

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

DENISE WEFFORT

**EFEITO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE (GTE) NO METABOLISMO E
EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS OSTEoblÁSTICAS DA MEDULA ÓSSEA DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

RIBEIRÃO PRETO

2018

DENISE WEFFORT

**EFEITO DO EXTRATO DE CHÁ VERDE (GTE) NO METABOLISMO E
EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS OSTEABLÁSTICAS DA MEDULA ÓSSEA DE
RATAS OVARIECTOMIZADAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
Curso de Graduação de Odontologia da
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo – USP.

Orientadora: Prof^ª Dra. Karina Fittipaldi
Bombonato Prado

RIBEIRÃO PRETO

2018

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por permitir que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como universitária, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Ao meu pai Paulo e minha irmã Nádyá, por sempre estarem ao meu lado e me incentivarem a buscar sempre o meu melhor.

A minha mãe e avó (*in memoriam*), Vera e Rosária, por sempre torcerem por mim e me apoiarem quando presentes, e hoje olham por mim lá do céu.

A Prof^a Dra. Karina Fittipaldi Bombonato Prado, por ter aceitado me orientar, pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho. Muito obrigada, por tudo.

Aos técnicos Gustavo, Milla e Roger, por toda ajuda prestada, pois sem vocês não conseguiria desenvolver este trabalho.

À Universidade de São Paulo, à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, que ao longo da minha formação ofereceu um ambiente de estudo agradável, motivador e repleto de oportunidades.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo apoio financeiro.

À 89^a Turma de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pelos cinco anos de convivência e aprendizado.

RESUMO

A osteoporose é uma doença que comumente aparece no período pós-menopausa e se caracteriza por perda de massa óssea e fragilidade do osso, o que facilita a ocorrência de fraturas. Muitos fatores, tais como inflamação crônica e deficiência de estrógeno são capazes de promover a perda de massa óssea, porque aumentam o estresse oxidativo ou porque reduzem a capacidade antioxidante do organismo. Dessa forma, o chá verde, uma bebida muito consumida em todo o mundo, tem recebido muita atenção. O extrato de chá verde (GTE) é rico em antioxidantes não vitamínicos denominados catequinas, compostos fenólicos que possuem atividade anti-inflamatória e antioxidante, reduzindo a reabsorção óssea, aumentando a diferenciação osteoblástica e a formação óssea. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi realizar estudos *in vitro* para avaliar o metabolismo de células osteoblásticas originárias da medula óssea de ratas ovariectomizadas na presença do extrato de chá verde (GTE). Foram utilizadas ratas *Wistar* divididas em grupos controle e ovariectomizado. Após 60 dias, as ratas foram sacrificadas e os fêmures coletados para o isolamento das células, que foram cultivadas em garrafas de cultura em meio osteogênico até a subconfluência e plaqueadas em uma concentração de 2×10^4 células por poço em placas de cultura (n=5) divididas em três grupos: controle (C); ovariectomizado (O) e ovariectomia com adição de GTE (OGTE). Após os tempos experimentais, foram avaliados viabilidade celular, atividade de fosfatase alcalina, detecção e quantificação de nódulos mineralizados, assim como quantificação da expressão de genes associados à osteogênese. Os dados obtidos foram analisados por programas estatísticos adequados com significância de $p \leq 0.05$, com o objetivo de encontrar dados estatisticamente significantes que demonstrem os efeitos benéficos do GTE.

ABSTRACT

Osteoporosis is a common disease in the postmenopausal period and it is characterized by fragility and loss of bone mass, which might result in severe fractures. Several factors like chronic inflammation and estrogen deficiency are capable of promoting loss of bone mass, because of oxidative stress or reduced antioxidative capacity. Thus, antioxidants beverages like green tea have been receiving increasing attention. Green tea extract (GTE) is rich in antioxidants denominated catechins, which are suggested to have antiinflammatory and antioxidant properties, reducing bone resorption and increasing bone formation. Thus, the aim of this investigation was to perform *in vitro* assays to evaluate the metabolism of osteoblastic cells from bone marrow of ovariectomized rats in the presence of green tea extract (GTE). There were used *Wistar* female rats, submitted to ovariectomy and after 60 days sacrificed for removal of both femurs. Cells were isolated and cultivated in cell flasks with osteogenic medium. After subconfluence, cells were be seeded in cell plates of 24 wells in a concentration of 2×10^4 cells/well (n=5) and divided in 3 groups: control (C); ovariectomized (O) and ovariectomized with GTE (OGTE). After the experimental periods, the following parameters were evaluated: cell proliferation and viability, alkaline phosphatase activity, detection and quantification of mineralized nodules, as well as quantitative expression of genes associated to bone metabolism (i.e. ALP, RUNX2, RANKL/OPG ratio). Data obtained were analyzed by statistical softwares for significance of $p \leq 0.05$, with the goal of finding relevant results of the beneficial effects of green tea extract.

1. INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo fisiológico que mantém a integridade do esqueleto através da substituição do osso antigo por uma matriz óssea jovem (Marie & Kassem, 2011). Esta remodelação requer ações coordenadas entre os osteoclastos para remover a matriz óssea e os osteoblastos, para substituí-la. Porém, com a senilidade, a formação óssea, comparada à reabsorção, fica prejudicada em virtude da queda do número de osteoblastos e redução de suas atividades. Essas disfunções podem ser explicadas pelas mudanças decorrentes do processo de envelhecimento, como as alterações nos fatores de crescimento e hormonais. A consequência é um declínio na formação óssea, tanto do osso trabecular como do osso cortical, com redução da massa óssea (Khosla & Riggs, 2005; Russel e cols., 2006).

