

CONIC SEMESP

15º Congresso Nacional de Iniciação Científica

TÍTULO: ESTEROIDES OVARIANOS MODULAM A VIABILIDADE DE OSTEOLASTOS CULTIVADOS NA AUSÊNCIA E NA PRESENÇA DE SORO FETAL BOVINO

CATEGORIA: CONCLUÍDO

ÁREA: CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E SAÚDE

SUBÁREA: MEDICINA

INSTITUIÇÃO: CENTRO UNIVERSITÁRIO DE ARARAQUARA

AUTOR(ES): LUCAS FERNANDO CHICHETO BRANCAGLIÃO, CAIO HENRIQUE NEGRÃO RABESQUINE, JOSÉ EDUARDO SENEDA LEMOS, NICOLAS FERNANDO ROCHA, VITOR MARTINS GONÇALVES

ORIENTADOR(ES): LUÍS HENRIQUE MONTREZOR

COLABORADOR(ES): ANDRÉ CAPALDO AMARAL, RENATA AQUINO DE CARVALHO, WILTON ROGÉRIO LUSTRI

Realização:



Apoio:



1 – RESUMO

A síndrome do ovário policístico (SOP), é uma endocrinopatia metabólica de etiologia desconhecida, multifatorial e caracterizada por anovulação crônica, oligomenorreia, hiperandrogenismo, infertilidade e ovário policístico. A remodelagem óssea envolve a remoção contínua de osso seguida da síntese de nova matriz óssea e mineralização subsequente. A interação das funções dos osteoblastos e osteoclastos é essencial à regulação hormonal da renovação óssea. Os esteroides sexuais podem atuar sobre o número de ciclos de remodelação óssea agindo sobre os osteoclastos e osteoblastos. Como a SOP pode alterar as concentrações plasmáticas dos esteroides ovarianos e, tais hormônios, atuam sobre o metabolismo ósseo, conhecer alguns destes mecanismos celulares utilizando a cultura de osteoblastos, é importante para a geração de conhecimentos básicos e clínicos.

2 – INTRODUÇÃO

A remodelagem óssea é um processo ativo e contínuo que requer o equilíbrio entre a formação e a reabsorção ósseas. O desequilíbrio entre esses mecanismos pode desencadear patologias como osteopenia, osteoporose e osteomalacia¹. A massa óssea e a atividade osteoblástica bem como a proliferação e diferenciação dos precursores dos osteoblastos são regulados por vários fatores, incluindo hormônios, fatores de crescimento e citocinas^{2,3}. A fase de formação óssea é iniciada, por fatores produzidos pelos osteoclastos e/ou pela matriz óssea e envolve a produção de matriz pelos osteoblastos⁴. Sabe-se que osteoblastos e osteoclastos expressam receptores para os hormônios esteroides progesterona (P4), estradiol (E2) e testosterona (T), o que demonstra que tais hormônios modulam os processos do metabolismo ósseo⁵. As ações androgênicas sobre as atividades de remodelagem óssea podem ser diretas e/ou indiretas. As ações diretas são consequência da ligação da T diretamente aos receptores nucleares das células ósseas. As ações indiretas dependem da conversão da T em E2 pela enzima CYP11A1 (P450 aromatase)⁶. Evidências clínicas das ações androgênicas sobre a massa óssea de mulheres com hirsutismo, doença do ovário policístico e tumores ovarianos secretores de andrógenos, demonstram aumento na densidade óssea^{7,8,9}. Os andrógenos estimulam a proliferação e a diferenciação dos osteoblastos, além de elevar a síntese de proteínas da matriz extracelular e estimular a mineralização da mesma¹⁰. A SOP é uma endocrinopatia metabólica em mulheres na fase de vida reprodutiva e uma das mais frequentes causas de hiperandrogenismo e anovulação,

e pode ser caracterizada por anovulação crônica, oligomenorreia ou amenorreia, hiperandrogenismo, infertilidade e ovário policístico^{11,12}. É reconhecida por apresentar componentes metabólicos como hiperinsulinemia e resistência à insulina que a correlacionam com aumento na probabilidade de doenças cardiovasculares^{13,14}. Estudos demonstram que 68% de mulheres com insuficiência ovariana primária (IOP) e alterações plasmáticas de E2 e P4, têm menor densidade óssea comparada à mulheres na pré-menopausa, além de maior prevalência de osteopenia/osteoporose comparado à mulheres após menopausa¹⁵.

