



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**



**NATALIA CAROLINE ALVES**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS  
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO  
DURANTE A OSTEOLASTOGÊNESE  
INDUZIDA EM CÉLULAS DA MEDULA  
ÓSSEA DE ANIMAIS NOX2-/-.**

UBERLÂNDIA

2018

NATALIA CAROLINE ALVES

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS  
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO  
DURANTE A OSTEOCLASTOGÊNESE  
INDUZIDA EM CÉLULAS DA MEDULA  
ÓSSEA DE ANIMAIS NOX2-/-.**

Trabalho de conclusão de curso apresentado  
a Faculdade de Odontologia da UFU, como  
requisito parcial para obtenção do título de  
Graduado em Odontologia

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula de Lima  
Oliveira

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Ms<sup>a</sup>. Marília Cherulli  
Dultra

UBERLÂNDIA

2018




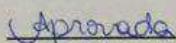
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
 GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

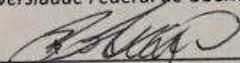
ATA DA COMISSÃO JULGADORA DA DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DO (A) DISCENTE **Natalia Caroline Alves** DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA.

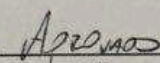
No dia **21 de maio de 2018**, reuniu-se a Comissão Julgadora aprovada pelo Colegiado de Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para o julgamento do Trabalho de Conclusão de Curso apresentado pelo(a) aluno(a) **Natalia Caroline Alves**, COM O TÍTULO: "AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO DURANTE A OSTEOCLASTOGÊNESE INDUZIDA EM CÉLULAS DA MEDULA ÓSSEA DE ANIMAIS NOX2-/-". O julgamento do trabalho foi realizado em sessão pública compreendendo a exposição, seguida de arguição pelos examinadores. Encerrada a arguição, cada examinador, em sessão secreta, exarou o seu parecer. A Comissão Julgadora, após análise do Trabalho, verificou que o mesmo se encontra em condições de ser incorporado ao banco de Trabalhos de Conclusão de Curso desta Faculdade. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas da Graduação, legislação e regulamentação da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos e lavrada a presente ata, que após lida e achada conforme, foi assinada pela Banca Examinadora.


Uberlândia, 21 de maio de 2018.


  
 Prof.ª. Dr.ª. Ana Paula de Lima Oliveira  
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

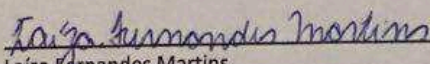
  
 Aprovado/Reprovado

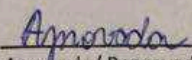
  
 Prof. Dr. Bruno Rodrigues Reis  
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

  
 Aprovado/Reprovado

  
 Prof.ª. Dr.ª. Juliana Bisinotto Gomes Lima  
 Universidade Federal de Uberlândia – UFU

  
 Aprovado/Reprovado

  
 Laiza Fernandes Martins  
 Aluno(a) de doutorado – PPGO/UFU

  
 Aprovado/Reprovado

*A Deus Pai, a Jesus e ao Espírito Santo,  
Aos meus pais, Raimundo Inacio Alves e Marilene Santos Alves,  
A minha irmã, Nayara Alves,  
Ao meu namorado, Josimar Silva e a minha linda vovó Rita.*

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, meu Pai e Conselheiro, por guiar meus passos e me cercar de pessoas especiais. Aos meus pais Raimundo e Marilene, por se doarem para que essa conquista fosse possível. À minha irmã, Nayara, com quem eu compartilho todas as etapas da minha vida. Ao meu namorado, Josimar, por me motivar e acreditar em cada um dos meus sonhos.*

*À minha orientadora, Ana Paula, pela dedicação, carinho e por todas as oportunidades de crescimento tanto profissional quanto pessoal. Ao professor Marcelo Barbosa e à Mariana Soares pelos ensinamentos. À minha co-orientadora, Marília Cherulli, pela alegria, carinho e ensinamentos. Aos amigos de laboratório Isadora e Matheus pelos dias alegres e por todas as contribuições para a realização desse trabalho.*

*As minhas amigas, Anna Luiza, Jéssica, Juliana, Mariana, Sara e Valquiria, por tudo que vivemos e aprendemos juntas. Foi um verdadeiro presente conhecê-las.*

*À minha turma 78 e ao Grupo de Oração por todos os bons momentos. À minha linda dupla de clínica, Isadora, por todo carinho. Aos amigos e aos professores da Escola Técnica de Saúde, por todo carinho e ensinamentos.*

*Aos professores, técnicos e pacientes da FOUFU que contribuíram com a minha formação. Muito obrigada!!*

## RESUMO

O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica que está sob ciclos constantes de remodelação dada pela atividade dos osteoblastos e osteoclastos. A maioria das doenças ósseas está associada a uma atividade osteoclástica excessiva, que promovem um desequilíbrio na remodelação óssea, resultando em danos ao esqueleto humano como os observados na osteoporose, doença periodontal e artrite reumatóide. Os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão dos precursores da linhagem dos monócitos/macrófagos oriundos da medula óssea que chegam ao local da reabsorção através da corrente sanguínea. Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pelo complexo NADPH oxidase estão envolvidas na diferenciação de osteoclastos. Para avaliar a influência de NOX2 na formação de osteoclastos foi realizada a cultura das células da medula óssea de camundongos knockout para NOX2 frente a estímulo com RANKL e M-CSF. O número de osteoclastos foi maior nos animais NOX2 comparados com o C57. Os dados estão em desacordo com a literatura uma vez que estudos que inibem a enzima NOX2 demonstraram que a formação de osteoclasto é inibida parcialmente. No entanto, não há estudos semelhantes a esse na literatura e por tanto uma investigação criteriosa precisaria ser feita para explicar o por que dos precursores de osteoclastos diferenciarem mais nos animais NOX2.

**Palavras chaves:** Osteoclasto, Doença Periodontal, Osteoclastogênese, ROS, NOX2

## **ABSTRACT**

The bone tissue is a dynamic structure that is under constant cycles of remodeling given by the activity of osteoblasts and osteoclasts. Most bone diseases are associated with excessive osteoclastic activity, which promote imbalance in bone remodeling, resulting in damage to the human skeleton such as those seen in osteoporosis, periodontal disease, and rheumatoid arthritis. Osteoclasts are multinucleated cells formed by the fusion of the precursors of the lineage of the bone marrow monocytes / macrophages that reach the site of reabsorption through the bloodstream. It is known that the reactive oxygen species (ROS) produced by the NADPH oxidase complex are involved in the differentiation of osteoclasts. To evaluate the influence of NOX2 on osteoclast formation, bone marrow cells were cultured from knockout mice to NOX2 against RANKL and M-CSF stimulation. The number of osteoclasts was higher in NOX2 animals compared to C57. The data are at odds with the literature since studies that inhibit the NOX2 enzyme have demonstrated that the formation of osteoclast is partially inhibited. However, there are no studies similar to this in the literature and therefore a careful investigation should be made to explain why osteoclast precursors differentiate more in NOX2 animals.

