

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ARTUR FERRONATO SOTO

**EFEITO DA HEMINA NA PROLIFERAÇÃO E NA DIFERENCIAÇÃO  
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS MC3T3-E1**

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Machado Mengatto

Porto Alegre

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ARTUR FERRONATO SOTO

**EFEITO DA HEMINA NA PROLIFERAÇÃO E NA DIFERENCIAÇÃO  
OSTEOGÊNICA DE CÉLULAS MC3T3-E1**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Graduação em  
Odontologia da Faculdade de Odontologia  
da Universidade Federal do Rio Grande do  
Sul, como requisito parcial para obtenção  
do título de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Machado Mengatto

Porto Alegre

2021

## **AGRADECIMENTOS**

Sou grato aos meus pais e a minha família, pelo incentivo aos estudos e pelo apoio incondicional. À minha mãe, meu exemplo, ao meu pai, minha referência, à minha avó, que é o amor que nos une.

Agradeço aos meus amigos, por estarem ao meu lado sempre, apoiando-me nos momentos bons e ruins, na clínica e fora dela, crescendo e evoluindo juntos.

Grato pela confiança depositada pela minha orientadora Cristiane, que me acolheu desde o primeiro semestre, dedicou inúmeras horas para sanar as minhas questões, e por me guiar dentro da universidade.

Também agradeço à Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e aos seus docentes, pelo seu ensino de excelência, que nos capacitou de forma singular, incentivando-nos a percorrer o caminho da pesquisa científica e a sermos profissionais mais humanizados.

***“Viver, é melhor que sonhar...”***

**Elis Regina**

## RESUMO

A hemina, molécula oxidada do heme fisiologicamente presente no sangue, pode modular genes relacionados ao metabolismo do heme e influenciar na osteogênese durante a cicatrização óssea e a osseointegração dos implantes de titânio. Considerando tal potencial, o objetivo do estudo *in vitro* foi avaliar o efeito da hemina na proliferação e na diferenciação de células precursoras de osteoblastos. Para isso, cultivaram-se células MC3T3-E1 durante 3, 7 e 14 dias, em meio regular ou osteogênico suplementado ou não com hemina nas concentrações de 0 a 20 µg/ml. Nos respectivos tempos, foram verificadas a proliferação e a viabilidade celular através do teste de exclusão por Azul de Tripiano; a diferenciação e mineralização através da mensuração da quantidade de Vermelho de Alizarina por espectrofotometria; e a migração celular, por meio de análise descritiva dos vídeos em *Time Lapse* de 24 horas. Os resultados foram comparados por ANOVA, com post hoc Tukey a 5% de significância. O comportamento da cultura diferiu para os grupos que receberam hemina a 5 µg/ml, com aumento da proliferação em 1,6 vezes em 7 dias e de 1,7 vezes em 14 dias. Para a diferenciação, o grupo tratado apenas com o meio osteogênico em 14 dias apresentou sinais de diferenciação e mineralização, enquanto o tratamento com o meio osteogênico associado às concentrações de hemina de 5 e 10 µg/ml atrasou o início da fase de mineralização. As células suplementadas com hemina a 5 µg/ml tiveram maior migração no meio de cultura em 24 horas do que as não-suplementadas. Concluiu-se que a suplementação com hemina em baixas concentrações como 5 µg/ml teve promissores efeitos para a proliferação celular, não interferiu na diferenciação osteoblástica, mas postergou a fase de mineralização celular

Palavras-chave: Hemina, Osseointegração, Osteoblastos

## ABSTRACT

Hemin can influence osteogenesis during bone healing and osseointegration of titanium implants. This study aimed to verify whether medium supplementation with hemin promotes changes in the cell proliferation and differentiation processes. For this purpose, MC3T3-E1 osteoblastic precursor cells were cultured for 3, 7 and 14 days, in a regular medium, or osteogenic medium supplemented or not with hemin in the amounts from 0 to 20 µg/ ml. In the respective times, the cell proliferation and viability were verified through the Trypan Blue exclusion test; the cell differentiation and mineralization were analyzed by measuring the amount of Alizarin Red by spectrophotometry; and the cellular mobility was descriptively analyzed through 24-hour Time Lapse videos. The results were compared by ANOVA, with *post hoc* Tukey at 5% significance. The culture behavior differed for the groups that received 5 µg/ ml hemin, with greater proliferation, with an increase of 1.6 times after 7 days and 1.7 times after 14 days. Regarding the cell differentiation tests, there were significant differences in the osteogenic potential. The cells treated only with osteogenic medium continued to differentiate and initiated mineralization, while the cells treated with osteogenic medium associated with 5 or 10 µg/ ml of hemin presented a delay in the mineralization phase. The cells supplemented with hemin in 5 or 10 µg/ ml had greater mobility in the culture medium in 24 hours than the non-supplemented ones. It was concluded that supplementation with hemin at low doses such as 5µg/ ml had promising effects for the cell proliferation and did not interfere with the osteoblastic differentiation, but it postponed the phase of cell mineralization.

**Keywords:** Hemin, Osseointegration, Osteoblasts

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>RESUMO</b>  | 4  |
| <b>ABSTRACT</b>  | 5  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 7  |
| <b>2. OBJETIVOS</b>  | 9  |
| <b>3. METODOLOGIA</b>  | 10 |
| 3.1 Expansão da cultura e semeadura  | 10 |
| 3.2 Experimento 1 - proliferação celular e determinação da concentração fisiológica da solução de hemina | 10 |
| 3.3 Experimento 2 - diferenciação osteogênica  | 11 |
| 3.4 Experimento 3 - migração celular no meio de cultura  | 12 |
| 3.5 Análise dos resultados   | 13 |
| <b>4. RESULTADOS</b>   | 14 |
| 4.1. Experimento 1   | 14 |
| 4.2. Experimento 2   | 16 |
| 4.3. Experimento 3   | 19 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>  | 21 |
| <b>6. CONCLUSÃO</b>  | 29 |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | 30 |
| <b>ANEXO – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE PESQUISA INSTITUCIONAL</b>   | 35 |

## 1 INTRODUÇÃO

A hemina, molécula oxidada de heme, é uma substância fisiologicamente disponível no sítio ósseo, sendo tóxica quando livre em altas concentrações, ditas não fisiológicas. O heme é uma molécula formada por um anel de porfirina associado ao ferro, que age como um grupo protético de muitas proteínas (hemoproteínas, como a hemoglobina) e é crucial para os processos fisiológicos ou sinalização celular podendo regular fatores de transcrição como o NPAS2 e a enzima HO-1.<sup>1-3</sup> A enzima da HO-1 participa da degradação da molécula heme, pode inibir a ação de osteoclastos,<sup>4</sup> e também é regulado pela quantidade intracelular de heme; e os genes NPAS2 e BMAL2 também fazem parte da maquinaria do relógio biológico periférico do tecido ósseo,<sup>5-10</sup> além de serem sensores de oxigênio que podem ser regulados através da quantidade da molécula heme intracelular (NPAS2/PER2). Os genes BMAL2 e NPAS2 também participam da sinalização de xenobióticos (BMAL2), da hipóxia (NPAS2) e de processos de oxidação.<sup>11,12</sup>

Além dos papéis da hemina relacionados aos fatores de transcrição NPAS2 e a enzima HO-1, descritos anteriormente, foi demonstrado, pela primeira vez, que a inserção de implantes de titânio nanoestruturados em fêmures de ratos alterou a expressão de genes envolvidos no metabolismo da molécula heme e na sinalização celular de resposta à hemina, tais como os genes codificadores da heme-oxigenase-1 (HO-1), ácido  $\delta$ -aminolevulínico sintase (ALAS2), ferritina, PAS domínio 2 neuronal (NPAS2) e BMAL2 (do inglês, Brain and muscle Arnt-like 2).<sup>13</sup> Os autores também confirmaram *in vitro* e *in vivo* que o gene NPAS2 parece regular localmente a osseointegração inicial do titânio na diferenciação das células progenitoras.<sup>13</sup> Assim, pode ser possível que o titânio nanoestruturado induza respostas de oxidação, eletrostáticas ou xenobióticas no tecido ósseo subjacente por cascatas sinalizadoras ativadas pela quantidade intracelular de heme.<sup>13</sup>

