das concentrações utilizadas (Schindeler e Little, 2007).

Os resultados obtidos nas imagens representativas CLSM, demonstram que as células MG63 apresentaram um fenótipo característico, tendo adoptado um padrão de crescimento típico fibroblástico (Hofmann *et al.*, 2008; Walter *et al.*, 2010).

Os resultados do presente estudo também demonstram que o alendronato e o zoledronato não afectaram a viabilidade/proliferação das células endoteliais humanas, HDMECs, ao longo do tempo de cultura. No entanto, ao dia 2, verificou-se que à concentração mais elevada dos compostos, a taxa de proliferação das células endoteliais foi significativamente diferente do controlo, o que pode ser justificado pela possível adaptação das células aos compostos em fase precoce de cultura. Em concordância com os resultados obtidos, Michailidou e colaboradores, demonstraram que a exposição de HDMECs ao zoledronato nas concentrações de  $10^{-6}$  e  $10^{-5}$  M, não afectou a proliferação celular. No entanto, também verificaram que em concentrações mais elevadas ( $25 \times 10^{-5}$  e  $5 \times 10^{-5}$  M), este composto inibiu a capacidade proliferativa das células (Michailidou *et al.*, 2010). Outros estudos prévios também demonstraram os efeitos dose-dependentes do alendronato e do zoledronato, na viabilidade, na proliferação, na migração e na diferenciação de células endoteliais da macrovascularização humana (Wood *et al.*, 2002; Hashimoto *et al.*, 2007; Walter *et al.*, 2010; Ziebart *et al.*, 2011) e de células progenitoras endoteliais (Yamada *et al.*, 2009; Ziebart *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos relativos às características fenotípicas, demonstram que as HDMECs apresentaram uma morfologia típica endotelial, com tendência para uma forma circular (Lang *et al.*, 2003). Além disso, as células expressaram o marcador endotelial estabelecido CD31. Esta molécula é expressa em elevados níveis na superfície das células endoteliais e desempenha um papel fundamental nas várias

interacções celulares, participando na cascata de adesões intercelulares das células endoteliais durante o processo de angiogénese. Devido ao papel activo da CD31 como mediador de adesão endotelial, a sua distribuição celular representa um marcador altamente sensível das funções das células endoteliais (Michiels, 2003; Silva Marques *et al.*, 2009). Verificou-se que esta molécula manteve a sua expressão ao longo do período de cultura e em todas as condições testadas. No entanto, à concentração mais alta de zoledronato, este marcador mostrou uma diminuição da expressão ao dia 14, acontecimento que pode ser justificado pelo potencial inibitório do zoledronato nas células endoteliais, quando administrado em concentrações mais elevadas. O facto de estes efeitos inibitórios não se terem verificado para mesma concentração de alendronato, pode ser devido ao maior potencial farmacológico do zoledronato em comparação com o alendronato.

Os resultados obtidos para as células MG63 e HDMECs co-cultivadas numa proporção de 1:2, demonstram em todas as condições testadas, um aumento da viabilidade/proliferação celular ao longo do tempo de cultura. Este acontecimento pode ser devido às interacções celulares existentes em sistema de co-cultura com contacto directo e pelas comunicações celulares parácrinas que ocorrem via factores solúveis, conhecidos por mediar o crescimento celular (Villars *et al.*, 2000). No entanto, ao dia 2, verificou-se que à concentração de  $10^{-8}$  M de alendronato, a taxa de proliferação celular foi significativamente diferente do controlo, acontecimento que pode ser devido à adaptação das células aos compostos em fase precoce de cultura. Em concordância com os resultados obtidos, Aguirre e colaboradores, em 2010 verificaram que a existência de interacções entre células progenitoras endoteliais da medula óssea (BM-EPCs) e células estaminais mesenquimatosas (MSCs), em sistema da co-cultura com contacto directo, conduziram a uma elevada proliferação celular. Também Zhang e colaboradores demonstraram, em diferentes estudos, que a co-cultura com contacto directo entre células MG63 e HUVECs estimulou a proliferação das células osteoblásticas (Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). Em estudos realizados por outros autores envolvendo células MG63 e HDMECs (Unger *et al.*, 2007) e células HOBs e HUVECs (Hofmann *et al.*, 2008), em sistema de co-cultura com contacto directo, demonstraram que as interacções entre as células osteoblásticas e as células endoteliais estimularam a viabilidade/proliferação das células endoteliais (Unger *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 2008). No entanto, tendo em conta as diferenças nas condições de cultura, a nível dos sistemas de cultura utilizados, densidades e proporções celulares a

que as co-culturas foram feitas e os modelos celulares estudados, torna-se difícil fazer uma comparação directa entre os resultados obtidos nestes estudos anteriores e os resultados obtidos no presente estudo. Outros autores também demonstraram que a existência de interações físicas e químicas, entre células endoteliais e células osteoblásticas, em sistema de co-cultura com contacto directo, podem estimular a diferenciação, a migração e a formação de estruturas microcapilares (Villars *et al.*, 2002; Grellier *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009).

Os resultados obtidos pelas imagens representativas CLSM demonstram que as células MG63 e HDMECs apresentaram, em todas as condições testadas, uma morfologia característica, com a organização das células osteoblásticas em clusters, rodeadas pelas células endoteliais, sugerindo que o crescimento das células endoteliais foi condicionado pela presença das células osteoblásticas. No entanto, ao dia 14, verificou-se uma mistura das duas populações celulares, o que pode ser indicativo das interações recíprocas existentes entre as células endoteliais e as células osteoblásticas nesta fase de cultura. Em concordância com estas observações, alguns autores verificaram a migração de células endoteliais sobre células osteoblásticas, utilizando-as como uma matriz sobre a qual se alinharam (Grellier *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2009). Em fase de cultura tardia, verificaram a formação de estruturas microcapilares que se estabeleceram entre os osteoblastos, indicando as interações complexas existentes entre estes dois tipos celulares (Unger *et al.*, 2007; Santos *et al.*, 2009). Os resultados obtidos também demonstram que as células endoteliais expressaram o marcador de adesão endotelial CD31, ao longo do tempo de cultura (Unger *et al.*, 2007; Hofmann *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009).

A segunda parte deste estudo consistiu em avaliar a expressão génica por RT-PCR, de células MG63 e HDMECs, em sistema de monocultura e co-cultura, expostas ao alendronato e ao zoledronato nas concentrações de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M, durante 14 dias. Os resultados obtidos demonstram que as monoculturas de células MG63, na ausência dos compostos testados, não expressaram os marcadores osteoblásticos ALP e BMP-2, ao longo do tempo de cultura. Ao contrário do marcador OPG que foi expresso ao dia 14. No entanto, verificou-se que as concentrações de alendronato e zoledronato testadas induziram um aumento da expressão deste marcador ao longo do tempo de cultura e a expressão dos marcadores ALP e BMP-2 ao dia 14. A ALP é um dos marcadores de diferenciação dos osteoblastos maduros e o aumento da sua expressão está associado com a diferenciação progressiva e actividade dos osteoblastos (Boanini *et al.*, 2008;

Panzavolta *et al.*, 2009; Xiong *et al.*, 2009). A BMP-2 é um marcador associado às células osteoblásticas, envolvido na diferenciação e no desenvolvimento do fenótipo celular osteoblástico (Pan *et al.*, 2004; Lian *et al.*, 2006). Tendo em conta que a ALP e a BMP-2 são marcadores de diferenciação osteoblástica, os baixos níveis de expressão obtidos para estes marcadores, em todas as condições testadas, podem ser indicativos de que as células osteoblásticas se encontravam em fase proliferativa, o que está em concordância com os resultados obtidos pela análise da viabilidade/proliferação das células MG63. A OPG é um membro da família TNF, expressa pelas células osteoblásticas, envolvida nas interações entre os osteoblastos e os osteoclastos no desenvolvimento e remodelação óssea. Esta citocina liga-se à RANKL e impede a sua ligação RANK nos osteoclastos, inibindo a diferenciação e a activação destas células (Boyce e Xing *et al.*, 2007; Greiner *et al.*, 2007; Boanini *et al.*, 2008; Panzavolta *et al.*, 2009). Verifica-se então, que estes marcadores osteoblásticos apresentaram perfis de expressão génica específicos, dependentes do tempo de cultura e da exposição aos compostos estudados, demonstrando que nestas condições e em sistema de monocultura, se alcançou o fenótipo osteoblástico. Anteriormente, Simon e colaboradores demonstraram que o zoledronato ( $10^{-6}$ ,  $5 \times 10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  e  $2 \times 10^{-5}$  M) provocou uma redução da expressão do gene ALP, em células osteoblásticas humanas e células SaOS-2, ao longo de 4 semanas de cultura (Simon *et al.*, 2008). Em contrapartida, outros autores demonstraram que a exposição de células MG63 ao alendronato, em concentrações similares às testadas no presente estudo, aumentou a expressão génica da BMP-2, após 3 dias (Im *et al.*, 2004) e 4 dias (Xiong *et al.*, 2009) de cultura. O aumento da expressão génica deste marcador foi também demonstrado por outros autores, que avaliaram os efeitos do zoledronato (Pan *et al.*, 2004) e do alendronato e zoledronato (Von Knoch *et al.*, 2005) em células osteoblásticas. Também Viereck e colaboradores, verificaram que a exposição de células osteoblásticas humanas ao zoledronato ( $10^{-12}$  a  $10^{-5}$  M) estimulou a expressão do marcador OPG, após 3 dias de cultura (Viereck *et al.*, 2002). Em contrapartida, Kim *et al.*, em 2002 demonstraram que a exposição de osteoblastos de calvário de rato ao alendronato ( $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M), não influenciou a expressão génica da OPG, mantendo-se constante ao longo de 2 dias de cultura. Dadas as informações obtidas no presente estudo em comparação com os estudos previamente mencionados, é possível constatar uma variedade de perfis dose-efeito a nível da expressão génica dos marcadores estabelecidos osteoblásticos, que podem ser justificados pelas variações nas condições de cultura utilizadas, nomeadamente, as doses