**Key words:** Osteoclast, Periodontal Disease, Osteoclastogenesis, ROS, NOX2

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Dissecação das tíbias e fêmures dos camundongos	15
FIGURA 2	Remoção das células da medula	16
FIGURA 3	Ressuspensão das células em lise de hemácias	17
FIGURA 4	Cultura das células da medula	18
FIGURA 5	Tratamento com RANKL e M-CSF	19
FIGURA 6	Determinação das células diferenciadas por TRAP	20
FIGURA 7	Osteoclastos	21
GRÁFICO 1	Avaliação do número de osteoclastos por poço	22
GRÁFICO 2	Avaliação do número total de osteoclastos	22



## SUMÁRIO

Resumo .....	6
1. Introdução .....	10
2. Revisão de literatura .....	12
3. Objetivos .....	14
4. Metodologia .....	14
5. Resultados .....	20
6. Discussão .....	23
7. Conclusão .....	24
8. Referências Bibliográficas .....	25
9. Anexo A .....	30
10. Anexo B .....	32

## 1. INTRODUÇÃO

A doença periodontal assim como outras alterações que acometem o tecido ósseo, possui alta taxa de prevalência na população e causa efeitos deletérios no organismo humano. A periodontite em específico promove a perda de elementos dentários que culminam em alterações nos estados físicos, psíquicos e relações interpessoais implicando diretamente na qualidade de vida das pessoas acometidas (LINDHE, 2015). O tecido ósseo é uma estrutura dinâmica que está em constante remodelação. A nível celular, sua remodelação se dá por repetidos ciclos de reabsorção pelos osteoclastos, seguido pela formação óssea através dos osteoblastos. Em condições de normalidade existe um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, garantindo assim a homeostase dos tecidos (TORRES et al., 2004).

A reabsorção óssea é um processo de múltiplas etapas, iniciando-se com proliferação de precursores dos osteoclastos imaturos, seguindo com a diferenciação e maturação desse tipo celular, e finalmente a degradação das matrizes orgânicas e inorgânicas do tecido ósseo (TEITELBAUM, 2000). Osteoclastogênese é o nome dado ao processo de formação do osteoclasto. Esse complexo processo é regulado por uma cascata de eventos que envolvem a participação de moléculas e citocinas pro-inflamatórias bem como do eixo RANKL/RANK/OPG (COCHRAN, 2008). Essa cascata de eventos é dependente da interação do ativador do receptor do fator nuclear (NF) -  $\kappa$  B (RANK), expresso no osteoclasto ao ligando de RANK (RANKL) proveniente dos osteoblastos, apresentando uma função importante na regulação da diferenciação e atividade dos osteoclasto, sendo moléculas chaves na regulação do metabolismo ósseo.

A osteoclastogênese tem seu início em células estaminais hematopoiéticas que, devido à ligação do fator estimulador de colônia de macrofágica (M-CSF), ao receptor da superfície celular c-Fms (CSF1R), se autofosforila e ativa a cinase regulada por sinais extracelulares 1 ou 2 (ERK1/2) e a fosfatidilinositol-3-cinase/Akt, sendo este o primeiro passo na formação do osteoclasto. Quando RANK liga-se ao seu ligante específico, ocorre à ativação das enzimas MAPKs (p38, cinase regulada por sinais extracelulares (ERK) e cinase N-terminal Jun) que estimulam uma variedade de fatores de transcrição e, deste modo, promove a osteoclastogênese (SUN S, 2008). O CSF-1 e

RANKL também são necessários para induzir a expressão de genes como fosfatase resistente ao tartarato ácido (TRAP), catepsina K (CATK), receptor de calcitonina e  $\alpha\beta 3$ -integrina, que são necessários para finalizar a diferenciação dos osteoclastos (Lacey DL et al., 1998).

Quando maduro, o corpo celular dos osteoclastos é polarizado e, em resposta a ativação do RANK pelo seu ligante RANKL (BURGESS TL et al., 1999), ocorrem mudanças estruturais que o preparam para reabsorver osso, como o rearranjo do citoesqueleto de actina e formação de uma junção bem definida entre a superfície óssea e a membrana basal para formar um compartimento selado. No microambiente estabelecido, os osteoclastos descarregam ácidos, especialmente o ácido láctico e cítrico, promovendo um pH muito baixo, em média 4,7 (SILVER et al., 1988). Os íons H livres nos lisossomos clásticos ativam TRAP e CATK, que degradam a porção orgânica e a inorgânica da matriz óssea, complementando a ação dos ácidos, desmontando a estrutura óssea (CONSOLARO, 2012).

Algumas condições inflamatórias podem levar a um quadro de reabsorção óssea excessiva, como observados na periodontite e osteoporose (COCHRAN, 2008). A maioria das doenças inflamatórias está associada com a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e TNF- $\alpha$ ) sendo elas indutoras da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que possuem grande participação na diferenciação óssea nesses microambientes e, conseqüentemente, na reabsorção óssea (FUKADA et al., 2009; LIN, 2007). As ROS são geradas a partir de um processo denominado “explosão” oxidativa, promovida pela ativação do sistema NADPH oxidase através da redução de oxigênio molecular por elétrons provenientes, predominantemente, da NADPH acarretando a produção de ânion superóxido. A ativação do sistema enzimático NADPH oxidase é induzida in vivo por imunocomplexos, bactérias e diversos metabólitos (glicose, aminoácidos, ácidos graxos, citocinas) (GARCIA, et al. 1999).

O sistema enzimático NADPH oxidase é formado por componentes dissociados na célula em repouso. Estes componentes são a p40NOX2, p47NOX2 e a p67NOX2, agrupadas em um sistema protéico citoplasmático. Também há o citocromo b558, composto pelas proteínas p22NOX2 e NOX2 (também conhecida como gp91NOX2) localizadas nas membranas das vesículas secretórias e dos grânulos específicos

citoplasmáticos (GUICHARD et al., 2008). Há ainda outras proteínas de baixa massa molecular, ligantes de nucleotídeo guanina: a Rac1 e 2 e Rap1a, que também participam do processo (BOKOCH, 2003; ROOS, et al., 2003).

A ativação do sistema NADPH oxidase se inicia pela fosforilação do componente citosólico p47NOX2, resultando na migração de todas as proteínas citosólicas para a membrana plasmática. Uma vez na membrana, estas proteínas se associam ao citocromo b558 que migrou para a mesma através da fusão das vesículas secretórias e dos grânulos específicos. A Rac1/2 liga-se simultaneamente ao trifosfato de guanosina (GTP) e migra para a membrana juntamente com o sistema citosólico (BABIOR, 1999; BEDARD, 2007). Quando ativo, o sistema multienzimático NADPH oxidase é responsável pela transferência de elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, formando ROS (REEVES, LU et al. 2002).

