



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA APLICADAS



MARIANA SOARES PENA RIBEIRO

AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE ROS E DO EIXO DE
CONTROLE DA LIBERAÇÃO DE CÁLCIO NA OSTEOCLASTOGÊNESE

Uberlândia – MG
Outubro/2016



**AVALIAÇÃO DA IMPORTÂNCIA DA PRODUÇÃO DE ROS E DO EIXO DE
CONTROLE DA LIBERAÇÃO DE CÁLCIO NA OSTEOCLASTOGÊNESE**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para obtenção de título de Mestre.

Mariana Soares Pena Ribeiro

Marcelo José Barbosa Silva

Ana Paula Lima Oliveira

Uberlândia-MG

Outubro/2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

R484a Ribeiro, Mariana Soares Pena, 1988
2016 Avaliação da importância da produção de ROS e do eixo de controle
da liberação de cálcio na osteoclastogênese / Mariana Soares Pena
Ribeiro. - 2016.
34 f : il.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.
Coorientadora: Ana Paula Lima Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Ossos - Doenças - Teses. 3. Oxigênio ativo
no organismo - Teses. 4. Ossos - Crescimento - Teses. I. Silva, Marcelo
José Barbosa. II. Oliveira, Ana Paula Lima. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.07



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas



Mariana Soares Pena Ribeiro

"Avaliação da importância da produção de ROS e do eixo de controle de cálcio na osteoclastogênese"

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção
do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 24 de outubro de 2016.

Taia maria B. Rezende

Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende – UCB/DF

Alberto Moraes da Silva

Prof. Dr. Alberto Moraes da Silva – ICBIM/UFU

Marcelo José Barbosa Silva

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva (orientador) – ICBIM/UFU

Dedicatória:

Ao meu marido pelo companheirismo, carinho, dedicação e aos meus pais que sempre me incentivaram a lutar pelos meus ideais.

Agradecimentos:

A Deus, por me dar o dom da vida e ajudar a ter força e coragem para vencer.

Ao Fernando, meu marido, que esteve sempre presente me apoiando e incentivando a lutar pelos meus objetivos.

Aos meus pais, que sempre estiveram na torcida, aconselhando-me na minha caminhada.

Ao Professor Marcelo, que me ensinou grande parte das técnicas laboratoriais, me incentivou a ser independente e me estimulou a buscar, incessantemente, mais conhecimento.

À Professora Ana Paula, que disponibilizou recursos para realização deste trabalho e também pelo carinho.

À Professora Sandra Yasuho Fukada Alves, que nos ajudou na parte técnica-científica e com materiais necessários para que pudéssemos concluir o nosso trabalho.

Aos amigos do laboratório, que me auxiliaram em todos os momentos e demonstraram o verdadeiro sentido do companheirismo.

Lista de abreviações:

AMA- antimicina A

APO- Apocinina

CaM- Calmodulina

CaMK- Proteína kinase dependente de Cálcio/Calmodulina

CMO- Células da medula óssea

CREB- Proteína ligante responsiva à cAMP

CTK- Catepsina K

DCFH2- DA- Diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína

DC-STAMP- Proteína transmembrana específica de células dentríticas

DPI- Difenileno iodônio

EEIG1- Gene precoce 1 induzido por estrógeno

ER- Retículo endoplasmático

ERK1- Quinase regulada por sinal extracelular

FAD- Dinucleotídeo flavina-adenina

IP3- Inositol 1,4,5-trifosfato

IP3R ou ITPR1- Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato

ITAM- Motivo ativador de imunorreceptor baseado em tirosina

MCSF-1- Fator de estimulação de colônia de monócitos 1

NAC- N-acetilcisteina

NAADP- Fosfato de dinucleotídeo de ácido nicotínico e adenina

NADPH- Fosfato dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NFATc1- Fator nuclear de ativação de células T 1

NOX2- NADPH oxidase 2

OPG- Osteoprotegerina

OSCAR- Receptor associado a osteoclastos

PLC γ - Fosfolipase C γ ;

RANK- Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B;

RANKL- Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B

ROS- Espécies Reativas de oxigênio

TFP-Trifluoperazina;

TPC2- Canal de segmento de dois poros

TRAP- Fosfatase ácida resistente a Tartarato

Sumário:

Resumo:.....	9
Abstract:	10
1- Introdução:	11
2-Justificativa:	16
3-Objetivo geral:.....	16
2.1- Objetivos específicos:.....	16
4-Métodos e materiais:	17
4.1.Cultura de células da medula óssea:	17
4.2.Determinação do número de osteoclastos diferenciados:	18
4.4.Determinação de ROS:	18
4.5.Determinação da concentração de cálcio livre intracelular:	19
4.6- RT-PCR:	19
5-Análise estatística:.....	20
6- Resultados:	20
6.1- O efeito inibitório da APO no número de osteoclastos e ensaio de MTT:.....	20
6.2- O efeito da APO e NAC na diferenciação de osteoclastos:	21
6.3- APO e NAC reduzem a produção de ROS e reduzem os níveis de Ca^{2+} intracelular:	22
6.4- A influência de APO na expressão de RANK, ERK1, EEIG1, TRAP e DC-STAMP na osteoclastogênese:.....	24
6.4- A influência de NAC na expressão de RANK, ERK1, EEIG1, TRAP e DC-STAMP na osteoclastogênese:.....	25
7-Conclusão:	30
8-Referências bibliográficas:	32

Resumo:

Espécies ativas de oxigênio (ROS) são produzidas por um complexo enzimático denominado NADPH oxidase (NOX) que é capaz de reduzir o oxigênio utilizando o NADPH como substrato. Sabe-se que ROS estão envolvidas na diferenciação de osteoclastos. Para avaliar a influência de NOX2 e ROS na formação de osteoclastos foi utilizado o tratamento com Apocinina (APO) como inibidora de NOX2 (isoforma 2 de NADPH) e a N-acetil-cisteína (NAC) como redutora dos níveis de ROS intracelular. A oscilação de Ca^{2+} também é importante nos momentos finais da formação de osteoclastos e foi analisado se NOX2 e ROS estavam envolvidas nesse mecanismo. Os resultados demonstraram que o tratamento com APO reduziu o número de células TRAP positivas e a expressão de TRAP, o que sugere que a redução do número de osteoclastos está relacionada com a diminuição de TRAP. No entanto, o tratamento com NAC não reduziu o número de TRAP-positivas além de aumentar a expressão de TRAP. Ademais, acredita-se que a osteoclastogênese é dependente de NOX2 por outras vias além da produção de ROS e da expressão de RANK, vias que foram alteradas tanto pelo tratamento com APO quanto com NAC, porém com impacto diferente no número de osteoclastos. Na via EEIG1 observou-se que o tratamento com APO reduziu a expressão dessa via, enquanto que o tratamento com NAC aumentou essa expressão. Dessa forma, comprova-se que NOX2 reduz a osteoclastogênese de modo ainda não conhecido. As vias ERK1 e TPC2 apresentaram um comportamento bifásico com relação aos tratamentos. Por outro lado, hipotetizamos que o tratamento com NAC retardaria ou inibiria de forma tardia a osteoclastogênese, além de sugerirmos que a participação de NOX2 na formação de osteoclastos não estaria relacionada apenas com a produção de ROS. Com isso, nós também sugerimos que a participação das vias RANKL/RANK/NOX2/ROS quanto RANKL/RANK/NOX2/Rac1/PLC γ 1 são importantes para a osteoclastogênese, sendo que apenas uma destas não é suficiente para a osteoclastogênese. Nos tratamentos com APO e NAC em CMO obtivemos uma redução da área dos osteoclastos, assim como também foi observada a redução da expressão de DC-STAMP. Conclui-se que NOX2 participa do processo de osteoclastogênese em várias vias de sinalização e está relacionada além da produção de ROS e outros processos ainda não conhecidos, porém imprescindíveis para diminuírem a formação de osteoclastos.

Palavras-chaves: osteoclasto, Apocinina, NAC, RANK, ROS, TRAP, NADPH

Abstract:

Species active oxygen (ROS) are produced by an enzyme complex called NADPH oxidase (NOX) which is able to reduce oxygen using NADPH as the substrate. It is known that ROS are involved in the differentiation of osteoclasts. To evaluate the influence of NOX2 and ROS on osteoclast formation, Apocynin (APO) was used as a NOX2 inhibitor (NADPH isoform 2) and N-acetyl-cysteine (NAC) as a reductant of intracellular ROS levels. The oscillation of Ca^{2+} is also important in the final moments of osteoclast formation and it was analyzed if NOX2 and ROS were involved in this mechanism. The results demonstrated that treatment with APO reduced the number of TRAP cells positive and the expression of TRAP, which suggests that the reduction of the number of osteoclasts is related to the decrease of TRAP. However, treatment with NAC didn't reduce the number of TRAP-positive in addition to increasing the expression of TRAP. In addition, it is believed that osteoclastogenesis is dependent on NOX2 by other pathways besides ROS production and RANK expression, pathways that were altered by both APO and NAC, but with a different impact on the number of osteoclasts. In the EEIG1 pathway, it was observed that the APO treatment reduced the expression of this pathway, whereas the treatment with NAC increased this expression, thus it was verified that NOX2 reduces osteoclastogenesis in a way not yet known. The ERK1 and TPC2 pathways presented a biphasic behavior in relation to the treatments. On the other hand, we hypothesized that treatment with NAC would delay or inhibit late osteoclastogenesis, in addition to suggesting that the participation of NOX2 in the formation of osteoclasts would not be related only to the production of ROS. Therefore, we also suggest that the participation of the RANKL/RANK/NOX2/ROS pathways as RANKL/RANK/NOX2/Rac1/PLC γ 1 are important for osteoclastogenesis, with only one of these being insufficient for osteoclastogenesis. In the treatments with APO and NAC in BMC we obtained a reduction of the area of the osteoclasts, as well as the reduction of the expression of DC-STAMP. It is concluded that NOX2 participates in the process of osteoclastogenesis in several signaling pathways and is related in addition to the production of ROS and other processes not yet known, but essential to decrease the formation of osteoclasts.

