

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

ISADORA AKEMI UEHARA

Avaliação da ação do receptor de estrógeno beta e a função de NOX2 na
osteoclastogênese e na atividade de osteoclastos

Uberlândia – MG

2020

ISADORA AKEMI UEHARA

Avaliação da ação do receptor de estrógeno beta e a função de NOX2 na osteoclastogênese e na atividade de osteoclastos

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva

Uberlândia – MG

2020

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

U22
2020

Uehara, Isadora Akemi, 1994-
Avaliação da ação do receptor de estrógeno beta e a função de
NOX2 na osteoclastogênese e na atividade de osteoclastos
[recurso eletrônico] / Isadora Akemi Uehara. - 2020.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Modo de acesso: Internet.
Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.399>
Inclui bibliografia.

1. Imunologia. I. Silva, Marcelo José Barbosa ,1976-, (Orient.). II.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 612.017

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia
 Aplicada

Av. Amazonas, s/n, Bloco 4C, Sala 4C218 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
 Telefone: (34) 3225-8672 - www.imunoparasito.ufu.br - coipa@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico nº 262 do PPIPA				
Data:	quinze de maio do ano de dois mil e vinte	Hora de início:	14h00	Hora de encerramento:	17h10min
Matrícula do Discente:	11812IPA003				
Nome do Discente:	Isadora Akemi Uehara				
Título do Trabalho:	Avaliação da ação do receptor de estrógeno beta e a função de NOX2 na osteoclastogênese				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Imunopatologia e Alergia				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Avaliação da ação do receptor de estrógeno beta na osteoclastogênese				

Reuniu-se por vídeo conferência, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos membros titulares: Dra.Taia Maria Berto Rezende - Universidade Católica de Brasília (UCB)/DF; Profa. Dra. Bellisa de Freitas Barbosa - ICBIM / UFU; e o Presidente: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva - ICBIM / UFU - orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva apresentou a Comissão Examinadora e a candidata, agradeceu a presença do público, e concedeu a palavra à discente, para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação, o tempo de arguição e a resposta, foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovada

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Taia Maria Berto Rezende, Usuário Externo**, em 16/06/2020, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015.



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo José Barbosa Silva, Professor(a) do Magistério Superior**, em 18/06/2020, às 07:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bellisa de Freitas Barbosa, Professor(a) do Magistério Superior**, em 23/06/2020, às 12:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2079913** e o código CRC **30BAC406**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador prof. Marcelo José Barbosa Silva pela oportunidade que me concedeu, pela confiança e por todos esses anos de orientação.

Agradeço aos meus pais Erica e Wilston, meus irmãos, Gabi e Hiro e ao meu namorado Renato pelo apoio, compreensão e por sempre me ajudarem em todos os momentos. Amo vocês!

Agradeço à Mariana pela amizade, pelos conselhos e por ter me ajudado de maneira fundamental com os experimentos. Assim como agradeço à professora Sandra que me permitiu usar seu laboratório em Ribeirão Preto.

Agradeço aos meus amigos de laboratório por toda a ajuda e companheirismo, especialmente à Bruna, que esteve comigo desde que iniciei no laboratório e quem me ensinou muita coisa. Agradeço também aos amigos do laboratório de tripanosomatídeos que fizeram os dias mais descontraídos e sempre me ajudaram. Inclusive agradeço ao prof. Cláudio, responsável pelo laboratório.

Agradeço aos meus amigos Daniel, Caio e Karen pelas conversas e amizade!

Agradeço aos técnicos de laboratório, às meninas da limpeza e aos vigilantes que sempre estavam dispostos a ajudar.

Agradeço ao REBIR por fornecer os camundongos para realização desse trabalho.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG.

CAPÍTULO 1

RESUMO

Mulheres na pós menopausa são mais suscetíveis ao desenvolvimento da osteoporose, uma doença caracterizada pela maior reabsorção óssea mediada por osteoclastos. Sabe-se que o estrógeno, um dos principais hormônios afetados durante a menopausa, é importante para a proteção óssea. O estrógeno age por meio de dois receptores clássicos, o receptor de estrógeno α (ER α) e β (ER β). Porém há uma carência de estudos acerca da relação entre o ER β e os osteoclastos. Por isso o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do ER β na osteoclastogênese a partir do uso de diarilpropionitrilo (DPN), um agonista seletivo para o receptor. A expressão do receptor em células estimuladas com RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) foi avaliada por PCR em tempo real e foi constatado uma maior expressão gênica de ER β no tempo de 72h. O DPN não afetou o número, a área dos osteoclastos, a polimerização de actina e nem mesmo a capacidade de reabsorção dos mesmos. Já a incubação com 17 β -estradiol (E₂) foi capaz de reduzir a área dos osteoclastos que demonstraram também ter sua capacidade reabsortiva diminuída, porém sem efeito visto na polimerização do anel de actina. Sendo assim, pode ser que o ER β não tenha ação significativa nos osteoclastos e que os efeitos observados no uso do estrógeno sejam mediados pelo ER α .

