



Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Projeto de Pesquisa
Editais Interno- DPDE N^o. 4/2017

Proponente

Dra Regina Affonso

Departamento de Biofármacos

Centro de Biotecnologia

a) identificação da proposta

Efeito de baixas doses de radiação gama em cultura de osteoblastos – uma abordagem proteômica.

Área de atuação

Programa 8 – Biotecnologia

Atividade 820 - Biofármacos

b) qualificação do principal problema a ser abordado

O esqueleto ósseo tem um importante papel na evolução de nossa espécie. O osso foi essencial para a transição da fase marinha para a vida terrestre, pois serviu de alavanca para a ação dos músculos que foram cruciais na respiração e locomoção terrestre. Na locomoção em específico levou ao bipedismo, na liberação das extremidades superiores e ao desenvolvimento de dedos opositores, alargamento do cérebro e consequente evolução da linguagem. Estes papéis evolutivos em essência sumarizam a principal função da mineralização do esqueleto em humanos e outros vertebrados (Rodan e col., 1998).

O osso é o maior suporte especializado que dá forma ao corpo e para isso possui características de rigidez, dureza e uma alta capacidade de regeneração e reparo. Este protege órgãos vitais, promove um ambiente para a medula tanto na formação de sangue quanto na estocagem de gordura, age como um reservatório mineral para a homeostase do cálcio, de fatores de crescimento e citocinas; e também participa em parte do balanço ácido-base do organismo (Kini e Nandeesh, 2012).

Tecido ósseo

Há duas principais classes de ossos no organismo – a cortical, com função mecânica e protetiva; e a trabecular, que dá a dureza e com a importante função metabólica. O balanço entre absorção e deposição de matriz óssea é feita principalmente pelo osso trabecular, o qual é o local de origem das doenças que envolvem o remodelamento ósseo, sendo as mais significativas: osteopenia, osteoporose, osteodistrofia renal, doença de Paget (Feng e MacDonald, 2011).

A sua composição é de aproximadamente 10% de células, 30% matriz orgânica e 60% cristais minerais (hidroxapatita) (Feng e McDonald, 2011); e tendo como constituintes nas porções - celular e matriz orgânica:

- células de suporte denominadas de osteoblastos e osteócitos;
- células de remodelamento denominadas de osteoclastos;
- proteínas de matriz não colágenas e colágenas não minerais denominadas osteóides e ainda,
- depósito de sal inorgânico entre a matriz (Kini e Nandeesh, 2012).

A formação do osso é denominada de osteogênese, que é composta por três etapas básicas que são: síntese de matriz orgânica extracelular (osteóide);

mineralização com o depósito de matriz levando a formação do osso; e remodelamento do osso via processo de reabsorção e formação óssea (Kini e Nandeesh, 2012) Fig. 1.

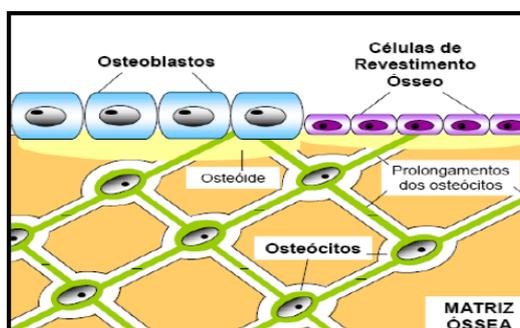


Fig. 1: Esquema representativo da distribuição e localização na matriz óssea das células da linha osteoblástica. Os osteoblastos e as células de revestimento ósseo encontram-se dispostos numa camada contínua, à superfície da matriz óssea (uma zona de matriz orgânica não calcificada, delimitada por osteóide, que separa estas células da matriz calcificada). Os osteócitos que se encontram situados no interior de lacunas existentes na matriz óssea. Estas lacunas formam uma profusa rede de canalículos que se interligam entre si e alojam os prolongamentos dos osteócitos (Judás e col., 2011).

O remodelamento ósseo é realizado por uma estrutura funcional e anatômica conhecida como unidade multicelular básica (BMU) e requer a ação coordenada de quatro tipos principais de células ósseas: células de revestimento ósseo, osteócitos, osteoclastos e osteoblastos, Fig. 2. Em estado quiescente o osso tem sua superfície coberta por uma camada de células de revestimento ósseo, as quais fazem parte da linhagem de células osteoblásticas (Feng e MacDonald, 2011).

A reabsorção do tecido ósseo, requerida para remodelamento, é feita pelos osteoclastos, que são células grandes e se originam de células hematopoiéticas multinucleadas relacionadas com linhagens de monócito/macrófago (Rodan e col., 1998).

Os osteoclastos são células de vida curta, de aproximadamente 2 semanas, e há evidências de sua morte por apoptose. Após a parada da fase de reabsorção óssea, estimada em 2 semanas, há a fase reversa, demarcada pela camada de células de revestimento, Fig. 2. A reabsorção de osso é frequentemente seguida pela formação de osso; e quando o esqueleto/ossatura está em balanço, a quantidade de osso novo corresponde a mesma quantidade do perdido.

Fase 1:
Inicialização/ativação do remodelamento ósseo por sítios específicos

Fase 2:
Reabsorção óssea e recrutamento simultâneo de células-tronco mesangiais (MSCs) e osteoprogenitoras.

Fase 3:
Diferenciação e função dos osteoblastos

Fase 4:
Mineralização dos osteoides e finalização do remodelamento ósseo.

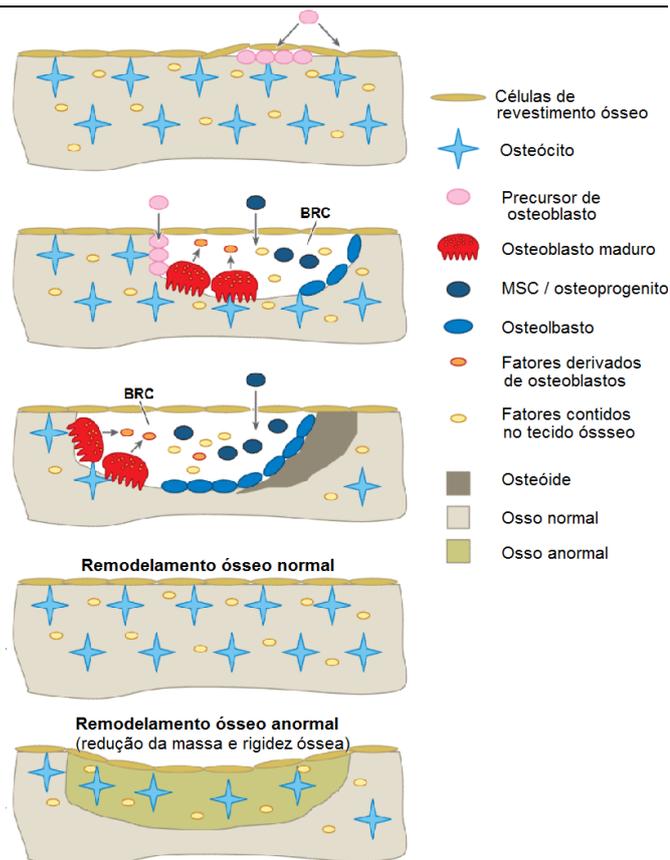


Fig. 2: Modelo esquemática da remodelação óssea. O processo de remodelamento consiste de 4 fases, que estão descritas na figura. MSC – células tronco mesangiais; BRC – compartimento de remodelamento ósseo. (Modificado de Feng and McDonald, 2011)