O desequilíbrio no processo de renovação óssea pode gerar uma desordem sistêmica crônica conhecida por osteoporose, onde ocorre a perda da microarquitetura do tecido ósseo, reduzindo sua densidade e tornando-o frágil, com suscetibilidade à fratura (South-Paul, 2001). Fatores genéticos, nutricionais e comportamentais são de fundamental importância na etiologia desta doença (Raisz, 2005). A alimentação influencia no risco de osteoporose e fraturas através da melhoria da densidade mineral óssea, microarquitetura e resistência. Na última década, a consciência de terapias alternativas para a prevenção e/ou tratamento da osteopenia e osteoporose, como suplementos alimentares ou alimentos funcionais, tem aumentado entre os consumidores (Shen et al, 2013).

O consumo de chá tem sido associado com maior densidade mineral óssea e menor risco de fraturas de quadril em homens e mulheres (Vali et al, 2009). Os chás possuem suplementos com várias propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes (Shao et al, 2011). Entre eles, o chá verde (*Camellia sinensis*), bebida mundialmente conhecida e muito consumida nos países asiáticos devido aos seus efeitos benéficos relacionados a saúde, tem um alto poder antioxidante devido aos seus compostos polifenólicos (catequinas) (Shen et al, 2009).

Alguns estudos têm mostrado a relação entre o consumo de chá verde e a perda de massa óssea/ osteoporose. (Vali et al, 2009). Estudos celulares observaram que a Epigallocatequina galato (EGCG) inibiu significativamente a sobrevivência dos osteoclastos diferenciados e o aumento da apoptose de osteoclastos (Shen et al, 2009). A EGCG também aumenta a atividade dos osteoblastos através de vias de sinalização Wnt, que modulam o desenvolvimento dos ossos e aquisição de massa óssea (Shen et al, 2013). Evidências a partir destes estudos *in vitro* sugerem que os polifenóis do chá podem favorecer o metabolismo ósseo, aumentando a osteoblastogênese e suprimindo osteoclastogênese por meio da

modulação de fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e seus receptores (Shen et al, 2013).

2. OBJETIVO

O objetivo principal deste projeto foi avaliar o efeito *in vitro* do extrato de chá verde (GTE) no metabolismo de células osteoblásticas da medula óssea de ratas ovariectomizadas, através dos seguintes parâmetros:

- Viabilidade celular;
- Marcação de nódulos de fosfatase alcalina *in situ*
- Detecção e quantificação de nódulos mineralizados;
- Expressão de genes relacionados à atividade osteoblástica através de PCR em tempo real.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais Utilizados

Com a aprovação do Comitê de Ética para o uso de animais (CEUA-FORP/USP), foram utilizadas 18 ratas Wistar (9 ratas do grupo controle e 9 ratas do grupo tratado) pesando aproximadamente 200g. Os animais foram procedentes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Eles foram tratados com ração especial para roedores e água filtrada *ad libitum*. Foram separados em duas caixas grandes com cama de maravalha nas dimensões 41 x 34 x 16 cm, em número de três por caixa. A temperatura do local de alojamento dos animais foi mantida à 23,5-24,5 °C, controlada por condicionador de ar quente/frio de janela, além de um sistema de exaustão de ar. Os animais foram mantidos no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto- USP.

3.2. Indução da osteoporose - Grupo Tratado

Os animais foram ovariectomizados bilateralmente. Primeiramente eles foram pesados e então anestesiados com a solução anestésica de Coopazine (Xylazina) - sedativo, analgésico e relaxante muscular; e Dopalen (Ketamina)- anestésico geral, fornecido pela Agibrands do Brasil LTDA- Campinas, SP, Brasil, na proporção de 75mg/Kg de Ketamina e de 10mg/Kg de Xylazina, injetada por via intraperitoneal. Também foi feita a aplicação em ambos os olhos dos animais, durante a cirurgia, de uma gaze estéril embebida em soro fisiológico a 0,9% com o objetivo de prevenir o ressecamento das córneas.

Após a anestesia os animais foram submetidos à tricotomia das regiões laterais. Foi feita a assepsia dos locais que foram incisionados com álcool iodado (PVPI). Foram realizadas incisões cutâneas bilaterais, sendo o tecido muscular divulsionado para a exposição dos ovários e excisão dos mesmos (Kalu, 1991). Foi realizada a sutura dos tecidos com fio de seda 4.0 (Ethicon, Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP, Brasil) de modo a fechar devidamente as margens do retalho. Em seguida, cada animal recebeu, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em número de três por caixa, por sessenta dias e receberam ração e água “*ad libitum*”. Os animais operados ficaram sob observação constante, sendo feita a limpeza de suas caixas, com troca da maravalha, três vezes por semana. A comprovação do sucesso do procedimento de ovariectomia foi feita pelo exame do ciclo estral e exame macroscópico dos cornos uterinos.

Duas semanas após a cirurgia, os animais foram submetidos ao exame do ciclo estral, por meio da coleta de líquido vaginal por um período de 5 dias consecutivos. Para o desenvolvimento desta técnica de observação foi introduzido, com o auxílio de uma borracha de conta-gotas acoplada a uma ponteira pequena, uma dose de solução salina (cerca de 1ml) no interior da vagina da rata. Após a introdução a solução foi rapidamente aspirada e seu conteúdo transferido para uma lâmina de vidro e imediatamente observado em microscopia óptica. Este procedimento foi realizado bem no início da manhã, por volta das 7 horas.