Palavras-chave: Receptor de estrógeno beta, diarilpropionitrilo, osteoclastogênese

ABSTRACT

Postmenopausal women are more susceptible to the development of osteoporosis, a disease characterized by greater osteoclast-mediated bone resorption. Estrogen, one of the main hormones affected during menopause, is known to be important for bone protection. Estrogen acts through two classic receptors, the estrogen receptor α and β . There is a lack about the relationship between ER β and osteoclast in the literature. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of ER β on osteoclastogenesis using diarylpropionitrile (DPN), a selective agonist for the receptor. The expression of the receptor in cells stimulated only with RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) was evaluated by real-time PCR and a higher gene expression was found in 72h. DPN did not change the number, area of osteoclasts, actin polymerization and not even their resorption capacity. Incubation with 17 β -estradiol (E2), on the other hand, was able to reduce the area of osteoclasts, which also demonstrated that their resorptive capacity was reduced, however no effect was seen in actin ring polymerization. Thus, it may be that ER β has no significant action on osteoclasts and the effects observed in use of estrogen are mediated by ER α .

Keywords: Estrogen receptor beta, diarylpropionitrile, osteoclastogenesis

CAPÍTULO 2

RESUMO

A osteoclastogênese é o processo de diferenciação de células de linhagem hematopoiética em osteoclastos maduros (células responsáveis pela reabsorção óssea). O desequilíbrio na ação dos osteoclastos a favor da maior reabsorção óssea gera doenças como a osteoporose. Elucidar as vias de sinalização que levam a osteoclastogênese é importante para conhecer mecanismos que possam se tornar alvos terapêuticos para tratamento de doenças que acometem o tecido ósseo. Para que ocorra a osteoclastogênese são necessários sinalizações intracelulares derivadas a partir de estímulo por citocinas, sendo as principais o fator estimulador de macrófagos (M-CSF) e o RANKL. As espécies reativas de oxigênio (ROS) foram descritas como moléculas que agem como mensageiros secundários em diversas vias de sinalização e foram descritas como indutoras da diferenciação e atividade dos osteoclastos. As NADPH oxidase (NOX) são as principais produtoras de ROS e apresentam sete isoformas. Neste trabalho a NOX2 foi avaliada durante a osteoclastogênese induzida por RANKL e M-CSF a partir do uso de camundongos *knockouts* para essa isoforma (NOX2^{-/-}). Os resultados mostraram que a diferenciação dos osteoclastos não foi afetada pela ausência da NOX2, o que sugere que essa isoforma não seja essencial para a osteoclastogênese. Apesar de não ter alterado a diferenciação, foi visto um aumento no influxo de cálcio intracelular e conseqüentemente aumento na expressão gênica de catepsina K avaliado por PCR em tempo real. Além disso, houve aumento da reabsorção óssea por células de camundongo NOX2^{-/-}, provavelmente devido ao aumento de catepsina K.

Palavras-chave: NADPH oxidase, NOX2, *knockout*, osteoclastogênese.

ABSTRACT

Osteoclastogenesis is the differentiating process of hematopoietic cell lineage into mature osteoclasts (cells responsible for bone resorption). The imbalance in the action of osteoclasts in favor of greater bone resorption generates diseases such as osteoporosis. Elucidating the signaling pathways that lead to osteoclastogenesis is important to understand mechanisms that can become therapeutic targets for treating diseases that affect bone tissue. To occur osteoclastogenesis, intracellular signals derived from stimulus by cytokines are necessary, the main ones being the macrophage stimulating factor (M-CSF) and RANKL. Reactive oxygen species (ROS) have been described as molecules that act as secondary messengers in several signaling pathways and have been described as inducing differentiation and activity of osteoclasts. NADPH oxidase (NOX) are the main producers of ROS and have seven isoforms. In this work, NOX2 was evaluated in osteoclastogenesis using the knockout mouse for this isoform (NOX2^{-/-}). The results showed that osteoclast differentiation was not affected by the absence of NOX2, which suggests that this isoform is not essential for osteoclastogenesis. Although it did not change the differentiation, an increase in the intracellular calcium influx and consequently an increase in the cathepsin K gene expression evaluated by real-time PCR was seen. In addition, there was an increase in bone resorption by NOX2^{-/-} mouse cells, probably due to the increase in cathepsin K.