Sabe-se que ROS desempenha um papel importante no osteoclasto, atuando como um segundo mensageiro nas várias vias de sinalização, aumentando consequentemente a atividade osteoclástica e favorecendo o desequilíbrio da atividade osteomodeladora (SUNDARESAN M et al.1995; FORMAN HJ et al. 2004). Portanto, este trabalho tem como objetivo analisar a influência de ROS durante a osteoclastogênese em células da medula óssea de camundongos *knockout* para NOX2, ou seja, camundongos que não tem a enzima para a produção de ROS.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

Nas últimas duas décadas, diversos estudos indicaram que as espécies reativas de oxigênio, como o superóxido e o peróxido de hidrogênio, são componentes cruciais que regulam o processo de diferenciação de osteoclastos (Callaway, D. A. & Jiang, J. X, 2015). Os pesquisadores Harman (1956), Altindag et al (2008) e Wauquier et al (2009), mostraram em seus trabalhos que o stress oxidativo induzido por ROS aumenta com o envelhecimento ou com o aparecimento de um estado inflamatório, afetando negativamente a homeostase óssea e favorecendo um ambiente reabsortivo. Algumas das primeiras evidências de participação ROS na biologia dos osteoclastos foram descritas pelo grupo do Dr. Greg Mundy, eles mostraram que a adição da enzima

produtora de superóxido, a xantina oxidase, in vivo e in vitro resultava em números aumentados de osteoclastos como também em sua atividade (Garrett IR et al.1990).

Chave LL et al. (1990), mostraram em seus trabalhos que a produção de ROS estava presente no osteoclastos e sugeriram que ele pode ser derivado do fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH oxidase) encontrada na membrana desta célula. Confirmando essa hipótese dada por Chave LL e seus colegas, (Darden AG et al. 1996, Yang S et al. 1998), comprovaram o envolvimento de NOX com a atividade osteoclástica, quando a adição de um inibidor específico de Nox, difenileno iodônio1q (DPI), promoveu a diminuição da produção de ROS e também da reabsorção óssea

Suda et al (1994), indicaram em seus estudos que ROS medem as vias de sinalização induzidas pelo RANK-RANKL e ainda atuam nos eventos celulares como um segundo mensageiro em células precursoras de osteoclastos regulando consequentemente sua diferenciação. Mostraram ainda que a estimulação RANKL aumenta transitoriamente os níveis intracelulares de ROS através de NADPH-oxidase. Hall et al. (1995), também sugerem que ROS tem um efeito indireto na ativação de vias de sinalização como fator nuclear  $\kappa$  B (NF-  $\kappa$  B) que promovem a formação de osteoclastos e também em sua atividade. As primeiras evidências da produção de ROS mediada por RANKL foram fornecida pelo grupo de Ha e colegas (2004) quando eles mostraram em um estudo que, após 5 minutos de estimulação RANKL, a presença de ROS poderia ser detectada através de um aumento em CM-DCF (detector geral ROS, diclorodi), o que pode ser atenuado pela adição de antioxidantes.

Para determinar qual das isoformas de Nox exerce efeito sobre a osteoclastogênese, Lee et al. avaliou os níveis de mRNA de Nox1, Nox2, Nox3 e Nox4. Em células da medula óssea linhagem monócito-macrófago (BMMs) não estimuladas, eles observaram que Nox2 estava presente a níveis mais elevados, enquanto que os níveis Nox1 foram muito baixos e NOX3 e NOX4 eram indetectáveis. Isto também foi confirmado por um grupo separado que avaliaram os níveis de NOX de miRNA durante o processo de diferenciação. Eles descobriram que embora Nox2 estava presente nas BMMs não estimuladas, os níveis de miRNA diminuiu significativamente 72 h após a adição de RANKL (Sasaki H et al. 2005).

A produção de ROS é um importante componente da ativação dos fagócitos e da sua atividade microbicida e tumoricida (BOGDAN et al., 2000). A presente pesquisa avaliou a influência das espécies reativa de oxigênio durante a osteoclastogênese induzida em célula da medula óssea de animais *nox2*<sup>-/-</sup>. Como metodologia foi realizada a cultura de células da medula óssea de camundongos knockout de gp91 principal subunidade formadora de ROS no complexo Nox2. Sabendo que ROS produzido pela enzima phagocyte oxidase NOX2 influência na formação de osteoclastos, nosso trabalho ampliará o campo de estudo e tratamento das doenças osteolíticas, colaborando com a bibliografia médica no que diz respeito à elucidação de novos alvos terapêuticos para a elaboração de drogas inibidoras da osteólise, sendo que tal abordagem é de suma importância para o tratamento de doenças de alta incidência como a artrite reumatóide e a doença periodontal.

### 3. OBJETIVOS

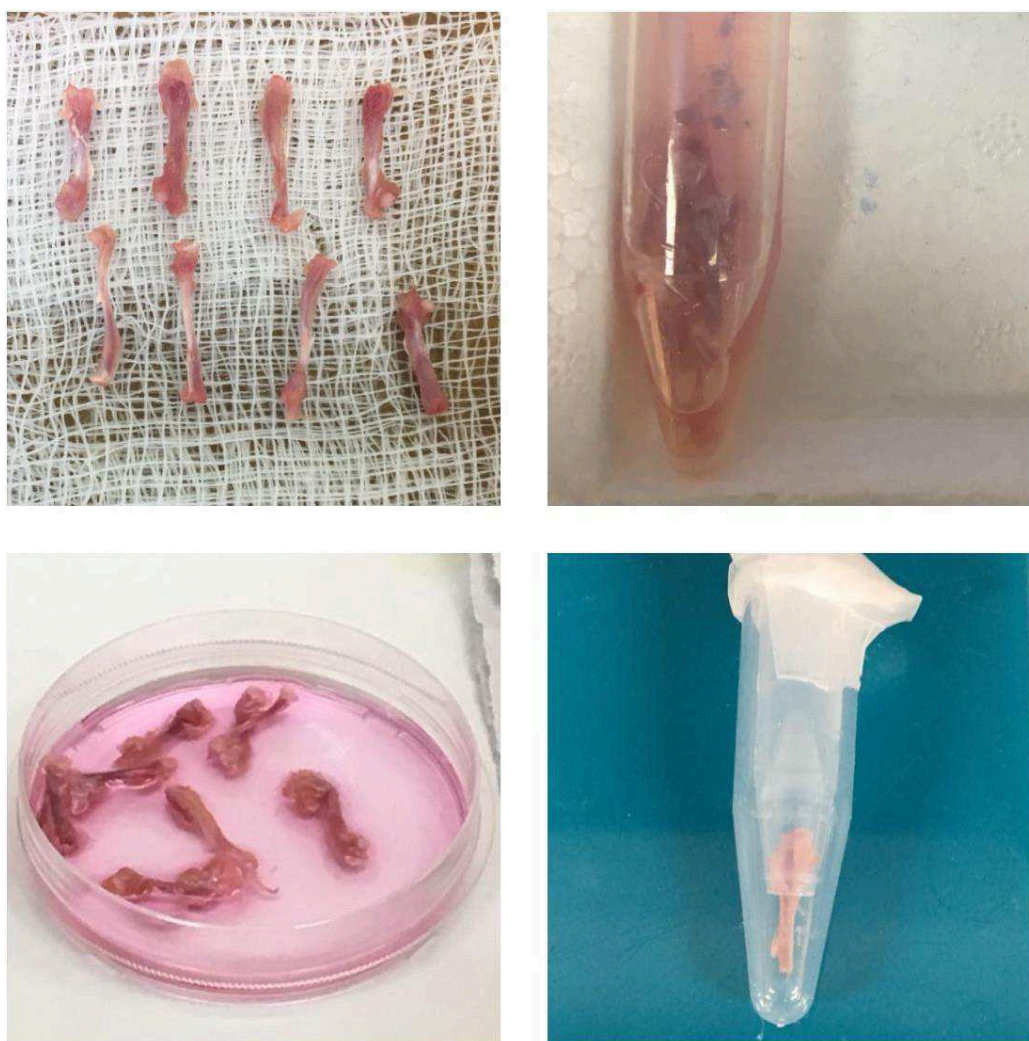
Avaliar a influência das espécies reativas de oxigênio durante a osteoclastogênese a partir de células da medula óssea de camundongos deficientes da *gp91<sup>NOX2</sup>* (principal subunidade da NOX2).