A literatura mostra que esta técnica é ideal para investigar as mudanças ocorridas no ciclo reprodutivo. O período do ciclo estral das ratas dura de 4 a 5 dias. Este ciclo pode ser dividido em quatro fases: metaestro, diestro, proestro e estro. Cada uma das fases se caracteriza por apresentar um tipo de célula predominante que pode ser facilmente observado nos esfregaços da vagina, assim como o nível de hormônios sexuais presentes no animal. Na fase metaestro, observam-se leucócitos e algumas células epiteliais anucleadas remanescentes. Nesta fase inicia-se o aumento da secreção de estrógeno e o primeiro pico de progesterona. Na fase diestro observam-se basicamente leucócitos e algumas células epiteliais nucleadas, sendo marcado pelo final do primeiro pico de progesterona e baixos níveis de estrógeno. Na terceira fase, proestro, o número de células epiteliais nucleadas aumenta enquanto os leucócitos praticamente desaparecem, ocorrendo neste momento o pico de secreção de estrógeno e o segundo pico de progesterona, enquanto na fase estro são visualizadas basicamente células epiteliais queratinizadas da camada córnea e o nível de estrógeno retorna aos valores basais (Marcondes e cols., 2002).

Durante o processo de sacrifício dos animais, foi possível avaliar, também, o efeito da ovariectomia, por meio do exame macroscópico dos cornos uterinos. Para a realização desta análise foi necessário, antes do sacrifício dos animais, incisionar a região abdominal para localização das respectivas estruturas. Nos animais ovariectomizados (com deficiência de hormônio) os cornos uterinos apresentaram-se finos, atróficos e anêmicos. Estes experimentos foram realizados em triplicata.

3.3. Grupo Controle - Sham

Os animais do grupo controle foram submetidos apenas ao procedimento da cirurgia com exposição e reposicionamento dos ovários. Estes animais também receberam, via intramuscular, uma única dose de 24.000UI/Kg de peso de penicilina (Pentabiotic Veterinário Pequeno Porte - Fort Dodge®, Campinas, SP, Brasil).

3.4. Sacrifício dos Animais e Coleta de Material

As ratas foram sacrificadas após sessenta dias da cirurgia por meio de anestesia convencional seguida por decapitação. Os anestésicos utilizados foram cloridrato de cetamina (40-80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal. A confirmação da morte do animal foi realizada por meio de verificação de ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos e perda do reflexo corneal. Após a confirmação, foi realizada a coleta dos fêmures para a realização da cultura celular. Os experimentos com cultura de células foram realizados no Laboratório de Cultura de Células da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

A cultura de células mesenquimais obtidas da medula óssea de fêmures das ratas foi realizada como descrito por (Maniatopoulos et al., 1988). Os fêmures foram retirados e transportados até o laboratório em meio de transporte α -MEM (Gibco, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 720 μ L de fungizona (Gibco) e 3 mL de gentamicina (Gibco). No fluxo laminar, os fêmures foram submetidos à anti-sepsia (clorexidina a 2,5% e álcool a 70% por 1 minuto cada). Posteriormente, foi realizada a remoção de tecidos moles restantes nos fêmures por meio de lâmina de bisturi intercalada com a permanência dos mesmos em meio de transporte/lavagem por 15 minutos (três vezes). As epífises foram cortadas e a medula óssea extraída do fêmur por meio de irrigação das diáfises com meio de cultura.

As células foram mantidas em frascos de 75 cm² (Corning, Corning, NY, EUA) com meio total suplementado (MTS), contendo α -MEM (Gibco), 10% de soro fetal bovino (Gibco), dexametasona 10⁻⁷ (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 5 μ g/mL de ácido ascórbico

(Gibco), 0,3 µg/mL de fungizona (Gibco), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco) e 2,16 g/mL de β-glicerofosfato.

Após atingirem subconfluência, as células foram liberadas enzimaticamente dos frascos de cultura pela adição de solução de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 1 mM (Gibco), 1,3 mg/mL de colagenase tipo II (Gibco) e tripsina a 0,25% (Gibco) e colocadas em presença de quantidade suficiente de meio de cultura para interromper a ação enzimática. Posterior à centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos foi obtido o precipitado celular, as células foram homogeneizadas em meio de cultura MTS e uma alíquota de 100 µL desta solução, adicionada à porção igual de corante azul de tripan 0,1% (Sigma) foi utilizada para contagem celular por meio de um contador de células automático (Countess automated cell counter tm, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A primeira passagem celular foi utilizada para realização dos experimentos. As células foram cultivadas no mesmo meio de cultura descrito acima (MTS) e passadas para placas de cultura de 24 poços na concentração de 2×10^4 células por poço. As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de dióxido de carbono e 95% de ar atmosférico. Durante o tempo de cultivo, as células foram acompanhadas por meio de observação em microscópio de luz invertido (Axiovert 25, Zeiss, Alemanha) sendo os meios de cultura trocados a cada 3 ou 4 dias.

3.5. Administração *in vitro* do extrato de chá verde (GTE)

O extrato de chá verde (GTE) utilizado foi o Sunphenon 90D, produzido pela Taiyo International (Japão), e certificado pela FDA (www.sunphenon.com/formulator-resources), fornecido pela empresa R&S Blumos do Brasil (Campinas, SP). Este extrato é caracterizado como tendo mais de 90% de polifenóis, mais de 80% de catequinas, mais de 45% de epigalocatequina-galato (EGCG) e menos de 1% de cafeína. O extrato foi utilizado de acordo com protocolo de Vester e cols (2014), com adição de 1µg/ml de GTE no meio de cultura nas em todas as trocas de meio.