Keywords: NADPH oxidase, NOX2, knockout, osteoclastogenesis.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Resposta genômica e não-genômica dos receptores de estrógeno	16
Figura 2. Representação esquemática da cronologia de diferenciação dos osteoclastos e incubação com DPN e E ₂	22
Figura 3. Expressão relativa do mRNA do gene <i>ESR2</i>	23
Figura 4. Número de osteoclastos formados após incubação com DPN e E ₂	24
Figura 5. Marcação do anel de actina em osteoclastos	25
Figura 6. Porcentagem da área reabsorvida por osteoclastos	26

CAPÍTULO 2

Figura 1. Vias de sinalização que leva a osteoclastogênese por meio da ligação RANKL/RANK e sinal co-estimulatório derivado de anticorpo OSCAR	39
Figura 2. NOX ativada e suas subunidades	40
Figura 3. Número e área de osteoclastos derivados de células de camundongo WT e NOX2 ^{-/-}	45
Figura 4. Influxo de cálcio após estímulo de RANKL por 1 hora	46
Figura 5. Expressão gênica relativa nos tempos de 0h e 49h após estímulo com RANKL	46
Figura 6. Área de reabsorção formada por osteoclastos derivados de células da medula óssea de camundongo WT e NOX2 ^{-/-}	47

LISTA DE ABREVIATURAS

cAMP: adenosina monofosfato cíclico

c-Fms: receptor de fator estimulador de colônias

DC-STAMP: proteína transmembrana específica de célula dendrítica

DMSO: dimetilsulfóxido

DPN: diarilpropionitrilo

E₂: 17 β -estradiol

ERE: elementos de resposta ao estrógeno

ERK: quinase regulada por sinal extracelular

ER α : receptor de estrógeno alfa

ER β : receptor de estrógeno beta

HBSS: solução salina balanceada de Hank

ITAM: imunorreceptor ativado por tirosina

JNK: c-Jun N-terminal quinase

MAPK: proteína quinase ativada por mitógeno

M-CSF: fator estimulante de colônia de macrófagos

MEM: meio essencial mínimo

mRNA: RNA mensageiro

NADPH: fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NFATc1: fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1

NF-kB: fator nuclear kappa B

NOX: NADPH oxidase

OC-STAMP: proteína transmembrana estimuladora dos osteoclastos

OSCAR: receptor do tipo imunoglobulina associado a osteoclastos

PCR: reação em cadeia da polimerase

PI3K: fosfatidil inositol 3 quinase

PKC: proteína quinase C

PLC: fosfolipase C

PLC γ 1: fosfolipase C gama 1

RANK: receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL: ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

ROS: espécies reativas de oxigênio

TNF: fator de necrose tumoral

TRAF6: fator 6 associado ao receptor de TNF

TRAP: fosfatase ácida resistente ao tartarato

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivo geral	21
2.2 Objetivos específicos	21
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 Osteoclastogênese <i>in vitro</i>	21
3.2 Confirmação da diferenciação de osteoclastos por reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato.	22
3.3 Extração de RNA e PCR em tempo real.....	22
3.4 Incubação das células.....	23
3.5 Marcação do anel de actina.....	23
3.6 Ensaio de reabsorção óssea (<i>osteassay</i>).....	23
3.7 Análise estatística	24
4 RESULTADOS	24
4.1 Aumento da expressão do gene <i>ESR2</i> durante a osteoclastogênese	24
4.2 DPN não altera o número de osteoclastos	25
4.3 DPN e E ₂ não influenciam na porcentagem das células com anel de actina, mas E ₂ altera o tamanho dos osteoclastos	25
4.4 E ₂ afeta capacidade de reabsorção dos osteoclastos	26
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÃO.....	31
7 REFERÊNCIAS	31

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO.....	39
2 OBJETIVOS.....	43
2.1 Objetivo geral	43
2.2 Objetivos específicos	43
3 METODOLOGIA.....	43
3.1 Diferenciação <i>in vitro</i> das células de medula óssea de camundongo em osteoclasto	43
3.2 Confirmação da diferenciação de osteoclastos por reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato	44
3.3 Mensuração de cálcio intracelular ([Ca ²⁺] _i).....	44

3.4 Extração de RNA e PCR em tempo real.....	45
3.5 Ensaio de reabsorção óssea (<i>osteassay</i>).....	45
3.6 Análise estatística	46
4 RESULTADOS	46
4.1 Ausência de NOX2 não influencia a diferenciação dos osteoclastos	46
4.2 A ausência de NOX2 promove aumento no influxo de cálcio intracelular	47
4.3 Ausência de NOX2 influencia a expressão gênica de catepsina K.....	48
4.4 Ausência de NOX2 promove maior atividade reabsortiva dos osteoclastos	49
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO.....	52
7 REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	57

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A remodelação óssea é um processo em que há reabsorção do tecido velho e formação de novo tecido ósseo. Esse processo ocorre por meio da ação de osteoblastos, que são células responsáveis pela deposição de cálcio e pela formação de novo tecido ósseo e por osteoclastos, que são células multinucleadas gigantes que reabsorvem o tecido ósseo (CHEN et al., 2018). Para que a remodelação óssea ocorra de forma normal é necessário haver equilíbrio entre a presença e atividade de osteoclastos e osteoblastos.

