

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito do Receptor de Estradiol ER β na Diferenciação de Osteoclastos

Matheus Eduardo de Almeida Jesus

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito do Receptor de Estradiol ER β na Diferenciação de Osteoclastos

Matheus Eduardo de Almeida Jesus

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia – MG
Julho – 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito do Receptor de Estradiol ER β na Diferenciação de Osteoclastos

Matheus Eduardo de Almeida Jesus

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva
Instituto de Ciências Biomédicas

Homologado pela Coordenação do
Curso de Biotecnologia em
___/___/___.

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia – MG
Julho - 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Efeito do Receptor de Estradiol ER β na Diferenciação de Osteoclastos

Matheus Eduardo de Almeida Jesus

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Uberlândia, de de 2018.

“Somewhere there’s a place where I find who I’m gonna be

A somewhere that’s just waiting to be found”

La La Land (2016) – dir. Damien Chazelle

RESUMO

Osteoclastos são células que promovem a reabsorção óssea, uma característica prejudicial em metástases ósseas. Estudos prévios já estabeleceram relações entre receptores de estrógeno α e β na osteoclastogênese. Este estudo procurou obter uma relação mais direta entre este processo e o receptor de estrógeno β utilizando tratamentos com agonistas e antagonistas específicos do receptor. Os osteoclastos foram originados de células de medula óssea de camundongos C57BL/6 pelo tratamento com M-CSF e RANKL. Os resultados indicam que o receptor ER β é necessário para a indução de osteoclastos pelo estrógeno.

Palavras-chave: osteoclasto; receptor de estrógeno; DPN; PHTPP.

ABSTRACT

Osteoclasts are cells that promote bone resorption, a detrimental feature in bone metastasis. Previous studies have already established relationships between estrogen receptors α and β on osteoclastogenesis. This research aimed to secure a more direct relationship between this process and the estrogen receptor β , utilizing treatments with specific agonists and antagonists of the receptor. The osteoclasts came from C57BL/6 type mice bone marrow treated with M-CSF and RANKL. The results indicate that ERB is necessary to induce osteoclastogenesis through estrogen.

Keywords: osteoclast; estrogen receptor; DPN; PHTPP.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Justificativa	3
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Gerais.....	4
2.2. Objetivos Específicos.....	4
3. METODOLOGIA	4
3.1. Diferenciação de Osteoclastos	4
3.2. Determinação do Número de Osteoclastos	6
3.3. Análise Estatística.....	6
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	6
5. CONCLUSÃO	11
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
7. ANEXOS	15

LISTA DE ABREVIATURAS

1. α -MEM - *Minimum Essential Medium Eagle α Modification*/Meio Essencial Mínimo com Modificação Eagle Alfa.
2. CS-FBS – *Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum*/Soro Fetal Bovino Despojado por Carvão
3. ER – *Estrogen Receptor*/Receptor de Estrognio
 - a. ER α – *Estrogen Receptor Alpha*/Receptor de Estrognio Alfa
 - b. ER β – *Estrogen Receptor Beta*/Receptor de Estrognio Beta.
4. E2 – 17 β -Estradiol
5. DMSO – *Dimethyl Sulfoxide*/Dimetilsulfxico
6. DPN – *Diarylpropionitrile*/Diarilpropionitrila
7. FBS – *Fetal Bovine Serum*/Soro Fetal Bovino
8. M-CSF – *Macrophage Colony Stimulating Factor*/Fator Estimulante de Colnia de Macrófagos
9. MPP - *1,3-Bis(4-hydroxyphenyl)-4-methyl-5-[4-(2-piperidinyloxy)phenol]-1H-pyrazole dihydrochloride*
10. PBS – *Phosphate Buffer Saline*/Tampão Fosfato Salino
11. PHTPP - *4-[2-phenyl-5,7-bis(trifluoromethyl)pyrazolo[1,5-a]pyrimidin-3-yl]phenol*
12. PTT - *propylpyrazole-triol*
13. RANKL - *Receptor activator of nuclear factor κ B ligand*/Ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B
14. TRAP – *Tartrate-resistant acid phosphatase*/Fosfatase cida Resistente a Tartarato

1. INTRODUÇÃO

Dentre os hormônios sexuais femininos, os principais são os compostos esteroides estrógenos. Em geral, estes influenciam na transcrição gênica e produção de proteínas nas células. As três formas naturais dos estrógenos são a estrona, o estriol, e o estradiol (17 β -estradiol ou E2), sendo o último o primário em mulheres da menarca à menopausa, agindo como hormônio do crescimento para os órgãos reprodutivos femininos. Difundido para o interior celular, as moléculas de 17 β -estradiol interagem com os receptores α e β de estrógeno (ER α e ER β) (Carwile *et al.*, 2009).

Estudos já mostraram que há diferenças na expressão de receptores de estrógeno, como a de ER α ser aumentada em estágios iniciais de câncer, agindo como promotor tumoral enquanto ER β age como supressor, sendo reduzido durante carcinogênese (Campesi *et al.*, 2017). Sabe-se também que ER β tem papel diminuto na proliferação da glândula mamária e endométrio além de não ser expresso na glândula pituitária, mas que de fato possui um papel importante nos sistemas cardiovascular, nervoso, e imune. Ademais, agonistas seletivos de ER β podem causar aumento na expressão de ER β em células cuja expressão foi minimizada. Assim, espera-se que, devido à sua característica supressora de tumor, o uso farmacológico de agonistas pode ajudar em tratamentos oncológicos (Warner *et al.*, 2017).