3.6. Ensaios Bioquímicos

3.6.1. Viabilidade celular

Após 7, 10 e 14 dias, a viabilidade e proliferação celulares foram avaliadas pelo ensaio colorimétrico MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]} (Sigma®).

Após remoção do meio de cultura, as células foram incubadas com solução de MTT em meio de cultura por 4 horas a 37 °C, em atmosfera umidificada contendo de 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após esse período, o meio de cultura foi retirado dos poços e estes foram lavados com 1 mL de solução PBS aquecida. Em seguida, será adicionado 1 mL de solução de isopropanol ácido em cada poço sob agitação por 5 min, para a solubilização completa do precipitado formado. Alíquotas de 150 µL foram retiradas dos poços e transferidas para uma placa de 96 poços para medida colorimétrica em espectrofotômetro (µQuant, Bio-tek Instruments, Inc.) a 570 nm com correção em 650 nm. Os valores de absorbância obtidos da amostra controle e do grupo experimental foram submetidos à análise estatística.

3.6.2. Análise da detecção de fosfatase alcalina *in situ*

A análise da enzima fosfatase alcalina *in situ* foi realizada aos 7 e 14 dias. Após a remoção do meio de cultura, os poços foram lavados duas vezes com PBS aquecido a 37°C. Trezentos e vinte miligramas do reagente Triz (Sigma) foram dissolvidos em 20mL de água deionizada e, adicionado, 7mg do reagente Fast Red (Sigma). Foram desprezados 2mL desta solução e acrescentados 8mg de naftol (Sigma) diluídos em 2mL de dimetil formamida (Merck) formando a solução de trabalho. Um mililitro dessa solução foi adicionado em cada poço. A placa foi levada à incubadora em uma atmosfera umidificada a 37°C com 5% de CO₂ por 30 minutos. Decorrido esse tempo, a solução foi retirada dos poços e a placa foi seca à temperatura ambiente para posterior análise qualitativa.

3.6.3. Formação e quantificação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 17 dias. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados 3 vezes com PBS (Gibco) aquecido a 37° C, preenchidos com 2 mL de formalina 10% e mantidos a 4 °C. Decorridas 24 horas, após remoção da formalina, os poços foram desidratados à temperatura ambiente em séries crescentes de álcoois (30°GL, 50°GL, 70°GL e 100°GL) e a duração da desidratação para cada graduação alcoólica foi de 1 hora. Após secagem, os poços foram corados com vermelho de alizarina (Sigma) e as áreas de mineralização ricas em cálcio, foram evidenciadas pela coloração vermelha.

Para quantificação da coloração segundo método de Gregory e cols (2004), 150 µL de ácido acético a 10% serão acrescentados a cada poço e as placas deixadas sob agitação suave por 30 minutos. A camada de células foi então raspada com um raspador de células e a solução transferida para tubos de 1,5 mL e agitadas em vortex por 30 segundos. Em seguida,

100 µL de óleo mineral foram adicionados à amostra para evitar evaporação, que foi aquecida a 85 °C por 10 minutos e transferida para o gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000 g por 15 minutos, adicionados 40 µL de hidróxido de amônia a 10% e 150 µL do sobrenadante foram lidos em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 405 nm. A curva padrão foi realizada com dissoluções sucessivas de alizarina de 0,5 a 3 mM em acetato de amônia (10% de ácido acético glacial e 5M de hidróxido de amônia). A média e a comparação entre os grupos foram realizadas através de teste estatístico.

3.7. PCR em tempo real (RT-PCR)

3.7.1.Extração de RNA e Transcrição Reversa

Após cada período experimental, foi realizada a extração do RNA total através do kit *SV Total RNA Isolation System* (Promega, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Em seguida, o RNA total foi quantificado em diferentes comprimentos de onda (260; 280; 230; 320 nm) no aparelho GeneQuant 1300 (GE Healthcare, Reino Unido). A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose desnaturante 1,5% (m/v). Os tampões para a realização da eletroforese foram preparados com água previamente tratada com *diethylpyrocarbonato* (Sigma, EUA). Para o preparo da água adiciona-se 1 mL de DEPC em 999 mL de água deionizada, sendo esta mistura incubada a temperatura ambiente por 24 horas e autoclavada por 30 minutos. O gel foi preparado dissolvendo-se 3 g de agarose (Gibco, EUA) em 144 mL de água previamente tratada com DEPC. Em seguida, a mistura foi incubada em banho-maria a 65 °C e, então, adicionados 20 ml de tampão de corrida (10X) (50mM acetato de sódio, Merck; 5mM EDTA, Merck; 100mM de Ácido morfolinopropanalsulfônico - MOPS, Sigma) e 36 ml de formaldeído 12,3 M (Merck). Despeja-se a mistura em formas adequadas para moldagem do gel.

Para o preparo das amostras, foram adicionados para um volume final de 10 mL:

a) cerca de 2 µg de RNA total; b) 2 ml de tampão de corrida (5X); c) 3,5 ml de formaldeído 12,3 M; e, d) 10 mL de formamida (Merck). Esta mistura foi aquecida a 85 °C por 10 minutos e, em seguida, submetida a resfriamento a 4 °C. No momento de aplicação das amostras no gel foram adicionados 2 mL de brometo de etídeo (10 mg/mL - Sigma, EUA). A eletroforese foi conduzida a 80 V durante 1 a 3 horas, utilizando-se tampão de corrida 1X. Após este período, o gel foi visualizado através de iluminação com luz ultravioleta (UV) a 300 nm. A caracterização de um RNA mensageiro (RNAm) de boa qualidade foi verificada

pela visualização de duas subunidades ribossômicas características nos eucariotos (18S e 28S).