O efeito da suplementação com hemina já foi estudado em várias linhagens celulares e tecidos, como células endoteliais, neuronais, musculares, apresentando-se ora com efeito tóxico ora protetivo sobre tais tecidos, dependendo da dose aplicada.<sup>2,3,14-27</sup> Os mecanismos de ação da hemina no

meio de sinalização celular dos efeitos protetivos estão em especial relacionados à ativação das cascatas da enzima hemeoxigenase e dos mecanismos de autofagia e mitofagia relacionados ao estresse oxidativo intracelular mediado por hipóxia e espécies reativas de oxigênio (ROS).<sup>2,15,17,24-33</sup> Além disso, estudos anteriores destacam que o estresse oxidativo pode reduzir a maturação e mineralização em células MC3T3-E1 através da ativação da via Nrf2 / HO-1 diminuindo a expressão de marcadores de diferenciação óssea. As células foram tratadas com 20 ou 50  $\mu\text{M}$  de hemina por 24 horas e em seguida, o meio osteogênico foi alterado para o meio sem hemina, nos tempos de 0 a 14 dias. O pré-tratamento com hemina em concentrações maiores de 20  $\mu\text{M}$  diminuiu a formação de nódulos ósseos em células MC3T3-E1, e também reduziu o acúmulo de cálcio.<sup>34</sup> No entanto, o efeito da suplementação com hemina em dosagens menores em células precursoras ósseas MC3T3-E1 induzidas à osteogênese permanece desconhecido.

## 2 OBJETIVOS

Este estudo teve por objetivo geral determinar o efeito da suplementação com hemina na proliferação e diferenciação de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1. A hipótese elaborada é que a hemina disponível no meio extracelular internaliza nessas células e aumenta a proliferação e a diferenciação celular durante as etapas iniciais da osteogênese.

Os objetivos específicos foram:

- a) determinar a concentração mais favorável da solução de hemina para ser utilizada nos experimentos subsequentes, sob a hipótese de que a concentração de hemina de 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  seja favorável para as células MC3T3-E1;
- b) determinar o efeito da solução em concentração fisiológica de hemina na proliferação e diferenciação celular osteogênica, sob a hipótese de que as células expostas à solução de hemina mais favorável apresentam maior proliferação e diferenciação celular osteogênica;
- c) determinar o efeito da hemina no comportamento de migração celular em 24 horas, sob a hipótese de que as concentrações de hemina de 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  promovem alterações no comportamento das células MC3T3-E1.

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 Semeadura e expansão da cultura**

A linhagem de células pré-osteoblásticas células MC3T3-E1 derivadas da calvária de camundongos (ATCC® CRL-2593™, American Type Culture Collection, Virgínia, US)<sup>35</sup> foi expandida em cultura em meio regular, neste trabalho composto por: meio de cultura mínimo de Eagle modificado por Dulbecco Meio de cultura (1X DMEM, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, US) que foi suplementado com soro fetal bovino a 10% (FBS, Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, US), solução de penicilina-estreptomicina a 1% (PS – antibióticos, Sigma Aldrich, Sigma Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil). As células foram mantidas em incubadora própria para cultura de células, sob incubação úmida a 5% de CO<sub>2</sub> e 37°C, até que se tivesse um número suficiente de células para os experimentos, em passagens iniciais. O estoque celular foi expandido por meio de plaqueamento na densidade de 3 x 10<sup>5</sup> células/ ml em placas de cultura de 100 mm, com troca de meio de cultura a cada 3 dias e troca de passagem a cada 3 dias ou quando atingisse 70% de confluência. As células expandidas foram mantidas em meio regular. As características morfológicas das células ao longo de sua expansão e diferenciação foram monitoradas com a utilização de um microscópio de contraste de fases (40x Zeiss Axioscope 5, Zeiss, Göttingen, Germany), e fotografadas por câmara de alta resolução em microscopia invertida (Zeiss Axio Vert.A1, Zeiss, Göttingen, Germany). Após a expansão, os experimentos foram iniciados, por meio do plaqueamento das células na densidade de 3 x 10<sup>4</sup> células/ ml em placas de 24 poços de poliestireno com fundo achatado, próprias para cultura celular. Após 24 horas do plaqueamento das células nos poços, iniciaram-se os experimentos.

#### **3.2 Experimento 1 - Proliferação celular e determinação da concentração fisiológica da solução de hemina**

Após 24 horas da semeadura em placas de poliestireno contendo 24 poços, iniciou-se o experimento 1 para determinar qual a melhor concentração de hemina para ser utilizada nos próximos experimentos. Para tal, o meio regular foi

suplementado ou não por uma solução de hemina (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich Brasil Ltda, São Paulo, Brasil) com diferentes concentrações: 0, 5, 10, 15 ou 20 µg/ ml. As células foram mantidas nestas condições por 3, 7 e 14 dias, com troca de meio fresco a cada 3 dias. Em cada tempo, o meio de cultura foi removido, e as células foram cuidadosamente lavadas com 1X PBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, US) e tripsinizadas com 0,25% Tripsina-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, US), por aproximadamente 4 minutos. Posteriormente, as células foram suspensas em 800 µl de meio DMEM contendo 10% FBS para neutralização da tripsina. O conteúdo de cada poço foi coletado e transferido para um tubo cônico de volume 1,5 ml. Um volume de 20 µl de cada amostra foi transferido para outro tubo a que foi acrescentada 10 µl da solução de Azul de Tripano (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, EUA). Deste volume, foram coletados 10 µl para a leitura em hemocitômetro (Kasvi, Kasvi Importação e Distribuição de Produtos para Laboratórios Ltda., Paraná, Brasil) por duas vezes. A média do número de células viáveis por mililitro foi calculada, de acordo com o recomendado pelo teste de exclusão por Azul de Tripano. Os resultados foram comparados por análise estatística e grupos que receberam as concentrações de hemina tiveram sua viabilidade celular semelhante aos níveis do controle, sendo escolhidas para serem utilizadas nos próximos experimentos.

### **3.3 Experimento 2 - diferenciação osteogênica**

Para verificar o efeito da suplementação da hemina na diferenciação osteogênica, a morfologia celular foi observada por microscopia e também foi aplicado método de coloração por Vermelho de Alizarina, para se quantificar o conteúdo celular mineral.<sup>36,37</sup> Em resumo, após 24 horas de as células serem expandidas e semeadas em placas de poliestireno de 24 poços, o meio regular foi trocado por meio osteogênico, que incluiu a adição de 10 mM β-glicerol-fosfato (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) e 50 µg/ml ácido ascórbico (Neon, Neon Comercial Reagentes Analíticos Ltda., São Paulo, Brasil) à mistura de meio regular. O meio osteogênico foi suplementado ou não por uma solução de hemina com diferentes concentrações fisiológicas: 0, 5 e 10 µg/ ml. As células foram mantidas nestas condições da solução de hemina por 7 e 14 dias,