Alguns destes agonistas específicos aos receptores de estrógeno, como o PPT (*propylpyrazole-triol*) para ER α e DPN (*diarylpropionitrile*) para ER β , já foram usados em outros estudos envolvendo a atividade estrogênica (Song e Pan, 2012). O mesmo pode ser dito com antagonistas seletivos como o MPP para ER α e PHTPP para ER β (Pastore *et al.*, 2016).

Tendo capacidade de alterar suas propriedades fenotípicas e funcionais, os macrófagos constituem uma população heterogênea que fazem parte do processo de reparo ósseo, incluindo a

diferenciação em osteoclastos. A descoberta em 1998 do RANKL, um fator que estimula a diferenciação de macrófagos em osteoclastos, contribuiu para a modernização da “osteoinmunologia” (Horwood, 2016).

A obtenção de macrófagos para estudos, por sua vez, tem sido conseguida de maneira eficiente e reproduzível através das células de medula óssea de camundongos. Para tal, usa-se o fator M-CSF, adicionado às células de medula óssea em cultura a fim de que estas se diferenciem em macrófagos (Manzanero, 2012).

A quantidade aumentada de osteoclastos no tecido ósseo é associada, em mulheres, a uma clássica deficiência de estrógeno comum para o período da menopausa. Esses fatores colaboram para que mulheres em idade avançada e que não utilizam terapia de suplementação hormonal corram riscos aumentados de sofrerem lesões mais graves. Devido a resultados controversos, os mecanismos de ação específicos do estrógeno em células ósseas, e em particular nos osteoclastos, ainda não foi completamente elucidada. (Oreffo *et al.*, 1999).

Como mencionado, os receptores de estrógeno possuem diferentes níveis de expressão associados a tipos celulares. No caso de osteoclastos, que são células que participam na reabsorção óssea, algumas linhas de pesquisas já encontraram resultados que mostraram que ER α é expresso apenas em precursores enquanto ER β está presente em todas as etapas de maturação, chegando à conclusão que o efeito inibitório do estrógeno na osteoclastogênese é mediada primariamente por ER α , mas que não diretamente inibia a reabsorção óssea por osteoclastos maduros (Sorensen *et al.*, 2006). Uma pesquisa julgou que o estradiol não elicava nenhum efeito direto, agindo apenas de forma mediada por osteoblastos (Michael *et al.*, 2005), contrastando outros achados que concluíam que o estradiol marcadamente suprimia a formação de osteoclastos independentemente de osteoblastos (Gyda *et al.*, 2001).

O papel de ER β ainda é frequentemente estudado frente a diversas linhas de pesquisa que descobrem fatos novos, como papel dicotômico em câncer de mama que sugere tanto um papel proliferativo como anti-proliferativo (Leygue e Murphy, 2013), tornando conclusões precisas difíceis de serem feitas.

Outro fator envolvido em pesquisas laboratoriais é o uso de FBS é bastante difundido em pesquisa científica devido às suas características e substâncias úteis para o desenvolvimento de culturas celulares. O soro possui, por exemplo, hormônios esteroides endógenos, vitaminas, enzimas, fatores de crescimento, e citocinas que poderiam ser consideradas fatores chave para a proliferação e diferenciação de células (Cao *et al.*, 2009). Entretanto, outras linhas de desenvolvimento de culturas preferem o uso de CS-FBS, um soro que passou por um tratamento com carvão ativado em que as suas substâncias acima são retiradas. É fato que a falta desses fatores pode influenciar o crescimento das células, mas alguns estudos que focam nessas variáveis necessitam do uso um soro que não altere os resultados da pesquisa (Dang e Lowik, 2005).

1.1. Justificativa

A metástase óssea é considerada uma das principais agravantes para o tratamento de câncer. Nessa condição, há uma intensa ativação dos osteoclastos, o que causa extensas áreas de reabsorção, podendo chegar a disfunção musculoesquelética e fraturas ósseas. Visto a propriedade supressora de tumores do receptor ER β e o desconhecimento dos efeitos desse na diferenciação de osteoclastos, estudos sobre sua participação na osteoclastogênese tornam-se importantes a fim de se obter informações relevantes para possíveis alvos de tratamentos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Analisar a influência do receptor de estrógeno ER β na diferenciação de osteoclastos.

2.2. Objetivos Específicos

- Induzir a osteoclastogênese em células da medula óssea isoladas de camundongos C57BL/6 utilizando-se M-CSF e RANKL.

- Estimular o ER β com DPN, agonista específico desse receptor durante a osteoclastogênese induzida por RANKL a partir de macrófagos diferenciados das células da medula óssea de camundongos C57BL/6.

- Inibir o ER β com PHTPP, antagonista específico desse receptor durante a osteoclastogênese induzida por RANKL a partir de macrófagos diferenciados das células da medula óssea de camundongos C57BL/6.

- Estimular o ER β e o ER α com E2 durante a osteoclastogênese induzida por RANKL a partir de macrófagos diferenciados das células da medula óssea de camundongos C57BL/6.

- Verificar a interação do DMSO com as células em comparação com os dois soros utilizados (FBS e CS-FBS).

3. METODOLOGIA

3.1. Diferenciação de Osteoclastos

Provenientes de camundongos C57BL/6 de 4-12 semanas de idade originados do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia, foram retirados o fêmur e a tíbia de acordo com os procedimentos do Comitê de Ética no Uso de Animais aprovado sob projeto n° 013/2014.

Os ossos foram submetidos a centrifugação (4000 rotações por minuto/5 minutos) para a extração das células da medula. Estas passaram por tampão de lise de hemácias para a retirada das células vermelhas presentes. Depois de homogeneização e contagem em câmara de Neubauer, as células foram cultivadas em placas Peri (1.3×10^7 células/placas) com meio α -MEM suplementado com 10% de FBS, 1% penicilina, e 0.1% gentamicina além de 3.9 μ L de MCSF para provocar a diferenciação em macrófagos, sendo incubadas na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 48-72 horas.

