



## MODULAÇÃO DE GENES OSTEOGÊNICOS EM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATO INDUZIDA POR MELATONINA

Debora Behn<sup>1</sup>  
Bruno Paiva dos Santos<sup>2</sup>  
Melissa Camassola<sup>3</sup>

### Resumo

A melatonina é um hormônio produzido em órgãos e células, cujas funções biológicas estão relacionadas com ritmo circadiano, o ciclo sono-vigília, inibição do crescimento do tumor, função imunológica, proteção antioxidante e homeostase redox. Alguns sugerem que os efeitos biológicos e variados de melatonina podem também incluir uma função reguladora na diferenciação de células-tronco mesenquimais. O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o papel osteogênico da melatonina em células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea de rato. As células foram isoladas a partir de fêmur e tíbia e cultivadas em meio base e osteogênico contendo diferentes concentrações de melatonina. Após 3 e 7 dias de incubação, os genes *Runx2*, *Sp7* e *Bglap* foram analisados. Não observamos modulação na expressão de *Bglap*, porém quando a melatonina foi adicionada ao meio base, vimos aumento da expressão de *Runx2* e *Sp7* após 7 dias de indução. Já quando em meio osteogênico, observamos aumento da expressão de *Sp7* em 3 e 7 dias. Nossos resultados mostram que a melatonina é capaz de induzir aumento na expressão de dois importantes marcadores iniciais e intermediários da osteogênese em meios base e osteogênico, indicando o potencial osteoindutor da melatonina.

Palavras-chave: Células Estromais Mesenquimais; Diferenciação celular; Osteogênese.

### INTRODUÇÃO

A melatonina (N-acetil -5-metoxitriptamina) é uma indolamina originalmente isolada a partir de tecido pineal bovino). Posteriormente, foi reconhecido que, em mamíferos, durante o período noturno há um aumento nos níveis sanguíneos de melatonina e que isso é o resultado da sua síntese e secreção a partir da glândula pineal. No entanto, este produto de secreção pineal também é produzido em outros, talvez todos, órgãos e células incluindo a retina, intestino, ovário, testículos (REITER et al., 2013). Além disso, a melatonina é produzida em todos os organismos dos reinos das plantas (PAREDES et al., 2009; PARK et al., 2013) e dos animais (REITER et al., 2009).

Muitas funções biológicas de melatonina foram identificadas até agora em vários organismos. A melatonina influencia o ritmo circadiano, o ciclo sono-vigília, inibição do crescimento do tumor, a função imunológica e fornece proteção antioxidante e homeostase redox em tecidos (ACUNA-CASTROVIEJO et al., 2001; JARZYNKA et al., 2009; CARDINALI et al., 2012; HARDELAND et al., 2012; SALIDO et al., 2013).

Alguns sugerem que os efeitos biológicos e variados de melatonina podem também incluir uma função reguladora na diferenciação de células-tronco mesenquimais (MSCs, *mesenchymal stem cells*), um processo envolvido principalmente no desenvolvimento e

---

1 Aluno do curso de graduação em Biomedicina – Bolsista PIBIC/CNPq deborabehn@outlook.com

2 PPGBioSaúde - ULBRA – brnpaivas@gmail.com

3 Professor do curso de graduação em Medicina e PPGBioSaúde – melissa.camassola@ulbra.br

regeneração de tecidos, como ossos e tecido adiposo, por exemplo. Em MSCs derivadas de medula óssea (BMSCs, *bone marrow mesenchymal stem cells*), foi observado que a melatonina aumenta a osteogênese e inibe a adipogênese; como resultado, a melatonina pode mudar o destino de células precursoras da medula óssea, da diferenciação adipocítica para a diferenciação osteoblástica, que pode ser de grande importância no desenvolvimento de estratégias de reparação óssea. Tal evidência, no entanto, sugere implicações no controle fisiológico de componentes do tecido ósseo em que os efeitos da melatonina dependentes e independentes de receptores promovem a formação de tecido e evitam a degradação (ZHANG et al., 2013).

O presente trabalho tem como objetivo caracterizar o papel osteogênico da melatonina em MSCs derivadas de medula óssea (rBMSCs) de rato.