com troca de meio a cada 3 dias. Como controle da osteogênese, utilizou-se a suplementação do meio osteogênico com 10nM de dexametasona (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Nos referidos tempos, as células foram lavadas com uma solução livre de cálcio e fosfato, e fixadas por uma solução gelada de 70% de etanol (Rialcool, Rioquímica S.A, São Paulo, Brasil) por 1 hora. Após breve lavagem com água deiodizada, as células foram coradas por 10 minutos com uma solução 40 mM de Vermelho de Alizarina (pH 4,2) à temperatura ambiente. As células foram lavadas 5x com água seguido de uma lavagem de 15 minutos com 1X PBS (sem rotação) para reduzir a coloração não-específica. A quantidade de coloração celular foi observada em microscopia e fotografada para posterior análise descritiva. Após as colorações serem deixadas secar em temperatura ambiente, o conteúdo mineral corado foi extraído em pH ácido pela adição de 400 µl de ácido acético a 10% (Bioquímica e Química Ltda., Minas Gerais Brasil) em cada poço e incubado por 30 minutos. Após este período, as células e conteúdo mineral foram transferidos para um tubo cônico de 2 ml com o auxílio de um raspador plástico apropriado. Os tubos foram agitados e incubados a 85°C por 10 min, transferidos para o gelo por 5 min e centrifugados a 20.000 rpm por 15 min. O total de 400 µl do sobrenadante foi transferido para um novo tubo e o pH neutralizado pela adição de 150 µL de hidróxido de amônio a 10% (Labsynth, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil). O volume de 100 µl de cada amostra foi transferido para uma nova placa de cultura de 96 poços para leitura em aparelho de espectrofotometria. A medição da absorbância de luz da solução foi realizada a 405 nm, em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific Inc, New York, EUA). Os resultados médios colorimétricos obtidos foram comparados a uma curva de calibração de concentração do Vermelho de Alizarina, para obter a concentração de Vermelho de Alizarina de cada amostra. Os resultados foram comparados por análise estatística.

### **3.4 Experimento 3 - migração celular**

As células MC3T3-E1 foram expandidas em placa de cultura de 100 mm, e mantidas em incubadora a 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C. Após atingirem 70% de

confluência, as células foram lavadas uma vez com solução salina fosfatada a 1X (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, US) incubadas com 0,02% EDTA (Labsynth, Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda., São Paulo, Brasil) por 10 minutos. Posteriormente, as células foram tripsinizadas com 0,1% de Tripsina-EDTA (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, US.), conforme descrito anteriormente. As células foram semeadas na densidade de  $1 \times 10^4$  células/ml em um anel de silicone (Fisher Scientific, Fisher Scientific UK Ltda., Leicestershire, UK) inserido e fixado no interior dos poços de uma placa de cultura de 6 poços. Após 8 horas de incubação para sua adesão ao poço, o meio regular foi trocado para o meio suplementado ou não por uma solução de hemina com diferentes concentrações: 0, 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$ . A filmagem de 24 horas iniciou-se utilizando microscópio invertido (Zeiss Observer Z1 – Time Lapse, Zeiss, Göttingen, Germany) que possibilitou a captura de imagens e confecção de vídeos *in vitro*. O *software* utilizado para as gravações foi o Axiovision (Zeiss, Göttingen, Germany). A filmagem microscópica ocorreu durante 24 horas, com aumento de 40x. O vídeo foi acelerado, assistido e analisado qualitativamente para avaliar se o comportamento celular foi induzido pela hemina, sendo observado e descrito nesse período.

### 3.5 Análise dos resultados

Todos os experimentos foram realizados em quadriplicatas e as médias desses valores foi calculada. Adicionalmente, os experimentos foram cegados por um pesquisador (AFS) e executado por outro (CMM). Para análise quantitativa dos resultados, a homogeneidade estatística foi primeiramente confirmada pelo teste de Shapiro Wilk ( $p > 0,05$ ). Tendo homogeneidade, os resultados foram analisados estatisticamente por ANOVA de dois fatores, com teste *post hoc* de Tukey, usando o software SPSS 19.0 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, US), com significância de 5%. As imagens e vídeos obtidos por meio de fotografias e filmagens foram analisados visualmente e descritos, de maneira que se compararam qualitativamente a morfologia e o comportamento das células nas culturas submetidas às variadas condições experimentais.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Experimento 1

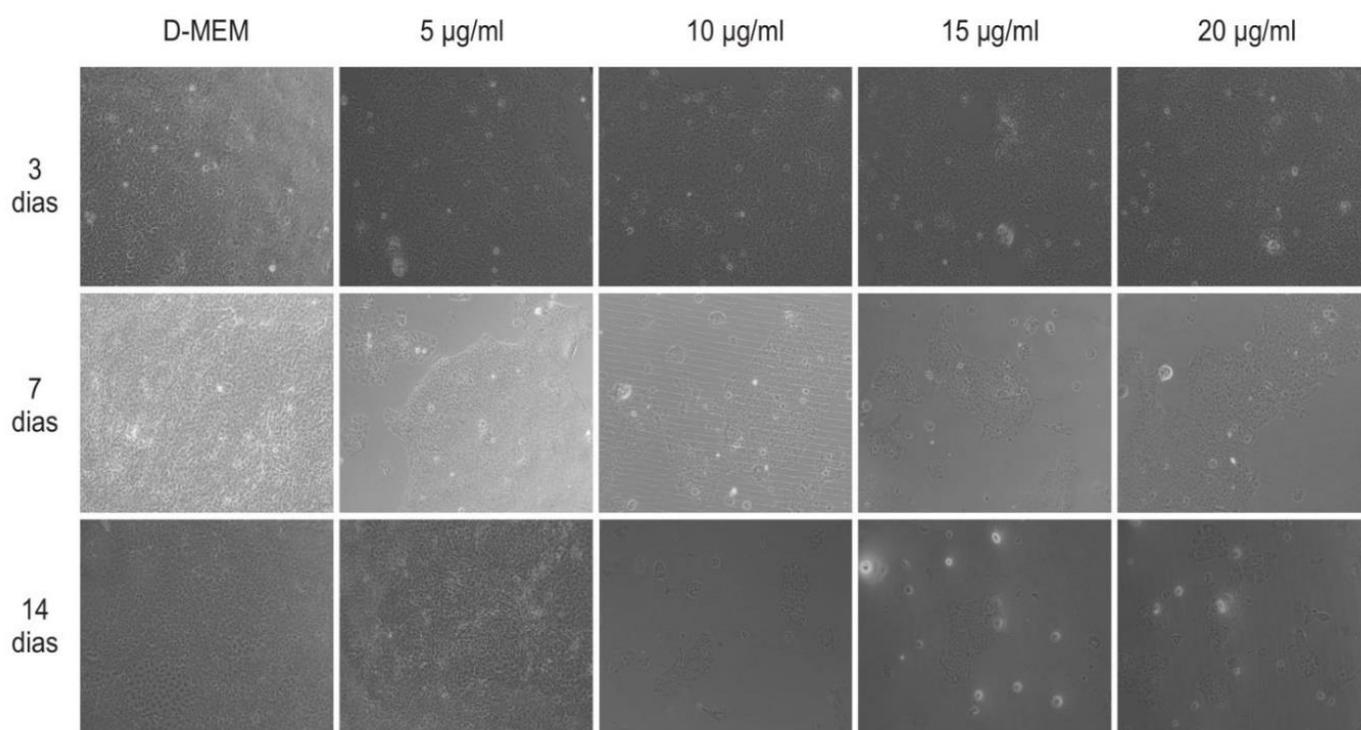
A Figura 1 e a Tabela 1 mostram o efeito da suplementação de diferentes concentrações de hemina (0, 5, 10, 15 ou 20 µg/ml) na viabilidade das células MC3T3-E1, após 3, 7 e 14 dias de cultura em meio regular. A análise da morfologia celular em microscópio de luz invertida mostrou que, quando cultivadas por 3 dias em meio não osteogênico independente da concentração de hemina, as células proliferaram e permaneceram aderidas à placa de cultura e confluentes, com poucas mortes celulares e sem células flutuantes para todos os grupos (pontos redondos brilhantes nas fotos), de maneira que a morfologia celular inicial similar ao grupo controle sem hemina foi mantida (Figura 1). No interior das células suplementadas por hemina, foram notadas estruturas escurecidas compatíveis com fagossomos ou endossomos. Após 3 dias de cultura, não houve diferença estatística significativa no número de células viáveis com relação ao grupo controle ( $p > 0,05$ ), independentemente da concentração de hemina utilizada como suplementação (Tabela 1).