Os osteócitos são originados a partir de osteoblastos. Alguns osteoblastos ficam presos na matriz óssea e passam por um processo de parada gradual de síntese de matriz recém-formada (osteóide) e tornam-se os osteócidos. Estes são as células mais abundantes do tecido ósseo e se comunicam umas com as outras através de extensões de sua membrana plasmática. Por conseguinte, estas células funcionam como mecanosensores, instruindo os osteoclastos onde e quando reabsorver o osso e os osteoblastos onde e quando formá-lo ((Kini e Nandeesh, 2012).

Os osteoblastos são responsáveis pela síntese e deposição da matriz extracelular e pela regulação dos osteoclastos. São responsáveis ainda pela síntese de: colágeno I, osteocalcin, proteoglicanas, sialoproteínas, gama-carboxiglutâmico (gla),

2HS-glicoproteína e proteínas glicosiladas. A principal proteína glicosilada presente no osso é a proteína fosfatase alcalina.

Processo de reabsorção óssea

Por estímulos para reabsorção de osso, os osteoblastos expressão o receptor RANKL e M-CSF, sendo este último com expressão constitutiva. Esses receptores se ligam aos receptores RANK e cFMs do precursor do osteoclastos e promovem sua diferenciação e ativação. Na borda em contato com a superfície do osso destes osteoclastos ocorre a formação de vilosidades, as quais liberam - via vesículas secretoras, ácido cítrico e ácido lácteo formados a partir das mitocôndrias, Fig. 3. Osteoblasto quando estimulado à deposição óssea produz a proteína OPG que se liga tanto a RANKL quanto a M-CSF, inibindo sua ligação com os receptores do osteoclasto e não possibilitando sua diferenciação e reabsorção óssea (Jain e col., 2007; Takahashi, 2011).

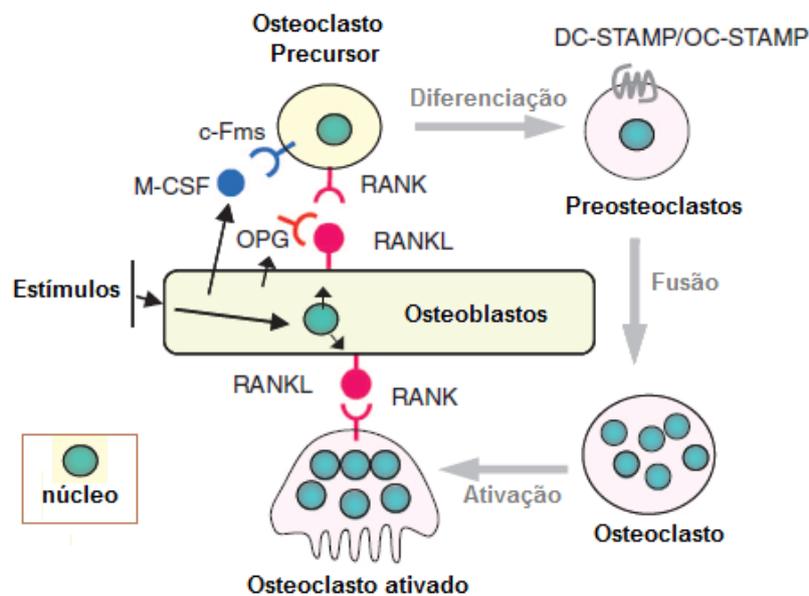


Fig. 3: Esquema da ação de osteoblasto ativado na diferenciação de osteoclastos. Estímulos de reabsorção de tecido ósseo promovem a expressão do receptor RANKL. Na presença deste receptor e do M-CSF, que é expresso constitutivamente pelo osteoblasto, os preosteoclastos passam a expressar os receptores RANK e c-Fms e diferenciam-se em osteoclastos ativos. A deposição óssea se faz quando o osteoblasto expressa a proteína OPG e esta inibe a ligação RANK/RANKL (modificada de Takahashi, 2011). DC-stamp e OC-stamp (*dentric cell-specific transmembrane protein* e *osteoclast-stimulatory transmembrane protein*, respectivamente) estão envolvidas na fusão de preosteoclastos mononucleados, que se fundem por meio destas proteínas de membrana e originam os osteoclastos multinucleados.

Processo de mineralização

A parte do tecido ósseo inorgânica corresponde a 60%, sendo 90% de cristais de hidroxiapatita (HA). Esta é constituída por cálcio (Ca^{2+}) e fosfato inorgânico (Pi). No meio extracelular ocorrem vesículas de matriz (VM) que são liberadas por condrócitos e osteoblastos, nas quais se encontram HÁ, Pi, Ca^{2+} , proteínas de membranas como anexinas e fosfatase alcalina tecido não específica (TNSALP- tissue-nonspecific alkaline phosphatase) entre outros componentes. Estas VM vão se fundindo no espaço extracelular em sítios de nucleação e formando cada vez mais HA, até o momento de se romperem e liberarem a HA, nesta etapa ocorre à calcificação. No espaço extracelular há também outro tipo de fosfato – o pirofosfato (PPi), que inibe a calcificação. Este PPi é excretado por condrócitos e osteoblastos, no espaço extracelular a formação de HA. Quando sua concentração está alta este é reduzido a Pi pela TNSALP e enviado para dentro das VM através de um receptor de membrana (piT1/2). O Ca^{2+} é enviado para as VMs por anexinas presentes na membrana das VMs, Fig. 4. É o balanço entre as concentrações de Pi/PPi que determinam em última análise - se ocorrerá a mineralização (Golub e col, 2007; Zhou e col, 2012).