Avaliar o número de osteoclastos diferenciados a partir de células da medula óssea de camundongos *NOX2*<sup>-/-</sup> após o tratamento com RANKL e M-CSF.

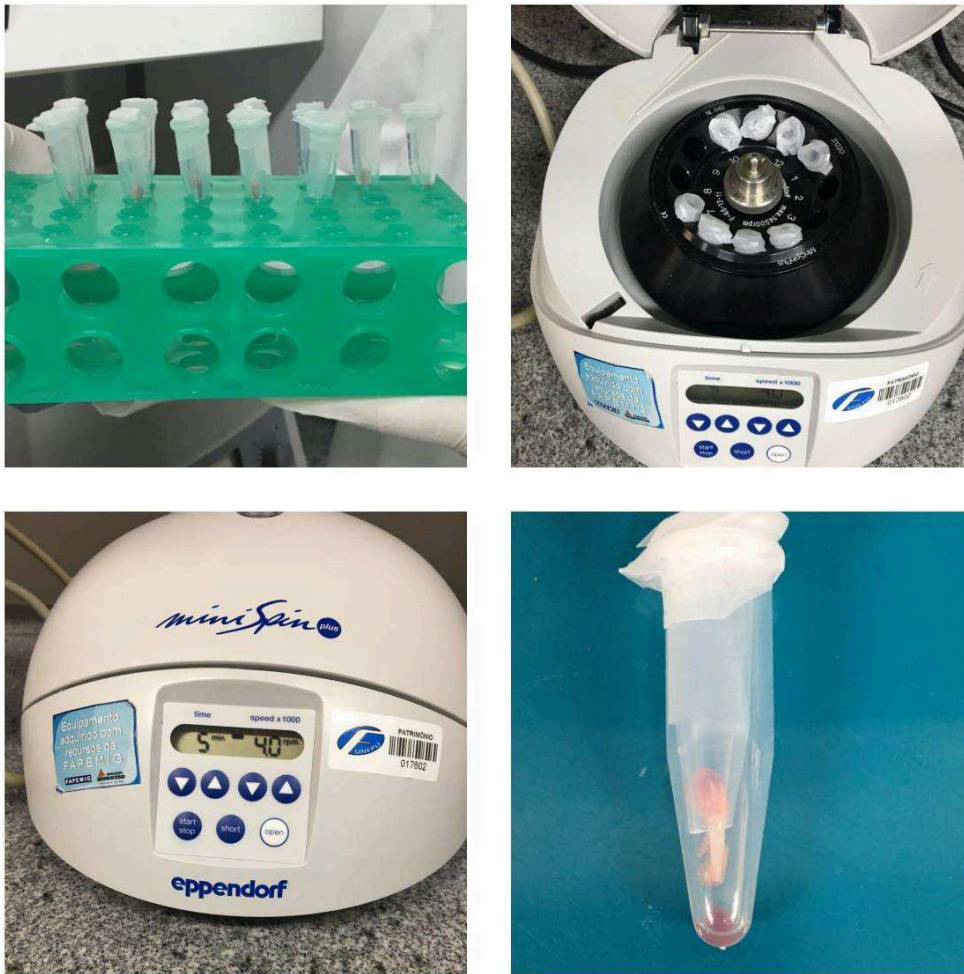
### 4. METODOLOGIA

As células da medula óssea foram removidas da tíbia e fêmur de camundongos *NOX2*<sup>-/-</sup> (B6.129S6-Cybbtm1Din/J) com idade entre seis e oito semanas, mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Essa pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em Experimentação Animal desta universidade sob o projeto de nº 014/13. Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Após o sacrifício, os animais foram limpos com gaze estéril embebida em álcool 70% e colocados sobre um campo cirúrgico para dissecação dos membros posteriores. A dissecação da tíbia e fêmur foi realizada com bisturi, tesouras e pinças esterilizadas. As peças foram colocadas em um tubo de 15 ml, contendo 2 ml de meio  $\alpha$ -MEN incompleto sem soro fetal de bezerro (SFB). (Fig. 1). As tíbias e fêmures foram colocados em uma na placa Petri com meio  $\alpha$ -MEN

completo. As cabeças dos fêmures e das tíbias foram removidas e descartadas. Em seguida as peças foram colocadas em microtúbulos de 0,5 mL furados no fundo e colocadas em microtúbulos de 1,5 mL, e centrifugadas em 10000 rpm por cinco minutos (Fig. 2). As células foram ressuspendidas em 500 uL de tampão de lise de hemáceas. Todos os volumes foram reunidos até completar 7 mL, e centrifugados novamente (Fig.3). O sobrenadante foi descartado e o pellet de células foi ressuspendido em 6 mL com meio  $\alpha$ -MEN completo. A contagem das células foi feita pela câmara de Neubauer.