Após 7 dias houve alterações morfológicas das células apenas para as concentrações de hemina de 15 e 20 µg/ml, de maneira que as células destes grupos apresentaram maior espaço intercelular, e algumas células tinham aspecto morfológico compatível com processo de morte celular (Figura 1). Considerando o número de células viáveis em 7 dias, houve aumento do processo proliferativo para o grupo de 5 µg/ml, que apresentou aumento significativo de 1,6 vezes no número de células viáveis com relação ao grupo controle do meio não suplementado ( $p < 0,05$ ) (Tabela 1). Para a concentração de 10 µg/ml de hemina, o número de células foi igual ao do controle não suplementado ( $p > 0,05$ ), mantendo a proliferação. No entanto, houve redução estatisticamente significativa de células viáveis para os grupos suplementados com 15 e 20 µg/ml de hemina ( $p < 0,05$ ).

Em 14 dias, as concentrações iguais ou superiores a 10 µg/ml de hemina apresentaram alteração da morfologia celular, redução do número de células visivelmente aderidas na placa de cultura, e o aparecimento de espaços grandes

entre as células, com células de aspecto compatível com morte celular (Figura 1). O aspecto da cultura suplementada por 5 µg/ml de hemina foi similar ao do grupo controle sem hemina. Quantitativamente, para a concentração de 5 µg/ml de hemina, houve um aumento estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) de 1,7 vezes do número de células viáveis em relação ao controle do meio não-suplementado, enquanto as demais concentrações iguais ou superiores a 10 µg/ml mantiveram o número médio de células viáveis estatisticamente similar ( $p > 0,05$ ) ao controle (Tabela 1).

**Figura 1.** Proliferação e comportamento celular em meio de cultura regular suplementado ou não por variadas concentrações de hemina (0, 5, 10, 15 ou 20 µg/ml), após 3, 7 e 14 dias de cultura.



**Tabela 1.** Média (desvio-padrão) da densidade de células ( $\times 10^4$  células/ ml) de acordo com as variadas concentrações de hemina suplementadas no meio regular de cultura, após 3, 7 e 14 dias.

| Concentrações ( $\mu\text{g/ ml}$ ) | 3 dias                   | 7 dias                    | 14 dias                     |
|-------------------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| 0                                   | 7,11 (1,65) <sup>a</sup> | 31,50 (4,34) <sup>a</sup> | 76,79 (14,18) <sup>a</sup>  |
| 5                                   | 4,86 (2,56) <sup>a</sup> | 50,38 (4,43) <sup>b</sup> | 128,13 (12,40) <sup>b</sup> |
| 10                                  | 4,86 (2,09) <sup>a</sup> | 32,50 (5,35) <sup>a</sup> | 56,07 (23,24) <sup>a</sup>  |
| 15                                  | 4,11 (0,95) <sup>a</sup> | 16,75 (6,54) <sup>c</sup> | 59,25 (26,16) <sup>a</sup>  |
| 20                                  | 4,24 (1,50) <sup>a</sup> | 16,25 (1,54) <sup>c</sup> | 53,56 (12,61) <sup>a</sup>  |
| <b>Valor de p</b>                   | 0,193                    | 0,000*                    | 0,000*                      |

\* a,b,c Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ), por análise de variâncias (ANOVA) e teste *post-hoc* de Tukey.

## 4.2 Experimento 2

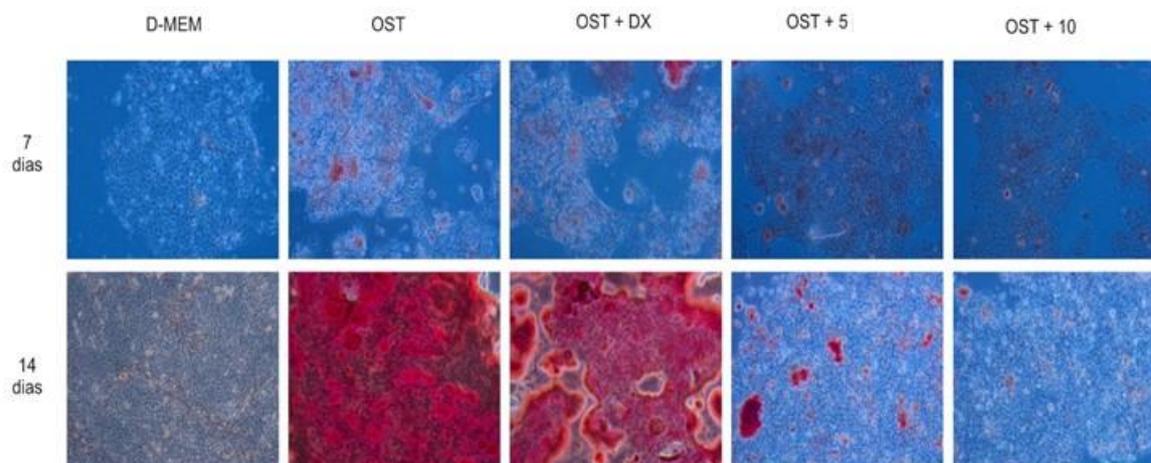
O experimento de diferenciação celular mostrou diferenças no potencial osteogênico das células de acordo com os variados tratamentos, conforme as seguintes fases: 1) proliferação, 2) diferenciação osteoblástica, síntese e maturação da matriz extracelular e 3) mineralização da matriz extracelular.

No período de 7 dias, as células precursoras mantiveram o seu processo proliferativo, com alteração da morfologia celular característica da diferenciação osteogênica independente da suplementação ou não com hemina. Os grupos que receberam o tratamento com meio osteogênico independente de terem ou não indução osteogênica pela adição de dexametasona no meio, apresentaram células com citoplasma ampliado, de formato cuboide e poliédrico, aumento na densidade e no tamanho do núcleo celular com coloração escura mais intensa, sinalizando intensa síntese proteica. Os grupos do meio osteogênico que receberam o tratamento com a hemina independentemente de suas concentrações, também apresentaram a mesma alteração de morfologia celular,

sugerindo diferenciação osteogênica. Esse comportamento foi diferente do grupo controle com meio de cultura não osteogênico, que apresentou células menores e uniformes, de mesmo formato filiforme, núcleo arredondado e pequeno, sugerindo a não diferenciação e a permanência como células precursoras. Em todos os grupos, após 7 dias de cultura, a coloração com Vermelho de Alizarina não evidenciou quantidade significativa de matriz mineralizada corada em vermelho ( $p > 0,05$ ).

No período de 14 dias, o grupo controle não osteogênico (DMEM) permaneceu não corado e com morfologia celular compatível com a proliferação das células precursoras MC3T3-E1, sem diferenciação. Já todos os grupos com meio osteogênico independente da suplementação com dexametasona ou com hemina, apresentaram aumento significativo no tamanho e no núcleo das células e formato quadrangular com morfologia compatível com a diferenciação celular (já descrita acima em 7 dias). Apenas os grupos com meio osteogênico sem hemina (OST e OST+DX), independente da adição de dexametasona coraram intensamente pelo Vermelho de Alizarina, compatível com a produção intensa de nódulos de calcificação. Em contrapartida, os grupos que receberam o meio osteogênico suplementados por 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de hemina (OST+5 e OST+10) não coraram em vermelho com a mesma intensidade que os grupos sem hemina, indicando uma inibição ou atraso para iniciar a fase de mineralização e deposição de mineral na matriz, parecendo que o processo de produção mineral se deu mais lentamente. Assim, nesses grupos suplementados com hemina, as células tiveram o processo proliferativo intenso e depois diferenciaram sua morfologia, mas não mineralizaram como nos grupos sem hemina. Vale destacar que em todos os grupos, não houve prejuízo no que tange à viabilidade das células, mostrando que essas concentrações de hemina de 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  não foram citotóxicas.