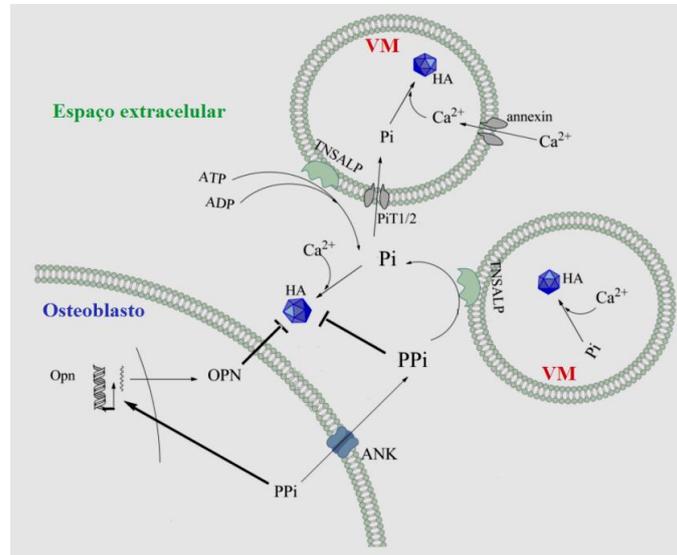


Fig. 4: Representação esquemática do processo de mineralização. A ligação entre o fosfato inorgânico (Pi) e o cálcio presentes no espaço extracelular formam a hidroxiapatita (HA) que constituirá a calcificação, tanto dentro das vesículas de matriz (VM) quanto no espaço extracelular. O pirofosfato (PPi) liberado dos osteoblastos inibe a formação de HA tanto no espaço extracelular quanto por meio da ativação da expressão da proteína osteopoitina (OPN) pelos osteoblastos, que irá inibir a formação da HA. Proteínas de membrana que participam deste processo de calcificação são a TNSALP que reduz o ATP e ADP (adenosina trifosfato e adenosina difosfato, respectivamente) em fosfato

inorgânico a anexina que transporta íons cálcio para o interior das vesículas, o receptor PiT1/2 que transporta Pi para o interior das vesículas e a proteína anquilose (ANK) que transporta o PPi para o espaço extracelular (modificada de Zhou e col., 2012).

No complexo processo de formação e reabsorção óssea os osteoblastos têm um importante papel, tanto na calcificação quanto na reabsorção, pois é ele que dá origem aos osteócitos que, na malha interna do tecido ósseo, determina esse processos ativando osteoclastos ou osteoblastos.

Cultura de osteoblastos *in vitro* - células MC3T3-E1

Um modelo muito adequado e que tem sido extensamente utilizado para estudos do complexo processo de diferenciação de osteoblastos e subsequente mineralização é a cultura de células de calvária (região óssea da calota craniana) derivada de murine, MC3T3-E1 (Sudo e col., 1983). Com este modelo foi estimado os estágios do desenvolvimento da cultura até a formação de nódulos de mineralização (Choi, 1996). Estes estágios possuem um padrão de expressão proteica temporal e são definidos como:

- | | |
|---|--------------|
| ① Proliferação: | 4 – 10 dias |
| ② Formação e maturação da matriz óssea: | 10 – 16 dias |
| ③ Mineralização: | 16 – 30 dias |

Para que a mineralização ocorra efetivamente ao longo deste período de 30 dias há a necessidade de adicionar ao meio de cultura o ácido ascórbico e β -glicerofosfato. O ácido ascórbico promove a formação da matriz de colágeno e um incremento na atividade da enzima ligada à membrana ALP. O aumento na atividade da ALP em um ambiente extracelular na presença de β -glicerofosfato resulta na formação de fosfato inorgânico (Conrads e col., 2004). A avaliação da atividade sérica da ALP óssea é um marcador ósseo que fornece informações úteis do remodelamento ósseo na osteoporose, na doença de Paget e no acompanhamento de terapias preventivas e de reposição hormonal ou de outras terapias antiabsortivas.

Ação da RPL10 na formação de nódulos de mineralização

Um aumento na atividade da ALP e consequente aumento nos nódulos de mineralização foram observados em células MC3T3-E1 transfectadas com vetor contendo cDNA para a proteína RPL10 (*Ribosomal Protein L10* - Proteína Ribossomal L10), nas quais a alta expressão da RPL10 também alterou a expressão dos marcadores descritos na Tabela 1 (Zhao e col.,2005).

Tabela 1: Descrição das proteínas marcadoras de mineralização óssea em cultura de células MC3T3-E1 em condições de superexpressão da proteína RPL10.

Concentração dos marcadores de mineralização	
Alta	Baixa
osteocalcin (OCN)	Osteopontin (OPN)
Type 1 colágeno (COLT)	sialoproteína
Oxterix (Osx)	proteínas reguladoras negativas da
BMP-2	proliferação e diferenciação de MC3T3-E1

Neste estudo, a análise de características da cultura de osteoblasto mostrou que a superexpressão de RPL10 levou a um aumento marcante na diferenciação de osteoblastos e mineralização em MC3T3-E1.

Green e col. (2000) observaram em cultura MC3T3-E1 que a concentração de RPL10 diminui em culturas mineralizadas quando comparada com a cultura não mineralizada e propuseram que a RPL10 pode ter um papel importante na diferenciação de células antes de sua mineralização ou na regulação do processo de mineralização. A confirmação de que uma alta expressão de RPL10 provoca alta atividade da ALP (Zhao e col, 2005), leva-nos a observar que a RPL10 possa estar agindo nas etapas iniciais do processo de mineralização, no qual a ALP está em franca atividade.

Irradiação em cultura de osteoblastos

O conhecimento de como a irradiação age sobre a formação e absorção do tecido ósseo ainda é bastante pequeno, isto devido em parte as variáveis intrínsecas desta técnica como: tipo de raio utilizado (X gama, alpha, beta, nêutrons), dose aplicada, atenuadores, localização do tecido alvo entre outros. O que se tem na literatura é o resultado da aplicação de doses altas, em terapias contra o câncer, as quais provocam

microfraturas que geram fraturas ósseas graves, principalmente se os pacientes estiverem na menopausa (Baxter e col, 2005)

Pesquisas com baixas doses de irradiação têm sido dirigidas objetivando não só entender como esta terapia pode agir nas células como também como um adjuvante em terapias contra o câncer. Em uma revisão da literatura de 2010, Blankenbecler cita um experimento em camundongos com Raios X, no qual um grupo de camundongo era irradiado com 8 Gy e tinham uma 30% de sobreviventes, enquanto que o grupo que também passava pela mesma dose, mas havia sido previamente irradiado com dose de 5 Gy, a sobrevivência aumentava para 70% (Blankenbecler, 2010). Em cultura de pele humana, administraram baixas doses de radiação gama – 0.1 - 50 cGy (0.001 Gy – 0.5 Gy), algumas horas antes da dose de 4 Gy e observaram por meio da quantidade de micronúcleos que as células pré-tratadas possuíam poucos micronucleos quando comparadas com as não tratadas previamente Broome e col. (2002). Em cultura de células embrionárias de camundongos quando pré-tratadas com doses de 0.1 – 10 cGy (0.001 Gy – 0.1 Gy) de radiação gama, reduzia o padrão de neoplasia provocada por uma alta dose de radiação, 4 Gy (Blankenbecler, 2010). (LDI = *Low dose irradiation* – irradiação em baixa dose)

Esta ação protetiva de baixas doses de radiação pode ativar a maquinaria de reparo do DNA, possibilitando assim que a célula quando exposta a doses altas já esteja com o sistema de reparo ativo e possa agir mais rapidamente (Blankenbecler, 2010).