e tipos de bifosfonatos testados, os modelos de cultura celulares estudados e o tempo de exposição aos compostos.

Os resultados obtidos no presente trabalho experimental revelam que a exposição do alendronato e do zoledronato em monoculturas de HDMECs, afectou a expressão génica dos marcadores endoteliais estabelecidos CD31 e CAD-VE. Esta caderina do endotélio vascular é um marcador de adesão celular, localizada nas células endoteliais e promotora dos contactos entre estas células, fazendo parte das junções de aderinas que estabelecem estes contactos. Está envolvida na morfogénese vascular e medeia a manutenção destas estruturas, tornando-se um marcador útil para monitorizar o processo de angiogénese (DeLisser, 1997; Vestweber, 2000; Martin *et al.*, 2005). Os resultados obtidos demonstram que em ambas as concentrações testadas, ocorreu uma diminuição da expressão do marcador CAD-VE, ao dia 14 de cultura. O mesmo padrão foi observado para o marcador CD31, apenas à concentração mais alta de zoledronato, o que foi consistente com os resultados obtidos para a expressão fenotípica deste marcador, observada nas imagens CLSM. Na ausência dos compostos verificou-se a expressão de ambos os marcadores, ao longo do tempo de cultura. Assim, verifica-se que estes marcadores endoteliais apresentaram perfis de expressão génica específicos, dependentes do tempo de cultura e da exposição ao alendronato e ao zoledronato, demonstrando que nestas condições e em sistemas de monocultura, as HDMECs alcançaram o fenótipo endotelial. Os efeitos dos bifosfonatos a nível da expressão génica dos marcadores endoteliais analisados neste estudo, nunca foram descritos na bibliografia. No entanto, tendo em conta as funções de adesão endotelial desempenhadas pela CD31 e CAD-VE, sugere-se que as concentrações de alendronato e de zoledronato testadas podem ter efeitos anti-angiogénicos, com maior sensibilidade da CAD-VE aos perfis dose-efeito dos bifosfonatos.

Os resultados obtidos para as células MG63 e HDMECs co-cultivadas numa proporção de 1:10, demonstram que na ausência dos compostos, ocorreu um aumento da expressão génica para todos os marcadores testados, comparativamente com os resultados obtidos para as respectivas monoculturas, comprovando a existência de interacções entre as células osteoblásticas e as células endoteliais, que estimularam a expressão dos marcadores característicos analisados. As concentrações de alendronato e zoledronato testadas provocaram um aumento da expressão dos marcadores osteoblásticos ALP e BMP-2, ao dia 14 de cultura, com níveis de expressão superiores aos obtidos nas monoculturas de células MG63. Além disso, também se verificou que

na presença dos compostos, ocorreu um aumento da expressão do marcador OPG, com um pico de expressão observado ao dia 7. Este acontecimento é indicativo de que a presença dos compostos testados provocou uma antecipação da expressão máxima deste marcador, o que poderá desencadear a ocorrência de uma inibição precoce da osteoclastogênese. Relativamente aos marcadores endoteliais, verificou-se que ao contrário das células endoteliais em monocultura, a presença do alendronato e do zoledronato, induziu a diminuição da expressão dos marcadores CD31 e CAD-VE, ao longo do tempo de cultura, o que pode ser indicativo de que em sistema de co-cultura o potencial anti-angiogénico dos bifosfonatos pode ser aumentado. Verifica-se então, que os marcadores osteoblásticos e endoteliais testados apresentaram perfis de expressão génica específicos, dependentes do tempo de cultura, da exposição aos compostos estudados e das interações entre as células MG63 e HDMECs. Anteriormente, Zhang e colaboradores demonstraram, em diferentes estudos, que após 5 dias de cultura, ocorreu um aumento da expressão dos marcadores ALP (Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b) e OPG (Zhang *et al.*, 2010a), em co-culturas de células MG63 e HUVECs, comparativamente com as células MG63 em monocultura (Zhang *et al.*, 2010a; Zhang *et al.*, 2010b). Grellier e colaboradores também verificaram um aumento da expressão do marcador ALP, após 2 dias de co-culturas de células HOPs e HUVECs, em comparação com as células osteoblásticas cultivadas individualmente (Grellier *et al.*, 2009). Em contrapartida, Hofmann *et al.*, demonstraram que a expressão do marcador ALP pelas células HOBs, não foi influenciada pela presença de HUVECs (Hofmann *et al.*, 2008). Meury e colaboradores verificaram que em co-culturas de HBMSCs e HUVECs, ocorreu uma diminuição significativa dos níveis de expressão do marcador BMP-2, após 14 dias de cultura (Meury *et al.*, 2006). Os níveis de expressão dos marcadores endoteliais CD31 e CAD-VE foram também analisados por Aguirre e colaboradores, tendo demonstrado que em co-culturas de células progenitoras endoteliais e osteoblásticas, ocorreu um aumento precoce da expressão destes marcadores, seguido de uma queda acentuada da expressão ao dia 7 e ao dia 14 (Aguirre *et al.*, 2010). As diferenças observadas neste estudo, a nível da expressão génica dos marcadores osteoblásticos e endoteliais, em comparação com os estudos previamente mencionados, podem estar relacionadas com as diferenças nos sistemas de co-cultura utilizados, nos modelos celulares avaliados, nas densidades e proporções celulares utilizadas e nos períodos de cultura efectuados.

Já foram realizados diversos estudos *in vitro* para averiguar a actividade dos bifosfonatos em vários tipos de células osteoblásticas e endoteliais, usando uma variedade de concentrações que geralmente são iguais ou superiores às que se estima estarem presentes no microambiente ósseo. No entanto, os efeitos destas concentrações de bifosfonatos ainda não foram analisados em sistema de co-cultura entre estes tipos celulares, sendo no entanto conhecido, através de estudos recentes, as interacções existentes entre as células osteoblásticas e as células endoteliais em sistema de co-cultura. Embora os níveis exactos de bifosfonatos a que os osteoblastos, células endoteliais e outros tipos celulares, estão expostos no microambiente ósseo durante a terapia com estes fármacos, sejam desconhecidos (Reinholz *et al.*, 2000; Pan *et al.*, 2004; Idris *et al.*, 2008; Orriss *et al.*, 2009), estima-se que estes sejam inferiores ou iguais a  $10^{-9}$  M (Green, 2004; Schindeler e Little, 2007; Bartl *et al.*, 2007b). No entanto, muitos estudos já sugeriram que os ossos mandibulares são mais susceptíveis à deposição de elevadas concentrações de bifosfonatos, uma vez que sendo um local onde a actividade diária é mais elevada, a ocorrência de uma constante remodelação óssea é acrescida (Bartl *et al.*, 2007b; Naidu *et al.*, 2008; Sarasquete *et al.*, 2009).

É importante mencionar que poucos são os estudos *in vitro*, que avaliam os efeitos dos bifosfonatos comparando diferentes tipos celulares, baseando-se apenas em sistemas de cultura individuais, o que providencia informações bastante limitadas e pouco representativas da exposição dos bifosfonatos *in vivo* (Schindeler e Little, 2007). A caracterização dos efeitos dos bifosfonatos em sistema de co-cultura de osteoblastos e células endoteliais, efectuada no presente estudo, permitiu obter informações sobre os efeitos dos bifosfonatos nas interacções existentes entre os processos de angiogénese e osteogénese do tecido ósseo. Além disso, este estudo também fornece informações detalhadas relativas aos perfis de expressão génica dependentes das concentrações de bifosfonatos, associados com a viabilidade/proliferação celular e características fenotípicas das células endoteliais e das células osteoblásticas.