**Figura 2:** Mineralização e comportamento celular após coloração com Vermelho de Alizarina, de acordo com meio de cultura controle (DMEM), ou meio osteogênico sem (OST) e com suplementação de dexametasona (OST+DX), ou com duas concentrações de hemina (OST+5 e OST+10), após 7 e 14 dias.



DMEM = grupo que recebeu apenas meio de cultura regular; OST = grupo que recebeu meio de cultura osteogênico sem dexametasona e sem hemina; OST+DX = grupo que recebeu meio de cultura osteogênico com dexametasona e sem hemina; OST+5 = grupo que recebeu meio de cultura osteogênico sem dexametasona, mas com suplementação de 5 µg/ ml de hemina; OST+10 = grupo que recebeu meio de cultura osteogênico sem dexametasona, mas com suplementação de 10 µg/ ml de hemina.

Em 7 dias, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para o grupo que recebeu o meio osteogênico não suplementado com hemina (OST), de maneira que este apresentou maior quantidade de Vermelho de Alizarina na espectrofotometria do que os demais grupos, correspondendo à conversão entre 0,5 e 1 mM do corante.

Em 14 dias, houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) para os grupos que receberam o meio osteogênico não suplementado com hemina (OST e OST+DX), independente da adição ou não da dexametasona, de maneira que este o meio osteogênico suplementado com dexametasona (OST+DX) apresentou, a maior quantidade de Vermelho de Alizarina entre os grupos comparado ao controle não osteogênico, correspondendo ao intervalo de conversão entre 1 e 1,5 mM de Vermelho de Alizarina. Já os meios osteogênicos suplementados com hemina (OST+5 e OST+10) não foram diferentes estatisticamente ( $p > 0,05$ ) do controle não osteogênico, apresentando similar

quantidade de Vermelho de Alizarina. Os meios suplementados com hemina assumiram valores intermediários entre o meio controle e o meio osteogênico, mostrando uma formação mineral mais lenta do que o meio osteogênico.

**Tabela 2.** Média (erro-padrão) da quantidade de Vermelho de Alizarina (nm), de acordo com meio de cultura controle (DMEM), ou meio osteogênico sem (OST) e com suplementação de dexametasona (OST+DX), ou com duas concentrações de hemina (OST+5 e OST+10), 7 e 14 dias.

| Concentrações (ug/ ml) | 7 dias                     | 14 dias                    |
|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <b>DMEM</b>            | 0,122 (0,002) <sup>a</sup> | 0,119 (0,005) <sup>a</sup> |
| <b>OST</b>             | 0,139 (0,006) <sup>b</sup> | 0,184 (0,028) <sup>c</sup> |
| <b>OST+DX</b>          | 0,125 (0,001) <sup>a</sup> | 0,388 (0,054) <sup>b</sup> |
| <b>OST+5</b>           | 0,130 (0,003) <sup>a</sup> | 0,154 (0,007) <sup>a</sup> |
| <b>OST+10</b>          | 0,131 (0,010) <sup>a</sup> | 0,142 (0,007) <sup>a</sup> |
| <b>Valor de p</b>      | <i>0,001</i>               | <i>0,001</i>               |

\* a,b,c,d Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística significativa entre os grupos ( $p \leq 0,05$ ), com análise de variâncias (ANOVA) e teste *post-hoc* de Tukey.

# DMEM = grupo que recebeu apenas meio de cultura regular; OST = grupo que recebeu meio de cultura osteogênico sem dexametasona e sem hemina; OST+DX = grupo que recebeu meio de cultura osteogênico com dexametasona e sem hemina; OST+5= grupo que recebeu meio de cultura osteogênico sem dexametasona, mas com suplementação de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de hemina; OST+10= grupo que recebeu meio de cultura osteogênico sem dexametasona, mas com suplementação de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de hemina.

### 4.3 Experimento 3

O experimento 3 foi realizado para se verificar a possibilidade formação de fagossomos ou endossomos intracelulares relacionados à hemina, assim como a migração celular no meio de cultura durante 24 horas de exposição à hemina. Embora os fagossomos ou endossomos não tenham sido visualizados nos vídeos, os grupos que foram expostos às duas concentrações de hemina (vídeos

5 $\mu$ g e 10  $\mu$ g/ ml) pareceram ter maior mobilidade e movimentação celular, com maior proliferação celular, estando mais agrupadas e aderidas entre si em 24 horas de cultura, comparados ao meio não suplementado com hemina e utilizado como controle (vídeo OST - controle). O comportamento das células pode ser visto no link:

Link de acesso ao vídeo: [https://youtu.be/q2U\\_Yru05M0](https://youtu.be/q2U_Yru05M0)

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo aceitou parcialmente as hipóteses formuladas. O primeiro experimento avaliou aspectos morfológicos e número de células viáveis relacionados à viabilidade e proliferação de células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 cultivadas sobre superfície de poliestireno e meio de cultura regular com suplementação de diferentes concentrações de hemina (0, 5, 10, 15 e 20 µg/ ml) durante 3, 7 e 14 dias. No experimento 1 a hipótese nula foi confirmada para 3 dias, mas parcialmente aceita para os tempos de 7 e 14 dias. Em 3 dias, todas as concentrações de hemina utilizadas nesse experimento mostraram-se fisiológicas para as células pré-osteoblásticas MC3T3-E1, não havendo redução de viabilidade celular estatisticamente significativa, independentemente da concentração de hemina utilizada como suplementação. O presente resultado corrobora estudos anteriores da literatura com outras linhagens celulares em 3 dias, em que soluções de hemina até 20 µg/ ml não se apresentaram citotóxicas para o número de células em culturas *in vitro*.<sup>26</sup> No entanto, à medida em que os dias de cultura passaram, houve aumento dos espaços intercelulares em 7 e 14 dias, e redução no número de células viáveis, sugerindo que as concentrações de 15 e 20 µg/ ml de hemina, reduziram a proliferação e induziram a apoptose celular.

Estudos anteriores levantaram a possibilidade de que a hemina induzisse processos de autofagia celular em eritroblastos da linhagem K562 por meio do receptor LRP1 (Low-density lipoprotein receptor-related protein 1), como parte do processo de maturação natural fisiológica ou farmacológica de remoção das mitocôndrias das células eritóides (mitofagia), com aumento intracelular do número e do tamanho de vesículas endossomais autofágicas contendo LRP1 após 8h e até 24 h de estimulação com hemina.<sup>31,33</sup> Também se descreveu que a ativação do complexo LRP1-hemina participou como receptor de morte para células hepáticas,<sup>18</sup> levando à internalização de hemina, formação de vesículas endossomais e seu metabolismo; mas até o momento não há informações disponíveis sobre a função LRP1 em células osteoblásticas. A autofagia é uma via degradante lisossômica, na qual macromoléculas e organelas inteiras são cercadas por vesículas de dupla membrana chamadas autofagossomos e, em

seguida, direcionadas a lisossomos para sua degradação, mas pode fazer parte de processos fisiológicos de redução no número de mitocôndrias celulares como maneira protetiva para a resposta celular a espécies reativas de oxigênio (ROS).<sup>30,33</sup>