2 - OBJETIVOS

2.1 - Geral

O objetivo do presente projeto foi analisar os efeitos de esteroides ovarianos sobre a adesão e viabilidade osteoblastos *in vitro*.

2.2 - Específicos

Linhagens de osteoblastos foram mantidas em cultura e desafiadas com diferentes concentrações (0, 10^{-8} M, 10^{-7} M) de P4, E2 e T; diferentes tempos de cultura (48h e 72h), na ausência e na presença de soro fetal bovino (SFB).

3. METODOLOGIA

3.1 - Cultura dos Osteoblastos

Para as análises *in vitro* foram utilizadas as linhagens de osteoblastos OSTEO-1. As células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas em meio de cultivo modificado de Eagle's (DMEM - Cultilab), suplementado ou não com 10% de SFB (Cultilab), Penicilina (100 U/mL - Cultilab) e Estreptomicina (100 µg/mL - Cultilab), a 37 °C, em atmosfera umedificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. P4, E2 e T (Sigma Aldrich) foram testados em diferentes concentrações (0, 10^{-7} M e 10^{-8} M), mimetizando suas concentrações plasmáticas em fêmeas adultas normais. Cada um dos esteroides foi adicionado, isoladamente e em conjunto, aos poços contendo 5.000 células. Cada teste foi realizado em triplicata.

3.2 -Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada após 48 e 72 horas de incubação, e realizada pelo ensaio colorimétrico MTT brometo de {[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]}. Alíquotas de MTT foram preparadas para medida colorimétrica em espectrofotômetro (570 nm).

3.3 - Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio de teste paramétrico ou não-paramétrico, para dados independentes e mais de duas amostras (ANOVA ou teste de Kruskal-Wallis, respectivamente, no caso de haver ou não distribuição amostral normal e homogeneidade de variâncias), seguido de teste de comparações múltiplas, quando aplicável. O nível de significância estatística estabelecido foi de 5%.

4- DESENVOLVIMENTO

Os resultados apresentados são produtos de cinco baterias de culturas celulares. A sequência dos experimentos desde a adequação da temperatura do meio de cultura para 37° C, cabine de fluxo laminar utilizada para todos os experimentos, obtenção das células, centrifugação das células, sedimentação das células após centrifugação, contagem das células viáveis, plaqueamento das células, manutenção das células em estufa e adição do MTT para análise da viabilidade celular.

5- RESULTADOS

Observa-se, na figura 1, os efeitos de diferentes concentrações de estradiol sobre a densidade ótica de osteoblastos mantidos em cultura por 48 e 72 horas, na ausência e na presença de 10% de SFB. No grupo de células mantidas em cultura por 48 horas em meio que não continha o SFB, observa-se aumento significativo da viabilidade celular para ambas as concentrações estudadas em relação ao grupo controle (Fig. 1-A). A viabilidade celular para as células mantidas em cultura por 72 horas, sem SFB, foi maior para ambas as concentrações de E2 quando comparadas ao grupo sem E2 (Fig. 1-A). No grupo cultivado por 48 horas com meio contendo soro fetal bovino, nota-se um declínio significativo da viabilidade celular na concentração de 10^{-7} M em relação ao controle, porém na concentração de 10^{-8} M não ocorreu alteração significativa em relação ao grupo controle; contudo, observa-se aumento da densidade ótica em relação ao grupo desafiado com a concentração de 10^{-7} M (Fig. 1-B). A viabilidade celular foi significativamente maior para as células cultivadas por 72 horas quando comparadas àquelas cultivadas por 48 horas, para todas as doses de E2, na presença e na ausência de SFB.