Após o período de encubação, o meio foi retirado das placas e PBS gelado foi adicionado, fazendo-se o *flush* a fim de se desaderir as células da placa. Após uma nova centrifugação, ressuspensão em α -MEM e 15% CS-FBS, e contagem, 5×10^4 células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Além de 50 μ L de células, foi adicionado 50 μ L M-CSF (30 ng/mL) e 50 μ L RANKL (10 ng/mL). No grupo controle, foram adicionados 50 μ L de meio *in lieu* de tratamento. Utilizando-se triplicatas, os tratamentos foram adicionados de acordo com o seguinte esquema:

- Tratamento 1: 25 μ L DPN 10 nM + 25 μ L meio α -MEM.
- Tratamento 2: 25 μ L E2 10 nM + 25 μ L meio α -MEM.
- Tratamento 3: 25 μ L DMSO 10 nM + 25 μ L meio α -MEM.
- Tratamento 4: 25 μ L PHTPP 10 nM + 25 μ L meio α -MEM.
- Tratamento 5: 25 μ L PHTPP 10 nM + 25 μ L E2 10 nM após uma hora.

Decorridas mais 48 horas, o meio e os tratamentos foram submetidos a renovação. Nesta etapa, cada poço recebeu 50 μ L meio α -MEM, 50 μ L M-CSF 10 ng/mL, 50 μ L RANKL 20 ng/mL, e seu respectivo tratamento como indicado no esquema acima.

Semelhantemente, os mesmos tratamentos foram aplicados em uma nova placa de layout e células iguais, porém utilizando-se 15% FBS comum sem o tratamento com carvão e contendo todos as substâncias padrões.

3.2. Determinação do Número de Osteoclastos

A contagem de osteoclastos diferenciados foi feita após a marcação com o kit de TRAP para detecção de fosfatase ácida, seguindo o protocolo do fabricante (*Sigma Aldrich*, St. Louis, MO, USA). Foi considerado osteoclasto a célula que possuía três ou mais núcleos com grânulos citoplasmáticos corados em púrpura ou vermelho escuro. As imagens foram obtidas pelo microscópio Olympus FSX100TM (Olympus Corporation, Japão).

3.3. Análise Estatística

Os dados obtidos pelo experimento foram analisados com o GraphPad Prism 6.0 sendo este também o software responsável pelos gráficos presentes. Foram realizados testes T e One-Way ANOVA, com significância estabelecida em $p < 0.05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo buscou quantificar o número de osteoclastos obtidos frente a cada tratamento e estabelecer uma relação entre o papel do ER β e a osteoclastogênese *in vitro* de células diferenciadas de camundongos. Após o término da cultura celular, as células foram fixadas e marcadas. Os anexos 1 e 2 mostram a contagem individual dos poços.

A figura 1 mostra uma sessão representativa dos poços de DMSO, com setas apontando osteoclastos encontrados. Observa-se uma boa quantidade de células diferenciadas nas imagens, apresentando diferentes tamanhos, formatos, e número de núcleos por célula. Além disso, percebe-se uma quantidade aproximada de células mesmo com a utilização de soros diferentes (CS-FBS e FBS). Após realizar teste t-Student não pareado, observou-se que não houveram diferenças significativas entre a utilização dos dois soros, representado pela figura 2.

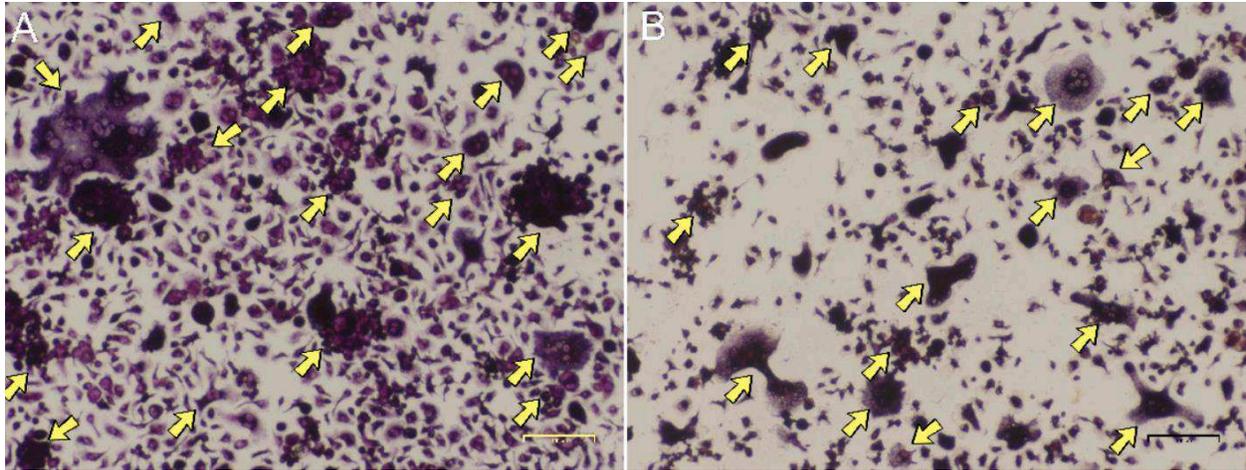


Figura 1. Reação de TRAP para identificação de osteoclastos. Imagens obtidas pelo microscópio FSX100TM dos osteoclastos diferenciados nos poços tratados apenas com o veículo DMSO usando-se FBS padrão (A) e CS-FBS (B). Estas células foram submetidas a tratamento com M-CSF e RANKL a fim de obter a diferenciação ideal. Escala: 100 μ m. As setas amarelas identificam osteoclastos com três ou mais núcleos.