Key words: osteoclasts, Apocynin, NAC, RANK, ROS, TRAP, NADPH

Lista de Figuras:

Figura. 1- Desenho esquemático mostrando a montagem do complexo NADPH oxidase	12
Figura. 2- Desenho esquemático da via de sinalização RANK para a produção de ROS	13
Figura. 3- Desenho esquématico das vias de sinalização para a formação de osteoclastos	15
Figura.4- Análise da viabilidade de células da medula óssea (CMO) e a diferenciação de osteoclastos.....	21
Figura.5-Diferenciação de osteoclastos.....	24
Figura.7- Expressão de mRNA de genes marcadores da osteoclastogênese.....	25
Fig. 8- Desenho das vias da osteoclastogênese dependentes de ROS e NOX2.....	31

Lista de Tabelas:

Tabela 1: Primers para análises quantitativas de RT-PCR	20
---	----

1- Introdução:

O tecido ósseo depende de um delicado equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e dos osteoclastos. Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, derivados das células hematopoiéticas e possuem a capacidade de reabsorção óssea. Já os osteoblastos são derivados das células-tronco mesenquimais e estão relacionados com o remodelamento ósseo (PEDERSON; RUAN; WESTENDORF, 2008). Vários hormônios e citocinas que regulam o metabolismo ósseo promovem o balanço entre a formação do osso e a reabsorção óssea. Alterações nesse equilíbrio, que favorecem a formação dos osteoclastos, resultam em um aumento da reabsorção óssea observada em doenças inflamatórias como artrite reumatoide, osteoporose e doença periodontal (RODAN; MARTIN, 2000; TAKAYANAGI et al., 2002). Grande parte das doenças inflamatórias estão associadas com a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-1 β , e TNF- α) que são indutoras da produção de ROS, importantes para a diferenciação de osteoclastos (STASHENKO et al., 1987, 1994; TORCIA et al., 1996).

A osteoclastogênese é dependente das interações do Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear Kappa B (RANKL) e RANK. Depois da diferenciação de osteoclastos, a interação entre RANK e RANKL é mantida pela constante produção de RANKL pelos osteoblastos, linfócitos e precursores de osteoclastos, aumentando a reabsorção e a capacidade de sobrevivência (RADDING et al., 1994). O sistema requer a presença do fator de estimulação de colônia de monócitos 1 (M-CSF1) produzido por osteoblastos, os quais induzem a expressão de RANK pelos pré-osteoclastos. Portanto, RANKL junto com M-CSF1 são necessários para finalizar a diferenciação de osteoclastos e para expressar certos genes que são responsáveis pela parte final da osteoclastogênese tais como fosfatase ácida resistente a Tartarato (TRAP), catepsina K (CTK), calcitonina e $\alpha\beta 3$ -integrina (RADDING et al., 1994).

Alguns estudos vêm demonstrando que ROS são produzidas por um complexo enzimático denominado NADPH oxidase (NOX) que é capaz de reduzir o oxigênio utilizando o NADPH como substrato (HAYMAN, 2009). Ademais, a ativação de NOX na membrana dos osteoclastos e a produção de superóxido parecem estar envolvidas no complexo processo de reabsorção óssea (HAYMAN, 2009). NOX é composta por duas cadeias polipeptídicas na membrana celular (gp91NOX2 e p22NOX2), três cadeias citosólicas (p67NOX2, p47NOX2 e p40NOX2) e dois peptídeos de baixo peso molecular conhecidos como Rac1 e Rac2 (BABIOR, 2004). Para que a enzima seja

ativada, a cadeia citoplasmática p47^{NOX2} tem de ser fosforilada, causando uma alteração conformacional na sua estrutura, o que permite a sua ligação à p22^{NOX2}. O complexo p22^{NOX2}-p47^{NOX2} ativa a p67^{NOX2} que, por sua vez, recruta a p40^{NOX2} e se une ao complexo de membrana. Por fim, Rac se liga diretamente à gp91^{NOX2}. Após essa ligação, forma-se um complexo estrutural que é capaz de oxidar o NADPH e reduzir o oxigênio através da doação de um elétron para o dinucleotídeo flavina-adenina (FAD), que está na estrutura da gp91^{NOX2} (BABIOR, 2004, BEDARD; KRAUSE, 2007).

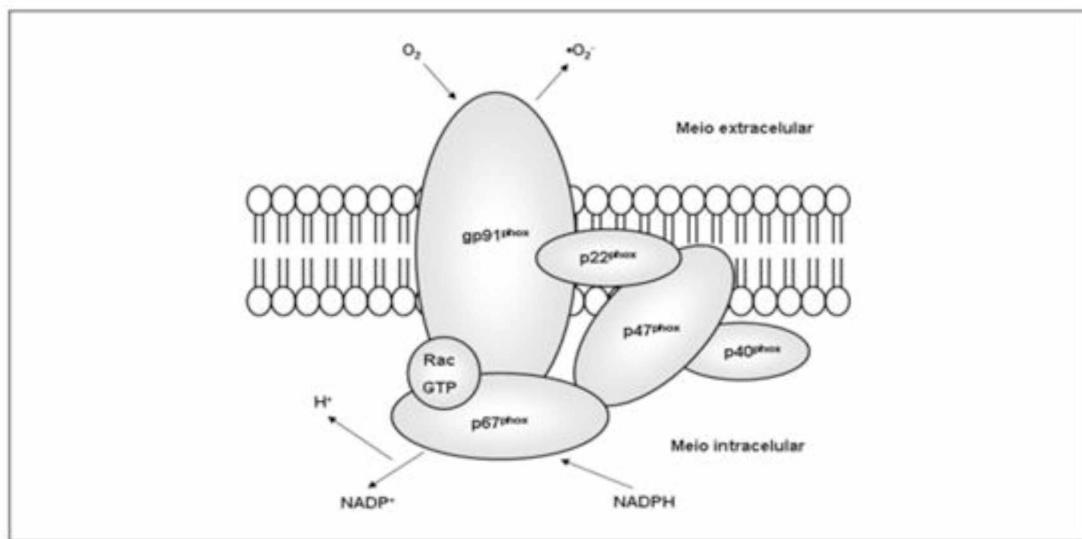


Fig. 1- desenho esquemático mostrando a montagem do complexo NADPH oxidase

RABÉLO et al., 2010

Acredita-se que a produção de ROS possa estar envolvida na sinalização intracelular mediada por RANK, que é via principal na diferenciação de osteoclastos. O tratamento de células da medula óssea (CMO) com RANKL induz a produção de ROS por essas células (KOH et al. 2006). Esses autores demonstraram que a produção de ROS pela interação RANK-RANKL envolve TRAF6, Rac1 e isoforma 1 da NOX (NOX1), indicando que a produção de ROS é regulada pela sinalização iniciada por RANK-RANKL (KOH et al. 2006). Existem trabalhos relatando que a isoforma 2 da NOX (NOX2) é importante durante os processos da osteoclastogênese (SASAKI et al. 2009). As expressões gênicas das isoformas 1, 2 e 3 (NOX1, NOX2 e NOX3) foram analisadas por PCR em tempo real durante a diferenciação das células RAW 264.7 após o tratamento com RANKL. RAW 264.7, apresentando elevados níveis de mRNA de NOX2 e pequenas quantidades de transcritos de NOX1 e NOX3. O tratamento das células RAW 264.7 por RANKL reduziu, acentuadamente, a expressão da NOX2 e aumentou a expressão das NOX1 e NOX3. Para confirmar se tais enzimas

seriam importantes na diferenciação dessas células em osteoclastos, a formação dos transcritos das enzimas p67NOX2 ou p22 foi bloqueada por pequenos RNAs de transferência (siRNA). Após a transfecção dos siRNA nas células RAW 264.7, observou-se uma redução na produção de ROS e a inibição na diferenciação de osteoclastos induzida por RANK (SASAKI et al. 2009). L. Portanto, a interação entre RANK-RANKL altera a expressão das diferentes isoformas da NOX sugerindo que a NOX2 e a produção de ROS tenham um papel importante na osteoclastogênese.

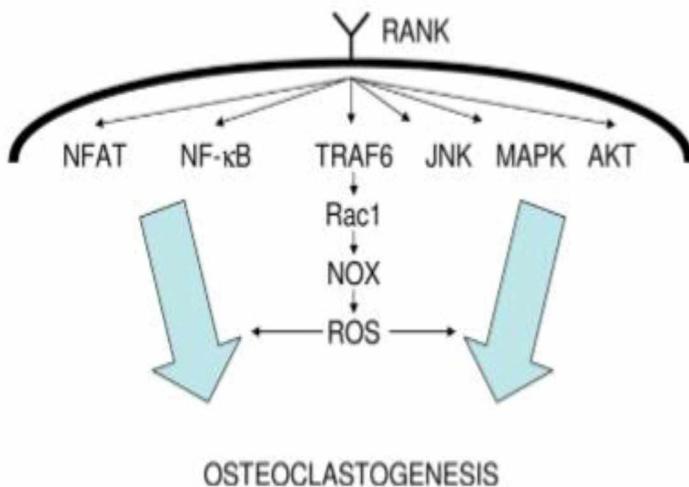


Fig. 2- Desenho esquemático da via de sinalização RANK para a produção de ROS
KANSAKI et al., 2016

Nosso grupo demonstrou que a produção de ROS pela gp91, da NADPH oxidase parece influenciar a diferenciação de osteoclastos nas lesões periapicais em modelo murino (SILVA et al., 2011). Nesse trabalho, os camundongos deficientes da gp91NOX2 (NOX2^{-/-}) apresentaram menor número de osteoclastos bem como menor área de reabsorção óssea na lesão periapical comparado com o C57BL/6.