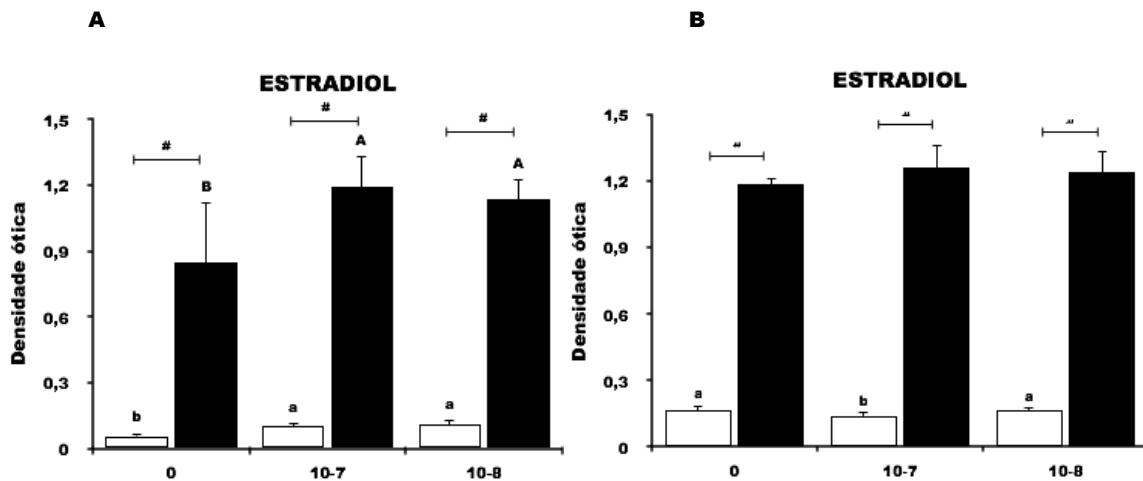


Figura 1 – Efeitos de diferentes concentrações (0, 10⁻⁷M e 10⁻⁸M) de estradiol sobre a densidade ótica de osteoblastos mantidos por 48 horas (barras branca) e 72 horas (barras pretas) em cultura sem (A) e com (B) soro fetal bovino. Letras minúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 48 horas. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 72 horas. # representa diferença entre os grupos. (p<0.05).

A figura 2 apresenta os resultados dos efeitos da progesterona sobre os osteoblastos mantidos em cultura por 48 e 72 horas, na ausência e na presença de 10% de SFB. Observa-se que para o grupo de células mantidas em cultura por 48 horas em meio sem o SFB, houve um aumento da viabilidade celular na concentração de 10⁻⁷ M em relação aos grupos controle e 10⁻⁸ M (Fig. 1-A). Quando as células foram mantidas em cultura por 72 horas na ausência de SFB, observa-se que ambas as concentrações de P4 estimularam a viabilidade celular comparadas as células do grupo sem P4 (Fig. 1-A). As células cultivadas por 72 horas, na ausência e na presença de SFB, para ambas as concentrações de P4 estudadas, apresentaram maior viabilidade celular comparadas às células cultivadas por 48 horas.

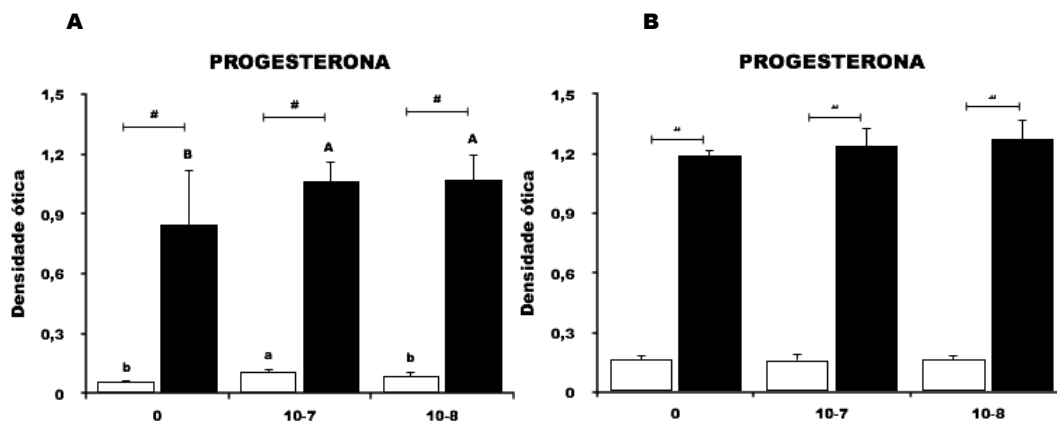


Figura 2 – Efeitos de diferentes concentrações (0, 10⁻⁷M e 10⁻⁸M) de progesterona sobre a densidade ótica de osteoblastos mantidos por 48 horas (barras branca) e 72 horas (barras pretas) em cultura sem (A) e com (B) soro fetal bovino. Letras minúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 48 horas. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 72 horas. # representa diferença entre os grupos. (p<0.05).