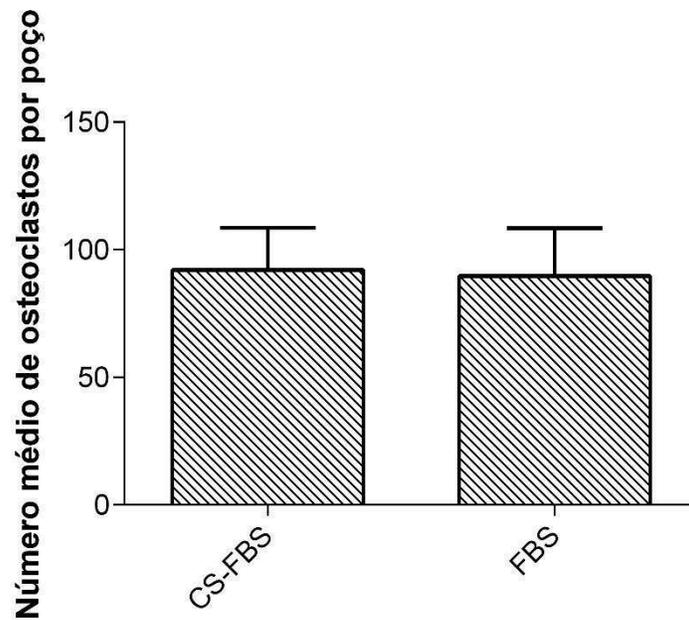


Figura 2. Efeito de FBS vs. CS-FBS na diferenciação de osteoclastos tratados apenas com o veículo DMSO. Foi utilizado o teste t-Student para tentar estabelecer diferença estatística, porém, com um $p < 0.05$, os dados se mostraram idênticos. As barras representam médias e \pm representa desvio padrão.

Comparando-se a média de osteoclastos encontrados nos poços de controle (sem o uso de qualquer tratamento) com os tratados apenas com o veículo, DMSO, não se encontrou diferença estatisticamente significativa (Figura 3). Isto indica que o DMSO não influenciou com o processo de osteoclastogênese. Este fato, encontrado nos experimentos com os dois tipos de soro fetal

bovino utilizados, é importante porque DMSO é o solvente das drogas utilizadas (DPN, E2, e PHTPP) e, portanto, qualquer dado relevante descoberto pela pesquisa pode ser unicamente atribuído aos diferentes tratamentos por não haver influência estatística.

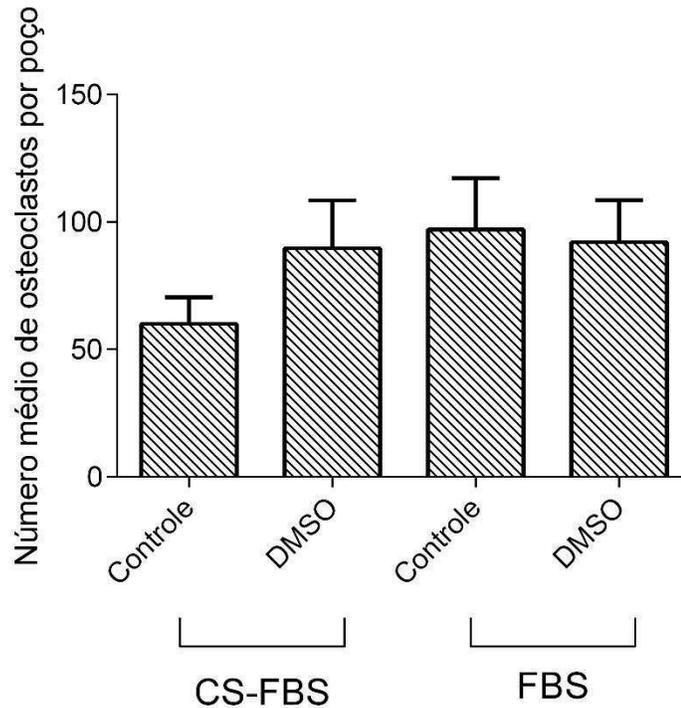


Figura 3. Efeito de DMSO na formação de osteoclastos entre FBS e CS-FBS. O experimento foi feito em triplicata. O teste t-Student foi utilizado para verificar significância. Para o considerar o valor estatístico das diferenças, foi considerado um $p < 0.05$. Barras significam médias e \pm significa desvio padrão.

O resultado obtido por esse experimento vai de contraste a outros descritos na literatura. Um estudo conduzido por Lemieux *et al.* mostrou que DMSO participa no processo de regulação da osteoclastogênese, obtendo número de células, área de superfície, e número de núcleos/célula aumentados em concentrações específicas (Lemieux *et al.*, 2011). Esses dados foram relativamente corroborados por outra pesquisa que, ainda que não focava em osteoclastogênese *per se*, verificou que DMSO induzia uma profunda estimulação, particularmente no tamanho de osteoclastos (Stephens *et al.*, 2011). Yang, em 2015, publicou que, enquanto o DMSO não inibia proliferação, essa substância possuía um efeito inibitório em RANKL e em genes-chave relacionados com a

função osteoclástica (Yang *et al.*, 2015). Estes estudos destacam que a capacidade regulatória do DMSO é tanto dependente de concentração como do tipo de célula utilizada.