Após extração do RNA total, o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA por reação de transcrição reversa utilizando o *Kit High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foram adicionados ao RNA: 2 µL de (10X) RT buffer, 0,8 µL de (25X) dNTP mix (100mM), 2 µL (10X) RT Random Primers, 1 µL de MultiScribe Reverse Transcriptase, 1 µL de RNase Inibitor e 3,2 µL de água DEPC, para um volume final de 20 µL/ reação. Em seguida, a amostra foi incubada a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos, 85 °C por 5 segundos, seguido pelo resfriamento a 4 °C. Ao final da reação a amostra foi mantida em gelo e o cDNA estocado em freezer -20°C.

3.7.2. Reação de PCR em tempo real utilizando o sistema de sondas TaqMan

A expressão quantitativa de *Runt-related transcription factor 2* (RUNX2), fosfatase alcalina (Alp), *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand* (RANKL) e osteoprotegerina (OPG) foi analisada após 3, 7 e 10 dias em cultura através de reações de PCR em tempo real.

As reações de PCR em tempo real realizadas pelo sistema de sondas TaqMan foram preparadas para um volume final de 10 µL por reação. Para cada reação, foram adicionados 5 µL de TaqMan Universal PCR Master Mix-No AmpErase UNG (2X), 0,5 µL das sondas TaqMan para os genes de interesse (20X TaqMan Gene Expression Assay Mix) e 11,25 ng de cDNA. As reações consistiram em 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, e quarenta ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C.

Os resultados foram analisados com base no valor de Ct (*cicle threshold* – ou ciclo limiar) e todas as amostras foram submetidas a reações para a detecção de RNA mensageiro para o gene de expressão constitutiva beta-actina. Os níveis de expressão do gene constitutivo foram utilizados para a normalização dos níveis de expressão do gene alvo e uma amostra negativa (água) foi submetida à reação com cada sonda TaqMan utilizada. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak e cols., 2001). Usando o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, os dados foram representados como diferença (em vezes) na expressão gênica normalizada pelo gene constitutivo.

A significância estatística das mudanças de expressão gênica foi avaliada pelo teste t entre os grupos experimentais. Os experimentos foram realizados em triplicata. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Os resultados representam os valores da média \pm desvio padrão, da intensidade de expressão de RNAm para o gene alvo, normalizado pela expressão da beta-actina.

4. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados obtidos das culturas células (n=5) foram analisados através de teste estatístico apropriado após aplicação de testes de normalidade e homogeneidade. Foi utilizado o *software* estatístico SPSS 17.0 e a significância foi fixada em 5%.

5. RESULTADOS

5.1. Viabilidade celular (MTT)

O MTT é um ensaio bioquímico colorimétrico que estima a viabilidade e a proliferação celular. Os resultados obtidos pelo espectrofotômetro foram submetidos a análise estatística. Pode ser observado que as células do grupo OGTE mostraram maior viabilidade em todos os períodos quando comparado às células do grupo O, com significância estatística para os sete e dez dias (Figura 1).

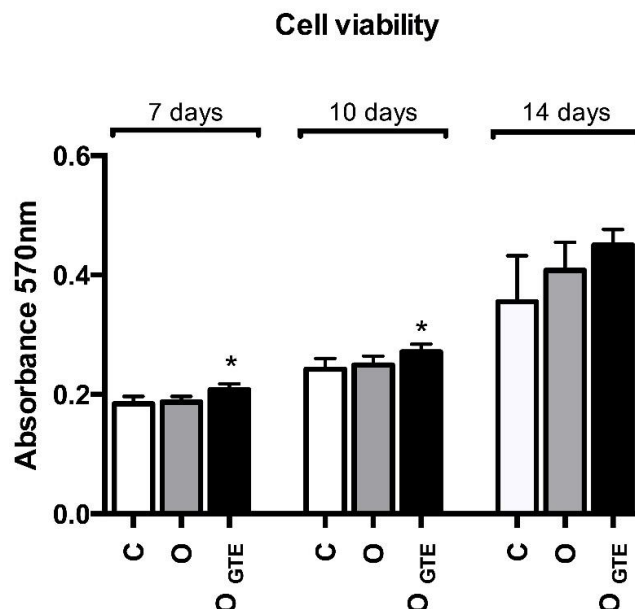


Figura 1. Viabilidade de células osteoblásticas da medula óssea de ratos controles (C), ovariectomizadas (O) e ovariectomizadas com GTE (O GTE) após 7, 10 e 14 dias de cultura.

5.2. Detecção *in situ* da Fosfatase Alcalina (ALP)

A análise da enzima fosfatase alcalina *in situ* foi realizada aos 7 e 14 dias, sendo observado aos 14 dias uma maior marcação no grupo OGTE, onde é possível avaliar que a adição de extrato atuou positivamente devido a maior quantidade de nódulos marcados nas imagens representadas abaixo com coloração de vermelho de alizarina, na qual foi encontrada diferença estatisticamente significativa na comparação com os demais grupos.