A análise qualitativa das imagens do presente estudo, confirmaram que a hemina alterou o comportamento celular, com o aparecimento de estruturas redondas e escurecidas de diferentes tamanhos no citoplasma e próximos à membrana celular, compatíveis com endossomos ou fagossomos, de maneira que maior foi o número dessas estruturas escurecidas quanto maior a concentração de hemina aplicada. Rocha *et al.* relataram que, no citosol de alguns tipos celulares de eucariotos, estão presentes inclusões, que servem como local de depósito de substâncias, tais como reservas energéticas, lipídicas ou de pigmentos como a melanina.<sup>31</sup> Em outras células, essas estruturas escurecidas são sugestivas de fagossomos, vesículas formadas por processos de endocitose, apresentando-se tanto na periferia da membrana celular ou distribuídos pelo citoplasma.<sup>31</sup> Existem células com inclusões cristalinas, que geralmente são compostas por proteínas, mas podem ser formadas por urato, ferritina, entre outros.<sup>31</sup> Portanto, fagossomos são estruturas celulares que participam da internalização celular de substâncias sólidas, tais como, no presente estudo poderia ser a hemina. Ao encontrar uma substância sólida no exterior celular, a membrana celular com microfilamentos de actina pode se invaginar, capturando tal substância e formando fagossomos, que se destacam da membrana celular e passam a ser transportados pelo citoplasma por meio de uma rede de microtubos e microfilamentos proteicos do citosol (exemplo de actina) até se fundirem a lisossomos para digestão. As proteínas motoras do citoesqueleto/ citosol utilizam os microfilamentos como ‘trilhos’ para locomoção de vesículas, organelas e/ou macromoléculas.<sup>31</sup> Os fagossomos são “digeridos” e as substâncias neles contida podem ser aproveitadas pela célula ou destruídas. As vesículas de endocitose formam um compartimento endossomal, que se expande desde a membrana plasmática até as proximidades do núcleo. Esse compartimento é responsável pela separação e endereçamento do material que penetra no citoplasma pelas vesículas de pinocitose.<sup>31</sup>

Embora tenha-se visualizado uma imagem compatível com fagossomos após 3 dias de exposição das células à hemina, não se visualizou tal imagem quando se fez o vídeo *Time Lapse* em 24 horas de exposição à hemina, trazendo a possibilidade de que a estrutura se formou após esse período e possa tratar-se, na verdade, de um endossomo relacionado à autofagia para redução mitocondrial protetiva na linhagem celular estudada. Estudos futuros que analisem a presença e função dessas estruturas intracelulares compatíveis com endossomos em células precursoras ósseas podem ajudar a desvendar os mecanismos envolvidos com a osteogênese mediada por espécies reativas de oxigênio e com a osseointegração de implantes de titânio.

A análise qualitativa da morfologia celular em microscópio de luz invertida confirmou os resultados quantitativos de contagem celular e de quantidade de Vermelho de Alizarina, e mostrou que, em 3 dias, as células de todos os grupos permaneceram aderidas à placa e confluentes, com poucas mortes celulares e células flutuantes (pontos redondos brilhantes nas fotos), de maneira que ou as células continuaram sua proliferação de maneira lenta em 3 dias, ou pararam o ciclo de proliferação, mantendo uma média de número de células similar entre os grupos. Embora a avaliação quantitativa de células viáveis (Tabela 1) não tenha detectado diferenças estatísticas significativas entre os grupos, a observação por microscopia apontou que as células expostas às concentrações maiores de hemina de 15 e 20 µg/ml apresentam, após 7 dias, maiores espaços entre as células, com menor quantidade de células visível em algumas partes.

No presente estudo, além de pontos escuros no citoplasma, verificou-se o aumento da intensidade de escurecimento (nucléolo evidente) e de tamanho dos nucléolos na região intranuclear, conforme se aumentou a concentração de hemina aplicada no meio de cultura. A transcrição do rDNA e os primeiros passos da biogênese dos ribossomos ocorrem no nucléolo, contudo as subunidades, maior e menor, somente se associam no momento da síntese proteica no citosol.

<sup>37</sup> Faz-se ressaltar que o tamanho varia conforme o estado funcional da célula, quanto maior a síntese proteica, maior o tamanho do nucléolo. Assim, o aumento de tamanho e evidenciação dos nucléolos na Figura 1 pode indicar alta síntese proteica. O nucléolo também se torna evidente durante o processo de

multiplicação celular. Para as células se multiplicarem, elas passam por um processo chamado de ciclo celular. Este compreende a intérfase e um processo de divisão celular, a mitose. A intérfase é uma fase em que ocorre a duplicação de todo material nuclear e citoplasmático da célula, sendo dividida nas subfases G1, S, G2. A fase S, que é a mais extensa, é caracterizada pela replicação do DNA e das histonas, nas fases G1 e G2 ocorre a transcrição dos RNA e tradução das proteínas.<sup>31</sup>

Em relação à proliferação celular, o presente estudo demonstrou que a suplementação do meio de cultura com hemina em baixas concentrações como 5 µg/ml quase duplicou o número de células pré-osteoblásticas após 7 e 14 dias. Outros estudos mostraram que a hemina pode desempenhar um papel importante quando interage com as células. Por exemplo, para células epiteliais de adenocarcinoma Caco-2, a hemina também influenciou no controle da viabilidade celular, contribuindo na proteção das células de compostos citotóxicos em potencial, como tetrapirróis livres,<sup>19</sup> oriundos da degradação do grupo heme. A explicação pode ser que o efeito benéfico da conversão da hemina em um antioxidante (biliverdina), por mecanismos moleculares relacionados à enzima hemeoxigenase capazes de manter a viabilidade das células Caco-2.<sup>15</sup>

O presente estudo mostrou que a suplementação da hemina com concentrações de 15 e 20 µg/ml reduziu a proliferação celular, apresentando-se potencialmente citotóxica. Estudos anteriores que trataram células MC3T3 com concentrações de hemina de 20 e 50 µM não avaliaram alterações de viabilidade em dosagens de 20 µM mas concentrações iguais ou maiores de 20 µM diminuíram a formação de nódulos ósseos em células MC3T3-E1, e também reduziu o acúmulo de cálcio.<sup>34</sup> A literatura relata um possível mecanismo molecular diferente envolvendo a regulação da viabilidade celular, de maneira que o efeito citotóxico da hemina pode ser, principalmente, devido à produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).<sup>29</sup> Alguns estudos reportam que a produção de ROS vinculada à hemina poderia desempenhar um papel significativo na evolução de diferentes disfunções humanas, como câncer colorretal, inflamação intestinal e lesão de células neuronais.<sup>16</sup> No entanto, o mecanismo molecular pelo qual a hemina exerce esse efeito ainda está em

debate. A hemina é uma molécula lipossolúvel que interage rapidamente com numerosos constituintes celulares e sua toxicidade pode ser mediada por mecanismos oxidativos e não-oxidativos. Em altas concentrações de hemina, verificou-se toxicidade para diversos de tipos de linhagens celulares.<sup>20,34</sup>

Em resumo, na diferenciação celular, o presente trabalho mostrou que a suplementação do meio osteogênico com hemina em baixas concentrações de 5 ou 10 µg/ml mantém a viabilidade e a proliferação celular, mas parece atrasar a mineralização das células diferenciadas. Nesse cenário, também se verificou que hemina tem um papel fundamental para proliferação celular, sem tem prejuízo na viabilidade. Estudos mostraram que o aumento intracelular de hemina influencia o processo de calcificação vascular das células hematopoiéticas (HSMC), por exemplo, como ocorre no efeito protetivo da prevenção da calcificação da aorta durante a progressão de lesões ateroscleróticas, guardando semelhanças à calcificação óssea, de forma que a hemina inibe a calcificação em células HSMC provocando a captura de fosfato e sua redução no meio extracelular.<sup>27</sup> A literatura reporta que as espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas na presença de hemina não apenas alteram vias de sinalização nas células, mas também influenciam mudanças genéticas e epigenéticas, modulando assim proliferação e diferenciação celular.<sup>25,26</sup> A hemina é capaz de aumentar os níveis de ROS de um modo dependente da concentração. Em contrapartida, o ácido ascórbico, que está presente no meio de cultura osteogênico, colaborar para esse efeito da hemina observado no presente estudo durante a diferenciação celular, já que a literatura menciona que o ácido ascórbico tem efeitos opostos da hemina, sendo um antioxidante que pode eliminar radicais livres derivados do oxigênio in vitro e in vivo.<sup>25</sup> Frente a estes resultados percebe-se que ácido ascórbico pode realizar um controle nos níveis de ROS.