## **6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**



Nas últimas décadas, múltiplos estudos têm sido realizados de modo a investigar os perfis dose-efeito dos bifosfonatos, no comportamento de células osteoblásticas e de células endoteliais. No entanto, os efeitos destes fármacos nas interações entre as células osteoblásticas e as células endoteliais, responsáveis por coordenar os processos de osteogénese e angiogénese, implicados na formação óssea, ainda não são conhecidos.

Desta forma, no presente estudo, a possibilidade de avaliar os efeitos de dois bifosfonatos muito utilizados na terapêutica clínica, o alendronato e o zoledronato, nas interações entre células osteoblásticas humanas, MG63 e células endoteliais humanas, HDMECs, em sistema de monocultura e co-cultura, apresentou-se como um grande desafio. Com esta avaliação, esperou-se obter respostas para algumas das questões com que os clínicos se têm vindo a deparar ao longo da sua prática diária, como o desenvolvimento de osteonecrose dos maxilares por pacientes tratados com bifosfonatos.

O alendronato e o zoledronato, em concentrações conhecidas por inibirem a reabsorção óssea *in vivo*, nomeadamente,  $10^{-12}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-8}$  e  $10^{-6}$  M, não causaram alterações significativas na proliferação das células endoteliais e das células osteoblásticas, tanto em sistema de monocultura, como em sistema de co-cultura. No entanto, ocorreu uma diminuição da expressão fenotípica das células endoteliais, sugerida pela redução da expressão dos marcadores CAD-VE e CD31.

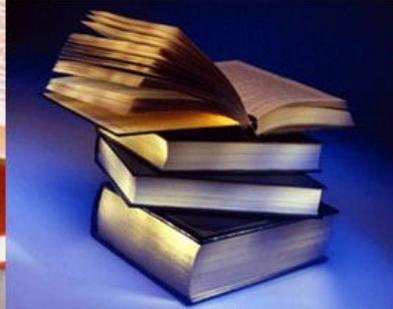
As células MG63 em monocultura e em co-cultura, sob as concentrações de alendronato e de zoledronato testadas de  $10^{-12}$  e  $10^{-6}$  M, aumentaram a expressão génica dos marcadores osteoblásticos ALP, BMP-2 e OPG, com um aumento significativo da expressão do inibidor de osteoclastogénese, OPG. Os marcadores endoteliais estabelecidos CD31 e CAD-VE, diminuíram a sua expressão sob as mesmas concentrações de alendronato e de zoledronato.

Estes acontecimentos sugerem que os efeitos inibitórios dos bifosfonatos nas células endoteliais podem ser indicativos dos efeitos deletérios destes compostos no tecido ósseo.

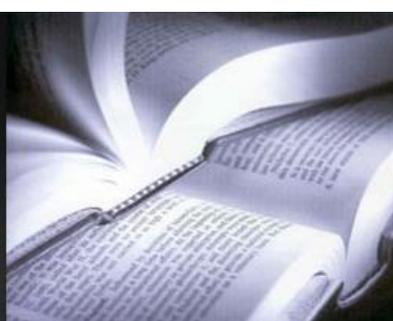
O sistema de co-cultura utilizado no presente estudo, permitiu a ocorrência de interações contínuas entre as células MG63 e as HDMECs, indicando que este pode ser um sistema útil para avaliar a regulação recíproca e as interações funcionais entre estes dois tipos celulares.

No entanto, para esclarecer o real potencial e mecanismos de acção dos bifosfonatos no tecido ósseo, é indispensável prosseguir com futuras investigações.

Uma maior clarificação dos efeitos destes compostos, nas interações entre as células osteoblásticas e as células endoteliais, em sistemas de co-cultura, é indispensável e constitui certamente um dos primeiros passos a seguir num futuro próximo, principalmente porque estes efeitos ainda não foram descritos pela literatura. Além disso, tendo em conta que vivemos numa época de grandes avanços tecnológicos na área da investigação científica, é necessário o desenvolvimento de sistemas de cultura celulares, que providenciem informações mais representativas da exposição dos bifosfonatos, *in vivo*.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Aguirre, A., Planell, J. A., Engel, E. (2010). Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 400(2): 284-91.
- Allegra, A., Oteri, G., Nastro, E., Alonci, A., Bellomo, G., Del Fabro, V., Quartarone, E., Alati, C., De Ponte, F. S., Cicciu, D., Musolino, C. (2007). Patients with bisphosphonates-associated osteonecrosis of the jaw have reduced circulating endothelial cells. *Hematol Oncol.* 25(4): 164-9.
- Alva, J. A., Zovein, A. C., Monvoisin, A., Murphy, T., Salazar, A., Harvey, N. L., Carmeliet, P., Iruela-Arispe, M. L. (2006). VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells. *Dev Dyn.* 235(3): 759-67.
- Aubin, J. E. (2008). Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. Principles of Bone Biology. 3 Ed. Bilezikian, J. P., Rodan, G.A., Raisz, L.G. . *Academic Press Inc.* 85-107. Toronto, Ontario, Canada.
- Bartl, R., Frisch, B., Von Tresckow, E., Bartl C. (2007a). The Skeleton. Bisphosphonates in Medical Practice: Actions, Side Effects, Indications, Strategies. 1 Ed. Schroder, M. G. *Springer.* 1-20. Berlin, Germany.
- Bartl, R., Frisch, B., Von Tresckow, E., Bartl C. (2007b). Bisphosphonates. Bisphosphonates in Medical Practice: Actions, Side Effects, Indications, Strategies. 1 Ed. Schroder, M. G. *Springer.* 33-68. Berlin, Germany.
- Bedalov, A., Salvatori, R., Dodig, M., Kapural, B., Pavlin, D., Kream, B. E., Clark, S. H., Woody, C. O., Rowe, D. W., Lichtler, A. C. (1998). 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibition of col1a1 promoter expression in calvariae from neonatal transgenic mice. *Biochim Biophys Acta.* 1398(3): 285-93.
- Bedogni, A., Bettini, G., Totola, A., Saia, G., Nocini, P. F. (2010). Oral bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw after implant surgery: a case report and literature review. *J Oral Maxillofac Surg.* 68(7): 1662-6.
- Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Fini, M., Mihailescu, I. N., Ristoscu, C., Sima, F., Torricelli, P. (2009). Biofunctional alendronate-Hydroxyapatite thin films deposited by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation. *Biomaterials.* 30(31): 6168-77.
- Boanini, E., Torricelli, P., Gazzano, M., Giardino, R., Bigi, A. (2008). Alendronate-hydroxyapatite nanocomposites and their interaction with osteoclasts and osteoblast-like cells. *Biomaterials.* 29(7): 790-6.
- Bogdanovic, Z., Huang, Y. F., Dodig, M., Clark, S. H., Lichtler, A. C., Kream, B. E. (2000). Parathyroid hormone inhibits collagen synthesis and the activity of rat col1a1 transgenes mainly by a cAMP-mediated pathway in mouse calvariae. *J Cell Biochem.* 71(1): 149-58.
- Bonewald, L. F. (2006). Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision.* 3(10): 7-15.
- Bou-Gharios, G., Crombrughe, B (2008). Type I Collagen: Structure, Synthesis, and Regulation. Principles of Bone Biology. 3 Ed. Bilezikian, J. P., Rodan, G.A., Raisz, L.G. *Academic Press Inc.* 285-318. London, United Kingdom., Houston, Texas.
- Boyce, B. F., Xing, L. (2007). Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 9 Suppl 1: S1.
- Breier, G., Risau, W. (1996). The role of vascular endothelial growth factor in blood vessel formation. *Trends Cell Biol.* 6(12): 454-6.
- Bukowski, J. F., Dascher, C. C., Das, H. (2005). Alternative bisphosphonate targets and mechanisms of action. *Biochem Biophys Res Commun.* 328(3): 746-50.