**Figura 1: Dissecação das tíbias e fêmures dos camundongos NOX2<sup>-/-</sup>.**



**Figura 2: Remoção das células da medula óssea de camundongos NOX2<sup>-/-</sup> (B6.129S6- Cybbtm1Din/J).**



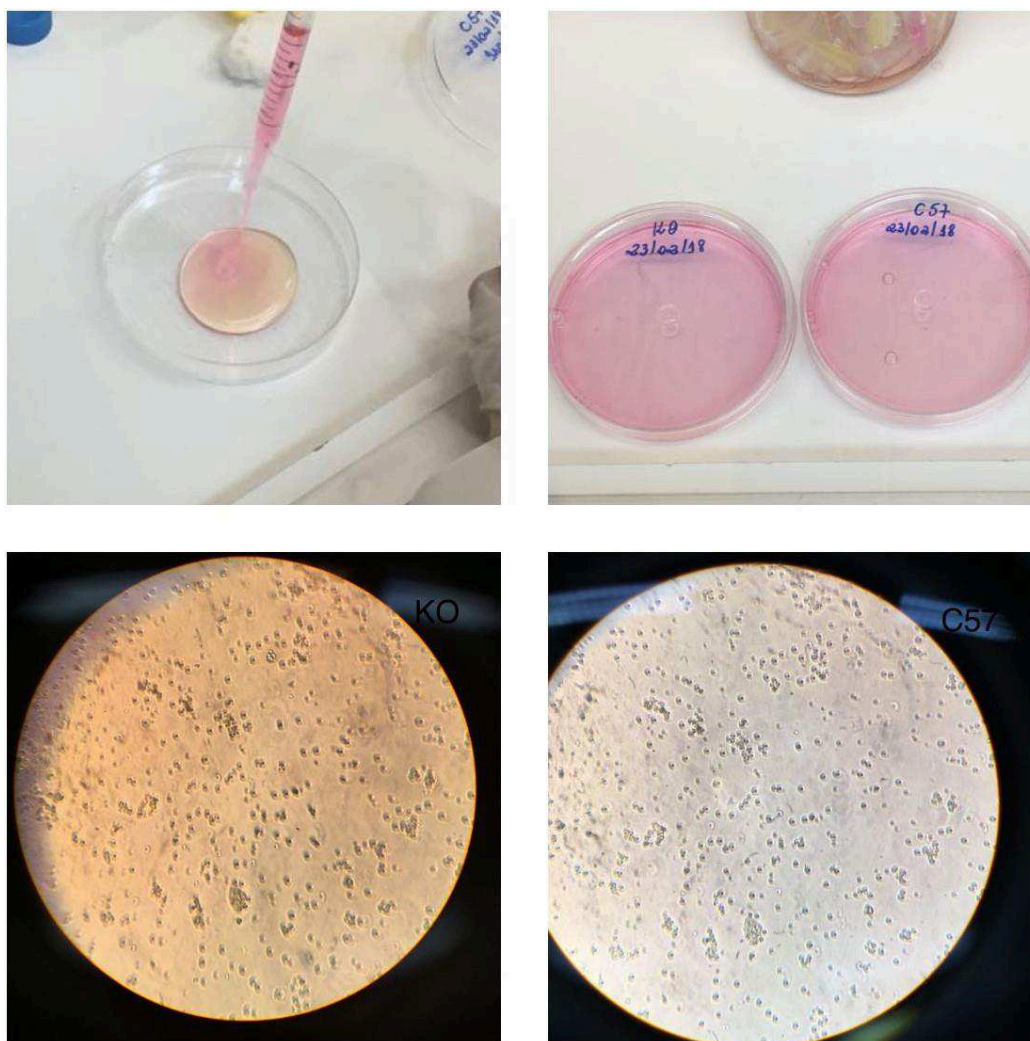


**Figura 3: Ressuspensão das células em 500ul de lise de hemácias**

### **CULTURA DE CÉLULAS DA MEDULA**

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), 15% 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) (Fig.4). Essas células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2 x 10<sup>5</sup> células/poço) e tratadas no dia 0 com 100 ng/mL de recombinante rRANKL (Peprotech, Rock Hill, NJ)

e 25 ng/mL de M-CSF. A cada 3 dias, metade do meio de cultura foi removido de cada poço e adicionado a mesma quantidade de rRANKL e M-CSF (Fig 5). A cultura foi interrompida no dia 5, momento em que os osteoclastos estão formados (ISHIDA;AMANO , S. 2004).



**Figura 4: Cultura de células da medula óssea de camundongos NOX2<sup>-/-</sup> (B6.129S6-Cybbtm1Din/J) em meio alfa-MEM e tratamento com 30 ng/mL de M-CSF.**

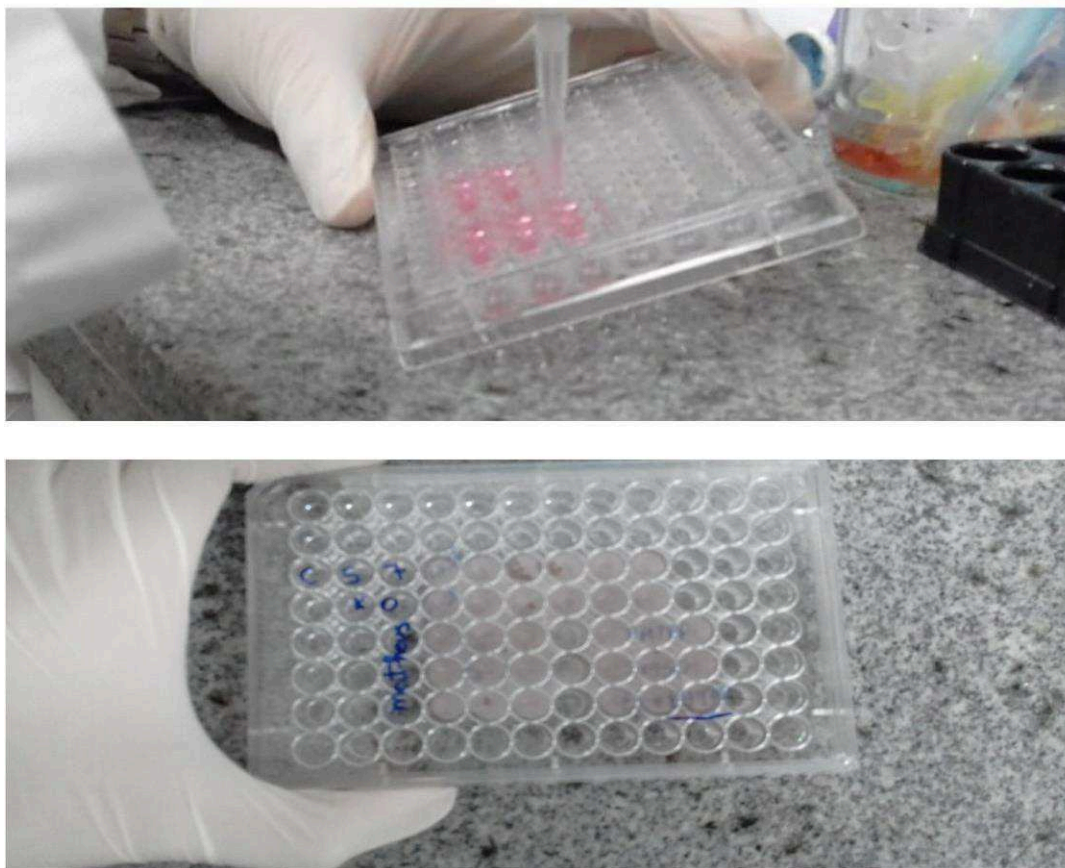


**Figura 5: Plaqueamento e tratamento com RANKL e M-CSF**

### **DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE OSTEÓCLASTOS 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 um kit específico (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Primeiramente, o meio de cultura foi descartado e as células aderidas foram fixadas em formalina 4% por 10 min. Em seguida, elas foram lavadas 5 vezes com tampão de fosfato (PBS) estéril e

incubadas com a solução de tartarato mais o naphthol por 1h em temperatura ambiente. Depois, as células foram lavadas 5 vezes com PBS e contra-coradas por 5 minutos com o verde de metil e contadas no microscópio. Consideramos células TRAP positivas aquelas que possuem três ou mais núcleos com grânulos citoplasmáticos marcados por depósitos de cor púrpura à vermelho escuro. As placas foram levadas ao microscópio óptico para a contagem dos osteoclastos diferenciados.