## METODOLOGIA

*Animais.* Foram utilizadas células de três ratos fêmeas da linhagem Lewis, com aproximadamente quatro semanas de idade. O uso dos animais foi aprovado pela Comissão de Ética da FEPPS (MEMO no. 02/201, 07 de agosto de 2013).

*Isolamento e cultivo de rBMSCs.* Para obtenção das rBMSCs, o conteúdo da medula óssea foi retirado da tíbia e do fêmur por punção com seringa contendo meio HDMEM e Hepes (referenciado neste trabalho como CCM). As células foram plaqueadas e cultivadas no mesmo meio em 5% de CO<sub>2</sub> a 37 ° C. Após o isolamento, o meio de cultura foi substituído depois de 72 h em cultura. Para manutenção das células em cultura, o meio foi trocado duas vezes por semana, juntamente com a remoção das células não aderentes. As células aderentes foram tripsinizadas e expandidas cada vez que atingiram 80-90 % de confluência.

As células foram plaqueadas com densidade de 10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup> e mantidas durante 3 a 7 dias em meio osteogênico ou CCM (controle). Para a definição dos grupos experimentais, a melatonina foi adicionada em CCM e em CCM-O (meio osteogênico, composto de CCM suplementado com 10<sup>-8</sup> M de dexametasona, 5 µg ácido ascórbico 2-fosfato mL<sup>-1</sup>, e 10 mM de fosfato de β-glicerol) nas concentrações de 10<sup>-9</sup> M a 10<sup>-5</sup> M, onde o veículo (DMSO 0,001%) se manteve sempre na mesma concentração para todos os grupos. Seu efeito também foi avaliado. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. Todos os experimentos foram realizados com as células entre passagens 3 e 6 e em triplicata.

*Extração de RNA, Síntese de cDNA e Expressão Gênica.* O RNA foi extraído usando o reagente TRIzol (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA). 500 ng de RNA foram usadas como molde para a síntese de cDNA com o kit da transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) seguindo as instruções do fabricante. Cada reação de RT-qPCR continha cDNA diluído 1:30, usando *Syber Green* para detecção das amplificações nas seguintes condições: 94 °C 5 min seguido de 40 ciclos de 94 °C por 15 s, 60 °C por 10 s, 72 °C por 15 s; *holding stage* a 60 °C por 35 s; 95 °C por 15 e curva de dissociação partindo de 60 °C por 1 min até 95 °C com acréscimo de 0,3 °C cada 15 s. Todas as amostras tiveram a curva de dissociação analisada para garantir a amplificação única. Os genes analisados foram *Runx2*, *Bglap* (osteocalcina) e *Sp7* (Osterix, Osx) e a sequência dos primers está disponível a Tabela 1. Para a quantificação relativa da expressão gênica, o método 2<sup>-DDCt</sup> foi utilizado. Os genes *Ppia* e *Hprt1* foram utilizados como normalizadores.