- Cao, Y., Mori, S., Mashiba, T., Westmore, M. S., Ma, L., Sato, M., Akiyama, T., Shi, L., Komatsubara, S., Miyamoto, K., Norimatsu, H. (2002). Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 17(12): 2237-46.
- Carano, R. A., Filvaroff, E. H. (2003). Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today.* 8(21): 980-9.
- Castro, L. F., Silva, A.T.A., Chung, M-C., Ferreira, A.G., Ferreira, E. I. (2004). Bifosfonatos (BPs) como transportadores osteotrópicos no planejamento de fármacos dirigidos. *Quim. Nova.* 27(3): 456-460.
- Cetiner, S., Sucak, G. T., Kahraman, S. A., Aki, S. Z., Kocakahyaoglu, B., Gultekin, S. E., Cetiner, M., Haznedar, R. (2009). Osteonecrosis of the jaw in patients with multiple myeloma treated with zoledronic acid. *J Bone Miner Metab.* 27(4): 435-43.
- Clarkin, C. E., Emery, R. J., Pitsillides, A. A., Wheeler-Jones, C. P. (2008). Evaluation of VEGF-mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells. *J Cell Physiol.* 214(2): 537-44.
- Corsi, A., Xu, T., Chen, X. D., Boyde, A., Liang, J., Mankani, M., Sommer, B., Iozzo, R. V., Eichstetter, I., Robey, P. G., Bianco, P., Young, M. F. (2002). Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res.* 17(7): 1180-9.
- Costa-Rodrigues, J., Teixeira, C. A., Sampaio, P., Fernandes, M. H. (2010). Characterisation of the osteoclastogenic potential of human osteoblastic and fibroblastic conditioned media. *J Cell Biochem.* 109(1): 205-16.
- Coxon, F. P., Thompson, K., Roelofs, A. J., Ebetino, F. H., Rogers, M. J. (2008). Visualizing mineral binding and uptake of bisphosphonate by osteoclasts and non-resorbing cells. *Bone.* 42(5): 848-60.
- D'Amelio, P., Grimaldi, A., Di Bella, S., Tamone, C., Brianza, S. Z., Ravazzoli, M. G., Bernabei, P., Cristofaro, M. A., Pescarmona, G. P., Isaia, G. (2008). Risedronate reduces osteoclast precursors and cytokine production in postmenopausal osteoporotic women. *J Bone Miner Res.* 23(3): 373-9.
- Delia, D., Lampugnani, M. G., Resnati, M., Dejana, E., Aiello, A., Fontanella, E., Soligo, D., Pierotti, M. A., Greaves, M. F. (1993). CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood.* 81: 1001-1008.
- DeLisser, H. M., Christofidou-Solomidou, M., Strieter, R. M., Burdick, M. D., Robinson, C. S., Wexler, R. S., Kerr, J. S., Garland, C., Merwin, J. R., Madri, J. A., Albelda, S. M. (1997). Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. *Am J Pathol.* 151(3): 671-7.
- Dos Santos, A. A., Miranda, C. D. O., Alves, M. T. S., Faloppa, F. (2005). O papel da proteína morfogenética óssea na reparação do tecido ósseo. *Acta Ortop Bras* 13(4): 194.
- Duff, S. E., Li, C., Garland, J. M., Kumar, S. (2003). CD105 is important for angiogenesis: evidence and potential applications. *FASEB J.* 17(9): 984-92.
- Duque, G., Rivas, D. (2007). Alendronate has an anabolic effect on bone through the differentiation of mesenchymal stem cells. *J Bone Miner Res.* 22(10): 1603-11.
- Everts, V., Delaisse, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *J Bone Miner Res.* 17(1): 77-90.

- Feres-Filho, E. J., Choi, Y. J., Han, X., Takala, T. E., Trackman, P. C. (1995). Pre- and post-translational regulation of lysyl oxidase by transforming growth factor-beta 1 in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *J Biol Chem.* 270(51): 30797-803.
- Fernandez-Tresguerres-Hernandez-Gil, I., Alobera-Gracia, M. A., del-Canto-Pingarron, M., Blanco-Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 11(2): E151-7.
- Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 280(6): C1358-66.
- Ferreira, C. D. J., Casado, P.L., Barboza, E.S.P. (2007). Osteonecrosis associated with bisphosphonates in dentistry. *R. Periodontia.* 17(3): 24-30.
- Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., Carmeliet, P. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Developmental Cell.* 16(2): 167-79.
- Garcia-Moreno, C., Serrano, S., Nacher, M., Farre, M., Diez, A., Marinoso, M. L., Carbonell, J., Mellibovsky, L., Nogues, X., Ballester, J., Aubia, J. (1998). Effect of alendronate on cultured normal human osteoblasts. *Bone.* 22(3): 233-9.
- Granjeiro, J. M., Oliveira, R. C., Bustos-Valenzuela, J. C., Sogayar, M. C., Taga, R. (2005). Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 38: 1463-1473.
- Green, J. R. (2004). Bisphosphonates: preclinical review. *Oncologist.* 9: 3-13.
- Greiner, S., Kadow-Romacker, A., Lubberstedt, M., Schmidmaier, G., Wildemann, B. (2007). The effect of zoledronic acid incorporated in a poly(D,L-lactide) implant coating on osteoblasts in vitro. *J Biomed Mater Res A.* 80(4): 769-75.
- Grellier, M., Ferreira-Tojais, N., Bourget, C., Bareille, R., Guillemot, F., Amédée, J. (2009). Role of vascular endothelial growth factor in the communication between human osteoprogenitors and endothelial cells. *Journal of Cellular Biochemistry.* 106: 390-398.
- Hashimoto, K., Morishige, K., Sawada, K., Tahara, M., Shimizu, S., Ogata, S., Sakata, M., Tasaka, K., Kimura, T. (2007). Alendronate suppresses tumor angiogenesis by inhibiting Rho activation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 354(2): 478-84.
- Heinemann, C., Heinemann, S., Worch, H., Hanke, T. (2011). Development of an osteoblast/osteoclast co-culture derived by human bone marrow stromal cells and human monocytes for biomaterials testing. *Eur Cell Mater.* 21: 80-93.
- Hofmann, A., Ritz, U., Verrier, S., Eglin, D., Alini, M., Fuchs, S., Kirkpatrick, C. J., Rommens, P. M. (2008). The effect of human osteoblasts on proliferation and neo-vessel formation of human umbilical vein endothelial cells in a long-term 3D co-culture on polyurethane scaffolds. *Biomaterials.* 29(31): 4217-26.
- Hu, Z., Peel, S. A., Ho, S. K., Sandor, G. K., Su, Y., Clokie, C. M. (2010). The expression of bone matrix proteins induced by different bioimplants in a rabbit sinus lift model. *J Biomed Mater Res A.* 95(4): 1048-54.
- Idris, A. I., Rojas, J., Greig, I. R., Van't Hof, R. J., Ralston, S. H. (2008). Aminobisphosphonates cause osteoblast apoptosis and inhibit bone nodule formation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 82(3): 191-201.
- Iguchi, T., Miyakawa, Y., Saito, K., Nakabayashi, C., Nakanishi, M., Saya, H., Ikeda, Y., Kizaki, M. (2007). Zoledronate-induced S phase arrest and apoptosis accompanied by DNA damage and activation of the ATM/Chk1/cdc25 pathway in human osteosarcoma cells. *Int J Oncol.* 31(2): 285-91.