O desequilíbrio na remodelação óssea pode levar ao surgimento de doenças como a osteopetrose e osteoporose. A osteopetrose é caracterizada pelo aumento na densidade óssea, em razão de uma deficiência na reabsorção mediada por osteoclastos, deixando o osso mais duro e mais quebradiço, mas essa enfermidade é considerada rara por ser uma doença que deve ser herdada (STARK; SAVARIRAYAN, 2009). Já a osteoporose, considerada a principal doença óssea metabólica, é caracterizada pela diminuição da massa óssea e deterioração da microarquitetura do tecido ósseo. O resultado é um osso fragilizado e suscetível a fraturas, principalmente nas regiões do quadril, pulsos e na coluna vertebral (SANDHU; HAMPSON, 2011).

A osteoporose afeta milhares de pessoas no mundo inteiro todos os anos e é uma doença que não tem cura, apenas tratamentos (SOZEN; OZISIK; BASARAN, 2017). Essa doença afeta ambos os sexos em diferentes faixas etárias. Porém é mais frequente em pessoas idosas e em mulheres na pós-menopausa, devido à diminuição na produção de hormônios que leva ao aumento do número e da atividade de osteoclastos, gerando assim maior reabsorção óssea do que o normal (JI; YU, 2015). Os estrógenos são uma classe de hormônios dentre os principais hormônios afetados pela menopausa. Esta classe abrange o 17- β estradiol (E_2), que é o mais abundante no organismo, estrona e estriol. Seus efeitos ocorrem através de duas isoformas clássicas do receptor de estrógeno: α ($ER\alpha$) e β ($ER\beta$) (NILSSON; GUSTAFSSON, 2002).

O $ER\alpha$ foi identificado nos anos de 1960 e clonado em 1986. Desde então, essa isoforma vem sendo bastante estudada, principalmente no sistema reprodutor feminino e em câncer de mama (GORSKI et al., 1968; GREEN et al., 1986). Enquanto isso, o $ER\beta$ foi identificado e clonado apenas em 1996 (KUIPER et al., 1996), sendo então menos caracterizado em relação ao $ER\alpha$. Nos humanos, o $ER\alpha$ é codificado pelo gene *ESR1*, localizado no cromossomo 6 enquanto o $ER\beta$ é codificado pelo gene *ESR2*, localizado no cromossomo 14. Ambos compartilham alto grau de homologia, sendo que o domínio

de ligação ao DNA possui semelhança de 95% e o domínio de ligação ao ligante de 55% (FUENTES; SILVEYRA, 2019). A principal diferença estrutural entre as duas isoformas é um menor domínio amino terminal no ER β em comparação ao ER α (SCHWABE; TEICHMANN, 2004). As isoformas de receptores de estrógeno são amplamente expressas em vários tecidos, inclusive no tecido ósseo, sendo encontrados no citoplasma e núcleo das células (KHALID; KRUM, 2016).

O efeito do estrógeno ao ligar-se em seus receptores pode ser dividida em uma resposta genômica e não-genômica (FUENTES; SILVEYRA, 2019), conforme ilustrado na figura 1. A resposta genômica, considerada a resposta clássica, é caracterizada pela ligação direta de complexos de receptores de estrógeno à sequências específicas denominadas ERE (elementos de resposta ao estrógeno) em promotores de genes (KLINGE, 2001). Já a resposta não-genômica dos receptores de estrógeno ocorre de maneira mais rápida do que a genômica. Esse tipo de resposta envolve a ativação de mecanismos de transdução de sinal com a produção subsequente de segundos mensageiros intracelulares, como cAMP (LOSEL; WEHLING, 2003) e a ativação da cascata de sinalização de proteína-quinase (exemplo, a via da fosfolipase C (PLC)/proteína quinase C (PKCs); proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK); fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K)/cascata Akt quinase e proteína quinase A (PKA)) que resultam em mudanças indiretas na expressão gênica (GU; MOSS, 1996; DOS SANTOS et al., 2002; MARINO; ACCONCIA; TRENTALANCE, 2003) .