A Apocinina (APO) e a N-acetil-cisteína (NAC) são dois compostos capazes de reduzir a concentração de ROS no meio, a primeira agindo como um inibidor do complexo NADPH-oxidase (NOX2) e a segunda atua diretamente reduzindo os níveis de ROS *in vivo e in vitro* (ARUOMA et al., 1989; BABIOR, 1999). A APO é um catecol capaz de inibir a formação de radicais livres, inclusive ROS, e tem sido utilizada como um inibidor eficaz do complexo NADPH-oxidase em vários modelos experimentais que envolvem as células fagocitárias e não fagocitárias (ZHANG et al., 2005). Recentes estudos relataram que o tratamento com APO aumenta a produção de osteoprotegerina (OPG), a qual é um regulador negativo na osteoclastogênese, em neutrófilos e no tecido vascular (SIMONET et al., 1997; PATERNITI et al., 2010; VEJRAZKA; MÍCEK; STÍPEK, 2005; ZENG et al., 2006). NAC é anminotiol e é

considerado um antioxidante (scavenger de ROS) (ZAFARULLAH et al., 2003). NAC bloqueia a produção de ROS dependente de RANKL, inibindo a ativação de ERK, JNK, ou p38 MAP kinase mediada por RANKL e, por consequência, inibe a diferenciação de osteoclastos (LEE et al., 2005). Um dos acontecimentos finais após a indução do eixo principal RANK/RANKL são as oscilações na concentração do cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ que é essencial para a ativação de fatores importantes na diferenciação final dos osteoclastos como calcineurina, receptor associado ao osteoclasto (OSCAR) e NFATc1 (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; FU et al., 2015; SHINOHARA et al., 2008; TAMAKI et al., 2008). Além disso, um eixo secundário denominado de sinais co-estimulatórios mediados por imunorreceptores ativados por tirosina (ITAM) e a ativação de fosfolipase C γ 1 (PLC γ 1) está envolvido nas oscilações de cálcio (Kim et al. (2010). Alguns pesquisadores relatam que a ativação PLC γ promove a geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), levando a liberação de Ca^{2+} no ER através da proteína kinase II dependente de calmodulina (CaMKII) (FU et al., 2015). E esta proteína efetora ubliquamente traduz elevados sinais de Ca^{2+} expressos em várias proteínas-alvo, incluindo canais iônicos e ativadores de transcrição (FU et al., 2015). Entretanto, sabe-se pouco sobre a relação da produção de ROS e o fluxo e influxo de cálcio do retículo endoplasmático (ER).

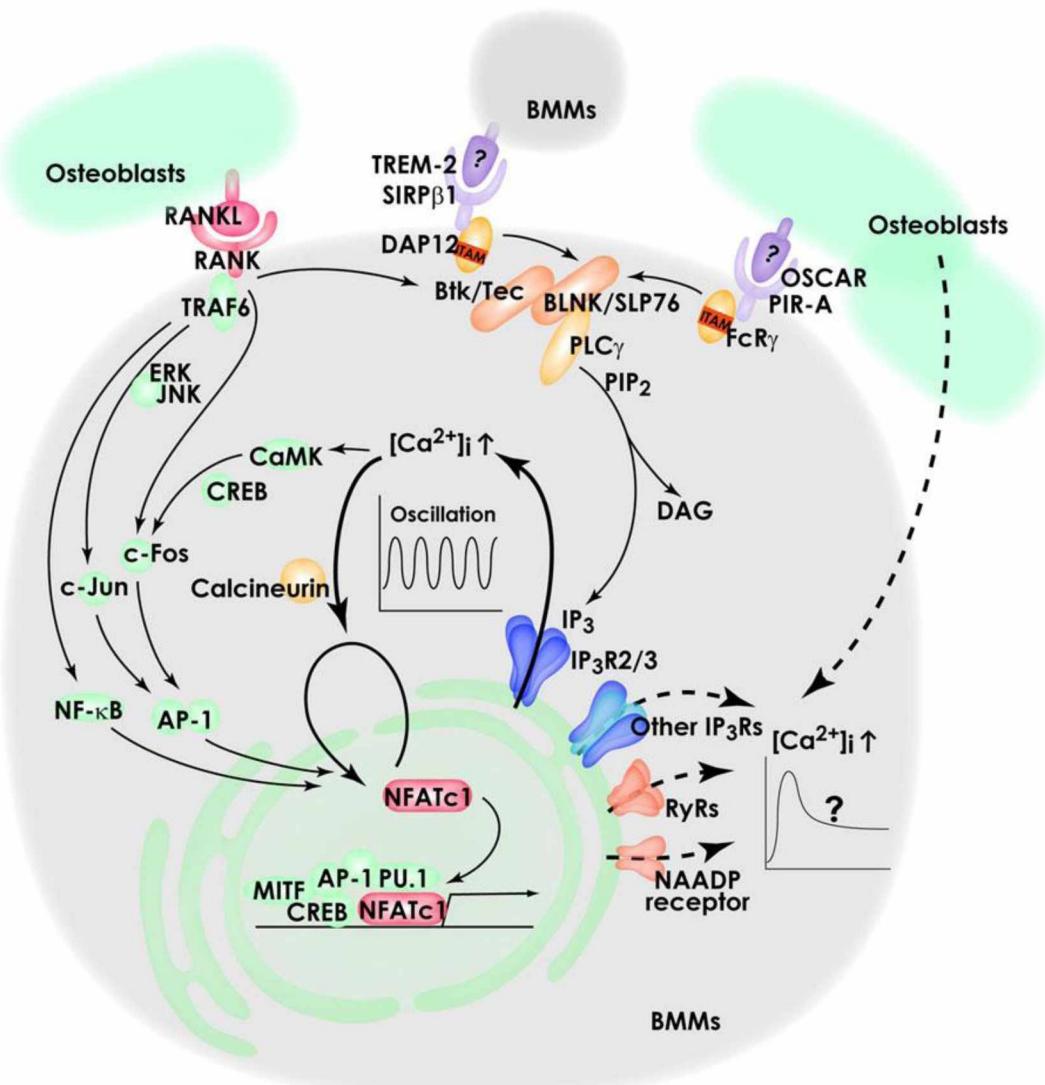


Fig. 3- Desenho esquemático das vias de sinalização para a formação de osteoclastos

KOGA et al, 2009

Sabe-se que a concentração da calmodulina é mais elevada em osteoclastos e os antagonistas de calmodulina são potentes inibidores da osteoclastogênese e da secreção de ácido, realizada pelos osteoclastos durante a reabsorção óssea (WILLIAMS et al., 1996). A calmodulina (CaM) é uma proteína multifuncional que liga Ca^{2+} e medeia ações do cálcio no metabolismo dos nucleotídeos cíclicos, fluxos de Ca^{2+} , fosforilação de proteínas, regulação do citoesqueleto e neurotransmissão. A trifluoperazina (TFP) é um potente inibidor competitivo da calmodulina, impedindo a ligação da calmodulina ao Ca^{2+} (ZHANG et al., 2003). Portanto, este trabalho teve como objetivo analisar a influência do tratamento com APO e NAC no eixo NOX2-ROS e os seus desdobramentos na via de sinalização na osteoclastogênese.

2-Justificativa:

A osteoclastogênese é um mecanismo que envolve várias vias de sinalização, enzimas, fosforilação de proteínas, fatores no microambiente do osso que permitem a ativação/desativação da sinalização nas células da medula óssea (CMO) para que ocorra a formação dos osteoclastos e, por consequência, a reabsorção óssea. Estudos na literatura já comprovaram a importância da produção de ROS na osteoclastogênese (LEE et al., 2005). Ademais, outros estudos provaram que camundongos knockout para gp91NOX2 influenciam de alguma forma na produção de osteoclastos (SILVA et al., 2011).

Dessa maneira, essa problemática poderia ser melhor esclarecida se fosse estudada a diferenciação dos osteoclastos a partir das CMO de camundongos com drogas que inibem NOX2 como APO (ZHANG et al., 2005) e NAC que bloqueia a produção de ROS (ARUOMA et al., 1989; BABIOR, 1999). Portanto, foi avaliada a participação de ROS na principal via de sinalização (RANK), vias secundárias como ERK1 e EEIG1 na osteoclastogênese, além dos marcadores de osteoclastos como TRAP, catepsina K (CTK), DC-STAMP e alguns canais de cálcio que podem estar envolvidos na osteoclastogênese como TPC2 e ITPR1. Tais esclarecimentos podem abrir novas portas para diferentes abordagens terapêuticas que poderiam ser aplicadas no tratamento de várias doenças osteolíticas.

3-Objetivo geral:

Avaliar o papel de ROS induzido pela NOX2 na liberação de cálcio, bem como componentes de importantes vias celulares durante a osteoclastogênese

2.1- Objetivos específicos:

- a) Determinar a menor concentração de APO capaz de inibir a osteoclastogênese.
- b) Determinar a viabilidade celular na presença das concentrações das drogas utilizadas.
- c) Avaliar o número de osteoclastos diferenciados a partir de CMO tratadas com APO e NAC.
- d) Avaliar a produção de ROS e oscilação de cálcio na osteoclastogênese a partir de CMO tratadas com APO e NAC.
- e) Avaliar a importância de ROS em genes essenciais para a osteoclastogênese (RANK, ERK1, EEIG1, TRAP, CTK, DC-STAMP, ITPR1 e TPC2), durante a osteoclastogênese de monócitos derivados de medula óssea.