- Im, G. I., Qureshi, S. A., Kenney, J., Rubash, H. E., Shanbhag, A. S. (2004). Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*. 25(18): 4105-15.
- Iraburu, M. J., Domínguez-Rosales, J. A., Fontana, L., Auster, A., García-Trevijano, E. R., Covarrubias-Pinedo, A., Rivas-Estilla, A. M., Greenwel, P., Rojkind, M. (2000). Tumor necrosis factor alpha down-regulates expression of the alpha1(I) collagen gene in rat hepatic stellate cells through a p20C/EBPbeta- and C/EBPdelta-dependent mechanism. *Hepatology*. 31(5): 1086-93.
- Issa, J. P. M., Tiozzi, R., Pitol, D. L., Silva Mello, A. S. (2006). TGF- $\beta$  and new bone formation. *Int. J. Morphol.* 24(3): 399-405.
- Iwata, J., Hosokawa, R., Sanchez-Lara, P. A., Urata, M., Slavkin, H., Chai, Y. (2010). Transforming growth factor-beta regulates basal transcriptional regulatory machinery to control cell proliferation and differentiation in cranial neural crest-derived osteoprogenitor cells. *J Biol Chem*. 285(7): 4975-82.
- Jeong, I., Yu, H. S., Kim, M. K., Jang, J. H., Kim, H. W. (2009). FGF2-adsorbed macroporous hydroxyapatite bone granules stimulate in vitro osteoblastic gene expression and differentiation. *J Mater Sci Mater Med*. 21(4): 1335-42.
- Kanczler, J. M., Oreffo, R. O. (2008). Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 15: 100-14.
- Kawase, T., Okuda, K., Wolff, L. F., Yoshie, H. (2003). Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*. 74(6): 858-64.
- Khan, A. A., Sandor, G. K., Dore, E., Morrison, A. D., Alshahli, M., Amin, F., Peters, E., Hanley, D. A., Chaudry, S. R., Dempster, D. W., Glorieux, F. H., Neville, A. J., Talwar, R. M., Clokie, C. M., Al Mardini, M., Paul, T., Khosla, S., Josse, R. G., Sutherland, S., Lam, D. K., Carmichael, R. P., Blanas, N., Kendler, D., Petak, S., St-Marie, L. G., Brown, J., Evans, A. W., Rios, L., Compston, J. E. (2008). Canadian consensus practice guidelines for bisphosphonate associated osteonecrosis of the jaw. *J Rheumatol*. 35(7): 1391-7.
- Kim, Y. H., Kim, G. S., Jeong-Hwa, B. (2002). Inhibitory action of bisphosphonates on bone resorption does not involve the regulation of RANKL and OPG expression. *Exp Mol Med*. 34(2): 145-51.
- Klein-Nulend, J., Bonewald, L. F. (2008). The Osteocyte. Principles of Bone Biology. 3 Ed. Bilezikian Jp, R. G., Raisz Lg. *Academic Press Inc*. 153-174. Amsterdam, The Netherlands., Kansas City.
- Ko, M. K., Kay, E. P. (2005). Regulatory role of FGF-2 on type I collagen expression during endothelial mesenchymal transformation. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 46(12): 4495-503.
- Koch, F. P., Merkel, C., Al-Nawas, B., Smeets, R., Ziebart, T., Walter, C., Wagner, W. (2010). Zoledronate, ibandronate and clodronate enhance osteoblast differentiation in a dose dependent manner - A quantitative in vitro gene expression analysis of Dlx5, Runx2, OCN, MSX1 and MSX2. *J Craniomaxillofac Surg*. ahead of print Epub 26 out 2010.
- Koch, F. P., Wunsch, A., Merkel, C., Ziebart, T., Pabst, A., Yekta, S. S., Blessmann, M., Smeets, R. (2011). The influence of bisphosphonates on human osteoblast migration and integrin aVb3/tenascin C gene expression in vitro. *Head Face Med*. 7(1): 4.
- Kowanetz, M., Ferrara, N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: therapeutic perspective. *Clin Cancer Res*. 12: 5018-5022.
- Koyama, Y., Mitsui, N., Suzuki, N., Yanagisawa, M., Sanuki, R., Isokawa, K., Shimizu, N., Maeno, M. (2008). Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol*. 53(5): 488-96.

- Lang, I., Pabst, M. A., Hiden, U., Blaschitz, A., Dohr, G., Hahn, T., Desoye, G. (2003). Heterogeneity of microvascular endothelial cells isolated from human term placenta and macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 82(4): 163-73.
- Leask, A., Abraham, D. J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *Faseb J.* 18(7): 816-27.
- Lehrer, S., Montazem, A., Ramanathan, L., Pessin-Minsley, M., Pfail, J., Stock, R. G., Kogan, R. (2008). Normal serum bone markers in bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 106(3): 389-91.
- Lehrer, S., Montazem, A., Ramanathan, L., Pessin-Minsley, M., Pfail, J., Stock, R. G., Kogan, R. (2009). Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaws, bone markers, and a hypothesized candidate gene. *J Oral Maxillofac Surg.* 67(1): 159-61.
- Li, Z., Sasaki, Y., Mezawa, M., Wang, S., Li, X., Yang, L., Wang, Z., Zhou, L., Araki, S., Matsumura, H., Takai, H., Ogata, Y. (2011). cAMP and fibroblast growth factor 2 regulate bone sialoprotein gene expression in human prostate cancer cells. *Gene.* 471(1-2): 1-12.
- Lian, J. B., Stein, G. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Montecino, M., Hassan, M. Q., Gaur, T., Lengner, C. J., Young, D. W. (2006). Networks and hubs for the transcriptional control of osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord.* 7(1-2): 1-16.
- Lobato, J. V., Mauricio, A. C., Rodrigues, J. M., Cavaleiro, M. V., Cortez, P. P., Xavier, L., Botelho, C., Hussain, N. S., Santos, J. D. (2008). Jaw avascular osteonecrosis after treatment of multiple myeloma with zoledronate. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 61(1): 99-106.
- Mader, S. S. (2004). The Skeletal System. Understanding Human Anatomy & Physiology. 5 Ed. *The McGraw-Hill Companies.*
- Maes, C., Goossens, S., Bartunkova, S., Drogat, B., Coenegrachts, L., Stockmans, I., Moermans, K., Nyabi, O., Haigh, K., Naessens, M., Haenebalcke, L., Tuckermann, J.P., Tjwa, M., Carmeliet, P., Mandic, V., David, J-P., Behrens, A., Nagy, A., Carmeliet, G., Haigh, J.J. (2010). Increased skeletal VEGF enhances b-catenin activity and results in excessively ossified bones. *The EMBO Journal.* 29: 424-441.
- Marieb, E. N., Hoehn K. (2007). Bones and Skeletal Tissues. Human Anatomy and Physiology. 7 Ed. Beuparlant, S. *Pearson Education, Inc.* 175-201. San Francisco.
- Marks, S. C. J., Hermey, D.C. (1996). The Structure and Development of Bone. Principles of Bone Biology. Bilezikian, J. P., Rodan, G.A., Raisz, L.G. *Academic Press Inc.* 3-14. Worcester, Massachusetts.
- Martin, T. A., Watkins, G., Lane, J., Jiang, W. G. (2005). Assessing microvessels and angiogenesis in human breast cancer, using VE-cadherin. *Histopathology.* 46(4): 422-30.
- Marx, R. E. (2003). Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. *J Oral Maxillofac Surg.* 61(9): 1115-7.
- Marx, R. E., Sawatari, Y., Fortin, M., Broumand, V. (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 63(11): 1567-75.
- Masaki, H., Li, M., Hasegawa, T., Suzuki, R., Ying, G., Zhusheng, I., Oda, K., Yamamoto, T., Kawanami, M., Amizuka, N. (2010). Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in the epiphyseal trabecule and diaphyseal cortical bone of osteoprotegerin deficient mice. *Biomedical Research.* 31(5): 307-318.
- Matos, M. A., Tannuri, U., Guarniero, R. (2010). The effect of zoledronate during bone healing. *J Orthop Traumatol.* 11(1): 7-12.

- Mescher, A. L. (2010). Bone. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. 12 Ed. *The McGraw-Hill Companies*. Chapter 8. Bloomington, Indiana.
- Meury, T., Verrier, S., Alini, M. (2006). Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts in vitro by interfering with osterix expression. *J Cell Biochem*. 98(4): 992-1006.
- Michailidou, M., Brown, H. K., Lefley, D. V., Evans, A., Cross, S. S., Coleman, R. E., Brown, N. J., Holen, I. (2010). Microvascular endothelial cell responses in vitro and in vivo: modulation by zoledronic acid and paclitaxel? *J Vasc Res*. 47(6): 481-93.
- Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *J Cell Physiol*. 196(3): 430-43.
- Migliorati, C. A., Casiglia, J., Epstein, J., Jacobsen, P. L., Siegel, M. A., Woo, S. B. (2005a). Managing the care of patients with bisphosphonate-associated osteonecrosis: an American Academy of Oral Medicine position paper. *J Am Dent Assoc*. 136(12): 1658-68.
- Migliorati, C. A., Schubert, M. M., Peterson, D. E., Seneda, L. M. (2005b). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: an emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer*. 104(1): 83-93.
- Milan, A. M., Sugars, R. V., Embery, G., Waddington, R. J. (2004). Dentinal proteoglycans demonstrate an increasing order of affinity for hydroxyapatite crystals during the transition of predentine to dentine. *Calcif Tissue Int*. 75(3): 197-204.
- Naidu, A., Dechow, P. C., Spears, R., Wright, J. M., Kessler, H. P., Opperman, L. A. (2008). The effects of bisphosphonates on osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 106(1): 5-13.
- Newman, P. J. (1997). Perspectives series: cell adhesion in vascular biology. The biology of PECAM-1. *J. Clin. Invest*. 99(1): 3-8.
- Nicolin, V., Bareggi, R., Baldini, G., Bortul, R., Martinelli, B., Narducci, P. (2007). Effects of neridronic acid on osteoclasts derived by physiological dual-cell cultures. *Acta Histochem*. 109(5): 397-402.
- Niederreither, K., D'Souza, R. N., de Crombrughe, B. (1992). Minimal DNA sequences that control the cell lineage-specific expression of the pro alpha 2(I) collagen promoter in transgenic mice. *J Cell Biol* 119(5): 1361-70.
- Notarnicola, A., Tamma, R., Moretti, L., Panella, A., Dell'endice, S., Zallone, A., Moretti, B. (2011). Effect of shock wave treatment on platelet-rich plasma added to osteoblast cultures. *Ultrasound Med Biol*. 37(1): 160-8.
- Odvina, C. V., Zerwekh, J. E., Rao, D. S., Maalouf, N., Gottschalk, F. A., Pak, C. Y. (2005). Severely suppressed bone turnover: a potential complication of alendronate therapy. *J Clin Endocrinol Metab*. 90(3): 1294-301.
- Orriss, I. R., Key, M. L., Colston, K. W., Arnett, T. R. (2009). Inhibition of osteoblast function in vitro by aminobisphosphonates. *J Cell Biochem*. 106(1): 109-18.
- Ory, B., Moriceau, G., Trichet, V., Blanchard, F., Berreur, M., Rédini, F., Rogers, M., Heymann, D. (2008). Farnesyl diphosphate synthase is involved in the resistance to zoledronic acid of osteosarcoma cells. *J Cell Mol Med*. 12(3): 928-41.
- Pan, B., To, L. B., Farrugia, A. N., Findlay, D. M., Green, J., Gronthos, S., Evdokiou, A., Lynch, K., Atkins, G. J., Zannettino, A. C. (2004). The nitrogen-containing bisphosphonate, zoledronic acid, increases mineralisation of human bone-derived cells in vitro. *Bone*. 34(1): 112-23.