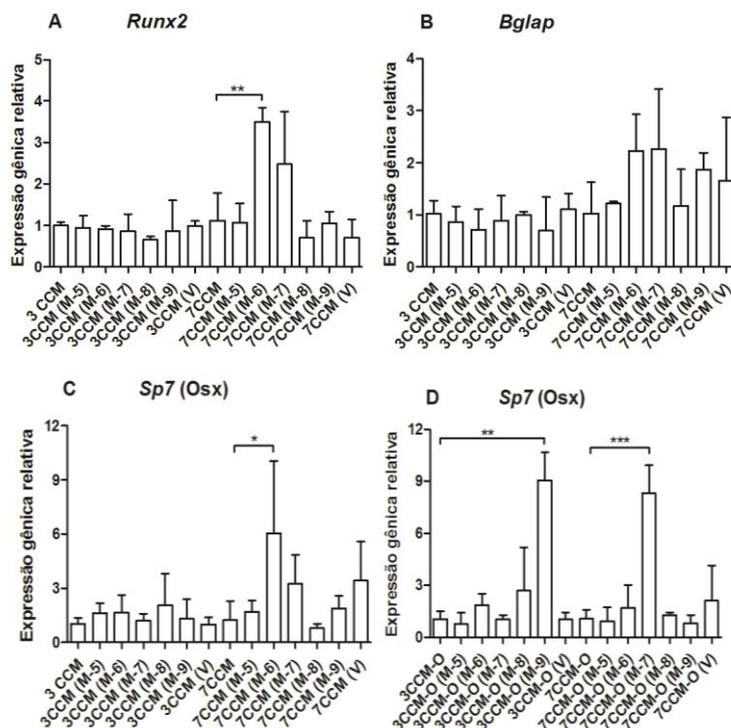
*Análise Estatística.* Os dados são expressos em média ± desvio padrão. A diferença entre os grupos foi analisada utilizando Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA) no teste One-Way ANOVA seguido de Dunnet como post-hoc. Uma diferença de p < 0,05 foi considerada estatisticamente significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de melatonina testadas neste estudo foram decididas após revisão na literatura. Os trabalhos que fizeram parte da revisão envolvem tipos celulares humanos e murinos e as concentrações descritas abrangem níveis farmacológicos e fisiológicos (BLACKMAN et al., 2001; RADIO et al., 2006; ZHANG et al., 2010). Essas concentrações foram usadas com o intuito de avaliar o potencial de indução de osteogênese da melatonina.

A modulação na expressão gênica de *Runx2*, *Sp7* e *Bglap* foram verificadas em 3 e 7 dias e nos meios CCM e CCM-O (Figura 1). Para essas análises, as diferentes concentrações de melatonina foram comparadas em relação ao controle correspondente no mesmo tempo analisado: CCM ou CCM-O sem melatonina. A expressão de *Runx2* (Figura 1) teve um aumento em 3,49 X na sua expressão quando a melatonina é adicionada ao meio CCM na concentração  $10^{-6}$  M ( $p < 0,01$ ) em 7 dias. A mesma concentração em CCM também aumentou a expressão de *Sp7* (Figura 1C) em 6,05 X ( $p < 0,05$ ) em 7 dias. Já em *Bglap* (Figura 1B), não observamos diferença estatística entre os grupos. Nossos resultados mostram que a melatonina é capaz de induzir aumento na expressão de dois importantes marcadores iniciais e intermediários da osteogênese na ausência de meio indutor osteogênico. Achados similares foram descritos por Matsumura e colaboradores (2014), que estudaram a regulação do gene da sialoproteína óssea, um importante marcador osteogênico, na linhagem de osteossarcoma humano Saos2 (MATSUMURA; OGATA, 2014). Eles mostraram o aumento na expressão desse gene após 12 h de exposição à melatonina nas concentrações  $10^{-8}$  M e  $10^{-7}$  M na ausência do meio indutor. Juntos estes dados reforçam o potencial osteoindutor da melatonina.

Figura 1. Expressão os genes *Runx2*, *Bglap* e *Sp7* (*Osx*) em rBMSCs em diferentes concentrações de melatonina em CCM ( $M 10^{-X}$ ), CCM-O ( $M 10^{-X}$ ) ou veículo (V) em 3 e 7 dias (números indicados antes de cada tratamento). Os asteriscos indicam diferença estatística. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ . Foram usados os genes *Ppia* e *Hprt1* como normalizadores.



Quando a melatonina é adicionada em CCM-O, também observamos modulação na expressão de *Sp7* (Figura 1D). Em 3 dias, houve o aumento de 9,06 X ( $p < 0,01$ ) na concentração de  $10^{-9}$  M de melatonina. Em 7 dias, houve aumento de 8,31 X ( $p < 0,001$ ) na expressão de *Sp7* quando a melatonina é adicionada na concentração de  $10^{-7}$  M.