No experimento realizado, foi observado que, em geral, as maiores células com um número superior de núcleos foram, de fato, encontradas esporadicamente nos poços de DMSO. Enquanto o osteoclasto encontrado em maior frequência possuía entre 3 e 5 núcleos (Figura 1A), alguns somente sob a ação DMSO tinham mais de 30, como pode ser visto no Anexo 3.

Como já observado, o DMSO é o veículo das drogas, não gerando influência relevante na diferenciação de osteoclastos neste experimento. Assim, ao utilizar um agonista específico de ER β , como o DPN, observou-se um aumento considerável de osteoclastogênese, o que pode corroborar com a hipótese que o receptor de estrógeno β tem papel significativo no processo. Além disso, o uso de E2, um agonista tanto de ER α como ER β , também mostrou números significativos de osteoclastos, reafirmando a participação do ER β e potencialmente indicando a participação de ER α .

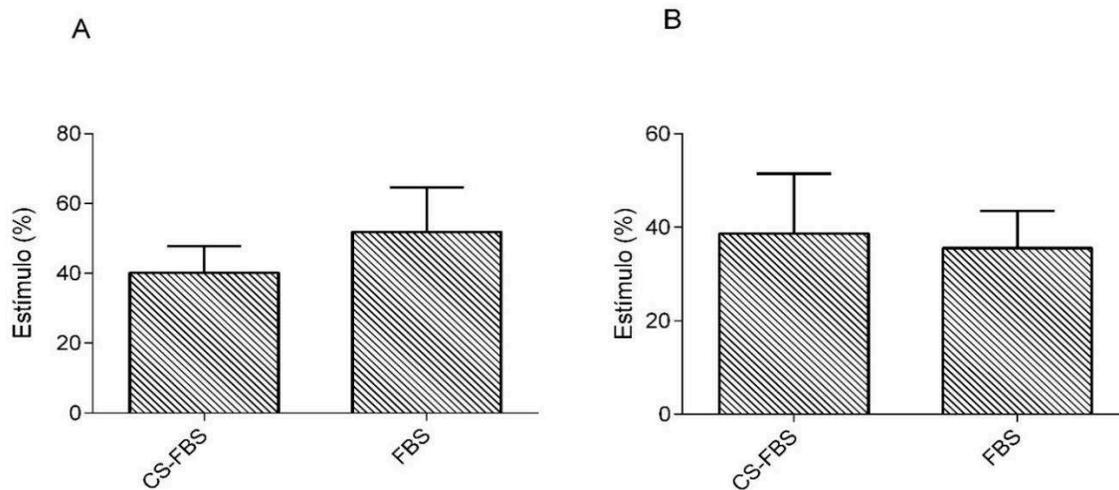


Figura 4. Estímulo (%) Calculado Comparado ao DMSO de DPN e E2. Para este cálculo, foi utilizada a equação descrita no Anexo 3. O teste t-Student foi usado para tentar estabelecer significância com $p = 0.05$, porém, estatisticamente, não houve diferença entre os dados. As barras significam média e \pm significa desvio padrão.

Ao se comparar a porcentagem de estímulo (Anexo 4) do DPN e do E2 entre os tratamentos com os dois tipos de soro fetal bovino (Fig. 4), observou-se ausência de significância estatística, indicando que o soro não produziu diferenças no estímulo. Na literatura existe evidência que a falta dos fatores hormonais em CS-FBS impacta a diferenciação de osteoclastos (Wang *et al.*, 2014), embora outros estudos semi-relacionados indicam o contrário no caso de osteoclastos humanos (Abdallah *et al.*, 2018).

Observando-se os dados obtidos pela contagem de osteoclastos nos poços com as drogas (Fig. 5), verifica-se um alto nível de diferenciação com ambos os soros utilizados. A análise estatística mostrou diferenças significantes em três casos: DMSO contra DPN, DMSO contra E2, e E2 contra PHTPP + E2.

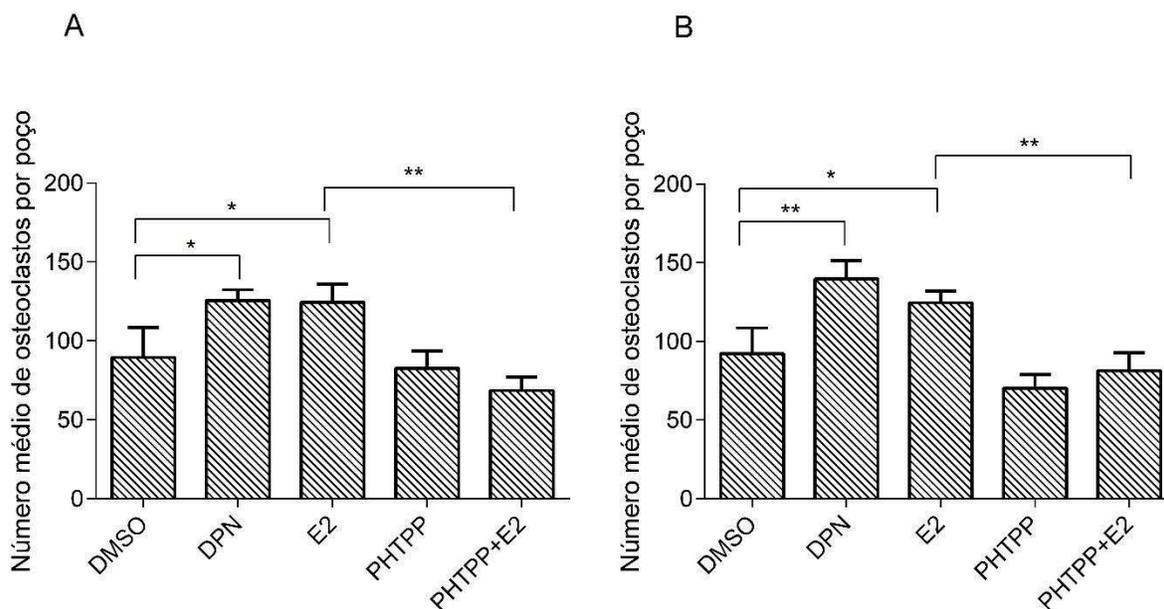


Figura 5. Quantificação dos osteoclastos frente aos diferentes tratamentos. Efeitos do uso de DPN e estrógeno associado ou não ao PHTPP com (A) CS-FBS e (B) FBS. O teste utilizado foi One-Way Anova. O asterisco (*) significa diferença estatisticamente significativa, sendo esta diferença aumentada com (**). Barras significam médias e \pm significa desvio padrão.