4-Métodos e materiais:

4.1.Cultura de células da medula óssea:

As células da medula óssea foram removidas da tíbia e fêmur de camundongos C57BL/6 (B6.129S6- Cybbtm1Din/J). Os animais foram mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da UFU. O comitê de ética em Experimentação Animal da UFU aprovou o projeto sob o projeto de n° 024/2015.

As células da medula óssea foram cultivadas em alfa- MEM (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementada com 2,2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma), 10% de soro fetal de bezerro (SFB) (Altana, Lawrenceville, GA), 1% de penicilina/estroptomicina (1000 U/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY), 1% de solução aminoácida MEM (Invitrogen), 1% de L- glutamina (Invitrogen) e 0,1% de gentamicina (Invitrogen). Essas células foram plaqueadas em placas Petri (2×10^6 células) e tratadas com 30ng/mL de recombinante M-CSF (Peprotech, Rock Hill, NJ). As células foram diferenciadas em macrófagos após 3 dias com o estímulo de M-CSF, que denominamos como dia 0. Os macrófagos (1×10^5) foram plaqueados em placa de 96 poços e tratadas com 30ng/mL de M-CSF e 10ng/mL do recombinante RANKL (Peprotech, Rock Hill, NJ). A cultura foi interrompida no dia 3, momento em que os osteoclastos estavam formados (ISHIDA; AMANO, 2004).

4.1.1. Tratamentos com APO e NAC:

Os tratamentos com APO e NAC ocorreram no dia 0 após a diferenciação de macrófagos, quando essas células foram replaqueadas em placas de 96 poços, juntamente com o estímulo de M-CSF e RANKL, e ocorreram apenas uma vez.

4.2. Viabilidade Celular por MTT:

As CMOs (1×10^5) foram plaqueadas em placas de 96 poços e foi adicionado 90 μ L α -MEM (Sigma, St. Louis, MO, EUA) com 10% SFB e 10 μ L de solução de MTT (5mg/mL) e foram incubadas por 4 horas na ausência de luz. Adicionou-se 100 μ L de SDS 10% diluído em 50% de dimetilformamida. Obteve-se um sobrenadante azulado e foi analisado a densidade óptica (OD) foi lida pelo Glomax no comprimento de onda 570nm.

4.3.Determinação do número de osteoclastos diferenciados:

A reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) é considerada específica para osteoclastos por marcar as enzimas resistentes ao tartarato que são típicas destas células multinucleadas. A atividade TRAP foi identificada utilizando- se o kit de TRAP para detecção de fosfatase ácida (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Primeiramente, o meio de cultura será descartado e as células aderidas serão fixadas em paraformaldeído 4% por 10 min. Em seguida, elas serão lavadas 5 vezes com tampão de fosfato salino (PBS) estéril e incubadas com a solução de tartarato mais o naphtol por 1h em temperatura ambiente. Depois, as células serão lavadas 5 vezes com PBS e contracoradas por 5 minutos com o hematoxilina e contadas no microscópio. Serão consideradas células TRAP positivas aquelas que possuírem 3 ou mais núcleos com grânulos citoplasmáticos marcados por depósitos de cor púrpura a vermelho escuro. As imagens de cada poço foram realizadas por um microscópio invertido com câmara Leica DFC490 com 10x de resolução (Leica, Wetzlar, Alemanha). As imagens foram analisadas pelo software IMAGE J (National Institutes of Health, Bethesda, MD). O número de osteoclastos ou da área foram normalizados e os dados foram apresentados como um aumento ou diminuição relativa em número ou área dos osteoclastos gerados por poço comparado com o controle com RANKL(Fig.2B).

4.4.Determinação da concentração de ROS:

A produção intracelular de ROS será medida utilizando a sonda diacetato de 2',7'- diclorodihidrofluoresceína (DCFH2- DA) com o método sugerido pelo fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os macrófagos foram plaqueados em placa de 96 poços com 1×10^5 células/poço com α -MEM suplementado com 10% SFB e foram estimulados com M-CSF e RANKL. Após remoção do meio de cultura, os poços foram lavados com solução balanceada de HANK (HBSS) três vezes para a remoção do SFB. Em seguida, foram adicionados 200 μ l de HBSS contendo 10 μ M DCFH2- DA por 60 min. a 37°C. Então, os poços foram lavados 3 vezes com HBSS gelado para a remoção da sonda que não entrou nas células. A intensidade de fluorescência foi medida 1h após a aplicação do RANKL e M- CSF no espectrofotômetro Glomax (Promega, Wisconsin, USA) equipado com uma incubadora termostatizada a 37°C. As células foram excitadas a 530 nm e a fluorescência emitida em 585 nm.

4.5.Determinação da concentração de cálcio livre intracelular:

A determinação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} livre, $[\text{Ca}^{2+}]$ foi feita por fluorescência, utilizando o aparelho Glomax (Promega, Wisconsin, USA) usando a sonda fluorescente Fura- Red. Essa sonda possui em sua estrutura a molécula EGTA ligada aos grupos cromóforos. A ligação de Ca^{2+} à sonda desvia o comprimento de onda de excitação de 405 nm para 460 nm, aumentando a intensidade de fluorescência com o aumento da concentração de Ca^{2+} .

Os macrófagos (1×10^5 células) após 1h de estímulo com RANKL e M-CSF foram cultivados em placas de 96 poços em solução HBSS e incubados a 37°C , com Fura Red 4 μL (400 ng/mL), durante 60 min. Após este período de incubação, o Fura Red que não foi internalizado foi eliminado por 3 lavagens em 500 μL de HBSS. Após isso, as células foram ressuspensas em 200 μL de HBSS.

As determinações da $[\text{Ca}^{2+}]$ foram feitas pelo Glomax, a 37°C , após a lavagens. As células foram excitadas a 405 nm e a emissão de fluorescência foi registrada no comprimento ideal da sonda (460 nm) após serem lavadas (1h).

4.6- RT-PCR:

O RNA total foi isolado com células extraídas pelo kit (Promega, Wisconsin, USA). O cDNA foi sintetizado usando o Mix PrimeScript RT (Promega, Wisconsin, USA). A quantificação do PCR foi realizada utilizando o kit SYBR Green para RT-PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha) e o sistema utilizado foi o Applied Biosystems 7300 Real Time PCR (Thermo Fisher, Waltham, USA). As condições de PCR utilizadas foram: 50°C por 2 min; 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C de 15 s e 60°C por 1 min. O gene $\beta 2$ foi amplificado como um controle interno. Os primers para a análise quantitativa de RT-PCR foram sintetizados com base nos dados do GenBank e as sequências de nucleotídeos de primers de PCR estão descritas abaixo:

Tabela 1: Primers para análises quantitativas de RT-PCR

Primers	Forward	Reverse
Vias		
EEIG1 ¹	5'-CTAAATTCCAGGGCTCCAAA-3'	5'-AGACCTTGGCTTGAGTTAG-3'
ERK1 ²	5'-CATTGTTCAAGGACCTCATGG-3'	5'-GAGGATCTGGTAGAGGAAGTAG-3'
RANK ³	5'-CTGGTTCACTGCTCCTAATC-3'	5'-TGGCTTAAACTGTCGTTCTC-3'
Cálcio		
ITPR1 ⁴	5'-GGTGGAGATGAAGGAGATTAC-3'	5'-TTCCTGTCGCTTGTGTTG-3'
TPC2 ⁵	5'-GTAGCTTGGCAGACCATTAG-3'	5'-GGAAGTCACTCTCTCCTTAG-3'
Diferenciação de osteoclastos		
CTK ⁶	5'-TGGATGAAATCTCTCGGCGT-3'	5'-TCATGTCTCCCAAGTGGTTC-3'
TRAP ⁷	5'-CACGATGCCAGCGACAAGAG-3'	5'-TGACCCCGTATGTGGCTAAC-3'
Fusão célula a célula		
DC-STAMP ⁸	5'-GAATTCATGAGGCTCTGGACCTTGGCACCAAGT-3'	5'-CTCGAGTCATAGATCATCTTCATTGCAAGGGAT-3'

Fonte: ¹ (CHOI et al., 2013), ⁴ (YAROSLAVSKIY et al., 2007) ^{2,3,7,8} (YAGI et al., 2005) ⁵ (NOTOMI; EZURA; NODA, 2012) ⁶ (MATSUMOTO et al., 2004),

5-Análise estatística:

Os resultados do RT- PCR serão expressos como quantificação relativa (RQ), ou seja, este índice expressa a variação relativa do gene em estudo do grupo experimental em relação ao grupo controle. O teste de Kolgomorov Smirnov foi aplicado para verificar se a característica estudada nas amostras era oriunda de uma população com distribuição normal. Para comparar mais de um grupo, foi utilizado o teste two-way ANOVA. A diferença foi considerada estatística quando $p < 0,05$.

Os resultados dos outros experimentos foram realizados em comparação das médias, dependendo da distribuição das amostras, entre dois grupos pelo teste t de Student. Para comparar mais de dois grupos, foi utilizado o teste de análise da variância univariada (one-way ANOVA), seguido do teste Post-hoc de Tukey. A diferença foi considerada estatística quando $p < 0,05$.

6- Resultados:

6.1- O efeito inibitório do tratamento com APO no número de osteoclastos e ensaio de MTT:

Diferentes concentrações de APO (0,01 μ M, 0,1 μ M e 1 μ M) foram testadas para avaliar quais concentrações inibiram a osteoclastogênese de células da medula óssea. As

análises quantitativas demonstraram que a menor concentração testada de APO diminuiu significativamente o número de células TRAP-positivas, isto é, osteoclastos ($p<0.05$), e o efeito observado é dose-dependente.(Fig. 1.B)

Para verificar se a diminuição da formação de osteoclastos é devido ao efeito da citotoxicidade de APO, a técnica utilizada foi de MTT para avaliar a viabilidade celular. Os resultados mostraram que o tratamento com APO não reduziu a viabilidade celular em células de medula óssea estimuladas com RANKL. A mesma técnica também foi utilizada para as células tratadas com NAC, as quais não apresentaram redução na viabilidade celular. Já o TFP apresentou redução na viabilidade celular, porém não foi estatístico (Fig. 1A).