Estudos com células K562, amplamente utilizadas como modelo para a investigação de doenças do sangue (eritropoiese) e expressão genética da hemoglobina, utilizaram a hemina para induzir a sua diferenciação em células eritróides.<sup>22</sup> Quando as células K562 são tratadas com hemina, os níveis de ROS intracelulares aumentam transitoriamente 3,07 vezes logo em 20 min. Além disso, neste estudo, o tratamento com ácido ascórbico seguido de exposição à hemina

por 20 minutos resultou em uma diminuição da diferenciação dependente da concentração no níveis de ROS intracelulares. Dessa forma, demonstrou-se que o ácido ascórbico em eritrócitos induzidos por hemina podem ter sua diferenciação celular mediada por ROS. Portanto, modulando os níveis de ROS intracelulares por meio de antioxidantes pode ser capaz de regular o estado de diferenciação de eritróides.<sup>25</sup>

No presente estudo, a hemina em baixas concentrações apresentou-se promissora no incentivo da proliferação celular durante o processo de osteogênese, aumentando consideravelmente o número de células e não impedindo sua diferenciação. O atraso na mineralização celular observado quando da presença da hemina pode sugerir esse acontecimento de maior diferenciação celular, e menor produção de mineralização, participando de maneira importante da modulação temporal do processo de mineralização da matriz colágena, e pode, no futuro, com mais estudos, ser utilizada como um tratamento para a modulação de sítios de implantes de titânio. Em outros trabalhos, a hemina foi considerada como uma opção potencial tratamento para doenças caracterizadas pela geração de radicais de oxigênio como as doenças cardiovasculares.<sup>25</sup>

O presente estudo demonstrou que a migração celular em meio de cultura aumento em 24 horas para os grupos suplementados com hemina a 5 e 10 µg/ml. Outros estudos também reportaram que, em condições de 15%, a taxa de migração acelerou do dia 3 ao dia 6, e durante o dia 6 ao dia 8, a taxa de migração das células foi bastante acelerada. Após o dia 8, as células migraram significativamente para longe do seu local primário e a maior distância de migração foi 833,62 milímetros. Esse cenário era muito diferente da condição de menos de 5% de oxigênio, em que as células migraram menos.<sup>31</sup> A distância mais próxima entre as linhagens celulares também resultou na maior capacidade de migração celular. Além disso, quanto mais curtas as distâncias intercelulares, mais rápida é a migração das células.<sup>25</sup>

A alta geração de ROS pode resultar em uma migração celular mais lenta devido ao dano celular. Sob um microambiente de 21% de oxigênio, a geração de ROS manteve-se em baixa frequência porque poderia ser facilmente neutralizado

por defesas antioxidantes. O conteúdo de ROS abaixo de 5% de oxigênio era maior do que sob 21%, indicando que o equilíbrio de defesas antioxidantes pode ser quebrado. Durante as primeiras 24 horas, a geração de ROS em ambas as células foi maior do que após as 24 horas, o que é diferente para a migração celular. Além disso, na distância curta, o conteúdo de ROS era alto, demonstrando que a distância afetava a difusão de ROS.<sup>25</sup>

A literatura aqui reportada traz resultados similares aos obtidos na presente pesquisa e parecem explicar os processos observados, mas os resultados do presente estudo devem ser analisados com cautela já que este foi um estudo inicial do efeito da hemina em células precursoras ósseas, necessitando de mais testes futuros. No entanto, percebeu-se que as células pré-osteoblásticas apresentaram diferenças no padrão de proliferação, de diferenciação e mineralização celular na presença de diferentes concentrações de hemina. Quando expostas apenas ao meio osteogênico que incluiu um antioxidante como ácido ascórbico em sua composição, as células iniciaram sua diferenciação celular, marcada pela grande quantidade de corante Vermelho de Alizarina nas células. Em contrapartida, houve um atraso no início da mineralização celular para os grupos que receberam o meio osteogênico suplementado com hemina, possivelmente devido à presença de ROS, aos processos de internalização da hemina pelo receptor LRP1 e à formação de endossomos indutivos de autofagia ou mitofagia.

O presente estudo limitou-se por não realizar testes com expressão gênica ou de proteínas, mas estudos futuros que investiguem mais a fundo os mecanismos das células pré-osteoblásticas mediante a suplementação de hemina na osteogênese, auxiliarão para o entendimento dos fenômenos envolvidos no papel da hemina na ativação de reações celulares e modulação dos processos biológicos. Embora não tenha sido esse o objetivo deste trabalho, esse é o primeiro estudo que verificar o efeito da hemina em células MC3T3-E1, fazendo com que a comparação entre os resultados obtidos e a literatura existente seja complicado. E este foi o primeiro passo para entender o papel da hemina na cicatrização óssea, osteogênese e na osseointegração de implantes. A compreensão do papel da hemina na osteogênese possivelmente postergando a

mineralização, abre novos caminhos para se pensar o metabolismo ósseo durante os processos de cicatrização óssea e de osseointegração de implantes de titânio, além dos tratamentos que envolvam a osteoporose e a recuperação de fraturas.

## **6 CONCLUSÃO**

A suplementação com solução de hemina em baixas concentrações como 5 µg/ ml teve efeitos promissores para a proliferação celular, não interferindo com a diferenciação celular, mas postergando a mineralização celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Okinaga S, Takahashi K, Takeda K, et al. Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. *Blood*. 1996;87(12):5074-5084. doi:10.1182/blood.v87.12.5074.bloodjournal87125074
2. Takahashi T, Shimizu H, Morimatsu H, et al. Heme oxygenase-1 is an essential cytoprotective component in oxidative tissue injury induced by hemorrhagic shock. *J Clin Biochem Nutr*. 2009;44(1):28-40. doi:10.3164/jcbn.08-210-HO
3. Lee KS, Raymond LD, Schoen B, et al. Hemin interactions and alterations of the subcellular localization of prion protein. *J Biol Chem*. 2007;282(50):36525-36533. doi:10.1074/jbc.M705620200
4. Zwerina J, Tzima S, Hayer S, et al. Heme oxygenase 1 (HO-1) regulates osteoclastogenesis and bone resorption. *FASEB J*. 2005;19(14):2011-2013. doi:10.1096/fj.05-4278fje
5. Gu YZ, Hogenesch JB, Bradfield CA. The PAS superfamily: Sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2000;40:519-561. doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.519
6. Reick M, Garcia JA, Dudley C, McKnight SL. NPAS2: An analog of clock operative in the mammalian forebrain. *Science* (80- ). 2001;293(5529):506-509. doi:10.1126/science.1060699
7. Balsalobre A. Clock genes in mammalian peripheral tissues. *Cell Tissue Res*. 2002;309(1):193-199. doi:10.1007/s00441-002-0585-0
8. Honma S, Kawamoto T, Takagi Y, et al. Dec1 and Dec2 are regulators of the mammalian molecular clock. *Nature*. 2002;419(6909):841-844. doi:10.1038/nature01123
9. Yamada K, Miyamoto K. Basic helix-loop-helix transcription factors, BHLHB2 and BHLHB3; their gene expressions are regulated by multiple

extracellular stimuli. *Front Biosci.* 2005;10 (SUPPL. 3):3151-3171. doi:10.2741/1772