A figura 3 representa os resultados de diferentes concentrações de T sobre a viabilidade das células cultivadas durante 48 e 72 horas na ausência e na presença de 10% de soro fetal bovino. Pode-se observar que a testosterona, nas concentrações de 10^{-7} M e 10^{-8} M, aumentou a densidade ótica das células cultivadas em meio sem o SFB em comparação ao grupo controle (Fig. 3-A). Em relação às células mantidas em cultura por 72 horas na ausência de SFB, observa-se a maior viabilidade celular na concentração de 10^{-7} M de P4, enquanto na concentração de 10^{-8} M observa-se a menor viabilidade celular em relação aos demais grupos (Fig. 3-A). Na presença de SFB, para as células cultivadas por 72 horas de cultura, observa-se redução da viabilidade celular na concentração 10^{-8} M comparada aos demais grupos (Fig. 3-B). Para todas as concentrações de T analisadas, na ausência e na presença de 10% de SFB, observa-se maior viabilidade celular para as culturas de 72 horas comparadas às de 48 horas.

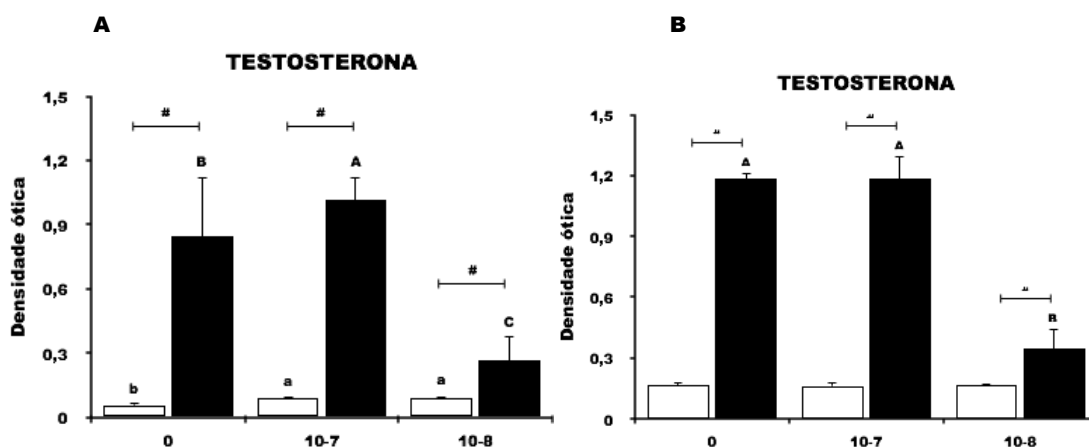


Figura 3 – Efeitos de diferentes concentrações (0, 10^{-7} M e 10^{-8} M) de testosterona sobre a densidade ótica de osteoblastos mantidos por 48 horas (barras branca) e 72 horas (barras pretas) em cultura sem (A) e com (B) soro fetal bovino. Letras minúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 48 horas. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 72 horas. # representa diferença entre os grupos. ($p < 0,05$).

Os resultados dos efeitos das associações entre os hormônios (E2 + P4 + T) sobre a densidade ótica de osteoblastos mantidos em 48 e 72 horas de cultura, na ausência e na presença de 10% de SFB, podem ser observados na figura 4. Observa-se maior viabilidade celular nas concentrações 10^{-7} M em relação aos demais grupos e, nas concentrações 10^{-8} M há maior viabilidade em relação ao grupo controle, porém menor viabilidade em relação ao grupo 10^{-7} M, para as células cultivadas por 72 horas na ausência de 10% de SFB (Fig. 4-A). Observa-se diminuição da viabilidade das células mantidas por 48 horas de cultura, em meio de

cultura contendo o SFB, quando foram adicionados os hormônios nas concentrações de 10^{-7} M em relação aos demais grupos (Fig. 4-B). Para as células cultivadas por 72 horas na presença de SFB, há redução da viabilidade nas concentrações 10^{-8} M comparada ao grupo controle e ao grupo 10^{-7} M (Fig. 4-B). A viabilidade celular foi maior para as células mantidas em cultura por 72 horas quando comparadas com as células cultivadas por 48 horas, para todas as doses estudadas, na ausência e na presença do SFB.