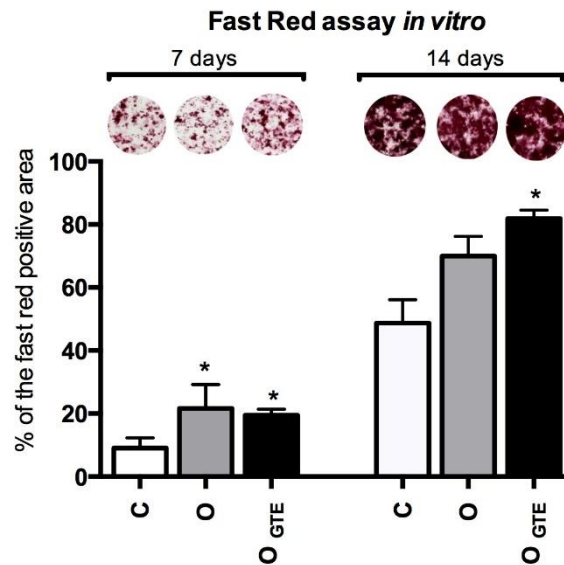


Figura 2. Detecção *in situ* de fosfatase alcalina (ALP) em células osteoblásticas da medula óssea de ratas controles (C), ovariectomizadas (O) e ovariectomizadas com GTE (OGTE) após 7 e 14 dias de cultura.

5.3. Formação e Quantificação de Matriz mineralizada

A mineralização foi avaliada ao final do período de 17 dias. Na análise qualitativa podemos observar vários nódulos no poço de grupo O e também uma grande quantidade no poço correspondente ao grupo OGTE quando comparado aos outros grupos, sugerindo um favorecimento na mineralização. A análise quantitativa mostra resultados estatisticamente significantes com $p < 0,001$. Ao avaliarmos os grupos houve uma maior formação de nódulos pelo grupo O, porém ausência de diferenças estatísticas entre os grupos C e OGTE.

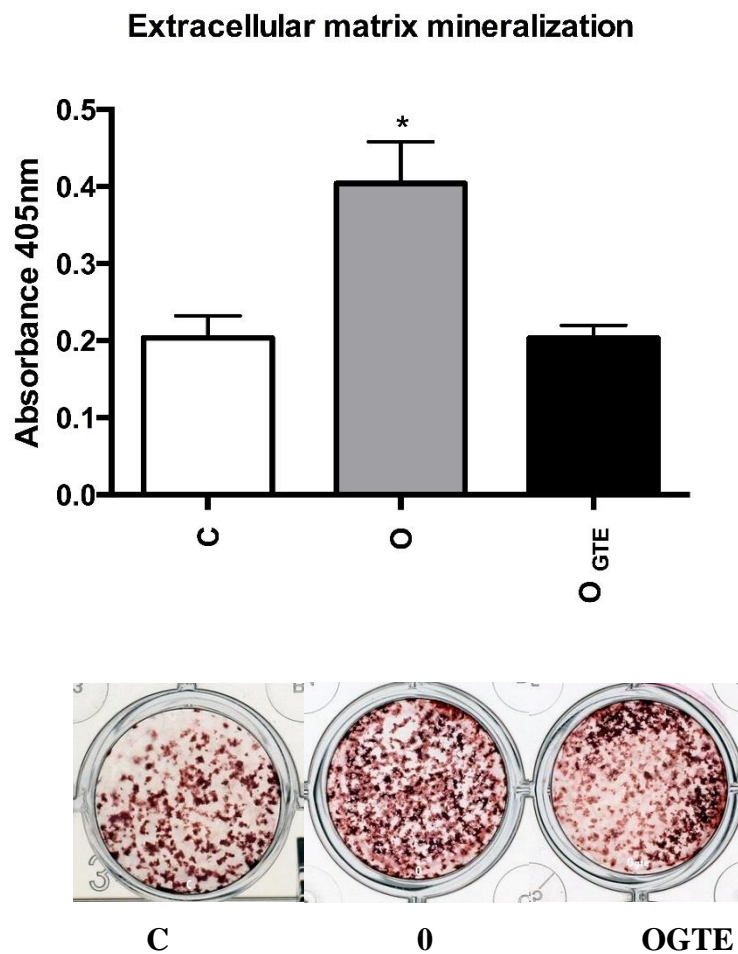


Figura 3. Atividade de fosfatase alcalina (ALP) em células osteoblásticas da medula óssea de ratas controles (C), ovariectomizadas (O) e ovariectomizadas com GTE (OGTE).

5.4. Expressão gênica quantitativa por meio de PCR em tempo real

5.4.1. Expressão gênica de Runx2

O Fator de transcrição Runx2 nos períodos de 3 e 7 dias apresentou maior expressão estatisticamente significativa no grupo OGTE quando comparado aos outros grupos experimentais.

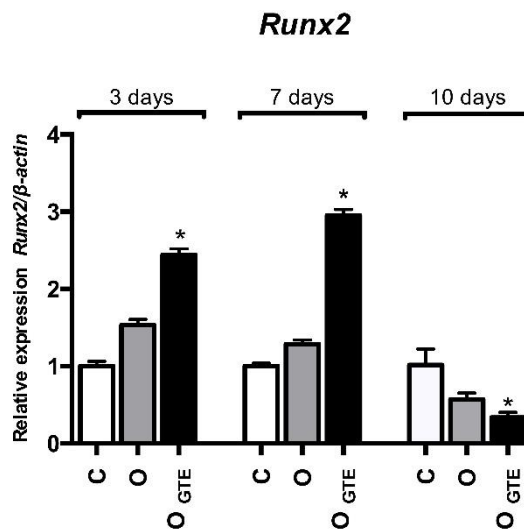


Figura 4. Expressão quantitativa do gene RUNX2 em células osteoblásticas derivadas da medula óssea após 3, 7 e 10 dias de cultura nos grupo C, O e OGTE.