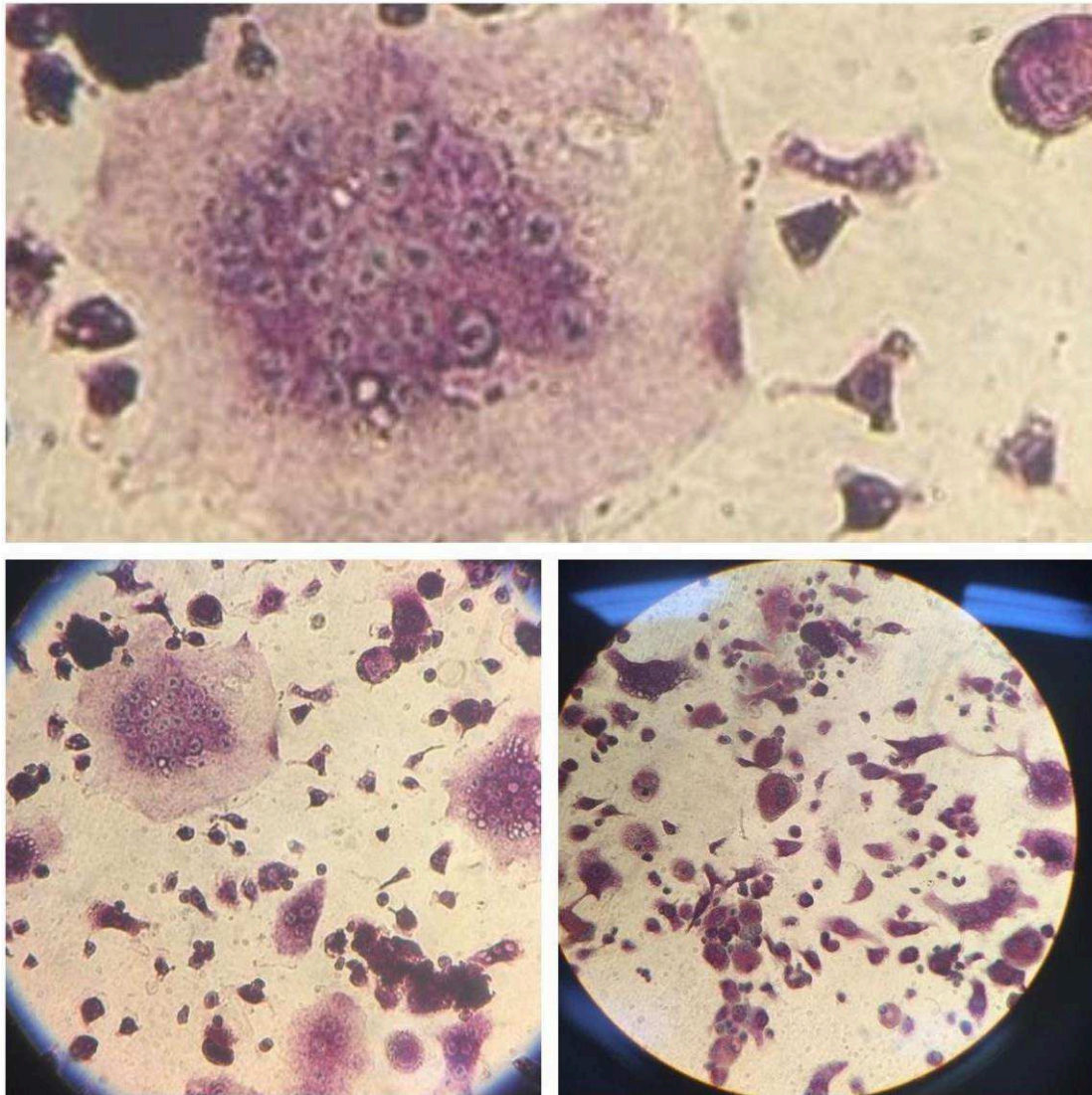


**Figura 6: Reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato.**

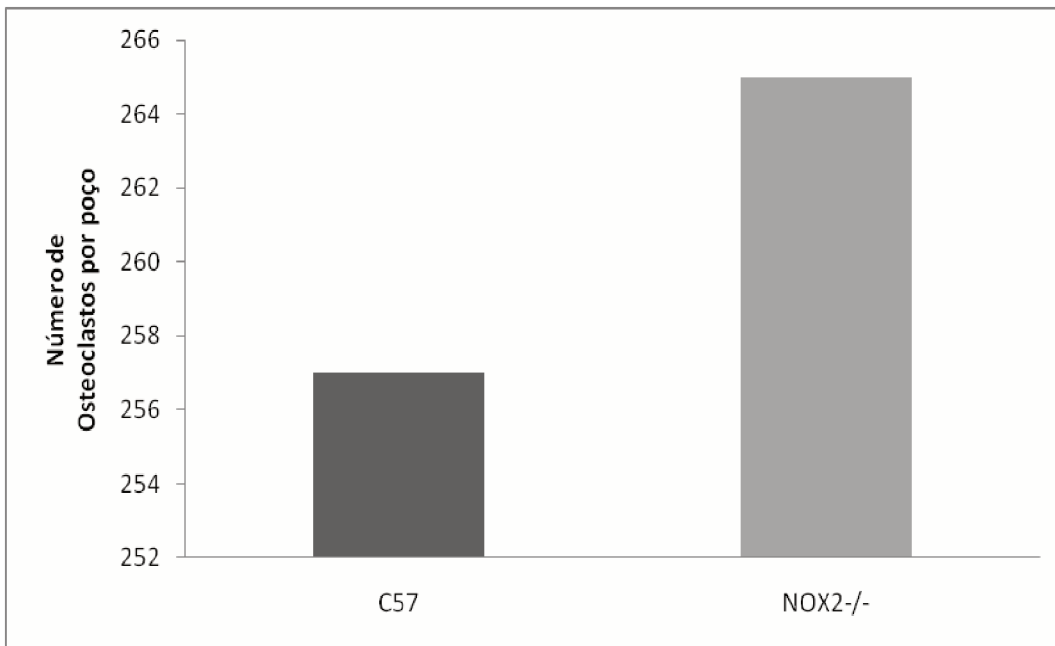
## **5. RESULTADOS**

As células positivas para TRAP apresentaram coloração púrpura, o que proporciona a visualização dos núcleos dos osteoclastos. A figura 7 mostra os osteoclastos derivados dos animais knockout em microscópio óptico em aumento de 40x. O número de osteoclastos derivados dos camundongos knockout de NOX2 por poço foi de 265 em média. E 257 osteoclastos derivados da medula óssea de camundongo controle em média por poço (Gráfico 1). Totalizando 2.387 osteoclastos