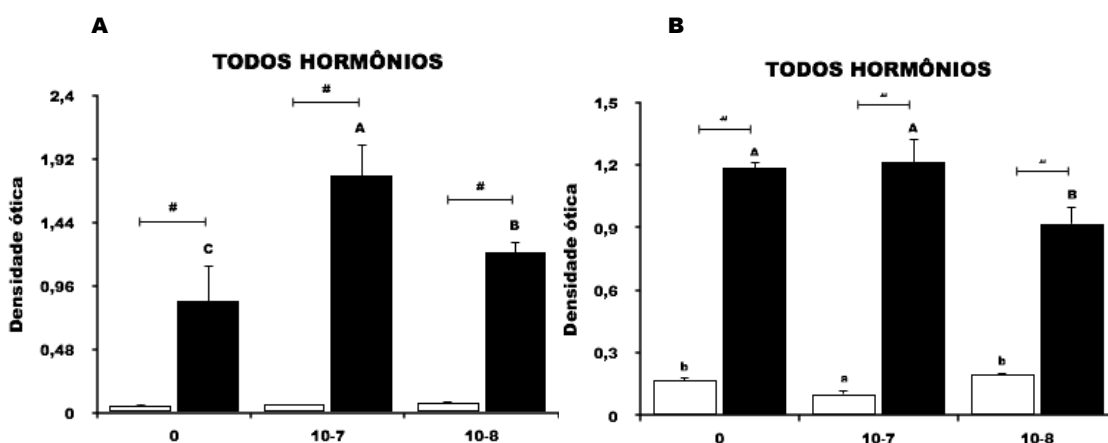


Figura 4 – Efeitos de diferentes concentrações (0, 10^{-7} M e 10^{-8} M) de estradiol + progesterona + testosterona sobre a densidade óptica de osteoblastos mantidos por 48 horas (barras branca) e 72 horas (barras pretas) em cultura sem (A) e com (B) soro fetal bovino. Letras minúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 48 horas. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças dentro do grupo 72 horas. # representa diferença entre os grupos. ($p < 0,05$).

5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho apresenta resultados sobre a viabilidade de osteoblastos cultivados por até 72 horas, na ausência e na presença de 10% de soro fetal bovino, desafiados com diferentes concentrações de estradiol, progesterona, testosterona e estradiol + progesterona + testosterona. Os resultados observados mostram que as células mantidas por 72 horas em cultura têm maior viabilidade quando comparadas às células cultivadas por 48 horas, para todos os hormônios (isolados ou em conjunto), nas diferentes concentrações e na ausência e na presença de SFB estudados. Além disso, os resultados obtidos com as culturas realizadas com a adição de SFB podem ter sido mascarados por componentes presentes nesse soro, porque os mesmos esteroides, nas mesmas concentrações, isolados ou em conjunto, e nos mesmos tempos de cultura apresentaram efeitos significantes para as culturas sem SFB e não apresentaram efeitos estatisticamente significantes quando as células foram cultivadas na presença do soro.

Os esteroides sexuais podem apresentar efeitos não genômicos sobre as atividades de células ósseas. Além disso, há resultados que mostram efeitos anti-apoptóticos de estrógenos e andrógenos sobre osteoblastos cultivados *in vitro*. Tais efeitos são mediados por vias de sinalização dependentes de Src/Shc/ERK após interações entre tais esteroides com seus receptores intranucleares clássicos¹⁶. Os resultados do presente trabalho, apesar de mostrarem efeitos do E2 e da T sobre a viabilidade de osteoblastos *in vitro*, ainda não apresenta resultados moleculares que demonstrem as vias de ações dos esteroides nas células cultivadas; contudo, sugere-se que tais efeitos sejam dependentes da interação desses esteroides com seus respectivos receptores nucleares presentes nos osteoblastos.