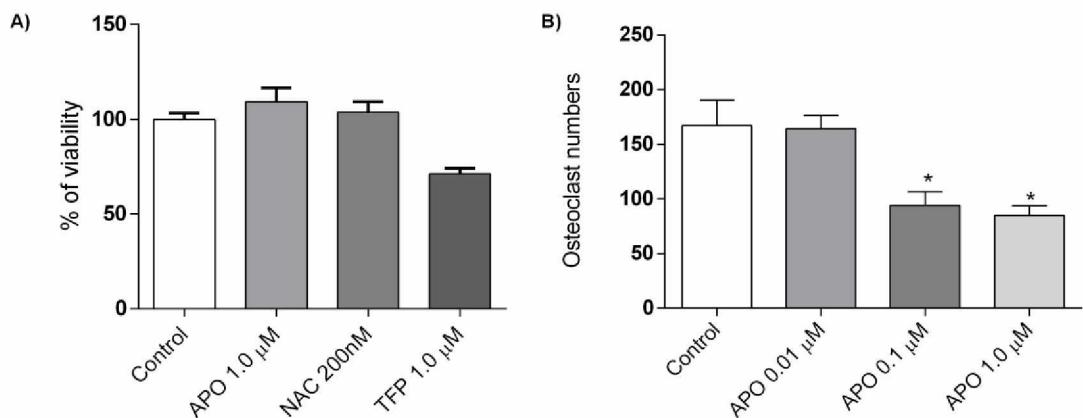


Fig.4- Análise da viabilidade de células da medula óssea (CMO) e a diferenciação de osteoclastos.(A) Ensaio de CMO após 24h de incubação com APO, NAC e trifluoperazina (TFP). (B) Inibição do número de osteoclastos formados por Apocinina (APO) depois da CMO serem estimuladas com M-CSF/RANKL Os dados são expressados com significado \pm SD para dois experimentos independentes. * Diferença considerada estatística comparada ao controle. $P<0.05$.

6.2- O efeito do tratamento com APO e NAC na diferenciação de osteoclastos:

Foi testado se o consumo de ROS alteraria a formação de osteoclastos, principalmente se inibiria este processo. Para essa proposta, um inibidor de NOX2 (APO), que está envolvida na produção de ROS, bem como NAC, e o espoliador de ROS (antioxidante) foram utilizados. Foi observado que o tratamento com APO inibe a osteoclastogênese, quando comparado ao grupo controle (Fig 2A-B). Já o tratamento com NAC não inibiu o número de osteoclastos, porém foi observado que houve uma diminuição da área dos osteoclastos em relação ao grupo de controle (Fig.2B).

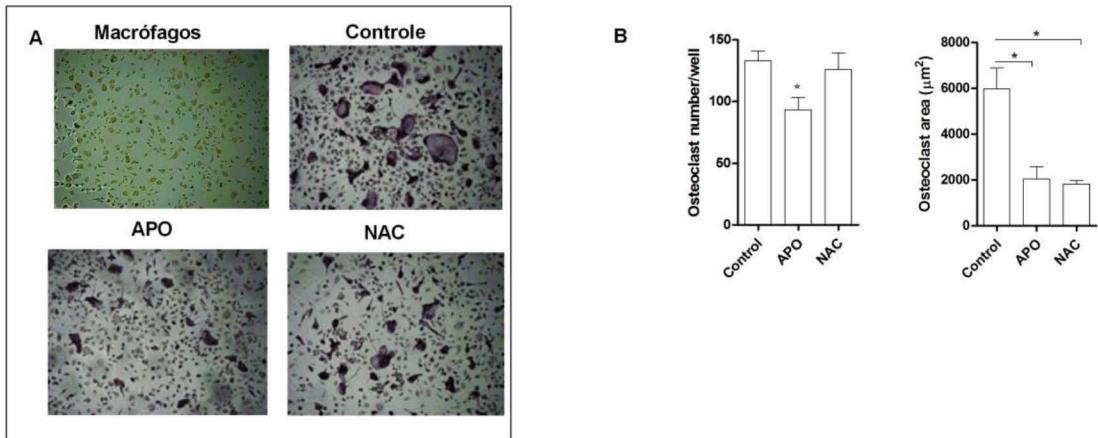


Fig.5-Diferenciação de osteoclastos. (A) Número de osteoclastos diferenciados provenientes de macrófagos sob o estímulo de RANKL(10 ng/ml) e MCSF (20 ng/ml), tratamento com APO (1 uM), NAC (200 nM), RANKL. (B) Os gráficos representam o número de células e a área em que ocorreu a inibição da formação de osteoclastos depois do tratamento com APO (1uM) e NAC (200nM). *Os dados são expressados com significado \pm SD para dois experimentos independentes. Significa que são considerados estatisticamente diferentes por testes T independentes se $P<0.05$.

6.3- Tratamento com APO e NAC reduz a produção de ROS e níveis de Ca^{2+} intracelular:

CMOs foram tratadas com RANKL e M-CSF e exibiram altos níveis de ROS intracelular, os quais são parcialmente inibidos pelo tratamento com APO e NAC (Fig. 3A). As análises quantitativas demonstraram uma diminuição significativa nos níveis de ROS ($p<0.05$) (Fig.3B). CMOs foram tratadas por 1h com um doador de ROS e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) para verificar a funcionalidade da fluorescência relativa de DCF. Foram detectados altos níveis de fluorescência, confirmando a eficiência da sonda de ROS ($p<0.05$)(Fig.3B).

O enfluxo de cálcio do retículo endoplasmático aumentou após 1h de estímulo de RANKL em CMO. ($p<0.05$)(Fig. 3C). O efeito do tratamento com APO e NAC na concentração de Ca^{2+} intracelular indica que foi significativamente reduzida ($p<0.05$)(Fig.3C). A Calmodulina é uma proteína que se liga ao cálcio (FU et al., 2015). Para verificar a importância do enfluxo de cálcio do retículo endoplasmático foi utilizado um antagonista da calmodulina, a Trifluorperazina (TFP). Os resultados demonstraram que o TFP inibe a formação de osteoclastos. ($p<0.05$)(Fig. 3D).

ITRP1 e TPC2 são canais de cálcio localizados no retículo endoplasmático e na membrana do lisossomo, respectivamente. Como a estimulação de RANKL e o

tratamento com APO e NAC que altera Ca^{2+} intracelular foram investigadas as mudanças de expressão de mRNA no ITPR1 e no TPC2. Os tratamentos com APO e NAC não alteram a expressão de ITPR1, porém há diferença estatística entre os tempos de tratamento. Os estímulo de RANKL aumenta entre 0h e 12h tanto em células de controle quanto em células tratadas com APO($p<0,05$)(Fig. 3E). Já entre 12h e 48h há diferença estatística em células apenas estimuladas com RANKL($p<0,05$)(Fig. 3E). O tratamento com APO não altera a expressão dos transcritos de TPC2 quando comparado com o controle em todos os tempos após os estímulo com RANKL e M-CSF (0h, 12h, 24h e 48h) (Fig. 3F). Já o tratamento com NAC altera a expressão de TPC2 em todos os tempos. Entre 0h e 12h houve uma diminuição dos transcritos, entre 12h e 24h houve um aumento e entre 24h e 48h ocorre uma nova diminuição da expressão de TPC2 ($p<0,05$)(Fig. 3F).