Através do gráfico, verifica-se uma diferença significativa entre o tratamento com E2 e PHTPP + E2. Sabendo-se que o PHTPP é um antagonista fortemente seletivo a ER β e que o E2 é

ligante tanto de ER α e ER β (Zhang *et al.*, 2018), pode-se discutir que, após uma hora de tratamento com o antagonista, o efeito esperado de E2 não foi verificado. Visto que E2 ainda poderia ligar-se aos receptores α das células e, teoricamente, induzir diferenciação, infere-se que ou o receptor α não possui uma função na osteoclastogênese suficientemente importante ou, ainda assim, que o receptor β tem algum tipo de efeito antagonista sobre a expressão do receptor α (Lindberg *et al.*, 2003).

Entretanto, é importante notar que os dados obtidos neste experimento contrastam fortemente estudos presentes na literatura que afirmam que o estrógeno tem função inibitória tanto de osteoclastogênese como de reabsorção óssea (Kimble *et al.*, 1996; Kameda *et al.*, 1997; Shevde *et al.*, 2000; Khosla, 2007; Chen *et al.*, 2009; Martin-Millan *et al.*, 2010).

5. CONCLUSÃO

Esta pesquisa buscou estabelecer uma conexão entre o desenvolvimento de osteoclastos *in vitro* e o papel exercido pelo receptor ER β expressado, utilizando-se tanto agonistas e antagonistas específicos quanto um agonista não seletivo.

Chegou-se a conclusão que os tipos diferentes utilizados de soro, FBS e CS-FBS, não influenciaram a diferenciação prevista. Além disso, ER β tem um efeito de diferenciação em osteoclastos *in vitro* devido a sua maior expressão frente ao uso de um agonista, mostrando uma dependência de estrógeno em relação ao receptor β para induzir a osteoclastogênese visto que observou-se uma influência superior na osteoclastogênese do ER β em comparação ao ER α devido a redução do número de osteoclastos encontrados no tratamento PHTPP + E2. Portanto, pode-se concluir que a osteoclastogênese é mais influenciada pelo receptor ER β do que o ER α .

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLAH, D. et al. An Optimized Method to Generate Human Active Osteoclasts From Peripheral Blood Monocytes. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 632, 2018-April-04 2018. ISSN 1664-3224. Disponível em: < <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00632> >.

CAMPESI, I. et al. Sex Differences in Estrogen Receptor α and beta Levels and Activation Status in LPS-Stimulated Human Macrophages. **J Cell Physiol**, v. 232, n. 2, p. 340-345, Feb 2017. ISSN 0021-9541.

CAO, Z. et al. Effects of Resin or Charcoal Treatment on Fetal Bovine Serum and Bovine Calf Serum. **Endocrine Research**, v. 34, n. 4, p. 101-108, 2009. ISSN 0743-5800. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3109/07435800903204082> >.

CARWILE, E. et al. Estrogen and stroke: a review of the current literature. **J Neurosci Nurs**, v. 41, n. 1, p. 18-25; quiz 26-7, Feb 2009. ISSN 0888-0395 (Print) 0888-0395.

CHEN, F.-P.; WANG, K.-C.; HUANG, J.-D. Effect of Estrogen on the Activity and Growth of Human Osteoclasts In Vitro. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 48, n. 4, p. 350-355, 2009. ISSN 1028-4559. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559\(09\)60323-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1028-4559(09)60323-5) >.

DANG, Z. C.; LOWIK, C. Removal of serum factors by charcoal treatment promotes adipogenesis via a MAPK-dependent pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 268, n. 1-2, p. 159-167, 2005. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-005-3857-7> >.

GYDA, M. et al. Macrophage colony-stimulating factor suppresses osteoblast formation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 285, n. 2, p. 328-34, Jul 13 2001. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

HORWOOD, N. J. Macrophage Polarization and Bone Formation: A review. **Clin Rev Allergy Immunol**, v. 51, n. 1, p. 79-86, Aug 2016. ISSN 1080-0549.

KAMEDA, T. et al. Estrogen Inhibits Bone Resorption by Directly Inducing Apoptosis of the Bone-resorbing Osteoclasts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 4, p. 489-495, 1997. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1084/jem.186.4.489> >.

KHOSLA, S. Estrogen and the death of osteoclasts: A fascinating story. **BoneKey-Osteovision**, v. 4, n. 10, p. 267-272, 2007. ISSN 1533-4368. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1138/20070275> >.

KIMBLE, R. B. et al. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1 and tumor necrosis factor-mediated stimulation of

macrophage colony-stimulating factor production. **J Biol Chem**, v. 271, n. 46, p. 28890-7, Nov 15 1996. ISSN 0021-9258 (Print) 0021-9258.

LEMIEUX, J. M. et al. DMSO regulates osteoclast development in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal**, v. 47, n. 3, p. 260-267, 2011. ISSN 1071-2690. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11626-011-9385-8> >.