Verhaar et al., demonstraram que o estradiol tem efeito na diferenciação dos osteoblastos, enquanto a progesterona tem efeito significativo na proliferação dessas células. Além disso, quando ambos os hormônios foram utilizados juntos na cultura, não houve alterações significativas na proliferação nem na diferenciação dessas células¹⁷. Os resultados do presente trabalho demonstram que o E2 tem efeitos sobre a viabilidade dos osteoblastos mantidos em cultura por 48 e 72 horas, na presença e ausência de soro fetal bovino. Também observou-se efeitos da progesterona sobre a viabilidade celular. Esses efeitos foram observados quando os hormônios foram utilizados isoladamente, assim como quando foram utilizados em conjunto.

Sabe-se que o estradiol inibe a osteoclastogênese, inibindo o fator de transcrição RUNX-2 e a resorção óssea mediante a inserção de RANKL nas membranas dos osteoblastos; justificando a ação de “proteção” óssea¹⁸. Estrógenos regulam a proliferação de osteoblastos, a expressão gênica para enzimas, a síntese de proteínas da matriz óssea, modula a expressão de receptores nas células ósseas para outros hormônios, assim como para fatores de crescimento e citocinas¹⁹. Como exposto anteriormente, no presente trabalho não há resultados sobre eventos moleculares nas células em cultura; porém, há efeitos do estradiol sobre a viabilidade celular e, sendo assim, modulando a atividade celular, pode-se inferir que em situações onde haja alterações dos níveis plasmáticos desse esteroide, como na SOP, pode-se imaginar alterações na dinâmica dos osteoblastos.

Culturas de osteoblastos de um dia, em meio livre de soro e livre de vermelho de fenol, mostram que E2 e P4, isoladamente, nas concentrações de 10^{-10} M,

estimularam a síntese de DNA e o crescimento de osteoblastos. A P4 foi mais potente na estimulação do crescimento celular em relação ao E2, e o E2 foi mais potente na indução da diferenciação celular, comprovado pelo aumento na atividade de fosfatase alcalina (FA). Os dois hormônios juntos mantiveram os resultados da FA e aumentaram ainda mais a síntese de DNA dos osteoblastos²⁰. Os resultados apresentados pelo presente trabalho mostram que houve diferenças na viabilidade dos osteoblastos cultivados sem e com 10% de SFB, diante de diferentes concentrações de E2 e P4, isoladamente ou em conjunto; dessa forma, pode-se inferir que o sistema de cultura proposto é eficaz para as análises realizadas diante das ações dos esteroides em até 72 horas de cultura.

Estudos *in vitro* demonstraram que tanto a testosterona quanto a diidrotestosterona (DHT) modulam a proliferação celular de células progenitoras de osteoblastos em diferentes espécies^{21,22,23,24}. Os efeitos controversos envolvem estimulação, inibição ou nenhum efeito sobre a atividade da FA, síntese de colágeno tipo I, síntese e liberação de osteocalcina e mineralização da matriz extracelular^{25,26}. Esses resultados conflitantes se devem a diferenças na presença de receptores, nas espécies de animais utilizadas para os estudos, de qual osso os osteoblastos foram obtidos ou do estágio de diferenciação dessas células. Entretanto, estudos indicam que os andrógenos induzem maior diferenciação no fenótipo dos osteoblastos. Kousteni et al., demonstraram que andrógenos diminuem a apoptose de osteoblastos e de osteócitos²⁷. Nossos resultados demonstram que nas concentrações de T utilizadas, houve modulações na viabilidade dos osteoblastos tanto na ausência como na presença de SFB, tanto em 48 horas quanto em 72 horas de cultura. Esses resultados sugerem que as células viáveis são essenciais para quaisquer atividades relacionadas à dinâmica óssea, tanto em situações normais quanto em situações clínicas, como por exemplo na SOP. Ratas com SOP induzida com valerato de estradiol demonstram hiperandrogenemia²⁸. Tal alteração plasmática pode influenciar a atividade dos osteoblastos no equilíbrio da dinâmica óssea o que justifica importantes modificações na resistência óssea diante de algumas patologias relacionadas a desequilíbrios envolvendo andrógenos ovarianos.