5.4.2. Expressão gênica de Alp

A expressão do gene da proteína Alp mostrou diferenças significantes somente aos 7 dias, onde podemos observar que o grupo OGTE apresentou expressão significativamente maior deste gene quando comparado ao grupo C, e tendência a este aumento quando comparado ao grupo O (Figura 5).

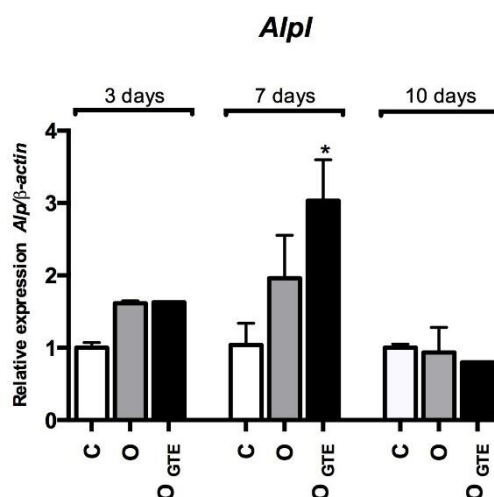


Figura 5. Expressão quantitativa do gene ALP em células osteoblásticas derivadas da medula óssea após 3, 7 e 10 dias de cultura nos grupo C, O e OGTE.

5.4.3. Expressão gênica da razão Rankl/Opg

A osteoprotegerina OPG, também chamada de proteína protetora óssea, é uma proteína sintetizada pelos osteoblastos, que age como receptor competitivo ligando-se ao

Rankl/Opg, assim impede sua ligação ao RANK, impedindo a ativação dos osteoclastos. Ao longo do tempo, tivemos um aumento da razão em todos os grupos. O grupo O mostrou uma diminuição significativa na taxa Rankl/Opg quando comparado com os outros grupos experimentais aos 7 e 10 dias de cultura.

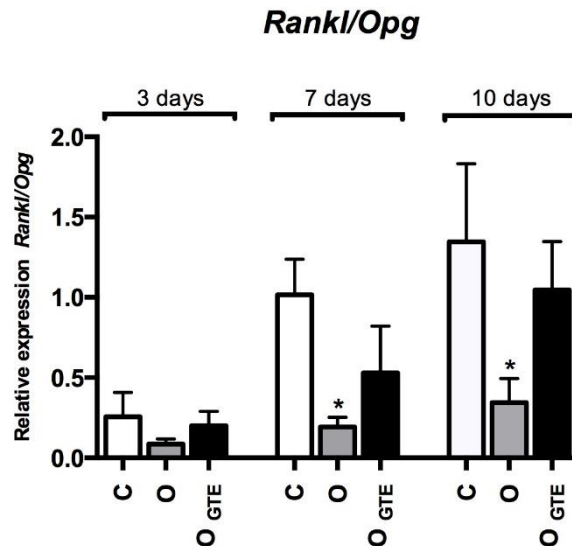


Figura 6. Expressão quantitativa da razão RANKL/OPG em células osteoblásticas derivadas da medula óssea após 3, 7 e 10 dias de cultura nos grupos C, O e OGTE.

6. DISCUSSÃO

O resultado mais significativo desse estudo foi a comprovação de que o extrato de chá verde pode influenciar o metabolismo de células mesenquimais provenientes da medula óssea de ratas ovariectomizadas.

Os resultados de viabilidade celular enfatizam que a administração *in vitro* do extrato de chá verde permitiu a sobrevivência das células osteoblásticas, sem diminuir a proliferação das mesmas ao longo dos períodos avaliados. Alguns estudos sugerem que o GTE melhora a viabilidade celular por meio da redução do acúmulo de ROS intracelular (Widowati et al, 2014).

A atividade de fosfatase alcalina é um importante parâmetro a ser analisado, pois além de ser uma proteína atuante no processo de deposição de minerais como fosfato e cálcio para a formação dos cristais de hidroxiapatita, ela também atua como um marcador osteoblástico. Em nosso estudo foi observado um efeito benéfico do GTE em ensaios mais tardios de 14 dias, sugerindo um efeito positivo na atividade de ALP. Não existem dados na literatura que

possam confirmar estes resultados, pois até o momento, nenhum trabalho foi publicado avaliando o GTE em células osteoblásticas.

A expressão gênica quantitativa foi realizada em três períodos diferentes: 3, 7 e 10 dias. O objetivo do ensaio consiste em verificar se o gene codificador de uma proteína determinada está sendo expresso por meio da utilização de sondas específicas desses genes que se ligam ao sítio alvo codificador da proteína. Os genes escolhidos para detecção foram alguns dos moduladores do mecanismo de remodelação óssea, portanto capazes de influenciar o metabolismo ósseo.

Analisando os resultados gráficos do PCR após serem normalizados segundo o gene de referência beta-actina, podemos observar que a expressão do gene da fosfatase alcalina (Alp) foi maior no grupo OGTE principalmente nos períodos iniciais quando comparado aos grupos O e controle, sugerindo uma influência do extrato na modulação deste gene tão importante para a mineralização óssea.

Foi notado um aumento na expressão do fator de transcrição Runx2 nos períodos iniciais de 3 e 7 dias no grupo OGTE. Este fator é essencial para a diferenciação osteoblástica morfogênese esquelética, agindo como um arcabouço para ácidos nucleicos e fatores de regulação envolvidos na expressão gênica do tecido ósseo (Ducy et al, 1997). A modulação positiva deste gene na presença do GTE sugere que o extrato possa influenciar a formação óssea na osteoporose por meio da diferenciação de células precursoras ósseas.