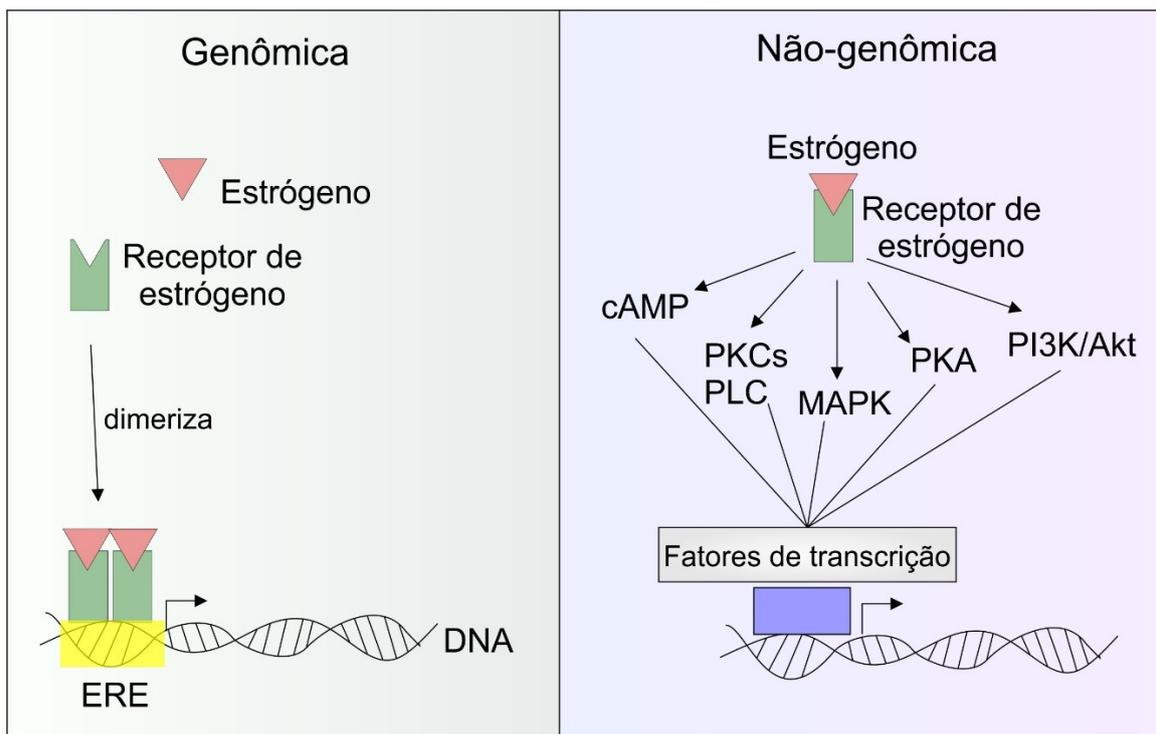


Figura 1. Resposta genômica e não-genômica dos receptores de estrogênio. A resposta genômica ocorre através da ligação dos receptores de estrogênio diretamente ao DNA em regiões de sequência específica denominado de ERE (elementos de resposta ao estrogênio). A resposta não genômica ocorre por meio da ativação de moléculas de sinalização como cAMP e proteínas quinases como PKC, PLC, MAPK (JNK, ERK e p38), PKA e PI3K/Akt. Essas moléculas são responsáveis pela ativação de fatores de transcrição que levam a ativação de genes relacionados ao estímulo com estrogênio.

Fonte: autoria própria

A deficiência de estrogênio tem sido associada à perda óssea e, portanto, sua presença é importante para manter o equilíbrio ósseo (RIGGS, 2000). Isso pode ser confirmado em estudos em que mulheres na pós-menopausa que receberam terapia de reposição hormonal apresentaram menos perda óssea em comparação com as mulheres que não receberam a terapia (REGINSTER et al., 1992; FISTAROL et al., 2019). Alguns estudos sugerem que os mecanismos pelos quais o estrogênio age protegendo o osso estão relacionados à repressão de produção de citocinas pró-osteoclásticas, como o fator de necrose tumoral, indução de apoptose em osteoclastos e proteção contra apoptose em osteoblastos (KHOSLA; OURSLER; MONROE, 2012). No entanto, os efeitos do estrogênio nessas células ósseas específicas são complexos e muitas vezes controversos.

A literatura apresenta estudos que relacionam os efeitos do estrogênio em sua maioria em osteoblastos do que em osteoclastos. Isso pode ser devido à dificuldade encontrada no início dos estudos quanto ao isolamento de osteoclastos e à dificuldade de trabalhar com eles em tempo hábil antes que entrem em apoptose, já que ainda não existe

uma linhagem imortalizada. Mas, atualmente já existem diversos métodos para isolamento e obtenção de osteoclastos, mas que podem apresentar respostas diferentes (MARINO et al., 2014). Uma das formas de obtenção dos osteoclastos é a partir da diferenciação de células da medula óssea mediada pelo estímulo combinado do fator estimulante de colônia de macrófagos (M-CSF) junto ao ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL). Essas são duas citocinas importantes que ativam sinalizações intracelulares que permitem a diferenciação das células progenitoras em osteoclastos maduros. A ligação do RANKL ao seu receptor RANK, leva a uma sinalização mediada por proteína quinases, como MAPK e PI3K/Akt, que permite ativação do fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1), que é o principal regulador que leva a ativação de genes relacionados a osteoclastogênese (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; KIM; KIM, 2016).

O estrógeno tem sido descrito como responsável por suprimir a osteoclastogênese induzida por RANKL (SHEVDE et al., 2000; GARCIA PALACIOS et al., 2005). E outros estudos relatam que o estrógeno tem efeito na vida útil de osteoclastos maduros, causando apoptose dessas células por meio do sistema Fas/FasL e dependente de osteoblasto (NAKAMURA et al., 2007). A maioria dessas pesquisas demonstram que o efeito do estrógeno no osteoclasto é mediado principalmente pelo ER α , sendo escassas as pesquisas que relacionem ER β e osteoclastos.