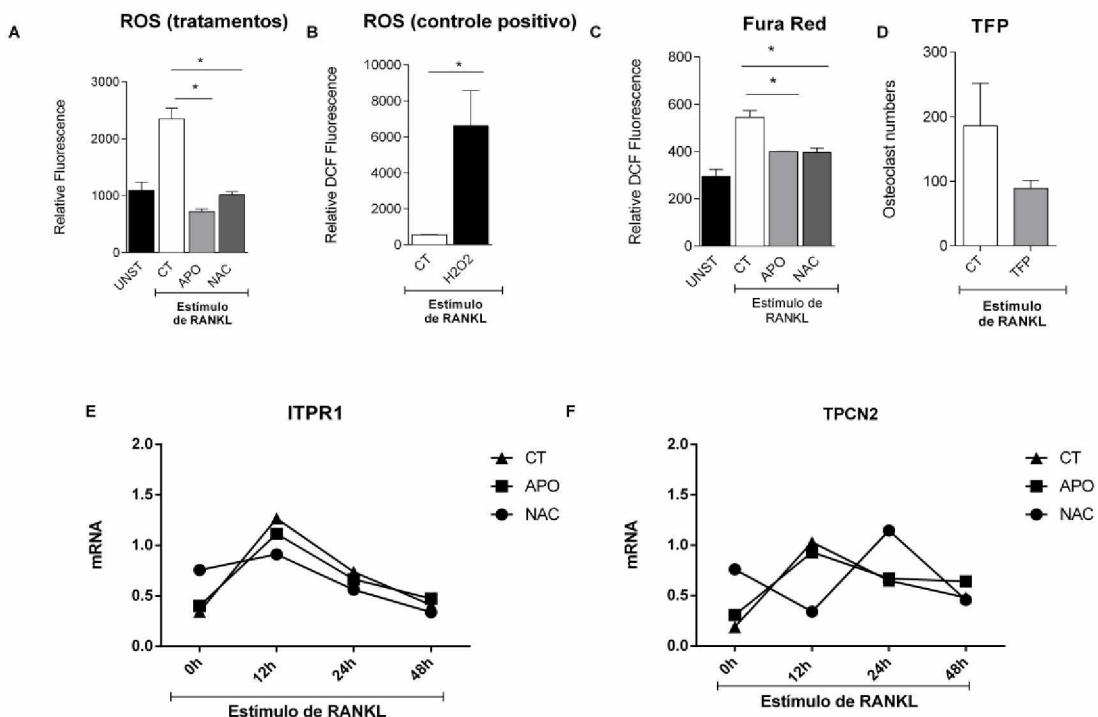


Fig.6- A produção de ROS após o estímulo com RANKL, a influência de RANKL na liberação de cálcio intracelular e os seus receptores. (A) A produção de ROS em células não estimuladas (UNST) com RANKL e CMOs estimuladas com RANK em células de controle (CT), tratadas com APO e NAC. (B) Produção de ROS em CMO tratadas com H₂O₂ (doador de ROS) 60 min. após a estimulação de RANKL. (C) Ca²⁺ intracelular em células estimuladas com RANKL (10ng/mL) e na presença da sonda Fura Red. (D) Número de osteoclastos em CMO tratadas com TPF (1uM). Os dados são expressados com significado ± SD para dois experimentos independentes. *Diferença considerada estatística comparada ao controle. $P<0.05$. (E) Expressão de mRNA de ITPR1 com relação a B2 após o estímulo com RANKL nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h em células de controle, tratadas com APO e as tratadas com NAC. (F) Expressão de mRNA de TPC2 com relação a B2 após o estímulo com RANKL nos tempos 0h, 12h, 24h e 48h em células de controle, tratadas com APO e as tratadas com NAC. Os dados indicam a diferença entre os tempos de estímulo com RANKL. *Significa que são considerados estatisticamente diferentes por (two- way ANOVA).

6.4- A influência do tratamento com APO na expressão de RANK, ERK1, EEIG1, TRAP e DC-STAMP na osteoclastogênese:

Os macrófagos tratados com APO expressam menos RANK após o estímulo de RANKL em todos os tempos (0h, 12h, 24h e 48h) ($p<0,05$) (Fig.4A). A expressão de ERK1 é maior em células tratadas com APO comparadas com o controle entre 0h e 12h de estímulo com RANKL($p<0,05$) (Fig.3B). Após 12h de tratamento com APO houve uma redução da expressão dos transcritos de ERK1 em relação ao tempo 0, porém maior que do grupo controle ($p<0,05$) (Fig.4B). Em 48h de estímulo as células tratadas com APO e as células de controle reduziram a expressão de ERK1 quando comparadas com o tempo 0. Já expressão de EEIG1 nos tempos 0h, 12h e 24h de estímulo com RANKL e M-CSF não sofreu variação em função dos tratamentos ($p<0,05$)(Fig.4C), mas houve aumento da expressão em função dos tratamentos entre 24h e 48h. O tratamento com APO inibiu a expressão de EEIG1($p<0,05$) (Fig.4C). Em relação aos transcritos de TRAP observa-se um aumento da expressão a partir de 24h de estímulo de RANKL e aos tratamentos com APO e NAC, observando a formação de pré-osteoclasto. No entanto, nesse mesmo ponto do tempo, a expressão de TRAP é menor no grupo tratado com APO ($p<0,05$) (Fig.4D). Já o transcrito de DC-STAMP não foi detectado nas primeiras 12h. Entretanto, entre 24h e 48h houve expressão. APO inibe a expressão de DC-STAMP após 48h de estímulo com RANKL. Além disso, houve uma diferença estatística entre a expressão de células tratadas com APO e NAC ($p<0.05$)(Fig. 4E). Em relação aos transcritos de CTK não houve mudança entre os tempos 0h, 12h e 24h em nenhuma circunstância. Porém, todos os tratamentos apresentaram um aumento a partir de 48h, apesar de não haver diferença estatística entre APO, NAC e controle ($p<0.05$)(Fig. 4F).

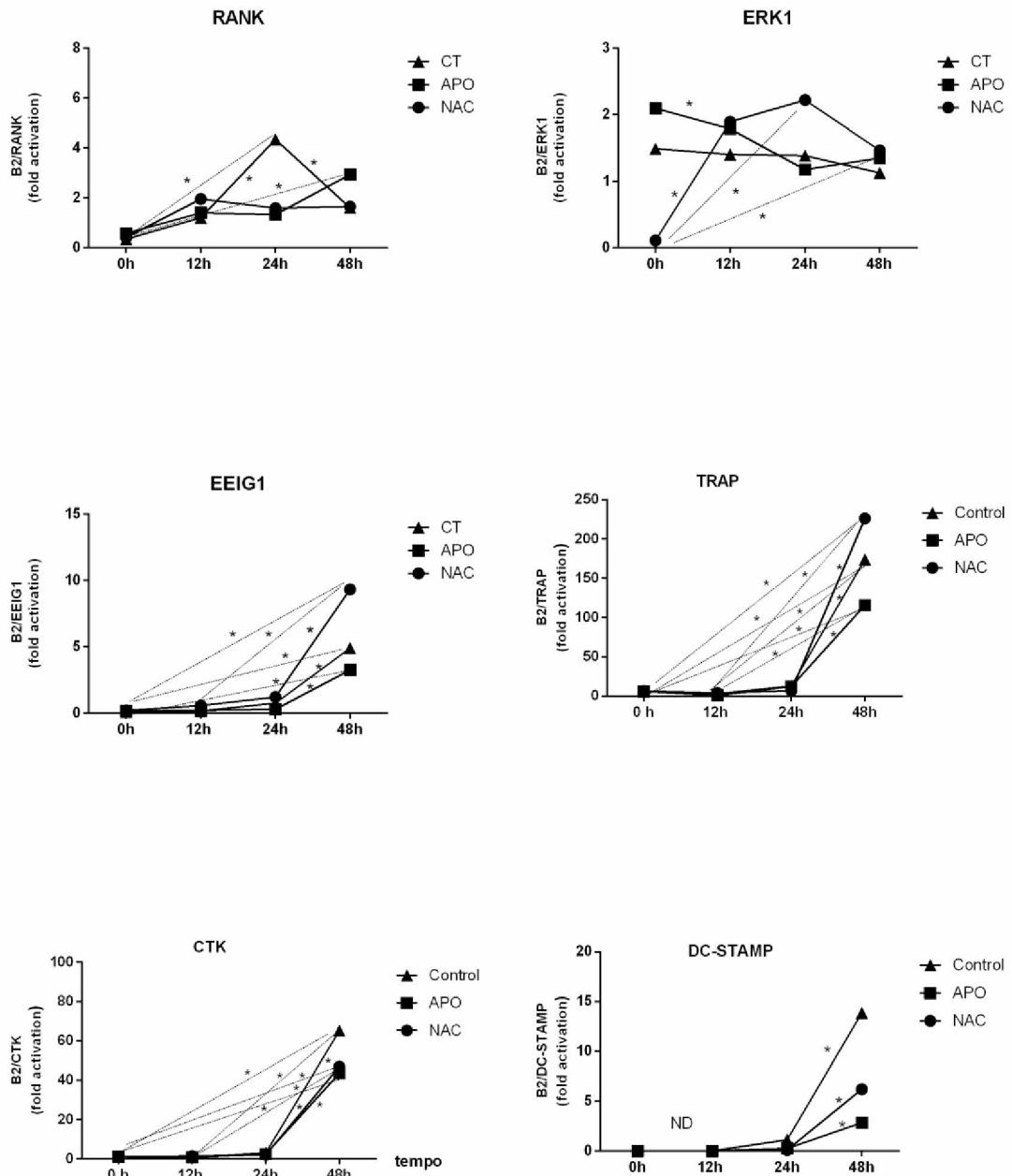


Fig.7- Expressão de mRNA de genes marcadores da osteoclastogênese. Expressão de mRNA de RANK (A), ERK1 (B), EEIG1 (C), TRAP (D), CTK (E) e DC-STAMP (F) co. *Significa que são considerados estatisticamente diferentes por (two- way ANOVA).

6.4- A influência de NAC na expressão de RANK, ERK1, EEIG1, TRAP e DC-STAMP na osteoclastogênese:

NAC diminui a expressão de RANK nos tempos 12h, 24h e 48h. Há apenas um ligeiro aumento entre 0h e 12h ($p<0.05$) (Fig.4A). A expressão de ERK1 aumenta consideravelmente em células tratadas com NAC comparadas com as células de controle que se mantêm nos mesmos níveis de expressão dos transcritos entre 0h e 12h de estímulo com RANKL($p<0,05$) (Fig.4B). Entre 12h e 24h, a expressão do tratamento

com NAC aumenta ainda mais se comparada com o tratamento com APO e o controle($p<0,05$) (Fig.4B). Após 24h de estímulo, o tratamento com NAC diminui a expressão de ERK1 e, em 48h de estímulo, não há diferença entre os tratamentos($p<0,05$) (Fig.4B). Com relação aos transcritos de TRAP não houve diferenças nos tempos 0h, 12h e 24h em todos os tratamentos. Interessantemente, o tratamento com NAC obteve um aumento expressivo entre 24h e 48h comparado com o tratamento com APO e o controle ($p<0.05$) (Fig.4D). Da mesma forma que no tratamento com APO não foi detectada (ND) a expressão de TRAP em células tratadas com NAC nos períodos entre 0h e 12h. No entanto, entre 24h e 48h, o tratamento com NAC e o controle aumentaram a expressão de DC-STAMP e houve diferenças estatísticas entre os tratamentos com NAC e APO ($p<0.05$) (Fig. 4F). Em relação aos transcritos de CTK não houve mudança entre os tempos 0h, 12h e 24h em nenhuma circunstância. Porém, todos os tratamentos apresentaram um aumento a partir de 48 horas, apesar de não haver diferença estatística entre o tratamento com APO e NAC e o controle ($p<0.05$)(Fig. 4E).