- Panzavolta, S., Torricelli, P., Bracci, B., Fini, M., Bigi, A. (2009). Alendronate and Pamidronate calcium phosphate bone cements: setting properties and in vitro response of osteoblast and osteoclast cells. *J Inorg Biochem.* 103(1): 101-6.
- Perez-Amodio, S., Beertsen, W., Everts, V. (2004). (Pre-)osteoclasts induce retraction of osteoblasts before their fusion to osteoclasts. *Journal of Bone and Mineral Research.* 19: 1722—1731.
- Pischon, N., Darbois, L. M., Palamakumbura, A. H., Kessler, E., Trackman, P. C. (2004). Regulation of collagen deposition and lysyl oxidase by tumor necrosis factor-alpha in osteoblasts. *J Biol Chem.* 279(29): 30060-5.
- Ponader, S., Brandt, H., Vairaktaris, E., von Wilmowsky, C., Nkenke, E., Schlegel, K. A., Neukam, F. W., Holst, S., Muller, F. A., Greil, P. (2008). In vitro response of hFOB cells to pamidronate modified sodium silicate coated cellulose scaffolds. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 64(2): 275-83.
- Potapova, I. A., Cohen, I. S., Doronin, S. V. (2010). Von willebrand factor increases endothelial cell adhesiveness for human mesenchymal stem cells by activating p38 mitogen-activated protein kinase. *Stem Cell Res Ther.* 1(5): 35.
- Prasad, M., Butler, W.T., Qin, C. (2010). Dentin sialophosphoprotein (DSPP) in biomineralization. *Connect Tissue Res.* 51(5): 404–417.
- Ramstad, V. E., Franzén, A., Heinegård, D., Wendel, M., Reinholt, F. P. (2003). Ultrastructural distribution of osteoadherin in rat bone shows a pattern similar to that of bone sialoprotein. *Calcif Tissue Int* 72(1): 57-64.
- Recker, R. R., Delmas, P. D., Halse, J., Reid, I. R., Boonen, S., Garcia-Hernandez, P. A., Supronik, J., Lewiecki, E. M., Ochoa, L., Miller, P., Hu, H., Mesenbrink, P., Hartl, F., Gasser, J., Eriksen, E. F. (2008). Effects of intravenous zoledronic acid once yearly on bone remodeling and bone structure. *J Bone Miner Res.* 23(1): 6-16.
- Reinholz, G. G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E. S., Subramaniam, M., Ingle, J. N., Spelsberg, T. C. (2000). Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer Res.* 60(21): 6001-7.
- Rey-Rico, A., Silva, M., Couceiro, J., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. (2011). Osteogenic efficiency of in situ gelling poloxamine systems with and without bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater.* 21: 317-40.
- Rizzoli, R., Reginster, J. Y., Boonen, S., Breart, G., Diez-Perez, A., Felsenberg, D., Kaufman, J. M., Kanis, J. A., Cooper, C. (2011). Adverse reactions and drug-drug interactions in the management of women with postmenopausal osteoporosis. *Calcif Tissue Int.* 89(2): 91-104.
- Roelofs, A. J., Thompson, K., Gordon, S., Rogers, M. J. (2006). Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 12(20 ): 6222-6230.
- Ruggiero, S. L., Dodson, T. B., Landesberg, R., Mehrotra, B. (2009). American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons position paper on bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws—2009 update. *J Oral Maxillofac Surg* 67: 2-12.
- Ruggiero, S. L., Mehrotra, B., Rosenberg, T. J., Engroff, S. L. (2004). Osteonecrosis of the jaws associated with the use of bisphosphonates: a review of 63 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 62(5): 527-34.
- Russell, R. G., Rogers, M. J. (1999). Bisphosphonates: from the laboratory to the clinic and back again. *Bone.* 25(1): 97–106.

- Russell, R. G., Watts, N. B., Ebetino, F. H., Rogers, M. J. (2008). Mechanisms of action of bisphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporos Int.* 19(6): 733-59.
- Saladin, K. S. (2003). Bone Tissue. *Anatomy & Physiology: The Unity of Form and Function.* 3 Ed. *The McGraw-Hill Companies.*
- Salgado, A. J., Coutinho, O. P., Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 4(8): 743-65.
- Santini, D., Vincenzi, B., Galluzzo, S., Battistoni, F., Rocci, L., Venditti, O., Schiavon, G., Angeletti, S., Uzzalli, F., Caraglia, M., Dicuonzo, G., Tonini, G. (2007). Repeated intermittent low-dose therapy with zoledronic acid induces an early, sustained, and long-lasting decrease of peripheral vascular endothelial growth factor levels in cancer patients. *Clin Cancer Res.* 13(15): 4482-6.
- Santos, M. I., Unger, R. E., Sousa, R. A., Reis, R. L., Kirkpatrick, C. J. (2009). Crosstalk between osteoblasts and endothelial cells co-cultured on a polycaprolactone starch scaffold and the in vitro development of vascularization. *Biomaterials.* 30(26): 4407-15.
- Sarasquete, M. E., Gonzalez, M., San Miguel, J. F., Garcia-Sanz, R. (2009). Bisphosphonate-related osteonecrosis: genetic and acquired risk factors. *Oral Dis.* 15(6): 382-7.
- Schindeler, A., Little, D. G. (2007). Bisphosphonate action: revelations and deceptions from in vitro studies. *J Pharm Sci.* 96(8): 1872-8.
- Schipani, E., Maes, C., Carmeliet, G., Semenza, G. L. (2009). Regulation of osteogenesis-angiogenesis coupling by HIFs and VEGF. *J Bone Miner Res.* 24(8): 1347-53.
- Schmidt, T., Carmeliet, P. (2010). Blood-vessel formation: bridges that guide and unite. *Nature.* 465: 697-699.
- Schönherr, E., Witsch-Prehm, P., Harrach, B., Robenek, H., Rauterberg, J., Kresse, H. (1995). Interaction of biglycan with type I collagen. *J Biol Chem* 270(7): 2776-83.
- Scoletta, M., Arduino, P. G., Dalmaso, P., Brocchetto, R., Mozzati, M. (2010). Treatment outcomes in patients with bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110(1): 46-53.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (2001). Sistema Esquelético: Histologia e Desenvolvimento. Anatomia e Fisiologia. 3 Ed. *Lusodidacta.* 176-202. Loures, Portugal.
- Seeley, R. R., Stephens, T. D., Tate, P. (2004). Skeletal System: Bones and Bone Tissue. Anatomy and Physiology. 6 Ed. Companies, T. M. H. *Mosby-Year, Inc.* USA.
- Seeman, E. (2008). Modeling and Remodeling. Principles of Bone Biology. 3 Ed. Bilezikian, J. P., Rodan, G.A., Raisz, L.G. *Academic Press Inc.* 3-28. Melbourne, Australia.
- Semenza, G. L. (2007). Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 102(4): 840-7.
- Shimoaka, T., Ogasawara, T., Yonamine, A., Chikazu, D., Kawano, H., Nakamura, K., Itoh, N., Kawaguchi, H. (2002). Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J Biol Chem.* 277(9): 7493-500.
- Shinoda, Y., Kawaguchi, H., Higashikawa, A., Hirata, M., Miura, T., Saito, T., Nakamura, K., Chung, U. I., Ogata, N. (2010). Mechanisms underlying catabolic and anabolic functions of parathyroid hormone on bone by combination of culture systems of mouse cells. *J Cell Biochem.* 109(4): 755-63.