A presença do ER β em células ósseas foi confirmada por meio de imunohistoquímica e *western blotting* (SØRENSEN et al., 2006), sendo visto que essa isoforma está presente nos núcleos e citoplasma de osteoclastos (BRAIDMAN et al., 2001), porém não há estudos que comprovem qual sua função nestas células. Um estudo sugere que ER β induz apoptose de osteoclastos em osso alveolar de rato, ao ser constatado forte marcação em células em apoptose detectadas pelo método de TUNEL (marcação de extremidade terminal dUTP mediada por desoxinucleotidil transferase) (CRUSODE DE SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009).

Para estudo do ER β , alguns laboratórios criaram camundongos *knockouts* denominados ER β KO e testaram substâncias consideradas seletivas para o receptor, como a genisteína que é uma isoflavona de soja com uma afinidade 20 vezes maior por ER β do que ER α (KUIPER et al., 1998) e ERB-041, que possui afinidade 200 vezes maior por ER β (HARRIS et al., 2003). Outra substância também conhecida como sendo um agonista seletivo para o ER β é o diarilpropionitrilo (DPN), com afinidade 170 vezes maior por ER β do que ER α (WEISER; WU; HANDA, 2009). O DPN já foi utilizado para avaliar

a influência do ER β na ansiedade e depressão (WEISER; WU; HANDA, 2009), na biologia do câncer de mama e próstata (OMOTO; IWASE, 2015) e na proliferação e metabolismo em uma linhagem celular óssea humana (SOMJEN et al., 2011).

Devido a carência de informações acerca do efeito do ER β na formação e função dos osteoclastos, o presente estudo tem como objetivo investigar o efeito do agonismo do ER β durante a osteoclastogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência do receptor de estrógeno beta na osteoclastogênese e na atividade de reabsorção de osteoclastos por meio do agonista seletivo para o receptor, diarilpropionitrilo (DPN).

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a presença do mRNA do receptor de estrógeno beta.
- b) Avaliar o número de osteoclastos formados enquanto tratados com DPN e E₂.
- c) Avaliar a presença de anel de actina e área dos osteoclastos.
- d) Avaliar a atividade dos osteoclastos em placa de *osteassay*.

3 METODOLOGIA

3.1 Osteoclastogênese *in vitro*

As células da medula óssea foram obtidas da tíbia e fêmur de camundongos fêmea C57BL/6 (B6.129S6-Cybbtn1Din/J). Os animais foram fornecidos e mantidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) sob o regime de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, dieta ad libitum e temperatura de 25 C°. O projeto foi executado conforme a aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) sob número de projeto 005/19.

As células obtidas do camundongo foram lavadas com tampão de lise de hemácias antes do plaqueamento. Depois dessa etapa, foi plaqueado $1,3 \times 10^7$ células em placa petri, acondicionadas em meio α -MEM (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) com 10% de soro fetal bovino (Gibco™, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) e tratadas com 30 ng/mL de proteína recombinante M-CSF murino (R&D Systems, Minneapolis, MN) por 72h. Após esse período, as células foram lavadas para retirar aquelas que não se

diferenciaram em macrófago. E em seguida os macrófagos foram desaderidos da placa petri com PBS 1X gelado e plaqueado 2×10^4 células/poço em placa de 96 poços. Para a diferenciação desses macrófagos em osteoclastos, as células foram tratadas com 30 ng/mL de M-CSF e 10 ng/mL de RANKL murino (R&D Systems) por 4 dias. A cada 2 dias o meio foi renovado (MARINO et al, 2014).

3.2 Confirmação da diferenciação de osteoclastos por reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato.

No fim da diferenciação constatou-se a formação dos osteoclastos por meio da reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), enzimas típicas dessas células multinucleadas, que são colorimetricamente marcadas. Para isso o meio foi removido e as células fixadas com solução de acetona, citrato e formol. Em seguida as células foram incubadas com a solução para TRAP, preparada de acordo com a recomendação do fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células TRAP positivas foram aquelas que tinham grânulos citoplasmáticos marcados por depósitos de vermelho escuro a roxo. Foi realizado a contagem dos osteoclastos formados por poço, sendo considerado as células multinucleadas positivas para a TRAP com 3 ou mais núcleos. As imagens foram obtidas com aumento de 5x usando o microscópio FSX 100 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

3.3 Extração de RNA e PCR em tempo real

Para a extração de RNA, os macrófagos derivados da medula óssea foram tratados com RANKL por 24h, 48h e 72h e o plaqueamento foi de 8×10^4 células/poço. Foi realizada extração de RNA automatizada com o kit Maxwell® RSC simplyRNA cells kit (Promega, Madison, WI, EUA). O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado com GoScript RT Mix (Promega). A PCR quantitativa (qPCR) foi realizada usando o kit GoTaq® Master Mix qPCR (Promega) realizado no StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Os primers foram sintetizados para o gene *ESR2* que codifica ERβ, a partir do banco de dados GenBank. Os primers utilizados foram TGG ACA CCT CTC TTC TTT AG (Forward) e CTC TTC AGG GTC TTC CTG TT (reverse). O controle gênico endógeno utilizado foi o GAPDH. Os níveis relativos de expressão de mRNA foram determinados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ e os resultados foram expressos como aumento relativo em relação ao gene endógeno.