O soro fetal bovino é frequentemente utilizado na suplementação de meios de cultura porque contém componentes biológicos como ácidos graxos, fatores de crescimento, aminoácidos, vitaminas e hormônios, incluindo estrógenos²⁹. Portanto,

a utilização de SFB em culturas de células pode interferir nos resultados dos experimentos relacionados à manutenção, divisão e diferenciação celulares³⁰. Além disso, o uso desse complemento pode ser um sério problema por se tratar de um componente natural, onde cada amostra pode apresentar diferenças em suas composições³¹. Os resultados do presente trabalho demonstram que houve diferenças na viabilidade dos osteoblastos quando as células foram mantidas sem ou com 10% de SFB. Tais diferenças podem ser observadas para todos os hormônios estudados, assim como para ambos os tempos de cultura. A não utilização de SFB em culturas de células é importante para que se possa analisar os efeitos dos esteroides diretamente relacionados às concentrações dos mesmos, uma vez que o SFB, apesar de ser essencial para algumas etapas da cultura de algumas células e tecidos, pode conter hormônios e fatores de crescimento e, tais substâncias, podem interagir com os receptores dos esteroides ovarianos alterando os efeitos celulares e, portanto, os resultados obtidos.

Nossos resultados sugerem que a cultura de osteoblastos proposta é viável para que se possa utilizá-la como ferramenta para estudos relacionados com a dinâmica celular e com controles hormonais sobre mecanismos funcionais assim como em situações clínicas, como a síndrome do ovário policístico.

7- FONTES CONSULTADAS

1. Sai, SQ, Yu, LP, Shi, X, Wu, H, Shao, P, Yin, GY, Wei, YZ. Serotonin regulates osteoblast proliferation and function in vitro. **Braz J Med Biol Res.** 47(9): 759-765, 2014.
2. Anastasilakis, AD, Polyzos, SA, Delaroudis, S, Bisbinas, I, Sakellariou, GT, Gkiomisi A. The role of cytokines and adipocytokines in zoledronate-induced acute phase reaction in postmenopausal women with low bone mass. **Clin Endocrinol.** 77:816-822, 2012.
3. Vescini, F, Grimaldi, F. PTH 1-84: bone rebuilding as a target for the therapy of severe osteoporosis. **Clin Cases Miner Bone Metab.** 9:31-36, 2012.
4. Raisz, LG. Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects. **J. Clin. Invest.** 115:3318-3325, 2005.
5. Spelsberg, TC, Subramaniam, M, Riggs, BL, Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. **Molecular Endocrinology.**13(6): 819-828, 1999.
6. Balasch, J. Sex steroids and bone: current perspectives. **Hum. Reprod. Update.** 3:201-222, 2003
7. Gregoriou, O, Kouskouni, E, Bakas, P, Konidaris, S, Papadimas, K, Kalovidouris, A, Creatsas, G. Bone mineral density in women with idiopathic hirsutism. **Gynecol. Endocrinol.** 14:364-368, 2000
8. Zborowski, JV, Cauley, JA, Talbott, EO, Guzick, DS.; Winters, SJ. Bone mineral density, androgens and the polycystic ovary: the complex and controversial issue and androgenic influence in female bone. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 67:937-943, 2000.
9. Castelo-Branco, C, Gómez, O, Pons, F, Martínez de Osaba, MJ, Balasch, J, Vanrell, JA. Secreting ovarian tumors may protect women from osteoporosis. **Gynecol. Oncol.** 88:149-152, 2003.
10. Notelovitz, M. Androgen effects on bone and muscle. **Fertil. Steril.** 77(Suppl. 4):S34-S41, 2002a.