- Silva Marques, J. M., Gomes, P. S., Silva, M. A., Silverio Cabrita, A. M., Santos, J. D., Fernandes, M. H. (2009). Growth and phenotypic expression of human endothelial cells cultured on a glass-reinforced hydroxyapatite. *J Mater Sci Mater Med.* 20(3): 725-31.
- Simon, M. J., Niehoff, P., Kimmig, B., Wiltfang, J., Acil, Y. (2008). Expression profile and synthesis of different collagen types I, II, III, and V of human gingival fibroblasts, osteoblasts, and SaOS-2 cells after bisphosphonate treatment. *Clin Oral Investig.* 14(1): 51-8.
- Stefanik, D., Sarin, J., Lam, T., Levin, L., Leboy, P. S., Akintoye, S. O. (2008). Disparate osteogenic response of mandible and iliac crest bone marrow stromal cells to pamidronate. *Oral Dis.* 14(5): 465-71.
- Stubbs, J. T., 3rd., Mintz, K. P., Eanes, E. D., Torchia, D. A., Fisher, L. W. (1997). Characterization of native and recombinant bone sialoprotein: delineation of the mineral-binding and cell adhesion domains and structural analysis of the RGD domain. *J Bone Miner Res.* 12(8): 1210-22.
- Suzuki, K., Takeyama, S., Sakai, Y., Yamada, S., Shinoda, H. (2006). Current topics in pharmacological research on bone metabolism: inhibitory effects of bisphosphonates on the differentiation and activity of osteoclasts. *J Pharmacol Sci.* 100(3): 189-94.
- Tanabe, N., Ito-Kato, E., Suzuki, N., Nakayama, A., Ogiso, B., Maeno, M., Ito, K. (2004). IL-1alpha affects mineralized nodule formation by rat osteoblasts. *Life Sci* 75(19): 2317-27.
- Tartaglia, L., Waugh, A. (2005). Support and movement. Veterinary Physiology And Applied Anatomy. A Textbook For Veterinary Nurses And Technicians. 1 Ed. Sciences, E. H. 77-82. England.
- Tenta, R., Sourla, A., Lembessis, P., Koutsilieris, M. (2006). Bone-related growth factors and zoledronic acid regulate the PTHrP/PTH.1 receptor bioregulation systems in MG-63 human osteosarcoma cells. *Anticancer Res.* 26(1A): 283-91.
- Tjwa, M., Luttun, A., Autiero, M., Carmeliet, P. (2003). VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis. *Cell Tissue Res.* 314(1): 5-14.
- Tortora, G. J., Derrickson, B. (2009). The Skeletal System: Bone Tissue. Principles of Anatomy and Physiology. 12 Ed. Roesch, B. *John Wiley & Sons, Inc.* 175-197. United States of America.
- Unger, R. E., Sartoris, A., Peters, K., Motta, A., Migliaresi, C., Kunkel, M., Bulnheim, U., Rychly, J., Kirkpatrick, C. J. (2007). Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials. *Biomaterials.* 28(27): 3965-76.
- van de Graaff, K. M., Rhee, R.W. (2001). Skeletal System. Human Anatomy and Physiology. Wilhelm, P. B. *Schaum's Outlines Series McGraw-Hill.* 34-35.
- van Driel, M., Koedam, M., Buurman, C. J., Hewison, M., Chiba, H., Uitterlinden, A. G., Pols, H. A., van Leeuwen, J. P. (2006). Evidence for auto/paracrine actions of vitamin D in bone: 1alpha-hydroxylase expression and activity in human bone cells. *Faseb J.* 20(13): 2417-9.
- Vestweber, D. (2000). Molecular mechanisms that control endothelial cell contacts. *J Pathol.* 190(3): 281-91.
- Vieira, J. G. H. (1999). Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 43(6).
- Vieira, S. C., Silva, B. B., Pinto, G. A., Vassallo, J., Moraes, N. G., Santana, J. O., Santos, L. G., Carvasan, G. A., Zeferino, L. C. (2005). CD34 as a marker for evaluating angiogenesis in cervical cancer. *Pathol Res Pract.* 201(4): 313-8.

- Viereck, V., Emons, G., Lauck, V., Frosch, K. H., Blaschke, S., Grundker, C., Hofbauer, L. C. (2002). Bisphosphonates pamidronate and zoledronic acid stimulate osteoprotegerin production by primary human osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(3): 680-6.
- Villars, F., Bordenave, L., Bareille, R., Amedee, J. (2000). Effect of human endothelial cells on human bone marrow stromal cell phenotype: role of VEGF? *J Cell Biochem.* 79(4): 672-85.
- Villars, F., Guillotin, B., Amedee, T., Dutoya, S., Bordenave, L., Bareille, R., Amedee, J. (2002). Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication. *Am J Physiol Cell Physiol.* 282(4): C775-85.
- von Knoch, F., Jaquier, C., Kowalsky, M., Schaeren, S., Alabre, C., Martin, I., Rubash, H. E., Shanbhag, A. S. (2005). Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 26(34): 6941-9.
- Waddington, R. J., Roberts, H. C., Sugars, R. V., Schonherr, E. (2003). Differential roles for small leucine-rich proteoglycans in bone formation. *Eur Cell Mater.* 6: 12-21; discussion 21.
- Walter, C., Klein, M. O., Pabst, A., Al-Nawas, B., Duschner, H., Ziebart, T. (2010). Influence of bisphosphonates on endothelial cells, fibroblasts, and osteogenic cells. *Clin Oral Investig.* 14(1): 35-41.
- Wang, J. W., Valentijn, K. M., De Boer, H. C., Dirven, R. J., Van Zonneveld, A. J., Koster, A. J., Voorberg, J., Reitsma, P. H., Eikenboom, J. (2011). Intracellular storage and regulated secretion of von Willebrand factor in quantitative von Willebrand disease. *J Biol Chem.* 286(27): 24180-8.
- Wood, J., Bonjean, K., Ruetz, S., Bellahcene, A., Devy, L., Foidart, J. M., Castronovo, V., Green, J. R. (2002). Novel antiangiogenic effects of the bisphosphonate compound zoledronic acid. *J Pharmacol Exp Ther.* 302(3): 1055-61.
- Xiong, Y., Yang, H. J., Feng, J., Shi, Z. L., Wu, L. D. (2009). Effects of alendronate on the proliferation and osteogenic differentiation of MG-63 cells. *J Int Med Res.* 37(2): 407-16.
- Yamada, J., Tsuno, N. H., Kitayama, J., Tsuchiya, T., Yoneyama, S., Asakage, M., Okaji, Y., Shuno, Y., Nishikawa, T., Tanaka, J., Takahashi, K., Nagawa, H. (2009). Anti-angiogenic property of zoledronic acid by inhibition of endothelial progenitor cell differentiation. *J Surg Res.* 151(1): 115-20.
- Yoshitani, K., Kido, A., Honoki, K., Akahane, M., Fujii, H., Tanaka, Y. (2011). Low concentrations of alendronate increase the local invasive potential of osteoblastic sarcoma cell lines via connexin 43 activation. *Pathol Res Pract.* 207(7): 417-22.
- Young, C. S., Bradica, G., Hart, C. E., Karunanidhi, A., Street, R. M., Schutte, L., Hollinger, J. O. (2010). Preclinical toxicology studies of recombinant human platelet-derived growth factor-BB either alone or in combination with beta-tricalcium phosphate and type I collagen. *J Tissue Eng.* 246215.
- Zhang, Y., Andrukhov, O., Berner, S., Matejka, M., Wieland, M., Rausch-Fan, X., Schedle, A. (2010a). Osteogenic properties of hydrophilic and hydrophobic titanium surfaces evaluated with osteoblast-like cells (MG63) in coculture with human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). *Dent Mater.* 26(11): 1043-51.
- Zhang, Y., Schedle, A., Matejka, M., Rausch-Fan, X., Andrukhov, O. (2010b). The proliferation and differentiation of osteoblasts in co-culture with human umbilical vein endothelial cells: An improved analysis using fluorescence-activated cell sorting. *Cell Mol Biol Lett.* 15(4): 517-29.
- Ziebart, T., Pabst, A., Klein, M. O., Kammerer, P., Gauss, L., Brullmann, D., Al-Nawas, B., Walter, C. (2011). Bisphosphonates: restrictions for vasculogenesis and angiogenesis: inhibition of cell function of endothelial progenitor cells and mature endothelial cells in vitro. *Clin Oral Investig.* 15(1): 105-11.