Estudos em cultura de células MC3T3-E1 com a aplicação de Raios X em baixas doses nos quais foram avaliados a ação de doses de 0.1, 0.5, 1.0 e 2.0 Gy (Xu e col., 2012). Neste foram observados um aumento da atividade da enzima ALP e aumento de nódulos de mineralização nas doses de 0.5 e 1.0 Gy, enquanto que a dose de 2.0 Gy provocou uma diminuição nestes parâmetros.

Tomuleasa e col, (2009), avaliaram a ação de Raios Gama em baixas doses em cultura de osteoblastos e células mesangiais humanos com doses de 0.5, 1.0, 2.0 e 4.0 Gy. Eles observaram que na cultura de osteoblastos o efeito das doses de 0.5 e 1.0 Gy eram mais pronunciadas que nas células mesangiais quanto à viabilidade e proliferação, enquanto 2.0 Gy provocava a parada do crescimento celular em ambas as linhagens.

Análise de proteínas totais - Proteômica

A técnica de proteômica é atualmente uma ferramenta bastante utilizada principalmente na comparação entre estados diferentes de tecidos por aplicação de algum ativador ou inibidor da expressão de proteínas. Em culturas de osteoblastos, Alves e col. (2010) analisaram o conteúdo proteico de culturas de células humanas SV-HFO em três estágios de diferenciação, nos quais encontraram algumas proteínas específicas do estágio de diferenciação celular diferencialmente expressas.

Análises proteômicas de culturas irradiadas, seja com raios x ou gama, ainda não foram feitas. No presente trabalho pretendemos analisar o conteúdo proteico dos estágios de maior relevância na proliferação, diferenciação e mineralização de osteoblastos, no qual escolhemos 7, 14 e 21 dias para cada estágio e um ponto no estágio mineralização tardio- 28 dias. Com triplicadas de culturas irradiadas, não irradiadas com e sem ativadores de mineralização (ácido ascórbico e β -glicerofosfato), estas serão analisadas separadamente em cada uma das triplicadas e separadamente em cada um dos três compartimentos celulares.

Com esta estratégia de obtenção de dados das culturas nas diferentes etapas do processo de mineralização acreditamos que teremos uma visão clara e detalhada do complexo processo aqui estudado.

c) objetivos a serem alcançados

- Identificar a baixa dose de radiação gama que possibilita a formação de maior número de nódulos de mineralização em cultura de células da linhagem MC3T3-E1;
- Analisar a composição proteica dos três compartimentos celulares da cultura irradiada frente as não irradiadas, na baixa dose de irradiação gama mais adequada;
- Verificar se nas culturas em processo de mineralização com e sem irradiação, a RPL10 tem sua expressão aumentada.

d) metodologia a ser empregada

1. Cultura celular MC3T3-E1

As células de MC3T3-E1 foram adquiridas do banco de Células do Rio de Janeiro (Subclone 14 BCRJ code: 0285). A cultura das MC3T3-E1 será feita em meio de cultura α -MEM (sem ácido ascórbico e beta glutaraldeído) com 10% FBS, 100 μ g/mL estreptomicina e 100U/mL penicilina, mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

2. Irradiação das culturas de osteoblastos

Cultura de células MC3T3-E1 serão irradiadas com raios-X, nas doses: 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 Gy (atenuador de 90%, Gamma cell 220, AtomicEnergy of Canada Limited)

3. Ensaio de eficiência de plaqueamento

Protocolo: Colocar 100 células por placa de 60 mm ou 400 células por placa de 100 mm, fazendo triplicata, em meio de cultura α -MEM (sem ácido ascórbico e beta glutaraldeído) com 10% FBS, 100 μ g/mL estreptomicina e 100U/mL penicilina, mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após 2 semanas, com troca do meio a cada 3 dias, as células serão coradas com cristal de violeta, lavadas com água e secadas ao ar. A contagem de colônias é feita em microscópio ou lupa.

Protocolo de coloração com cristal de violeta:

Remover o meio de cultura das placas, lavar com PBS, descartar, adicionar PBS+Metanol 50% e deixar 2 min, descartar, adicionar novamente a solução de PBS e metanol e deixar por 10 min em temperatura ambiente, descartar e deixar as placas secarem. Adicionar solução de cristal de violeta 0,5% (w/v em 20% metanol) e incubar por 10 min em temperatura ambiente. Lavar as placas com água destilada e deixar secar (Freshney, 2010). Contar as colônias e aplicar na fórmula:

$$\text{eficiência de plaqueamento} = \frac{\text{número de colônias}}{\text{número de células semeadas}} \times 100$$

4. Ensaio de mineralização

Os ensaios de mineralização serão feitos em culturas semeadas em placas de 60 mm com 1 x 10⁵ cels/placa, em triplicata para cada ponto estudado, em meio de

cultura α -MEM (sem ácido ascórbico e beta glutaraldeído) com 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ estreptomicina e 100U/mL penicilina, mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 .em meio de cultura sem ácido ascórbico e beta glutaraldeído. Após dois dias 2 dias o meio será trocado pelo mesmo meio contendo 50 mg/mL de ácido ascórbico e 10 mM beta-glicerofosfato, reagentes que promoveram a diferenciação e a mineralização. As placas serão mantidas por 7, 14, 21 e 28 dias com troca de meio a cada 3 dias. Será feita uma triplicata sem a adição do ácido ascórbico e o beta-glicerofosfato como controle negativo de mineralização.

Para o ensaio com cultura irradiada será feito o mesmo processo de semear em placas de 60 mm e no dia seguinte estas serão irradiadas nas doses de 0, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, e 2.0 Gy. Após um dia, no meio de cultura será adicionado 50 mg/mL de ácido ascórbico e 10 mM beta-glicerofosfato em todas as placas. Como controle negativo, serão feitas placas sem irradiação e crescidas em meio sem ácido ascórbico e beta glutaraldeído. Todos estes experimentos serão feitos em triplicata e serão mantidos pelo período de 28 dias.

Protocolo de coloração com Alizarin red S:

Remover o meio de cultura das placas, lavar a cultura 2 x com PBS e fixar com etanol 70% a 4° C por 1 h. Retirar o álcool e adicionar a solução de Alizarin red S (solução 1% em água destilada e ajustar o pH para 4.2-4,5 com acetato de amônia, filtrar) e incubar por 10 min em temperatura ambiente. Após a incubação, lavar com água para remover a coloração não específica e deixar secar. Contar os nódulos de mineralização, corados de vermelho, em lupa.