11. Carmina, E, Rosato, F, Janni, A, Rizzo, M, Longo RA. Extensive clinical experience: relative prevalence of different androgen excess disorders in 950 women referred because of clinical hyperandrogenism. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 91:2–6, 2006.
12. Ehrmann, DA. Polycystic ovary syndrome. **N. Engl. J. Med.** 352:1223–36, 2012.
13. Dunaif, A. Insulin resistance and the polycystic ovary syndrome: mechanism and implications for pathogenesis. **Endocr. Rev.** 8:774-800, 1997.
14. Legro, RS. Polycystic ovary syndrome and cardiovascular disease: a premature association? **Endocr. Rev.** 24:302-12, 2003.
15. Amarante, F, Vilodre, LC, Maturana, MA, Spritzer, PM. Women with primary insufficiency have lower bone mineral density. **Braz. J. Med. Res.** 44(1):78-83, 2011.
16. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, Han K, DiGregorio GB, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Roberson PK, Weinstein RS, Jilka RL, Manolagas. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. **Cell** 104:719–730, 2001.
17. Verhaar, HJ.;Damen, CA.; Duursma, SA.; Scheven, BAA. Comparison of the action of 17 beta-estradiol and progestins with insulin-like growth factors-I/II and transforming growth factor-beta 1 on the growth of normal adult human bone-forming cells. **Maturitas.** 21(3):237-43, 1994.
18. Martin, A.; Xiong, J.; Koromila, T.; Li, JS.; Chang, S.; Song, YS.; Miller, JL.; Han, CY.; Kostenuik, P.; Krum, SA.; Ching, NO.; Gabet, Y.; Frenkel, B. Estrogens antagonize RUNX2-mediated osteoblast-driven osteoclastogenesis through regulating RANKL membrane association. **Bone.** 75:96-104, 2015.
19. Spelsberg, TC.;Subramaniam M.; Riggs BL.; Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. **Mol. Endocrinol.** 13:819-828, 1999.
20. Scheven, BAA.;Damen, CA.; Hamilton, NJ.; Verhaar, HJJ.; Duursma, SA. Stimulatory effects of estrogen and progesterone on proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. **Biochemical and biophysical research communications.** 186:54-60, 1992.
21. Benz DJ, Haussler MR, Thomas MA, Speelman B, Komm BS. High-affinity androgen binding and androgenic regulation of 1(I)- procollagen and transforming growth factor- steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. **Endocrinology** 128:2723–2730, 1991.
22. Masuyama A, Ouchi Y, Sato F, Hosoi T, Nakamura T, Orimo H. Characteristics of steroid hormone receptors in cultured MC3T3–E1 osteoblastic cells and effect of steroid hormones on cell proliferation. **Calcif Tissue Int** 51:376–381, 1992.
23. Nakano Y, Morimoto I, Ishida O, Fujihira T, Mizokami A, Tanimoto A, Yanagihara N, Izumi F, Eto S. The receptor, metabolism and effects of androgen in osteoblastic MC3T3- E1 cells. **Bone Miner** 26:245–259, 1994
24. Hofbauer LC, Hicok KC, Khosla S. Effects of gonadal and adrenal androgens in a novel androgen-responsive human osteoblastic cell line. **J Cell Biochem** 71:96–108, 1998.
25. Kapur SP, Reddi AH. Influence of testosterone and dihydrotestosterone on bone-matrix induced endochondral bone formation. **Calcif Tissue Int** 44:108–113, 1989.
26. Takeuchi M, Kakushi H, Tohkin M. Androgens directly stimulate mineralization and increase androgen receptors in human osteoblast-like osteosarcoma cells. **Biochem Biophys Res Commun** 204:905–911, 1994.
27. Kousteni S, Han L, Chen JR, Almeida M, Plotkin LI, Bellido T, Manolagas SC. Kinase-mediated regulation of common transcription factors accounts for the bone-protective effects of sex steroids. **J Clin Invest** 111:1651–1664, 2003.
28. Montrezor, LH.; Carvalho, D.; Dias MB.; Anselmo-Franci, JA.; Bicego, KC.; Gargaglioni, LH. Hypoxic and Hypercapnic ventilatory responses in rat with polycystic ovaries. **Resp. Physiol. Neurobiol.** 217:17-24, 2015.
29. Faria, AN.; Zancanela, DC.; Ramos, AP.; Torqueti, MR.; Ciancaglioni, P. Estrogen and phenol red free medium for osteoblast culture: study of the mineralization ability. **Cytotechnology.** 67: 1-10, 2015.
30. Mavropoulos, E.; Hausen, M.; Costa, AM.; Alves, G.; Mello, A.; Ospina, CA.; Mir, M.; Granjeiro, JM.; Rossi, AM. The impact of the RGD peptide on osteoblast adhesion and spreading on zinc-substitute dhydroxyapatite surface. **J MaterSci: Mater Med.** 24:1271–1283, 2013
31. Kalbacova, M.; Broz, A.; Kalbac, M. Influence of the fetal bovine serum proteins on the growth of human osteoblast cells on graphene. **J Biomed Mater Res Part A.** 100A:3001–3007, 2012.