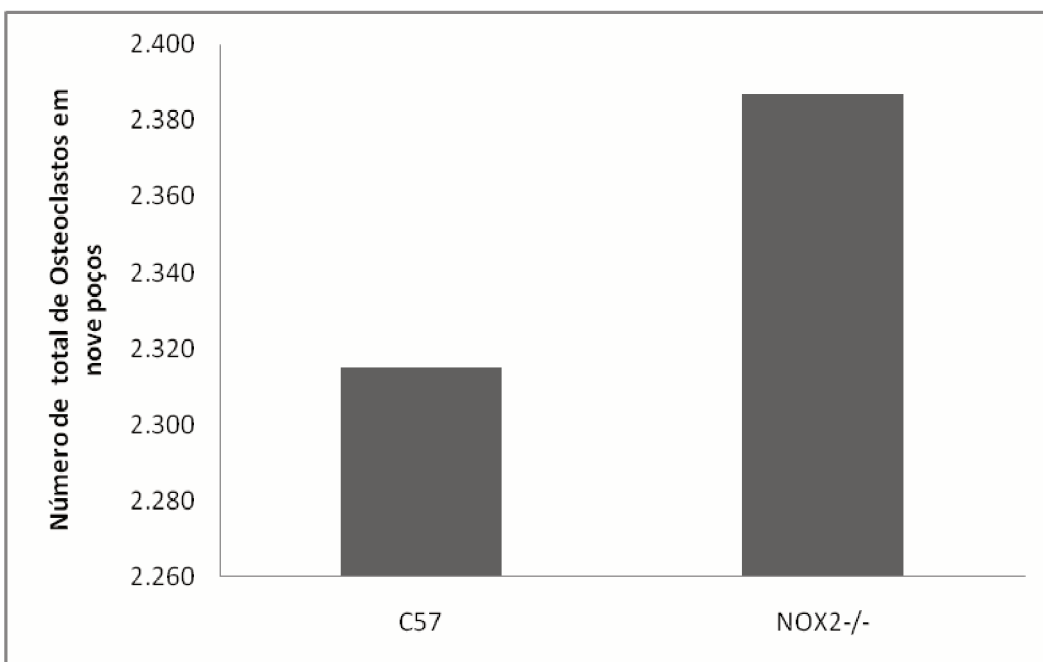
derivados dos camundongos Knockout contados em nove poços e 2.315 osteoclastos derivados da medula óssea de camundongos C57 somados em nove poços (Gráfico2). Foi observado um maior número de osteoclastos oriundos do animal knockout.



**Figura 7: Osteoclastos derivados dos animais knockout.**



**Gráfico 1: Avaliação do número de osteoclastos por poço.**



**Gráfico 2: Avaliação do número total de osteoclastos em nove poços.**

## 6. DISCUSSÃO

As primeiras evidências da produção de ROS mediada por RANKL foram fornecida pelo grupo de Ha et al (2004) quando eles mostraram em um estudo que, após 5 minutos de estimulação RANKL, a presença de ROS poderia ser detectada através de um aumento em CM-DCF (detector geral ROS, diclorodi), o que pode ser atenuado pela adição de antioxidantes. Os osteoclastos são células multinucleadas formadas pela fusão dos precursores da linhagem dos monócitos/macrófagos oriundos da medula óssea que chegam ao local da reabsorção através da corrente sanguínea. São induzidos principalmente pelas citocinas ósteo-reabsortivas associadas ao recrutamento e à diferenciação dos osteoclastos como a Interleucina1 (IL-1), Inteleucina 3 (IL-3), Inteleucina 6 (IL-6), Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (LINS et al., 2007). In vivo, bem como em modelos de cultura celular, a diferenciação em osteoclasto requer a presença de fatores de RANKL e M-CSF. O M-CSF induz a expressão de RANK, o receptor de RANKL em células mielóides (Goettsch et al. 2013).

Nossos resultados mostraram que RANKL e MCSF são citocinas que promovem a diferenciação dos osteoclastos. Sendo fundamentais no processo de osteoclastogênese. A diferenciação das células hematopoiéticas em osteoclastos requer a ação de M-CSF e RANKL que atuam através dos seus receptores de c-fms e receptor para a ativação de (RANK), respectivamente. Nos estágios iniciais da diferenciação osteoclástica, M-CSF estimula a expressão de RANK em células precursoras de osteoclastos (NAKANISHI et al. 2013).

Quanto ao número de osteoclastos diferenciados, nossos resultados mostraram que as células provenientes dos camundongos knockout de NOX2 apresentaram maior número de células diferenciadas em osteoclastos, quando comparado ao número de células diferenciadas provenientes dos camundongos controle. Sabe-se que condições inflamatórias podem alterar as respostas biológicas dos tecidos. Segundo Bartold et al. (2010), a formação dos osteoclastos é impulsionada por citocinas presentes nos tecidos periodontais inflamados. O que pode ser uma justificativa para os resultados encontrados. Existe ainda a discrepância entre as conclusões da literatura quanto às diferentes subunidades de NOX e os seus papéis na atividade osteoclástica. Goettsch et al. (2013) mostraram em um estudo, que o silenciamento genético de NOX4 leva à

formação reduzida de osteoclastos e, subsequentemente, a redução da reabsorção óssea. As divergências encontradas na literatura são fortes indicadores de que mais estudos precisam ser realizadas, a fim de definir os papéis das diferentes isoformas NOX na osteoclastogênese bem como na função do osteoclasto.

## **7. CONCLUSÃO**

Os resultados demonstraram que o tratamento com RANKL e M-CSF promovem a diferenciação dos osteoclastos. O número de osteoclastos foi maior nos animais NOX2 comparados com o C57. Portanto uma investigação criteriosa precisaria ser feita para explicar o por que dos precursores de osteoclastos diferenciarem mais nos animais NOX2.



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTINDAG O, Erel O, Soran N, Celik H, Selek S. Total oxidative/anti-oxidative status and relation to bone mineral density in osteoporosis. *RheumatolInt* 28:317–321, 2008.

BABIOR, B. M. The leukocyte NADPH oxidase. *Isr. Med. Assoc. J.*, Israel, v. 4 pt. 11, p. 1023-1024, 2002.

BARTOLD, M. P.; CANTLEY, M. D.; HAYNES, D. R. Mechanisms and control of pathologic bone loss in periodontitis. *Periodontology 2000*, Malden, v. 53, n. 1, p. 55-69, jun. 2010.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. *Blood*, v. 93, p. 1464 – 1476, 1999.

BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews*, v. 87, n. 1, p. 245-313, 2007.

BOGDAN, C. et al. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr.opin. immunol.*, Philadelphia, v. 12, pt.1, p. 64-76, 2000.

BOKOCH, G. M.; KNAUS U. G. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends biochem.sci.*, Cambridge, v. 28, pt. 9, p. 502-508, 2003.

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, v.423, p. 337-42, May. 2003.

BURGESS, T. L. et al. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J. Cell Biol.* 145, 527–538 (1999).

Callaway, D. A. & Jiang, J. X. Reactive oxygen species and oxidative stress in osteoclastogenesis, skeletal aging and bone diseases. *J. Bone Miner. Metab.* 33, 359–370 (2015).

Chave LL, Ries WL, Taylor GR, Hays BD, Pitzer BL. Derivados de oxigênio- radicais livres em osteoclastos especificidade e a localização da Reaçãonitrozul de tetrazólio. *Ossos* 11: 115-119, 1990.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, v. 79, p. 1569-1576, 2008.

#### CONSOLARO

DARDEN AG, Ries WL, Wolf WC, Rodriguiz RM, Key LL. A produção de superóxido osteoclástica e reabsorção óssea: a estimulação e inibição por moduladores de NADPH-oxidase. *J Bone Miner Res* 11: 671-675, 1996.

FORMAN HJ, Fukuto JM, M. Torres Redox signaling: chemical thiol which reactive species of oxygen and nitrogen may they act as second messengers. *Am J Physiol Cell Physiol*. 287: C246-256, 2004.

FUKADA, S. Y. et al. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res*, v. 87, n. 12, p. 1155-9, Dec 2008.

GARCIA, C. et al. Effects of adrenaline on glucose and glutamine metabolism and superoxide production by rat neutrophils. *Clin. sci., London*, v. 96, pt. 6, p. 549-555, 1999.