5. Análise Proteômica

Após definir a dose de radiação mais adequada à produção de nódulos de mineralização, esta será utilizada como padrão para todos os experimentos de proteômica. As culturas induzidas, induzidas e irradiadas e controle negativo terão seu conjunto proteico avaliado nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias. Para isso será utilizado o kit de extração de proteínas de espaços subcelulares PE extração de proteoma subc 1PC, US1539790, Merck.

As proteínas isoladas de cada compartimento e de cada amostra (24 placas irradiadas, 24 controle positivo e 24 controle negativo; cada uma analisada nos 3 compartimentos celulares - totalizando 216 amostras). Estas amostras serão clivadas

com a enzima Tripsina, Promega: Sequence Grade Modified cod: V5111 (seguindo o protocolo descrito em Carvalho e col, 2014).

As amostras serão analisadas no analisador *OrbiTrap* no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron – LNLS, Polo II de Alta Tecnologia de Campinas, SP; e os resultados serão analisados pelo programa Scaffold.

6. RT-PCR e PCR

Após definir qual a dose de irradiação propicia maior número de nódulos de mineralização, com está será feita avaliação dos mRNAs para as proteínas descritas na Tabela 1. Serão utilizadas amostras em triplicata de tempo de mineralização de 7, 14, 21 e 28 dias.

O protocolo usado para a extração do RNA total utilizará o reagente TRIzol (Thermofisher, USA), incluindo o controle positivo e negativo sem os reagentes que promovem a diferenciação. Estes RNAs serão quantificados em nanodrop e 1,0 µg de cada amostra será utilizado para a RT-PCR (reação em cadeia da polimerase - transcriptase reversa- PCR-TR) (Carvalho e col., 2014). O kit para a transcrição reversa será da Promega –GoScript Reversion Transcription Mixes. Para a reação de PCR será utilizado 0,1 µg de cada amostra, com a enzima Kapa Hifi (Ludwig Biotec) e os primers e condições de reação descritos na Tabela 2. As análises serão feitas em gel de agarose 1,5% em TAE e as análises quantitativas por luminescência das bandas serão feitas em um Gel Image Systems (Life Science).

Tabela 2: Descrição dos primers utilizados nas análises de PCR (modificado de Zhao e col., 2005).

Gene	Primers	Condições da PCR	pb	Ref.
RPL10	S : 5'-GGTACCCCGCCACCATTTGTCATCAT GGGCCGCCG 3' AS: 5'-GGGCCCGGAATGCAGGGCTCTCCA CTTGTCAGAG-3'	30 ciclos 94°C 10 s 58°C 30 s 72°C 2 min	642	
Colageno classe I	S : 5'-CCTGGTAAAGATGGTGCC-3' AS: 5'-CACCAGG TTCAC CTTTCGCACC-3'	25 ciclos 94°C 30 s 58°C 30 s 72°C 1 min	222	21
Osteocalcina	S : 5'-CCTCAGTCCCCAGCCCAGATCC-3' AS: 5'-CAGGGCAGAGAGAGAGGACAGG-3'	25 ciclos 94°C 30 s 58°C 30 s 72°C 1 min	219	21
Osterix	S : 5'-GTCAAGAGTCTTAGCCAAACTC-3' AS: 5'-AAATGATGTGAGGCCAGATGG-3'	25 ciclos 94°C 30 s 58°C 30 s 72°C 1 min	123	21
ALP	S : 5'-GCCCTCTCCAAGACATATA-3' AS: 5'-CCATGATCACGTCGATATCC-3'	30 ciclos 95°C 1 min 55°C 2min 72°C 1 min	372	22
BMP-2	S : 5'-AGTTCTGTCCCCAGTGACGAGTTT-3' AS: 5'-GTACAACATGGAGATTGCGCTGAG-3'	36 ciclos 95°C 1 min 63°C 30 s 72°C 1 min	708	23
Runx2/Cbfa1	S : 5'-CCGCACGACAACCGCACCAT-3' AS: 5'-CGCTCCGGCCACAAATCTC-3'	30 ciclos 94°C 30 s 60°C 30 s 72°C 30 s	289	24
Osteopontina	S : 5'-TCACCATTTCGGATGAGTCTG-3' AS: 5'-ACTTGTGGCTCTGATGTTC-3'	30 ciclos 95°C 1 min 55°C 2 min 72°C 1 min	437	25
Beta-actina	S : 5'-TGGACTTCGAGCAAGAGATGG-3' AS: 5'-ATCTCCTTCTGCATCCTGTGC -3'	23 ciclos 94°C 1 min 62°C 45 s 72°C 45 s	289	18

As análises dos produtos do RT-PCR serão feitas em eletroforese de DNA em gel de agarose. O protocolo é descrito a seguir:

Os produtos amplificados serão submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, em tampão de corrida TAE (40 mM Tris-acetato, 2 mM EDTA pH 8,0) contendo um corante para visualização do DNA após a migração – EzVision-Biosystem. A eletroforese será realizada a 100 V e a 60 mA durante 30 min. Para a determinação dos produtos amplificados será utilizado os marcadores de peso molecular

de Lambda EcoRI/HindII (Ludwig Biotec). Nos DNAs serão adicionado corante que possibilita a visualização da migração do DNA. Os resultados serão visualizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta.

7. Western blotting

Serão feitas análises das proteínas Osteopontina, Osterix, Osteocalcina, RPL10 e β -actina nas amostras irradiada (dose que produziu maior quantidade de nódulos) e a não irradiada. Serão avaliados os períodos de mineralização de 7 dias para a Osteopontina e RPL10; 14 dias para a Osterix e RPL10; e 21 e 28 dias para a Osteocalcina; tendo todos o controle da β -actina.

As proteínas totais serão extraídas das culturas utilizando o protocolo: as culturas serão centrifugadas, lavadas 2 vezes com PBS e então lisadas com o tampão de lise descrito abaixo. Após centrifugação de 10.000g por 10 min a 4°C os sobrenadantes terão as proteínas quantificadas pelo kit que utiliza o Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Serão utilizados 10 a 50 μ g de proteína por canaleta em um gel de SDS-PAGE 12,5% (Lammelli, 1970) e a transferência será feita como descrito por Burnette, 1980. Os anticorpos (feitos em coelho/rabbit) utilizados serão: para Anti-Osteopontin antibody (ab8448) (Abcam), Anti-Sp7 / Osterix antibody - ChIP Grade (ab22552) (Abcam), Anti-Osteocalcin antibody (ab93876) (Abcam), RPL10 – antiQM (Santa Cruz) e anti β -actina (Sigma); todos na diluição de 1:500 e o secundário anti-rabbit HRP na diluição de 1:2000. A detecção se fará com *WesternBreeze* Chromogenic Kits anti-rabbit (Life, Thermo Science).