3.4 Incubação das células

As células foram incubadas a partir do dia 3, juntamente com RANKL com Dimetilsulfóxido (DMSO) na diluição de 1:10000 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 10 nM de diarilpropionitrilo (DPN) (Sigma Aldrich) e 10 nM de 17 β -estradiol (E₂) (Sigma Aldrich), formando então 3 grupos. No dia 5 o meio foi renovado. O DMSO foi utilizado como controle por ser o veículo usado para preparar o DPN e o E₂. A intenção no uso do DPN foi de tentar elucidar a ação do ER β durante a osteoclastogênese e também na atividade dos osteoclastos, e o E₂ foi usado como um padrão de comparação, uma vez que o organismo está exposto a esse hormônio.

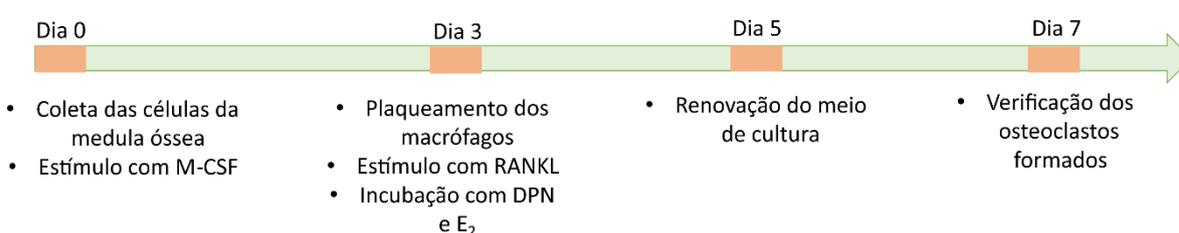


Figura 2. Representação esquemática da cronologia de diferenciação dos osteoclastos e incubação com DPN e E₂.

3.5 Marcação do anel de actina

As células da medula óssea (2×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placa de 96 poços preta com fundo transparente e a metodologia foi baseada em Wang e colaboradores (WANG et al, 2015). Após a diferenciação, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos. Para a permeabilização das células foi utilizado solução de Triton 0,2% por 5 minutos. Depois as células foram incubadas com anticorpo faloidina-TRITC, diluição 1:200 (Sigma Aldrich) para marcação da actina. O núcleo foi marcado com DAPI, diluição 1:500 (Sigma Aldrich). As imagens das células foram obtidas em microscópio de fluorescência. Para a análise das imagens foi utilizado o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD).

3.6 Ensaio de reabsorção óssea (*osteassay*)

Macrófagos derivados da medula óssea (2×10^4 células por poço) de camundongos fêmea C57BL/6 foram cultivados com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL) na superfície de poços recobertos por material sintético mimético a osso formado a partir de cristais inorgânicos de fosfato de cálcio (Corning Life Science, Corning, NY, EUA),

seguinte orientações do fabricante. Após 5 dias de cultura, o experimento foi finalizado e a percentagem da área reabsorvida (área escura) foi calculada considerando a área total do poço usando o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD).

3.7 Análise estatística

O teste de Kolmogorov Smirnov foi aplicado para verificar se as variáveis estudadas possuíam uma distribuição normal. Para comparar dois grupos foi usado o teste T de Student e para mais de dois grupos foi usado teste de análise da variância univariada (*One-way* ANOVA) seguido por teste Post-hoc de Tukey. A diferença foi considerada estatística se o valor de p for menor do que o alfa escolhido para o estudo (0,05).

4 RESULTADOS

4.1 Aumento da expressão do gene *ESR2* durante a osteoclastogênese

Para verificar a presença e a expressão do mRNA do gene codificador do receptor de estrógeno beta (*ESR2*), foi realizado a PCR em tempo real nos tempos de 0h, 24h, 48h e 72h pós-estímulo de diferenciação com RANKL. Observou-se aumento na expressão do mRNA do gene *ESR2* ao longo do tempo, sendo em 72h sua maior expressão em comparação com o tempo de 0h, 24h e 48h (Figura 3).