A osteoprotegerina é produzida por osteoblastos, e o Rankl é essencialmente produzido por osteoblastos e células estromais. A ligação do Rankl com o Rank fornece um sinal que direciona e produção de osteoclastos a partir de células hematopoiéticas progenitoras assim como a ativação de osteoclastos diferenciados (Tao et al, 2016). A relação Rankl/Opg é muito estudada, e em nosso estudo foi observado que ocorreu uma diminuição nesta taxa com o processo de ovariectomia, enquanto que os grupos C e OGTE mostraram valores similares. Estes dados sugerem que o extrato de chá verde favorece uma normalização do sistema RANKL/RANK/OPG na remodelação óssea como acontece no grupo saudável. Assim, os resultados obtidos são promissores no sentido de sugerir a influência positiva do extrato de chá verde no metabolismo de células osteoblásticas em uma situação de osteoporose.

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos sugerem que o extrato de chá verde administrado *in vitro* possui efeito sobre o comportamento das células osteoblásticas derivadas da medula óssea de ratas ovariectomizadas, capaz inclusive de favorecer a modulação gênica quantitativa de genes

atuantes sobre o metabolismo ósseo. Porém, ainda são necessários maiores estudos, com o objetivo de entender e comprovar algumas constatações apresentadas por este trabalho.

A acessibilidade do chá verde pela população é alta e concomitante e este fato, a osteoporose, devido a um processo demográfico e social, que leva ao envelhecimento populacional, se mostra uma das doenças crônicas de maior prevalência no Brasil e no mundo, o que fornece ao estudo de ambos uma base fundamentada no âmbito de saúde pública. Sendo assim, estudos como o apresentado podem favorecer para uma saúde pública de qualidade em nossa sociedade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ducy P, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation 1997 Cell 89 (5): 747–754.
2. Gregory CA, Gunn WG, Peister A, Prockop DJ. An Alizarin red-based assay of mineralization by adherent cells in culture: comparison with cetylpyridinium chloride extraction. Anal Biochemicals 2004 329 (1): 77-84.
3. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Miner 1991 15 (3):171–192.
4. Khosla S, Riggs BL. Pathophysiology of age-related bone loss and osteoporosis. Endocrinol. Metab. Clin. North. Am 2005 .34 (4):1015-1030.
5. Lian JB, Stein GS, Stein JL et al. Osteocalcin gene promoter: unlocking the secrets for regulation of osteoblast growth and differentiation J. Cell. Biochem. Suppl., 30–31 1998: 62–72.
6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.
7. Lowry OH, RoseBrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951 193: 265-75.
8. Maniatopoulos C, Sodek J, Melcher AH. Bone formation *in vitro* by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. Cell Tissue Res 1988; 254: 317-330.

9. Marcondes FK, Bianchi FJ, Tanno AP. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 2002 62 (4): 609-614.
10. Marie PJ, Kassem M. Osteoblasts in osteoporosis: past, emerging, and future anabolic targets. *Eur. J. Endocrinol.* 2011 165 (1): 1-10.
11. Raisz LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts and prospects. *J. Clin. Invest* 2005 115 (12) :3318-3325.
12. Russell RG, Espina B, Hulley P. Bone biology and the pathogenesis of osteoporosis. *Curr. Opin. Rheumatol* 2006 18 (1): 3-10.
13. Shao C, Chen L, Lu C, Shen CL, Gao W. A gel-based proteomic analysis of the effects of green tea polyphenols on ovariectomized rats. *Nutrition.* 2011 Jun;27(6):681-6
14. Shen CL, Chyu MC, Wang JS. Tea and bone health: steps forward in translational nutrition1. *Am J Clin Nutr.* 2013 Dec;98(6 Suppl):1694S-1699S14.
15. Shen CL, Yeh JK, Cao JJ, Wang JS. Green Tea and Bone metabolism. *Nutr Res.* 2009 Jul;29(7):437-56.
16. Song M, Huo H, Cao Z, Han Y, Gao L. Aluminum Trichloride Inhibits the Rat Osteoblasts Mineralization In Vitro. *Biol Trace Elem Res.* 2016 Jun 4. [Epub ahead of print]
17. South-Paul JE. Osteoporosis: Part I- evaluation and assessment. *Am. Fam. Physician* 2001 63 (5): 897-904.
18. Tao X, Qi Y, Xu L, Yin L, Han X, Xu Y, Wang C, Sun H, Peng J. Dioscin reduces ovariectomy-induced bone loss by enhancing osteoblastogenesis and inhibiting osteoclastogenesis. *Pharmacological Research* 2016 108: 90–101.
19. Vali B, Rao LG, El-Sohehy A.: Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells *J Nutr Biochem.* 2007 May;18(5):341-7.

20. Vester H, Holzer N, Neumaier M, Lilianna S, Nüssler AK, Seelinger C. Green tea extract (GTE) improves differentiation in human osteoblasts during oxidative stress. *J Inflamm (Lond)*. 2014 May 18;11:15.

21. Widowati W, Widyanto RM, Husin W, Ratnawati H, Laksmiawati DR, Setiawan B, Nugrahenny D, Bachtiar I. Green tea extract protects endothelial progenitor cells from oxidative insult through reduction of intracellular reactive oxygen species activity. *Iran J Basic Med Sci* 2014; 17:702-709.