8. Quantificação e atividade da enzima ALP

Os ensaios de quantificação e atividade de ALP serão feitos com cultura de MC3T3-E1 semeadas a $2,5 \times 10^5$ cel/cm² em placa de 24 poços. Após 90% de confluência (após 3 dias do plaqueamento), o meio de cultura será suplementado com 50 μ g/mL ácido ascórbico e 10 mM β -glicerofosfato para a diferenciação e mineralização. A cultura será mantida a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂.

Após os períodos de 7, 14, 21 e 28 dias as culturas serão lavadas 3 vezes com PBS e terão a concentração proteica determinada com o *Pierce* BCA Protein Assay

Kit (Thermo Scientific), no qual a leitura é em 550 nm. A atividade será feita com as culturas lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com tampão NaHCO₃-NaCO₃ 0,1 M pH 10,0 contendo Triton X-100 0,1%, MgSO₄ 2 mM e Fosfato inorgânico p-nitrophenol 6 mM (PNPP- Sigma) por 30 min a 37°C. A reação será parada com NaOH 1M, e a absorbância será medida em 405 nm.

A atividade de ALP será calculada de acordo com Zhao e col.(2005) com a fórmula:

$$\textit{atividade de ALP} = \frac{\textit{absorbância 405 nm}}{\textit{Absorbância 550 nm}}$$

9. Estatística

Os dados serão expressos como média ± DP (DP= desvio padrão) de pelo menos três experimentos independentes. A significância estatística será calculada pelo teste *t* de Student, no qual os valores de $p < 0,05$ serão considerados estatisticamente significativos, por convenção; e pela análise de variancia com um nível de confiança de 95% utilizando o programa Graph Pad Prism 5 (ANOVA).

Resultados Preliminares

As células MC3T3 já foram colocadas em cultura (Fig. 4).

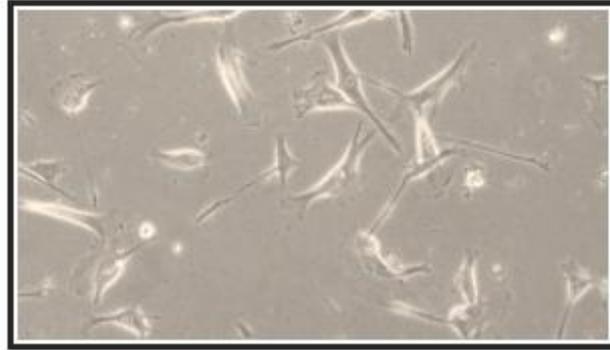


Fig. 4: Foto de cultura de células MC3T3-E1

As culturas foram avaliadas quanto à eficiência de plaqueamento. Em um primeiro experimento a eficiência foi de 30% enquanto que a cultura irradiada foi de 40% em relação as não irradiadas, Fig. 5. Houve uma queda significativa na eficiência da cultura irradiada logo com 0.5 Gy e se manteve até 2.0 Gy. O ponto de 0.25 Gy será feito nos próximos experimentos, pois foi a partir destes resultados que foi adicionado este ponto intermediário entre o 0 e 0.5 Gy.

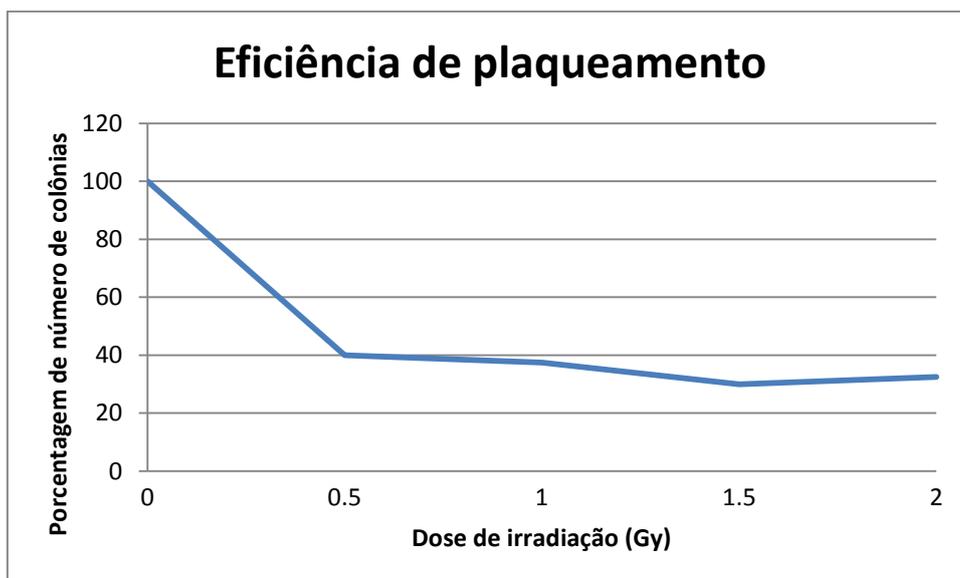


Fig. 5: Gráfico com as porcentagens de eficiência de plaqueamento de cultura de células MC3T3-E1 sem irradiação, ponto 0, e com irradiação nas doses de 0.5, 1.0, 1.5 e 2.0 Gy.

A avaliação na formação de nódulos de mineralização pela adição de ácido ascórbico e β -glicerofosfato foi feita em culturas de 7, 14 e 21 dias, Fig. 6. Pode-se observar a grande diferença entre a amostra de 21 dias com e sem ativadores da mineralização. Nos próximos experimentos será acrescentado o período de 28 dias.