## **8. ANEXOS**

**Apresentação em Poster:**

Ribeiro V, Garcia M, Oliveira P, Pires MJ, Colaço B, Fernandes MH “*Co-culture of osteoblastic and endothelial cells in the presence of Bisphosphonates*” Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society – TERMIS-EU – Granada, Espanha, 7-11 de Junho de 2011.

**Resumo Publicado:**

Ribeiro V, Garcia M, Oliveira P, Pires MJ, Colaço B, Fernandes MH “*Co-culture of osteoblastic and endothelial cells in the presence of Bisphosphonates*” Histology and Histopathology 26(1):10. P8, 2011.

# CO-CULTURE OF OSTEOBLASTIC AND ENDOTHELIAL CELLS IN THE PRESENCE OF BISPHOSPHONATES

Ribeiro V<sup>1,3</sup>, Garcia M<sup>3</sup>, Oliveira P<sup>2</sup>, Pires MJ<sup>2</sup>, Colaço B<sup>1</sup>, Fernandes MH<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CECAV, Departamento de Zootecnia, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

<sup>2</sup>CECAV, Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Portugal

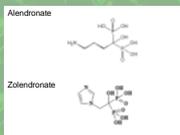
<sup>3</sup>Universidade do Porto, Faculdade de Medicina Dentária (FMDUP), Laboratório de Farmacologia e Biocompatibilidade Celular, Portugal

## Introduction

Long-term therapies with Bisphosphonates (BPs) can cause osteonecrosis of the jaws, a condition characterized by tissue dehiscence, chronic bone devitalization, hypocellularity and lytic radiographic features, being usually refractory to therapy. Among the diverse and complex mechanisms of action recently suggested for BPs, the anti-angiogenic properties appears to be a relevant feature of their pharmacological profile. Due to the intimate relationship between angiogenesis and osteogenesis during bone formation events, the aim of this study was to analyze the effect of representative BPs – alendronate and zoledronate, two widely used BPs in therapeutics – in the behavior of a co-culture system of human osteoblastic and endothelial cells.

## Methods

MG63 osteoblast-like cells (10<sup>3</sup> cell/cm<sup>2</sup>) and human dermal microvascular endothelial cells (HDMEC, 10<sup>4</sup> cell/cm<sup>2</sup>) were cultured isolated or co-cultured in endothelium medium, in the absence (control) and in the presence of 10<sup>-12</sup> to 10<sup>-6</sup> M Alendronate (AL) or Zoledronate (Zn).



Cultures were maintained for 14 days and characterized for:

- cell viability/proliferation by the MTT assay;
- pattern of cell growth by confocal laser scanning microscopy (CLSM), following immunostaining:
  - Endothelial cells were stained for CD31, a specific endothelial marker;
  - MG63 were stained for actin filaments with phalloidin;
- gene expression of osteoblastic markers (ALP, BMP-2, OPG) and endothelial markers (CD31, VE-Cadherin) by RT-PCR and densitometric analysis.

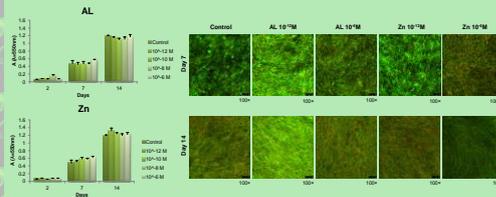
## References

1. Wood J, Bonjean K, Ruetz S, et al. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 2002; 302: 1055-1061.
2. Carano, R.A.D., Filvaroff, E.H. Drug Discovery Today 2003; 21:980-989.

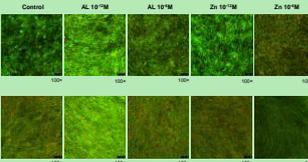
## Results and Discussion

### Effects of Alendronate and Zoledronate in MG63 cells

#### Cell viability/proliferation (MTT assay)



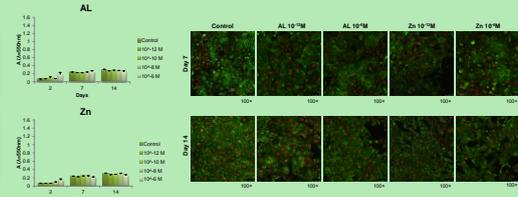
#### Pattern of cell growth (CLSM)



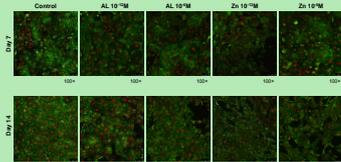
MG63 cells grew actively throughout the 14 days of culture. Cell behavior, regarding to proliferation and cellular phenotype (analysed by CLSM), of cultures exposed to Alendronate and Zoledronate with concentrations ranges between 10<sup>-12</sup> M and 10<sup>-6</sup> M, was similar to that of control.

### Effects of Alendronate and Zoledronate in HDMEC cells

#### Cell viability/proliferation (MTT assay)

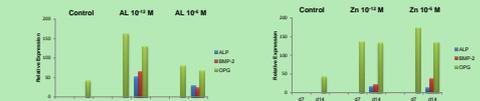


#### Pattern of cell growth (CLSM)



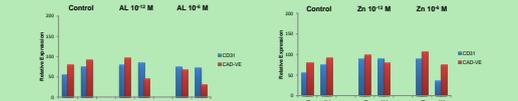
Alendronate and Zoledronate did not affect the cell viability/proliferation of HDMEC, at low and high concentrations. As shown by CLSM, the characteristic marker of the endothelial phenotype – CD31 – maintains its expression throughout the culture period and in each of tested conditions, except at the highest concentration of zoledronate, where its expression decreases over time.

#### Gene expression of osteoblastic markers



In control conditions, MG63 cells did not express ALP and BMP-2, and expressed OPG at day 14. In the presence of Alendronate or Zoledronate, 10<sup>-12</sup> M and 10<sup>-6</sup> M, cultures expressed high levels of OPG at days 7 and 14, and expressed ALP and BMP-2 at day 14.

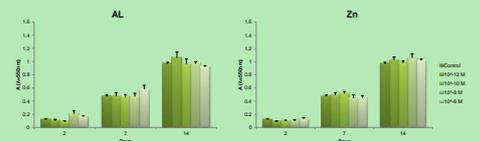
#### Gene expression of endothelial markers



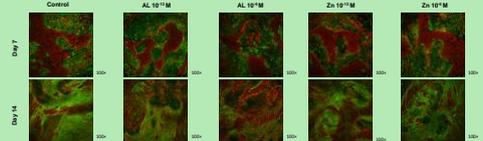
HDMEC cultures, in control conditions, expressed CD31 and CAD-VE markers. Alendronate, 10<sup>-12</sup> M and 10<sup>-6</sup> M, decreased the expression of CAD-VE marker at day 14. Zoledronate decreased the expression of CD31 marker at 10<sup>-6</sup> M.

### Effects of Alendronate and Zoledronate in co-cultures of MG63 cells and endothelial cells

#### Cell viability/proliferation (MTT assay)



#### Pattern of cell growth by CLSM



Co-cultures of MG63 cells and HDMEC proliferated from day 2 to day 14 of culture, and showed a characteristic morphology. At day 7, cultures presented clusters of osteoblastic cells surrounded by endothelial cells, but, at day 14, the two populations were mixed up. This pattern was observed in the absence or presence of Alendronate and Zoledronate. By CLSM it was verified that CD31 marker maintained its expression throughout the 14 days of culture, for all tested conditions.

#### Gene expression of osteoblastic and endothelial markers



Co-cultures of osteoblasts and endothelial cells, in control conditions, presented an increase of gene expression for all tested markers, compared to the respective monocultures. For all tested concentrations, Alendronate and Zoledronate increased the expression of ALP and BMP-2 osteoblastic markers at day 14; expression of OPG also increased, especially at day 7. Expression of CD31 and CAD-VE endothelial markers decreased in the presence of Alendronate and Zoledronate, at day 14.

## Conclusions

- ✓ Alendronate and Zoledronate, in concentrations ranging between 10<sup>-12</sup> and 10<sup>-6</sup> M, did not cause significant changes in cell proliferation of endothelial and osteoblastic cells in monoculture and co-cultures. However, there was a decrease in the phenotypic expression of endothelial cells, suggested by the reduction of CAD-VE and CD31 expression.
- ✓ Monoculture and co-cultured MG63 cells, under tested concentrations of Alendronate and Zoledronate (10<sup>-12</sup> and 10<sup>-6</sup> M), increased the gene expression of ALP, BMP-2 and OPG markers. Expression of OPG, an osteoclastogenesis inhibitor, increased significantly. Endothelial markers CD31 and CAD-VE decreased their expression under the tested concentrations of Alendronate and Zoledronate.
- ✓ These facts indicate that the inhibitory effects of BPs in endothelial cells might play a role in the deleterious effects of BPs in the bone tissue.