7- Discussão:

Nesse estudo, a influência da atividade de NOX2 por APO foi testado em macrófagos originados das células da medula óssea. NOX2 é expresso nas membranas de osteoclastos (TAMAKI et al., 2008). Essa enzima pode efetivamente reduzir o oxigênio para superóxido que reduz outros radicais livres, gerando um grupo de moléculas denominadas ROS. Essas moléculas são importantes para a diferenciação de osteoclastos e as atividades de reabsorção óssea (LEE; CHOI, 2011; NAM et al., 2014; SASAKI et al., 2009).

APO é um inibidor de NOX (HOUGREE et al., 2006) e NAC é um espoliador de ROS (CIRCU; AW, 2009). Um estudo mostrou que tanto a inibição de NOX por siRNA quanto à depleção de ROS por espoliadores (NAC e DPI) inibem a osteoclastogênese (KIM et al., 2010), evidenciando o papel crítico destes componentes neste processo de diferenciação. O primeiro achado importante foi que o tratamento com APO diminuiu o número de células TRAP-positivas, sugerindo a diminuição da quantidade de osteoclastos. TRAP é uma enzima característica da atividade osteoclastogênica (HAYMAN, 2008). É importante destacar que o método utilizado para quantificar os osteoclastos é realizado pela atividade enzimática de TRAP (células que coram pela atividade de TRAP). Interessantemente, o tratamento com APO

diminuiu a expressão de TRAP (Fig.4D), enquanto que o tratamento com NAC aumentou a expressão de TRAP (Fig. 4D), ambos no momento 48h. Curiosamente, o tratamento com APO, que diminuiu a TRAP, levou à diminuição de células TRAP-positivas (osteoclastos), mas o tratamento com NAC, que levou ao aumento de TRAP, não levou ao aumento de células TRAP-positivas. Um importante estudo demonstrou que a IL-4, uma interleucina com ação predominantemente anti-inflamatória, levou à diminuição de TRAP durante a osteoclastogênese, bem como diminuiu da formação de osteoclastos. Assim, a expressão de TRAP é um indicador fidedigno da osteoclastogênese. Neste caso, é uma possível explicação da diminuição da osteoclastogênese por APO é a diminuição de TRAP.

RANK é um importante receptor na diferenciação osteoclastogênica (NAKAGAWA et al., 1998), e foi observado que a via de sinalização do eixo RANKL/RANK é via TRAF6/Rac1/NOX2 (SHINOHARA et al., 2008), desta forma evidenciando a importância da NOX2 na osteoclastogênese. Neste estudo, observamos que a inibição de NOX2 por APO, bem como a depleção de ROS por NAC, levaram à diminuição da expressão de RANK, sugerindo que o eixo RANKL/RANK ativa um mecanismo de retroalimentação positiva por aumentar RANK durante a osteoclastogênese dependente de ROS. Os estudos com IL-4 também observaram que esta citocina, que inibe a osteoclastogênese, inibe a expressão de RANK.

Outro estudo observou que o tratamento com APO, induz a expressão de OPG, um antagonista do eixo RANKL/RANK, assim inibindo a osteoclastoêngese (SUDA et al., 1999; LEE; CHOI, 2011).). Nós observamos resultados semelhantes: o tratamento com APO levou a um número reduzido de osteoclastos (Fig 2B), o que poderia ser explicado pelos dados da literatura (SIMONET et al., 1997; ZENG et al., 2006), bem como pela diminuição da expressão de RANK. Interessantemente, a utilização do espoliador de ROS (NAC) não causou o mesmo efeito. Assim, sugerimos que a osteoclastogênese é dependente de NOX2 por outras vias que não somente a produção de ROS e expressão de RANK, vias alteradas tanto pelo tratamento com APO quanto com NAC, mas com impacto diferente no número de osteoclastos.

Um exemplo de outra possível via é EEIG1. EEIG1 é um regulador positivo da osteoclastogênese (CHOI et al., 2013). Nós observamos que o tratamento com APO levou à diminuição da expressão de EEIG1 após 48h (Fig 4C), enquanto que o tratamento com NAC aumentou a expressão deste gene (Fig 4C). Assim, poderia justificar-se a redução dos osteoclastos em função do tratamento com APO pela

diminuição de EEIG1, mas não no tratamento com NAC. De alguma forma não conhecida, a inibição de NOX2, ou outras ações não relatadas de APO, afetam a osteoclastogênese por impedir a expressão de EEIG1. Uma possível explicação é a oscilação de Ca^{2+} . A enzima NOX2 possui como componente Rac1 (KOH et al. 2006). Rac1 ativa PLC γ 1 (KANZAKI et al., 2013), a qual, por sua vez, leva à oscilação de Ca^{2+} , levando à diferenciação de osteoclastos (KANZAKI et al., 2013). Como NAC atua downstream à NOX2, apenas a depleção de ROS não consegue explicar a potente inibição da osteoclastogênese pelo inibidor de NOX2 (APO). Assim, o tratamento com APO, ao bloquear NOX2, inibe esta ação não-geradora de ROS por NOX2, mas que leva a oscilações de Ca^{2+} , como observado neste estudo (Fig 3C). No entanto, também observamos diminuição de Ca^{2+} pelo tratamento com NAC (Fig 3C), o que pode sugerir que ROS também participa nesta via dependente de cálcio, mas com resultado efetivo dependente de NOX2/Rac1.

Quanto à participação de ERK1, que também é regulador positivo da osteoclastogênese e da atividade de reabsorção óssea (HE et al., 2011), não foi observado que o tratamento com APO e NAC alteraram a expressão destes genes, ou de maneira que explique os fenômenos efetivos observados de redução da osteoclastogênese (ERK1). Por exemplo, um estudo observou que o tratamento com NAC inibe a via de sinalização ERK, JNK, p38 e MAPK ativados por RANKL (LEE; CHOI, 2011). Porém, observamos aumento de ERK1 entre 12h e 24h e diminuição entre 24h e 48h. Este fenômeno nos faz hipotetizar que o tratamento com NAC retarda a osteoclastogênese ou a inibe tardivamente em relação ao tratamento com APO. Um outro dado que corrobora esta hipótese é que o tratamento com NAC diminui a expressão de TPC2, um canal de cálcio importante que regula positivamente a osteoclastogênese (NOTOMI; EZURA; NODA, 2012) no mesmo instante que tanto o tratamento com APO quanto o controle aumentam, com posterior aumento da expressão em um momento que tanto o tratamento com APO quanto o controle diminuem a expressão. O comportamento bifásico de ERK1 e TPC2, em contraposição ao tratamento com APO e o controle, que não apresentam diferenças entre si, pode ajudar a entender o porquê o tratamento com NAC não impactou o número de osteoclastos, demonstrando que a NOX2 é importante na osteoclastogênese não apenas por produzir a ROS. Assim, nós sugerimos que a participação das vias RANKL/RANK/NOX2/ROS quanto RANKL/RANK/NOX2/Rac1/PLC γ 1 são importantes para a osteoclastogênese, sendo que apenas uma destas não é suficiente para a osteoclastogênese. No entanto, não se

pode descartar a hipótese de que a reposição de NAC durante o período de diferenciação poderia resultar num efeito semelhante ao tratamento com APO na diminuição do número de osteoclastos.

Outro importante achado foi que tanto o tratamento com APO quanto com NAC reduziram a área dos osteoclastos. A DC-STAMP é uma importante proteína de fusão de pré-osteoclastos durante a osteoclastogênese (CHEN et al., 2016; DOU et al., 2016; YAGI et al., 2005). Foi observado que a exposição tanto à APO quanto à NAC levou à diminuição da expressão de DC-STAMP, principalmente pelo primeiro. Assim, a redução da área dos osteoclastos pode se explicar pela diminuição da expressão deste importante gene. Outro espoliador de ROS, Alliin, mostrou efeitos semelhantes, diminuindo a expressão de DC-STAMP (CHEN et al., 2016; DOU et al., 2016; YAGI et al., 2005). Dado que tanto a inibição de NOX2 quanto a espoliação de ROS levaram à redução da área de osteoclastos e à diminuição de expressão de DC-STAMP. Por isso, sugerimos que a provável via que regula este evento seja a RANKL/RANK/NOX2/ROS/DC-STAMP.

A inibição da formação de osteoclastos coincide com a redução do mRNA de marcadores de osteoclastos analizados: TRAP e CTK. De forma semelhante ao que foi demonstrado na quantificação de osteoclastos, o tratamento com NAC não inibe a expressão dos transcritos de TRAP. Por outro lado, a expressão de mRNA de TRAP foi diminuída em células tratadas com APO. O mesmo grupo citado acima demonstrou que a atividade de TRAP e a expressão de mRNA foi diminuída em células RAW264.7 tratadas com Alliin de forma dose dependente, além de inibir a diferenciação de osteoclastos (YAGI et al., 2005). De forma contrária, os transcritos de CTK, após 48h de estimulação de RANKL, aumentou-se a expressão em todos os tratamentos e não houve diferença estatística entre os tratamentos com APO e NAC e controle. CTK é uma importante proteína na reabsorção óssea e, em alguns trabalhos, mostra que a expressão de mRNA de CTK diminui com a inibição e diferenciação de osteoclastos em células RAW 264.7 em baixos níveis de ROS (KANZAKI et al., 2013). Portanto, nesse trabalho, a CTK não influenciou na inibição do eixo NOX2-ROS na osteoclastogênese, o que sugere mais estudos para comprovar se ROS influencia na expressão de CTK.