LEYGUE, E.; MURPHY, L. C. A bi-faceted role of estrogen receptor in breast cancer. **Endocrine Related Cancer**, v. 20, n. 3, 2013. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-12-0389> >.

LINDBERG, M. K. et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ER α -regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ER α and ERbeta in mice. **Mol Endocrinol**, v. 17, n. 2, p. 203-8, Feb 2003. ISSN 0888-8809 (Print) 0888-8809.

MANZANERO, S. Generation of mouse bone marrow-derived macrophages. **Methods Mol Biol**, v. 844, p. 177-81, 2012. ISSN 1064-3745.

MARTIN-MILLAN, M. et al. The Estrogen Receptor- α in Osteoclasts Mediates the Protective Effects of Estrogens on Cancellous But Not Cortical Bone. **Molecular Endocrinology**, v. 24, n. 2, p. 323-334, 2010. ISSN 0888-8809. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1210/me.2009-0354> >.

MICHAEL, H. et al. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. **J Bone Miner Res**, v. 20, n. 12, p. 2224-32, Dec 2005. ISSN 0884-0431 (Print) 0884-0431.

OREFFO, R. O. et al. Expression of estrogen receptor- α in cells of the osteoclastic lineage. **Histochem Cell Biol**, v. 111, n. 2, p. 125-33, Feb 1999. ISSN 0948-6143 (Print) 0948-6143.

PASTORE, M. B. et al. Identification of Differential ER-A Versus ER-Beta Mediated Activation of eNOS in Ovine Uterine Artery Endothelial Cells. **Biol Reprod**, v. 94, n. 6, p. 139, Jun 2016. ISSN 0006-3363.

SHEVDE, N. K. et al. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 14, p. 7829-7834, 2000. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.130200197> >.

SONG, X.; PAN, Z. Z. Estrogen receptor-beta agonist diarylpropionitrile counteracts the estrogenic activity of estrogen receptor- α agonist propylpyrazole-triol in the mammary gland of

ovariectomized Sprague Dawley rats. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 130, n. 1-2, p. 26-35, May 2012. ISSN 0960-0760.

SORENSEN, M. G. et al. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. **DNA Cell Biol**, v. 25, n. 8, p. 475-83, Aug 2006. ISSN 1044-5498 (Print) 1044-5498.

STEPHENS, A. S. et al. Myocyte Enhancer Factor 2C, an Osteoblast Transcription Factor Identified by Dimethyl Sulfoxide (DMSO)-enhanced Mineralization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 30071-30086, 2011. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.253518> >.

WANG, Y. et al. Effect of Fetal Bovine Serum on Osteoclast Formation in vitro. **Journal of Hard Tissue Biology**, v. 23, n. 3, p. 303-308, 2014. ISSN 1341-7649. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.2485/jhtb.23.303> >.

WARNER, M.; HUANG, B.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen Receptor beta as a Pharmaceutical Target. **Trends Pharmacol Sci**, v. 38, n. 1, p. 92-99, Jan 2017. ISSN 0165-6147.

YANG, C. et al. Inhibition of differentiation and function of osteoclasts by dimethyl sulfoxide (DMSO). **Cell and Tissue Research**, v. 362, n. 3, p. 577-585, 2015. ISSN 0302-766X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s00441-015-2245-1> >.

ZHANG, B. et al. Estrogen receptor beta selective agonist ameliorates liver cirrhosis in rats by inhibiting the activation and proliferation of hepatic stellate cells. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 33, n. 3, p. 747-755, Mar 2018. ISSN 0815-9319.

7. ANEXOS

Anexo 1

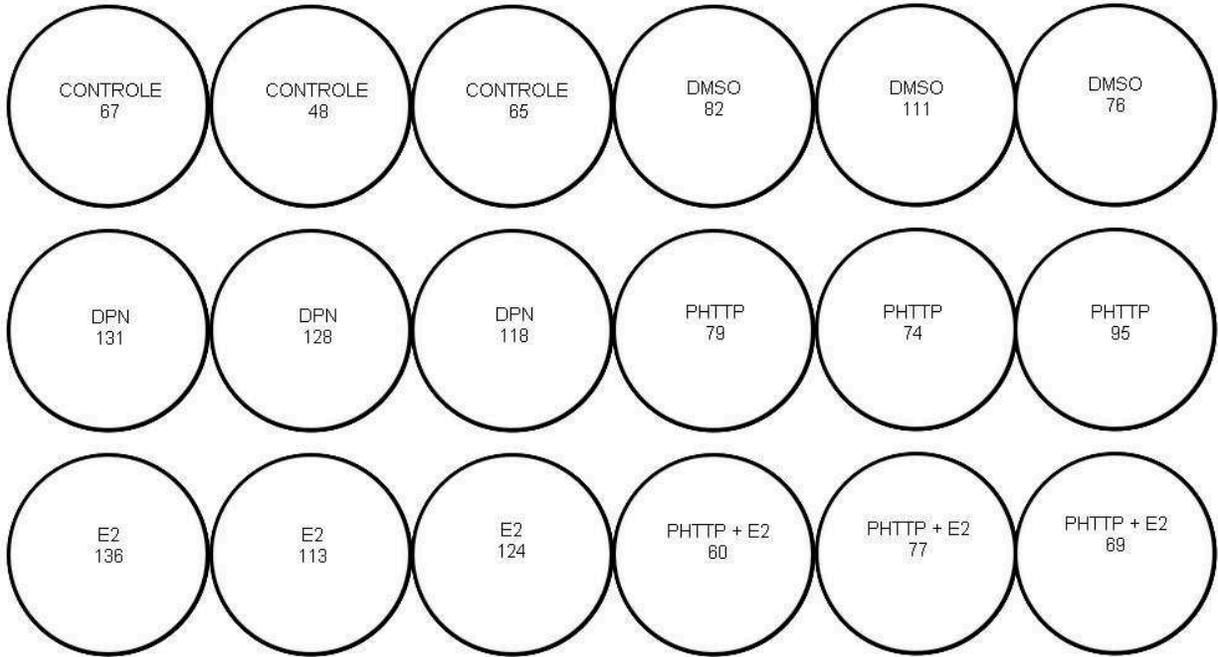


Figura 6. Contagem de osteoclastos diferenciados em cada poço de placa de 96 utilizando-se CS-FBS.