10. Langmesser S, Tallone T, Bordon A, Rusconi S, Albrecht U. Interaction of circadian clock proteins PER2 and CRY with BMAL1 and CLOCK. *BMC Mol Biol.* 2008;9. doi:10.1186/1471-2199-9-41

11. Schipani E. Hypoxia and HIF-1 $\alpha$  in chondrogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2005;16(4-5):539-546. doi:10.1016/j.semcdb.2005.03.003

12. Zuscik MJ, Hilton MJ, Zhang X, Chen D, O'Keefe RJ. Regulation of chondrogenesis and chondrocyte differentiation by stress. *J Clin Invest.* 2008;118(2):429-438. doi:10.1172/JCI34174

13. Mengatto CM, Mussano F, Honda Y, Colwell CS, Nishimura I. Circadian rhythm and cartilage extracellular matrix genes in osseointegration: A genome-wide screening of implant failure by vitamin D deficiency. *PLoS One.* 2011;6(1). doi:10.1371/journal.pone.0015848

14. Gatidis S, Föller M, Lang F. Hemin-induced suicidal erythrocyte death. *Ann Hematol.* 2009;88(8):721-726. doi:10.1007/s00277-009-0697-7

15. Gemelli C, Dongmo BM, Ferrarini F, Grande A, Corsi L. Cytotoxic effect of hemin in colonic epithelial cell line: Involvement of 18 kDa translocator protein (TSPO). *Life Sci.* 2014;107(1-2):14-20. doi:10.1016/j.lfs.2014.04.026

16. Goldstein L, Teng ZP, Zeserson E, Patel M, Regan RF. Hemin induces an iron-dependent, oxidative injury to human neuron-like cells. *J Neurosci Res.* 2003;73(1):113-121. doi:10.1002/jnr.10633

17. Grosso RA, Caldarone PVS, Sánchez MC, Chiabrando GA, Colombo MI, Fader CM. Hemin induces autophagy in a leukemic erythroblast cell line through the LRP1 receptor. *Biosci Rep.* 2019;39(1). doi:10.1042/BSR20181156

18. Hvidberg V, Maniecki MB, Jacobsen C, Højrup P, Møller HJ, Moestrup SK. Identification of the receptor scavenging hemopexin-heme complexes. *Blood.* 2005;106(7):2572-2579. doi:10.1182/blood-2005-03-1185

19. Lin X, Chen Q, Liu W, et al. Oxygen-induced cell migration and on-line monitoring biomarkers modulation of cervical cancers on a microfluidic system. *Sci Rep.* 2015;5. doi:10.1038/srep09643
20. Turner CP, Bergeron M, Matz P, et al. Heme oxygenase-1 is induced in glia throughout brain by subarachnoid hemoglobin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1998;18(3):257-273. doi:10.1097/00004647-199803000-00004
21. Wang JY, Lee YT, Chang PF, Chau LY. Hemin promotes proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via activation of AKT and ERK. *J Cell Physiol.* 2009;219(3):617-625. doi:10.1002/jcp.21711
22. Wang D, Si S, Wang Q, et al. MiR-27a Promotes Hemin-Induced Erythroid Differentiation of K562 Cells by Targeting CDC25B. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(1):365-374. doi:10.1159/000488436
23. West AR, Oates PS. Subcellular location of heme oxygenase 1 and 2 and divalent metal transporter 1 in relation to endocytotic markers during heme iron absorption. *J Gastroenterol Hepatol.* 2008;23(1):150-158. doi:10.1111/j.1440-1746.2007.05047.x
24. Yan WJ, Dong HL, Xiong LZ. The protective roles of autophagy in ischemic preconditioning. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(5):636-643. doi:10.1038/aps.2013.18
25. Yu CH, Jiang L, Wang Y, Cui NX, Zhao X, Yi ZC. Inhibition of Erythroid Differentiation of Human Leukemia K562 Cells by N-acetylcysteine and Ascorbic Acid through Downregulation of ROS. *Biomed Environ Sci.* 2018;31(3):247-251. doi:10.3967/bes2018.032
26. Yu CH, Suriguga, Li Y, et al. The role of ros in hydroquinone-induced inhibition of K562 cell erythroid differentiation. *Biomed Environ Sci.* 2014;27(3):212-214. doi:10.3967/bes2014.043
27. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, et al. Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(6):1254-1263. doi:10.1681/ASN.2008070788

28. Grosser N, Oberle S, Berndt G, Erdmann K, Hemmerle A, Schröder H. Antioxidant action of L-alanine: Heme oxygenase-1 and ferritin as possible mediators. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314(2):351-355. doi:10.1016/j.bbrc.2003.12.089
29. Ishikawa SI, Tamaki S, Ohata M, Arihara K, Itoh M. Heme induces DNA damage and hyperproliferation of colonic epithelial cells via hydrogen peroxide produced by heme oxygenase: A possible mechanism of hemeinduced colon cancer. *Mol Nutr Food Res.* 2010;54(8):1182-1191. doi:10.1002/mnfr.200900348
30. Grosso R, Fader CM, Colombo MI. Autophagy: A necessary event during erythropoiesis. *Blood Rev.* 2017;31(5):300-305. doi:10.1016/j.blre.2017.04.001
31. Rocha M, Zefa E, Rodrigues R, Timm J, Barcellos M. *Atividades Práticas Em Biologia Celular.* 1st ed. (Ed. UFPel, ed.); 2018. doi:10.15210/4154
32. Lang D, Reuter S, Buzescu T, August C, Heidenreich S. Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *Int Immunol.* 2005;17(2):155-165. doi:10.1093/intimm/dxh196
33. Grosso RA, Caldarone PVS, Sánchez MC, Chiabrando GA, Colombo MI, Fader CM. Hemin induces autophagy in a leukemic erythroblast cell line through the LRP1 receptor. *Biosci Rep.* 2019;39(1). doi:10.1042/BSR20181156
34. Lee D, Kook SH, Ji H, Lee SA, Choi KC, Lee KY, Lee JC. N-acetyl cysteine inhibits H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated reduction in the mineralization of MC3T3-E1 cells by down-regulating Nrf2/HO-1 pathway. *BMB Rep.* 2015 Nov;48(11):636-41. doi:10.5483/bmbrep.2015.48.11.112.
35. Wang D, Christensen K, Chawla K, Xiao G, Krebsbach PH, Franceschi RT. Isolation and Characterization of MC3T3-E1 Vivo Differentiation / Mineralization Potential. *J Bone Miner Res.* 1999;14(6):893-903.
36. 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 Biochem.* 2004;329(1):77-84. doi:10.1016/j.ab.2004.02.002

37. Stanford CM, Jacobson PA, Eanes ED, Lembke LA, Midura RJ. Rapidly forming apatitic mineral in an osteoblastic cell line (UMR 106-01 BSP). *J Biol Chem.* 1995;270(16):9420-9428. doi:10.1074/jbc.270.16.9420

## ANEXO



Universidade Federal do Rio Grande do Sul



Faculdade de Odontologia

## PARECER DA COMISSÃO DE PESQUISA

Parecer aprovado em reunião do dia 01 de abril de 2011 ATA 02/11.

A Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, após análise aprovou por estar adequado e metodologicamente de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o seguinte Projeto:

**PROJETO: N°20376. EFEITO DA HEMINA NA PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA E NA EXPRESSÃO DOS GENES NPAS2 E HEME-OXIGENASE-1 DURANTE A OSSEINTEGRAÇÃO *IN VITRO*.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Profa. CRISTIANE MACHADO MENGATTO**

**PESQUISADORES: Anna Christina de Medeiros Fossati**

Porto Alegre, 01 de abril de 2011.

Profa. Dra. Deise Ponzoni  
Coordenadora da Comissão de Pesquisa

Profa. Deise Ponzoni  
Coordenadora da COMPEP/2010