7-Conclusão:

Nesse trabalho foi observada a influência da atividade de NOX2 no tratamento com APO e NAC. O número de células TRAP positivas tratadas com APO diminuiu consideravelmente e nesse mesmo tratamento em CMO também observamos a redução da expressão gênica de TRAP. Entretanto, no tratamento com NAC não houve essa redução do número de células TRAP positivas além de um aumento da expressão de TRAP. Por consequência, acredita-se que a redução do número de osteoclastos no tratamento com APO é proveniente da diminuição de TRAP. Ademais, acredita-se que a osteoclastogênese é dependente de NOX2 por outras vias além da produção de ROS e da expressão de RANK, vias que foram alteradas tanto no tratamento com APO quanto com NAC, mas com impacto diferente no número de osteoclastos.

Outra via analisada foi a EEIG1, a qual observou-se que o tratamento com APO reduziu a expressão dessa via, enquanto que o tratamento com NAC aumentou essa expressão. Mais uma vez a redução do número de osteoclastos com APO pode ser explicado por EEIG1, porém com NAC isso não é possível. Portanto, de alguma forma ainda não conhecida, a inibição de NOX2 reduziu a osteoclastogênese.

Um outro fator fundamental analisado é que ERK1 e TPC2 apresentam um comportamento bifásico com relação aos tratamentos e que NOX2 participa da formação de osteoclastos, porém ela está relacionada não apenas com a produção de ROS. Com isso, nós também sugerimos que a participação das vias RANKL/RANK/NOX2/ROS quanto RANKL/RANK/NOX2/Rac1/PLC γ 1 são importantes para a osteoclastogênese, sendo que apenas uma destas não é suficiente para a osteoclastogênese.

Nos tratamentos com APO e NAC em CMO obtivemos uma redução da área dos osteoclastos, assim como também foi observada a redução da expressão de DC-STAMP. Desta maneira, sugerimos que uma via relacionada com a fusão dos osteoclastos poderia ser RANKL/RANK/NOX2/ROS/DC-STAMP. A expressão de CTK, nesse estudo, não influenciou na inibição de NOX2/ROS, o que sugere novos estudos.

Conclui-se que a NOX2 participa do processo de osteoclastogênese em várias vias de sinalização e está relacionada além da produção de ROS e outros processos

ainda não conhecidos, porém imprescindíveis para diminuírem a formação de osteoclastos.

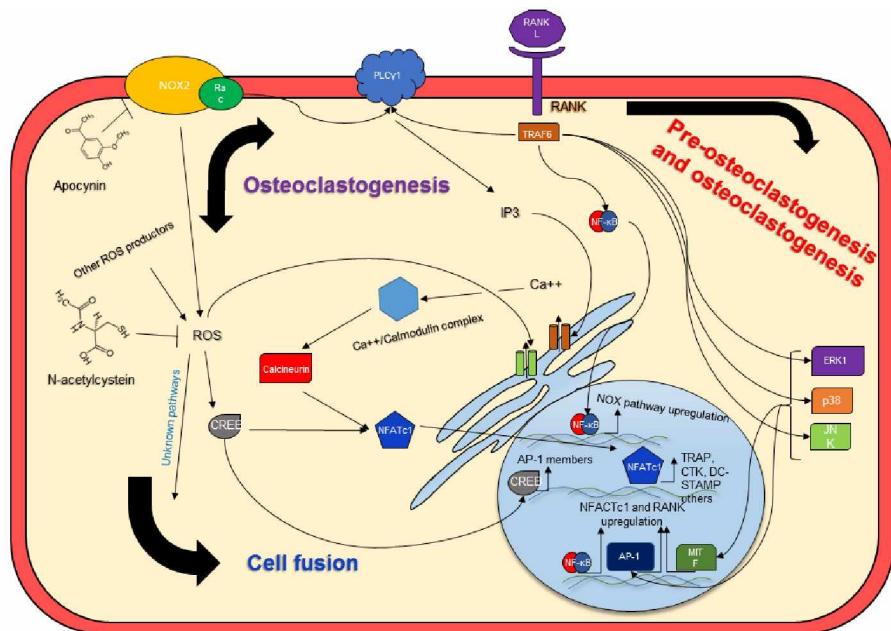


Fig. 8- Desenho das vias da osteoclastogênese dependentes de ROS e NOX2

8-Referências bibliográficas:

- ARUOMA, O. I. et al. The mechanism of initiation of lipid peroxidation. Evidence against a requirement for an iron(II)-iron(III) complex. **The Biochemical journal**, v. 258, n. 2, p. 617-20, 3 mar. 1989.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-76, 1 mar. 1999.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current opinion in immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-7, fev. 2004.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K.-H. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological reviews**, v. 87, n. 1, p. 245-313, 1 jan. 2007.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-42, 4 maio 2003.
- CHOI, H. K. et al. Early estrogen-induced gene 1, a novel RANK signaling component, is essential for osteoclastogenesis. **Cell research**, v. 23, n. 4, p. 524-36, 1 abr. 2013.
- CIRCU, M.; AW, T. Glutathione and apoptosis. **Free Radical Research**, p. 689-706, 2009.
- FU, Y. et al. Involvement of the Ca^{2+} signaling pathway in osteoprotegerin inhibition of osteoclast differentiation and maturation. **Journal of veterinary science**, v. 16, n. 2, p. 151-6, 4 jan. 2015.
- HAYMAN, A. R. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. **Autoimmunity**, v. 41, n. 3, p. 218-23, 2 abr. 2008.
- HE, Y. et al. Erk1 positively regulates osteoclast differentiation and bone resorptive activity. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24780, 6 jan. 2011.
- HOUGEE, S. et al. Oral administration of the NADPH-oxidase inhibitor apocynin partially restores diminished cartilage proteoglycan synthesis and reduces inflammation in mice. **European Journal of Pharmacology**, p. 264-269, 2006.
- KANZAKI, H. et al. The Keap1/Nrf2 protein axis plays a role in osteoclast differentiation by regulating intracellular reactive oxygen species signaling. **The Journal of biological chemistry**, v. 288, n. 32, p. 23009-20, 5 ago. 2013.

- KOH, J.-M. M. et al. Homocysteine enhances bone resorption by stimulation of osteoclast formation and activity through increased intracellular ROS generation. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 7, p. 1003-11, 6 jul. 2006.
- LEE, N. K. et al. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 852-9, 1 ago. 2005.
- LEE, Y. S.; CHOI, E. M. Apocynin stimulates osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. **Cellular immunology**, v. 270, n. 2, p. 224-9, 6 jan. 2011.
- MATSUMOTO, M. et al. Essential role of p38 mitogen-activated protein kinase in cathepsin K gene expression during osteoclastogenesis through association of NFATc1 and PU.1. **The Journal of biological chemistry**, v. 279, n. 44, p. 45969-79, 5 out. 2004.
- NAKAGAWA, N. et al. RANK Is the Essential Signaling Receptor for Osteoclast Differentiation Factor in Osteoclastogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 395-400, 1998.
- NAM, S.-J. J. et al. Apocynin regulates cytokine production of CD8(+) T cells. **Clinical and experimental medicine**, v. 14, n. 3, p. 261-8, 5 ago. 2014.
- NOTOMI, T.; EZURA, Y.; NODA, M. Identification of two-pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis. **The Journal of biological chemistry**, v. 287, n. 42, p. 35057-64, 5 out. 2012.
- PATERNITI, I. et al. Protective effects of apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase activity, in splanchnic artery occlusion and reperfusion. **Journal of leukocyte biology**, v. 88, n. 5, p. 993-1003, 1 nov. 2010.
- RABÉLO, L. et al. Desbalanço redox: NADPH oxidase como um alvo terapêutico no manejo cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 684-693, 2010.
- SASAKI, H. et al. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264.7) into osteoclasts. **The journal of medical investigation : JMI**, v. 56, n. 1-2, p. 33-41, fev. 2009.
- SHINOHARA, M. et al. Tyrosine kinases Btk and Tec regulate osteoclast differentiation by linking RANK and ITAM signals. **Cell**, v. 132, n. 5, p. 794-806, 5 mar. 2008.
- SILVA, M. J. et al. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. **Journal of dental research**, v. 90, n. 4, p. 495-500, 4 maio 2011.

- SIMONET, W. S. et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309-19, 5 abr. 1997.
- STASHENKO, P. et al. Interleukin-1 beta is a potent inhibitor of bone formation in vitro. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 2, n. 6, p. 559-65, 2 dez. 1987.
- STASHENKO, P. et al. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. **Oral surgery, oral medicine, and oral pathology**, v. 78, n. 4, p. 494-502, 6 out. 1994.
- SUDA et al. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. **Endocrine reviews**, p. 345-57, 1999.
- TAMAKI, Y. et al. Enhanced osteolytic potential of monocytes/macrophages derived from bone marrow after particle stimulation. **Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials**, v. 84, n. 1, p. 191-204, 2 jan. 2008.
- TORCIA, M. et al. Modulation of osteoclast-activating factor activity of multiple myeloma bone marrow cells by different interleukin-1 inhibitors. **Experimental hematology**, v. 24, n. 8, p. 868-74, 1 jul. 1996.
- VEJRAZKA, M.; MÍCEK, R.; STÍPEK, S. Apocynin inhibits NADPH oxidase in phagocytes but stimulates ROS production in non-phagocytic cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1722, n. 2, p. 143-7, 5 mar. 2005.
- WILLIAMS, J. P. et al. Regulation of avian osteoclastic H⁺ -ATPase and bone resorption by tamoxifen and calmodulin antagonists. Effects independent of steroid receptors. **The Journal of biological chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12488-95, 3 jun. 1996.
- ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of N-acetylcysteine actions. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 60, n. 1, p. 6-20, 3 jan. 2003.
- ZENG, G.-Z. Z. et al. Natural inhibitors targeting osteoclast-mediated bone resorption. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, n. 24, p. 6178-80, 5 dez. 2006.
- ZHANG, Y. et al. Apocynin but not allopurinol prevents and reverses adrenocorticotropic hormone-induced hypertension in the rat. **American journal of hypertension**, v. 18, n. 7, p. 910-6, 5 ago. 2005.