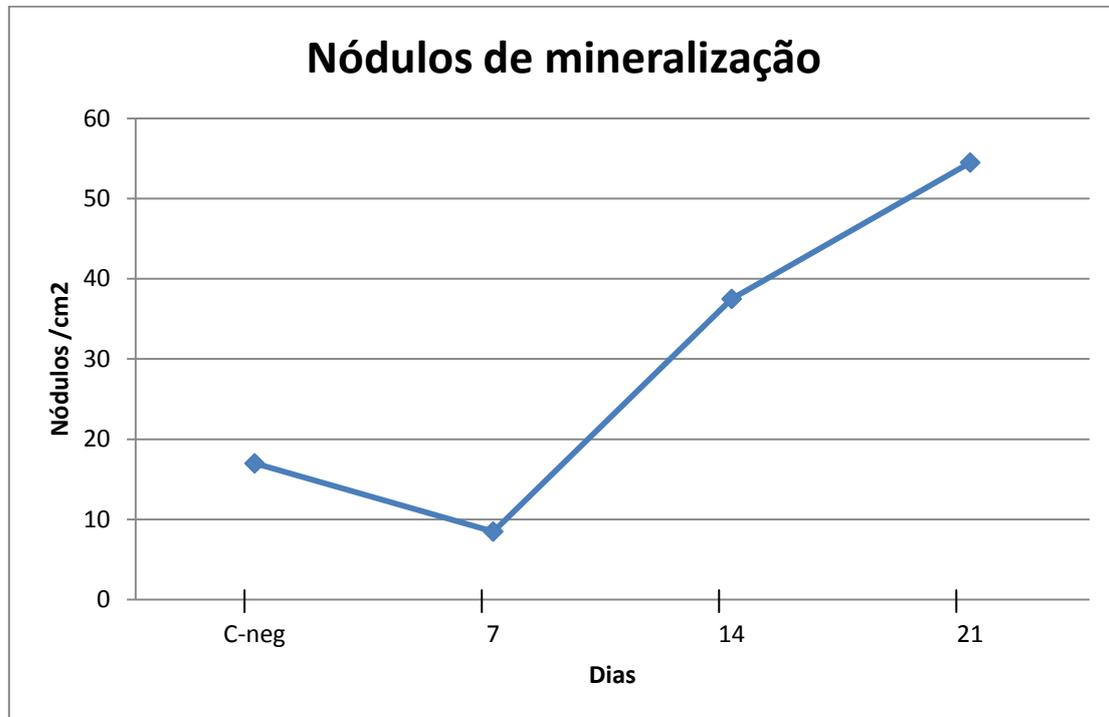


Fig. 6: Gráfico com a quantidade nódulos de mineralização/cm² nos tempos de 7, 14 e 21 dias de cultura mantida com ácido ascórbico e β -glicerofosfato. O controle negativo (C-neg) foi mantido por 21 dias sem os reagentes que provem a mineralização.

e) principais contribuições científicas ou tecnológicas da proposta

Diante do exposto, da importância do entendimento de como pode ser ativado o processo de mineralização, de fatores que podem agir de forma a estimular a diferenciação dos osteoblastos como a proteína RPL10 e baixas doses de irradiação – a pergunta: como a irradiação em baixas doses pode ativar os osteoblastos a se diferenciarem, quais proteínas do complexo sistema de proliferação / diferenciação / mineralização que ocorre nos osteoblastos estão contribuindo para acentuar este processo?

Analisando as proteínas dos principais compartimentos celulares das culturas de osteoblastos diferenciadas e não diferenciadas (o que não foi ainda descrito na literatura), as proteínas diferencialmente expressas fornecerão uma gama de informações sobre o processo de mineralização ainda não abordado.

Contamos ainda com a comparação com as culturas irradiadas, com a qual poderemos definir estratégias que poderão utilizar também a radiação em baixas doses como ferramenta nos casos de perda óssea seja por acidente/medicamentos, idade avançada ou doenças ósseas degenerativas.

f) orçamento detalhado

Reagentes:

Marcadores de peso molecular para DNA e proteínas -Sinapse
sistema de purificação de DNA –Life technologies
sais e reagentes para tampões de géis SDS-PAGE e agarose -Ludwig
ortoftaldialdeído –Sigma
reagente para transferência (Western blotting) – Thermo
Sais para tampões Fosfato de sódio, tris, TBE, PBS, TAE, EDTA, SDS – Sinapse
Meio de cultura alpha MEM ref 11900-016 - Life technologies
Antibiotic-Antimycotic (100x), no. 15240062 - Thermo
Soro fetal bovino - Cultilab
Solução de Tripsina e EDTA, T3924 – Sigma
Tampão RIPA, R0278 - Sigma
Alizarin red S, A5533- Sigma
Diethanolamine D8885 Sigma
SYBR safe corante de gel 10 000X, S33102- Life technologies
O-phthalapdehyde, P0657- Sigma
TRIzol RNA isolation reagents - Thermo

R\$ 20.300,00

Sistemas de detecção ou purificação- Kits

kit de purificação de DNA –Life Technologies
TRIzol™Plus RNA Purification Kit and Phasemaker™ Tubes Complete System, A33254, Thermo
GoScript Reversion Transcription, A5000- Promega (2x)
Kapa HiFi PCR kit- KapaBiosystems (2X)
kit para extração de proteínas - PE extração de proteoma subc 1PC, US1539790, Merck.
Pierce BCA Protein Assay Kit, no. 23225 - Thermo Scientific
KT - Cell Growth Determination Kit, MTT,cod CGD1 –Sigma
Fast BCIP/NBY, B5655 – Sigma
Western Breeze kit anti-camundongo, WB7103- Life technologies

R\$ 28.800,00

Anticorpos

Anti-Osteopontin antibody (ab8448) (Abcam)
Anti-Sp7 / Osterix antibody - ChIP Grade (ab22552) (Abcam)

Anti-Osteocalcin antibody (ab93876) (Abcam)

RPL10 – antiQM (Santa Cruz) e anti β -actina (Sigma)

.R\$ 12.500,00

Primers

18 primers sintetizados pela Exxtend soluções em oligos

.R\$ 2.000,00

Plásticos e vidraria:

Plascas de petri 60 mm 100 mm

placa de 24, 12 e 6 poços para cultura celular

tubo criogênico de 2,0 mL

microtubos de 0,6 mL, 1,5 mL e 0,2 mL

racks para 50 e 100 tubos

garrafas para cultura de 500 mL

filtros de 0,22 micra para seringa

sistema de filtração para meio de cultura celular, 0,22 micra, para 500 mL

ponteiras para 10 uL, 100 uL, 200 uL e 1 mL

rack para ponteiras

pipetas volumétricas para 2 mL, 5 mL, 10 mL e 25 mL

R\$ 9.400,00

Material permanente

Agitador orbital – Kline

R\$ 3.500,00

Mini capela vertical - Quimis Q216F20M

R\$ 10.000,00

Mini Centrífuga Eppendorf minispin plus 05.401.08

R\$ 9.500,00

Computador HPAll in One 23-R101BR mais impressora HP R\$

R\$ 5.300,00

Sistema para gel horizontal- Mini Sub cell GT system- Biorad

R\$2.000,00

Fonte- Power Pac Basic power supply, 100-120 and 220-240V- Biorad

R\$2.000,00

Inscrições em Congressos

SBBq 2019

R\$ 900,00

SBBN 2018

R\$ 2.500,00

Experimental Biology 2018

R\$ 2.500,00

Valor Total R\$ 111.200,00

g) cronograma físico

Trimestres	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
Ensaio de eficiência de plaqueamento E Ensaio de mineralização	+	+			+			
Cultura irradiada Ensaio de eficiência de plaqueamento E Ensaio de mineralização	+	+			+			
Ensaio mineralização nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias de culturas irradiadas e seus controles + e -			+	+				
Análise Proteômica					+	+		
RT-PCR e PCR					+	+		
Western blotting						+		
Quantificação e atividade da enzima ALP					+	+		
Análises Estatísticas		+		+	+	+	+	
Mestrado								+
Iniciação Científica		+		+		+		+
Congressos			+		+		+	
Relatórios				+				+
Redação de manuscritos para publicação			+	+		+	+	+
Prestação de contas				+				+

h) identificação dos demais participantes do projeto

Pesquisador Coordenador:

Profa. Dra. Regina Affonso

Instituição sede:

Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Equipe de pesquisa:

Dra. Regina Affonso
Barbara Teagnan- Iniciação Científica

Laboratórios envolvidos na execução do trabalho:

Centro de Tecnologia das Radiações- CTR, IPEN
Laboratório Nacional de Luz Síncrotron- LNLS

i) disponibilidade efetiva de infraestrutura e de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto, estimativa dos recursos financeiros de outras fontes, se pertinente e anuência do responsável pela unidade do IPEN

Eu, como pesquisadora responsável, conto com um laboratório dentro do Centro de Biotecnologia denominado “Laboratório de avaliação funcional de proteínas de eucariotos”, o qual está equipado com:

- 1) Centrífuga Sorvall refrigerada de bancada;
- 2) Sistema para eletroforese vertical, Biorad;
- 3) Sistema para transferência –Western blotting- Thermo
- 4) Transiluminador;
- 5) Agitador de tubos orbital com controle de temperatura, Tecnal;
- 6) Agitador refrigerado, Tecnal
- 7) 2 freezers,
- 8) 1 geladeira duplex,
- 9) Máquina para PCR Perkinelms;
- 10) pHmetro,
- 11) autoclave;
- 12) balança;
- 13) vidrarias.

No Centro ainda dispomos de:

- 14) um sistema Acta purific- GE;
- 15) freezer -80°C;
- 16) máquina de gelo;
- 17) sala de cultura celular equipada com 2 fluxos, 2 botijões de nitrogênio para armazenamento de amostras, centrífuga, banho-maria, 2 estufas de CO₂ e um microscópio com foto documentador.

j) lista de referências bibliográficas

- Alves RD, Eijken M, Swagemakers S, Chiba H, Titulaer MK, Burgers PC, Luider TM, van Leeuwen JP. Proteomic analysis of human osteoblastic cells: relevant proteins and functional categories for differentiation. *J Proteome Res.* 2010, 9(9):4688-700.
- Baxter NN, Habermann EB, Tepper JE, Durham SB, Virnig BA. Risk of Pelvic Fractures in Older Women Following Pelvic Irradiation. *JAMA.* 2005, 294(20):2587- 2593.
- Blankenbecler R. Low-dose pretreatment for radiation therapy. *Dose Response.* 2010, 8(4):534-42.
- Broome EJ, Brown D L and Mitchel REJ. Dose Responses for Adaption to Low Doses of ^{60}Co - and ^3H - Radiation in Normal Human Fibroblasts, *Rad Res,* 2002158:181-186
- Burnette WN. "Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrilamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinate protein A. *Anal biochem.* 1981, 112:195-203.
- Carvalho CV, Ricci G, Affonso R., 2014. Guia de práticas em Biologia Molecular 2ª ed. São Paulo: Yendis.
- Chazotte B. 2010, Labeling Nuclear DNA Using DAPI A Laboratory Manual. CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, USA: ed. Yuste.
- Choi JY, Lee BH, Song KB, Park RW, Kim IS, Sohn KY, Jo JS, Ryoo HM. Expression Patterns of Bone-Related Proteins During Osteoblastic Differentiation in MC3T3-E1. *Cells J Cell Biochem.* 1996, 61(4):609-18.
- Conrads KA, Yu LR, Lucas DA, Zhou M, Chan KC, Simpson KA, Schaefer CF, Issaq HJ, Veenstra TD, Beck GR Jr, Conrads TP. Quantitative proteomic analysis of inorganic phosphate-induced murine MC3T3-E1 osteoblast cells. *Electrophoresis.* 2004; 25(9):1342-52.
- Feng X, MacDonald JM. Disorders of Bone Remodeling *Annu Rev Pathol.* 2011; 6: 121–145.
- Freshney RI. 2010. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications, 6ª ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., Hoboken.
- Golub EE, Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr Opin Orthop.* 2007, 18:444–448.

- Green H, Canfield AE, Hillarby MC, Grant ME, Boot-Handford RP, Freemont AJ, Wallis GA. The ribosomal protein QM is expressed differentially during vertebrate endochondral bone development. *J Bone Miner Res.* 2000, 15(6):1066-75.
- Judas F, Palma P, Falacho RI. Estrutura e dinâmica do tecido ósseo. Clínica Universitária de Ortopedia dos HUC-CHUC (2012).
- Jain A, Kennedy P, Srinivasan R, Chaudhry S. Calcium homeostasis and osteoporosis *McMaster Pathophysiology Review*, 2007
http://www.pathophys.org/osteoporosis/#Bone_homeostasis
- Kini U, Nandeesh BN. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. Radionuclide and hybrid bone imaging. Springer Berlin Heidelberg, 2012, 29-57.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970, 227:680-685.
- Pereira LM, Silva LR, Alves JF, Marin N, Silva FS, Morganti L, Silva IDC, Affonso R. A simple strategy for the purification of native recombinant full-length human RPL10 protein from inclusion bodies. *Protein Expr Purif.* 2014, 101:115-120.
- Rodan GA. Control of bone formation and resorption: biological and clinical perspective. *J Cell Biochem Suppl.* 1998, 30-31:55-61.
- Sudo H, Kodama H-A, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification of a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol.* 1983, 96:191-198.
- Takahashi N, Udagawa N, Suda T. Vitamin D endocrine system and osteoclasts. *Bonekey Rep.* 2014, 3:495-504.
- Tomuleasa CI, Foris V, Sorițău O, Páll E, Fischer-Fodor E, Lung-Illes V, Brie I, Virág P, Perde-Schrepler M, Postescu ID, Cherecheș G, Barbos O, Tatomir C. Effects of ⁶⁰Co gamma-rays on human osteoprogenitor cells. *Rom J Morphol Embryol.* 2009, 50(3):349-355.
- Xu W, Xu L, Chen M, Mao YT, Xie ZG, Wu SL, Dong QR. The effects of low dose X-irradiation on osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *BMC Musculoskelet Disord.* 2012, 8;13:94.
- Zhao Y, Guan H, Liu S, Wu R, Wang Z. Overexpression of QM Induces Cell Differentiation and Mineralization in MC3T3-E1. *Biol. Pharm. Bull.* 2005, 28(8):1371-1376.

Zhou X, Cui Y, Zhou X, Han J. Phosphate/Pyrophosphate and MV-related Proteins in Mineralisation: Discoveries from Mouse Models. *Int. J. Biol. Sci.* 2012; 8(6):778-790.