Anexo 2

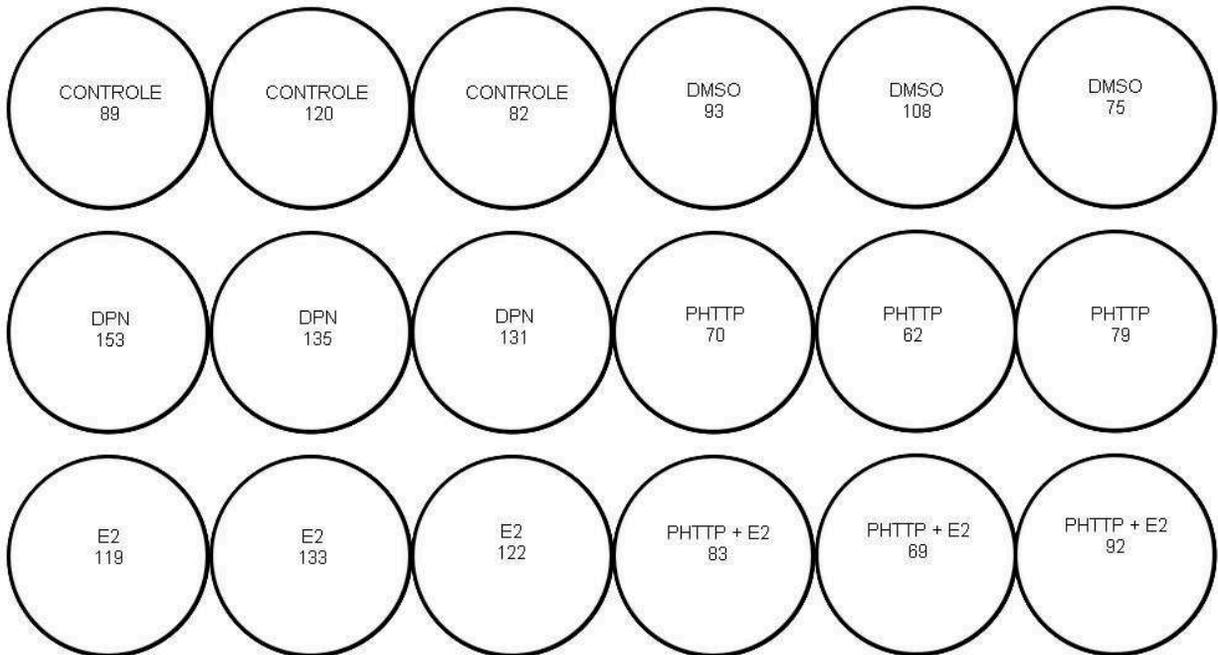


Figura 7. Contagem de osteoclastos diferenciados em cada poço de placa de 96 utilizando-se CS-FBS.

Anexo 3

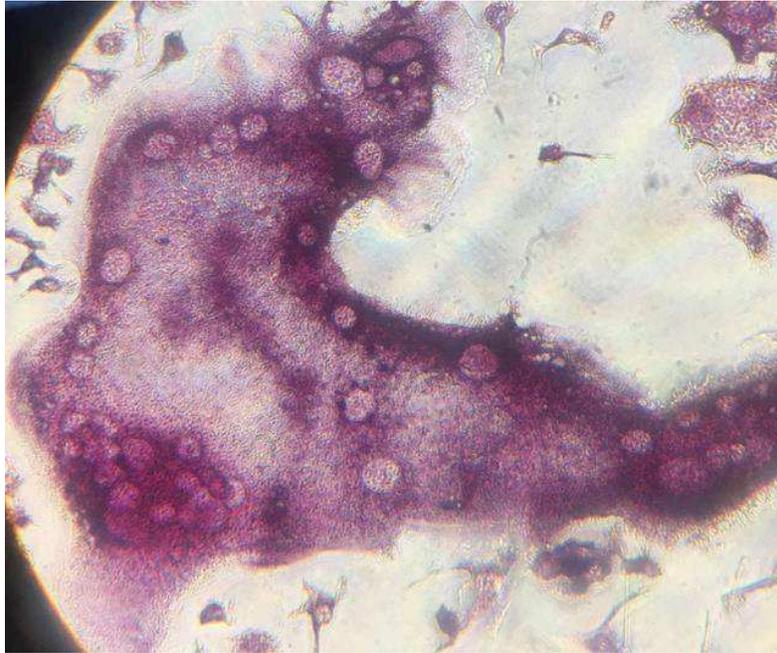


Figura 8. Exemplo de Osteoclasto Com Maior Quantidade de Núcleos. Foto retirada do poço DMSO1 – FBS em microscópio óptico de lente invertida comum.

Anexo 4

$$\text{Estimulação (\%)} = \left(\frac{\text{número de osteoclastos no poço}}{\text{média de osteoclastos em DMSO}} - 1 \right) \times 100$$