Garrett IR, Boyce BF, Oreffo RO, Bonewald G, J Poser, Mundy GR. Os radicais livres derivados de oxigênio estimulam a reabsorção óssea osteoclástica óssea em roedores in vitro e in vivo. *J Clin Invest* 85: 632-639, 1990.

Goettsch, C. et al. NADPH oxidase 4 limits bone mass by promoting osteoclastogenesis. *J. Clin. Invest.* 123, 4731-4738 (2013).

GUICHARD, C. et al. NOX family NADPH oxidases in liver and in pancreatic islets: a role in the metabolic syndrome and diabetes? *Biochem. Soc. T ofrans., London*, v. 36, pt. 5, p. 920-929, 2008.

Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, Lee ZH. As espécies reativas de oxigênio mediar RANK de sinalização em osteoclastos. *Exp Cell Res* 301: 119-127, 2004.

Hall TJ, Schaeublin M, Jeker H, Fuller K, Chambers TJ (1995) The role of reactive oxygen intermediates in osteoclastic bone resorption. *Biochem Biophys Res Commun* 207:280–287.

Harman D (1956) Envelhecimento-uma teoria baseada em radicais livres e radiação-química. *J Gerontol* 11: 298-300.

ISHIDA, M.; AMANO, S. Osteocalcin fragment in bone matrix enhances osteoclast maturation at a late stage of osteoclast differentiation. *J Bone Miner Metab*, v. 22, n. 5, p. 415-29, 2004.

Karen Bedard, Karl-Heinz Krause. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiological Reviews* Published 1 January 2007 Vol. 87 no.1, 245-313.

Lacey, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165–176 (1998).

Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, um papel crucial para as espécies de oxigênio reativas em diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL Lee SY (2005). *Sangue* 106: 852-859.

Li, Y. P., Chen, W., Liang, Y., Li, E. & Stashenko, P. Atp6i-deficient mice exhibit severe osteopetrosis due to loss of osteoclast-mediated extracellular acidification. *Nature Genet.* 23, 447–451 (1999).

LINDHE, J. Tratado de periodontia clínica e implantodontia oral, 5ª ed., Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro 2015.

LIN, L. M.; HUANG, G. T-J.; ROSENBERG, P . A. Proliferation of Epithelial cell Rest, formation of apical cysts after Periapical Wound healing. **Joe**, v.33, n.8,p. 908-16, 2007.

Nakanishi, A., Hie, M., Iitsuka, N. & Tsukamoto, I. A crucial role for reactive oxygen species in macrophage colony-stimulating factor-induced RANK expression in osteoclastic differentiation. *Int. J. Mol. Med.* 31, 874–880 (2013).

REEVES, E.P.H. LU, et al (2002). Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by  $k^+$  flux. *Nature* **416**(6878); 291-7

ROOS, D. et al. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes infect.*, Paris, v. 5, pt. 14, p. 1307-1315, 2003.

Sasaki H, Yamamoto H, Tominaga K, Masuda K, Kawai T, Teshima-Kondo S, Matsuno K, Yabe-Nishimura C, Rokutan K. Receptor activator of nuclear factor-  $\kappa$  B ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. *FreeRadicBiolMed*47:189–199, 2009.

SREINBECK MJ, Appel WH, Verhoeven AJ, Karnovsky MJ. Expressão da NADPH-oxidase e in situ produção de superóxido pelos osteoclastos de reabsorção óssea activamente. *J Cell Biol* 126: 765-772,1994.

SUBASINGHE, W. et al. Phagocyte-like NADPH oxidase promotes cytokine-induced mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells: Evidence for regulation by Rac1. *Am. j. physiol, regul.integr. comp. physiol.*, Bethesda, v. 300, p.12-20, 2010.

SUDA, N., Morita, I., Kuroda, T. &Murota, S. participação do estresse oxidativo no processo de diferenciação de osteoclastos. *Biochim.Biophys. Acta.*1157, 318-323 (1993).

SUN, S., Bone disease drug discovery: examining the interactions between osteoblast and osteoclast. *Expert OpinTher Targets*, 2008. 12(2): p. 239-51.

SUNDARESAN M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T. requirement for the generation of  $H_2O_2$  for platelet derived growth factor signal transduction.*Science.* 1995; 270: 296-299.

TORRES, M. M.; FRÍAS, M. H. L.; FERNÁNDEZ, D. Avances en el conocimiento de la biología del osteoclasto: el sistema osteoprotegerina-ligando del RANK. *GarcíaMedClin (Barc)*, v. 122, p. 75-7, 2004.

TEILTELBAUM, S. L. Bone resorption by osteoclasts. *Science*, v. 289, p.1504-8, 2000.

WAUQUIER F, G Léotoing, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y (2009) O stress oxidativo na remodelação óssea e na doença. *Trends Mol Med* 15: 468-477.

YANG S, Ries WL, Key LL. Oxidase de fosfato de nicotinamida-adenina- dinucleótido na formação de superóxido em osteoclastos. *CalcifTissueInt* 63: 346-350, 1998.

**ANEXO A**  
**(CERTIFICADO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA)**

**ANEXO A- CERTIFICADO DE DESENVOLVIMENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA.**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
DIRETORIA DE PESQUISA**

**C E R T I F I C A D O**

Certificamos que o(a) discente **NATALIA CAROLINE ALVES**, do curso de Graduação em Odontologia desta Universidade, participou como bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/FAPEMIG/UFU, no projeto de pesquisa intitulado "Avaliação da participação da gp91NOX2 na via intracelular de liberação de cálcio durante a osteoclastogênese.". A orientação foi efetuada pelo(a) Prof(a). ANA PAULA DE LIMA OLIVEIRA, do(a) Faculdade de Odontologia - FOUFU, sendo o período de vigência da bolsa de Março/2017 a Fevereiro/2018. O projeto está cadastrado nesta Diretoria sob o nº PIVICMG2017SAU048.

*Certificado emitido às 20:23:00 de quarta-feira, 21 de março de 2018.*

ESTE CERTIFICADO FOI GERADO ELETRONICAMENTE PELO SEG/PROPP. SUA AUTENTICIDADE PODERÁ SER CONFIRMADO NO SEG/PROPP (<http://www.propp.ufu.br>, link SEG/PROPP), POR MEIO DO CÓDIGO **1760F880-B606-4FD1-AE3F-BB5AA677AF1B**

**ANEXO B**

**(APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA EM  
UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS)**



## ANEXO B- APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS.



Universidade Federal de Uberlândia  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação  
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)  
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa  
Mônica - Uberlândia-MG –  
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;  
[www.comissoes.propp.ufu.br](http://www.comissoes.propp.ufu.br)

ANÁLISE FINAL Nº 042/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 014/13

Projeto Pesquisa: "Avaliação da participação das espécies reativas de oxigênio na osteoclastogênese e na reabsorção óssea".

Pesquisador Responsável: Marcelo José Barbosa Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 25 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA/UFU  
Universidade Federal de Uberlândia  
Prof. Dr. César Augusto Garcia  
Coordenador da CEUA - Comissão de Ética na  
Utilização de Animais - Portaria R Nº. 2014/2012