O aumento na expressão de outros marcadores osteogênicos quando a melatonina é adicionada em meio osteogênico já foi visto em outros trabalhos. Zhang e colaboradores (2010) observaram aumento na expressão de *RUNX2* em 3, 6 e 12 dias e *ALPL*, *SPP1* (osteopontina) e *BGLAP* em 12 dias em BMSC humanas a  $10^{-4}$  M de melatonina em meio osteogênico (Zhang et al., 2010). Adicionalmente, a ação da melatonina em outros sistemas de cultura também foi estudada. Son e colaboradores (2014) estudaram o efeito da melatonina em células MC3T3-E1 em condições de hipóxia em meio osteogênico (Son et al., 2014). Eles mostraram o aumento de marcadores osteogênicos como *Runx2* e também viram a ação forma dose-dependente para *Sp7* e *Bglap*. Para estes resultados, as células foram expostas nas concentrações de  $10^{-5}$  M a  $2,5 \times 10^{-4}$  M. Estas concentrações são bem maiores do que aquelas utilizadas nos estudos citados aqui.

## CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a melatonina possui efeito osteogênico sobre as rBMSCs, induzindo o aumento da expressão de genes como *Runx2* e *Sp7*. Este efeito osteoindutor é observado quando a melatonina é adicionada tanto em meio osteogênico como em meio base.

## REFERÊNCIAS

- ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; MARTÍN, M., MACÍAS, M.; et al. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. **Journal of Pineal Research**, v.2, p. 65-74, 2001.
- BLACKMAN, C.F. ; ANDREWS, P.W. ; UBEDA, A. ; et al. Physiological levels of melatonin enhance gap junction communication in primary cultures of mouse hepatocytes. **Cell Biology Toxicology**, v. 1, p. 1-9, 2001.
- CARDINALI, D.P. ; SRINIVASAN, V. ; BRZEZINSKI, A. ; et al. Melatonin and its analogs in insomnia and depression. **Journal of Pineal Research**, v.4, p. 365-375, 2012.
- HARDELAND, R.; MADRID, J.A.; TAN, D.X.; et al. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. **Journal of Pineal Research**, v. 2, p. 139-166, 2012.
- JARZYNKA, M.J.; PASSEY, D.K.; JOHNSON, D.A.; et al. Microtubules modulate melatonin receptors involved in phase-shifting circadian activity rhythms: in vitro and in vivo evidence. **Journal of Pineal Research**, v. 2, p. 161-171, 2009.
- MATSUMURA, H. ;OGATA ; Y. Melatonin regulates human bone sialoprotein gene transcription. **Journal of Oral Science**, v. 1, p. 67-76, 2014.
- PAREDES, S.D.; KORKMAZ, A.; MANCHESTER, L.C.; et al. Phytomelatonin: a review. **The Journal of Experimental Botany**, v.1, p. 57-69, 2009.
- PARK, S.; BYEON, Y.; BACK, K. Functional analyses of three ASMT gene family members in rice plants. **Journal of Pineal Research**, v. 4, p. 409-415, 2013.
- RADIO, N.M.; DOCTOR, J.S.; WITT-ENDERBY, P.A. Melatonin enhances alkaline phosphatase activity in differentiating human adult mesenchymal stem cells grown in

osteogenic medium via MT2 melatonin receptors and the MEK/ERK (1/2) signaling cascade. **Journal of Pineal Research** , v.4 ; p. 332-342, 2006.

REITER, R.J.; PAREDES, S.D.; MANCHESTER, L.C.; et al. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 4, p. 175-200, 2009.

REITER, R.J.; TAN, D.X.; ROSALES-CORRAL, S.; et al. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 373-384, 2013.

SON, J.H.; CHO, Y.C.; SUNG, I.Y.; et al. Melatonin promotes osteoblast differentiation and mineralization of MC3T3-E1 cells under hypoxic conditions through activation of PKD/p38 pathways. **Journal of Pineal Research**, v. 4, p. 385-392, 2014.

ZHANG, L.; SU, P.; XU, C.; et al. Melatonin inhibits adipogenesis and enhances osteogenesis of human mesenchymal stem cells by suppressing PPARgamma expression and enhancing Runx2 expression. **Journal of Pineal Research**, v. 4, p. 364-372, 2010.

ZHANG, L.; ZHANG, J.; LING, Y.; et al. Sustained release of melatonin from poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) microspheres to induce osteogenesis of human mesenchymal stem cells in vitro. **Journal of Pineal Research**, v. 1, p.24-32, 2013.