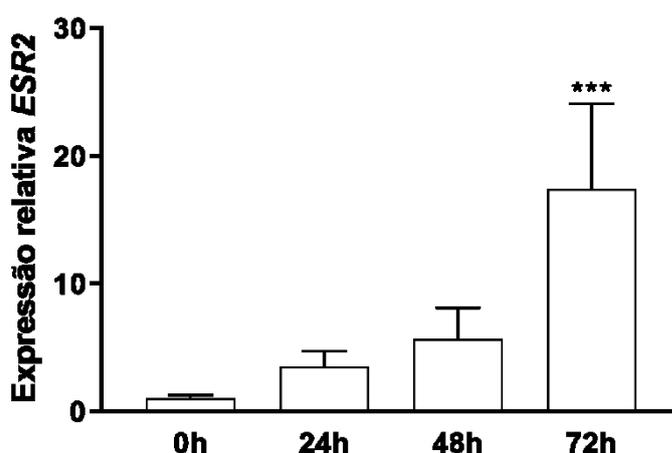


Figura 3. Expressão relativa do mRNA do gene *ESR2*. Para avaliar a expressão gênica do receptor de estrógeno beta as células da medula óssea de camundongo foram incubadas por 24h, 48h e 72h com 10ng/mL de RANKL. As barras representam a média ± SEM.*** significa que $p < 0,05$.

4.2 DPN não altera o número de osteoclastos

Para avaliar se o receptor de estrógeno beta influencia na osteoclastogênese, as células foram incubadas com DPN durante a diferenciação dos osteoclastos. A presença do DPN e do E₂ não influenciou na diferenciação final dos osteoclastos, comparados com o veículo (Figura 4). Os tratamentos com DPN e E₂ não afetaram a formação dos osteoclastos (Figura 4).

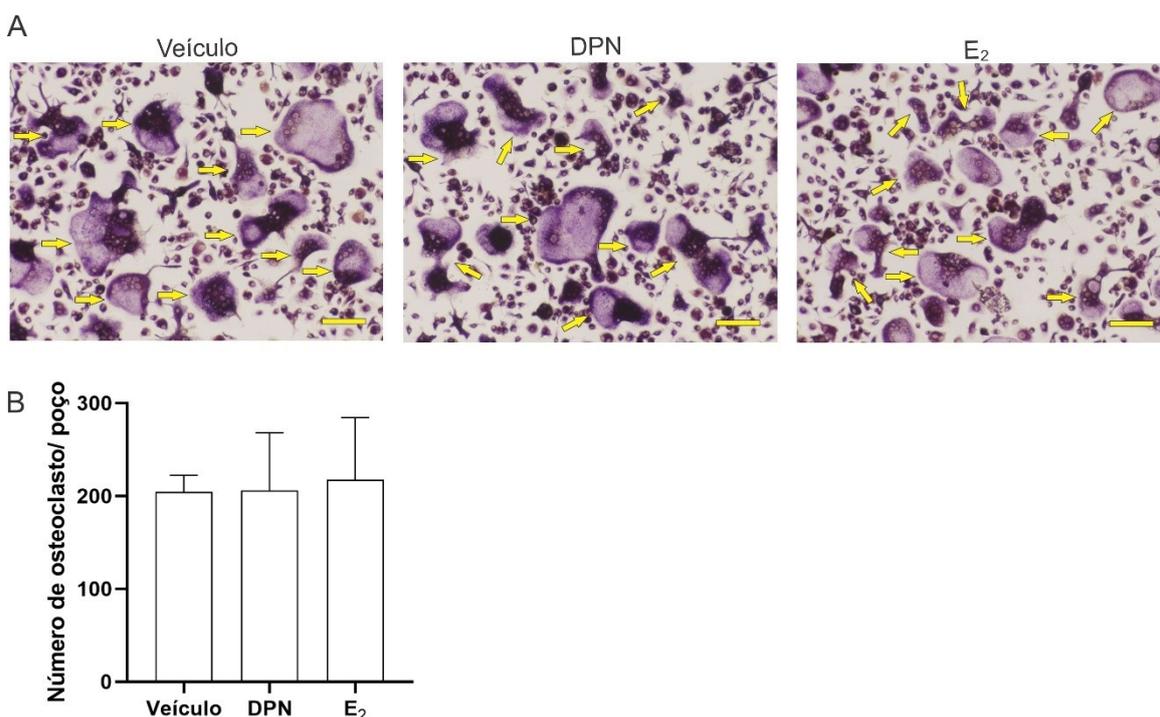


Figura 4. Número de osteoclastos formados após incubação com DPN e E₂. (A) Fotos representativas dos osteoclastos formados a partir da incubação com DMSO, DPN e E₂ após a realização da reação de TRAP. Setas amarelas indicam os osteoclastos (células TRAP⁺ que apresentam 3 ou mais núcleos). A escala amarela é referente a 100 μm. (B) Gráfico do número de osteoclastos formados para cada grupo. As barras indicam a média ± SEM.

4.3 DPN e E₂ não influenciam na porcentagem das células com anel de actina, mas E₂ altera o tamanho dos osteoclastos

O DPN e o E₂ não influenciaram na porcentagem de células que apresentavam o anel de actina em relação ao veículo (Figura 5A e 5B). No entanto, o E₂ influenciou no tamanho dos osteoclastos formados, gerando osteoclastos menores, fato que não foi

observado no grupo incubado com o DPN ($p < 0,05$) (figura 5C). O veículo foi utilizado como referência para essa análise.

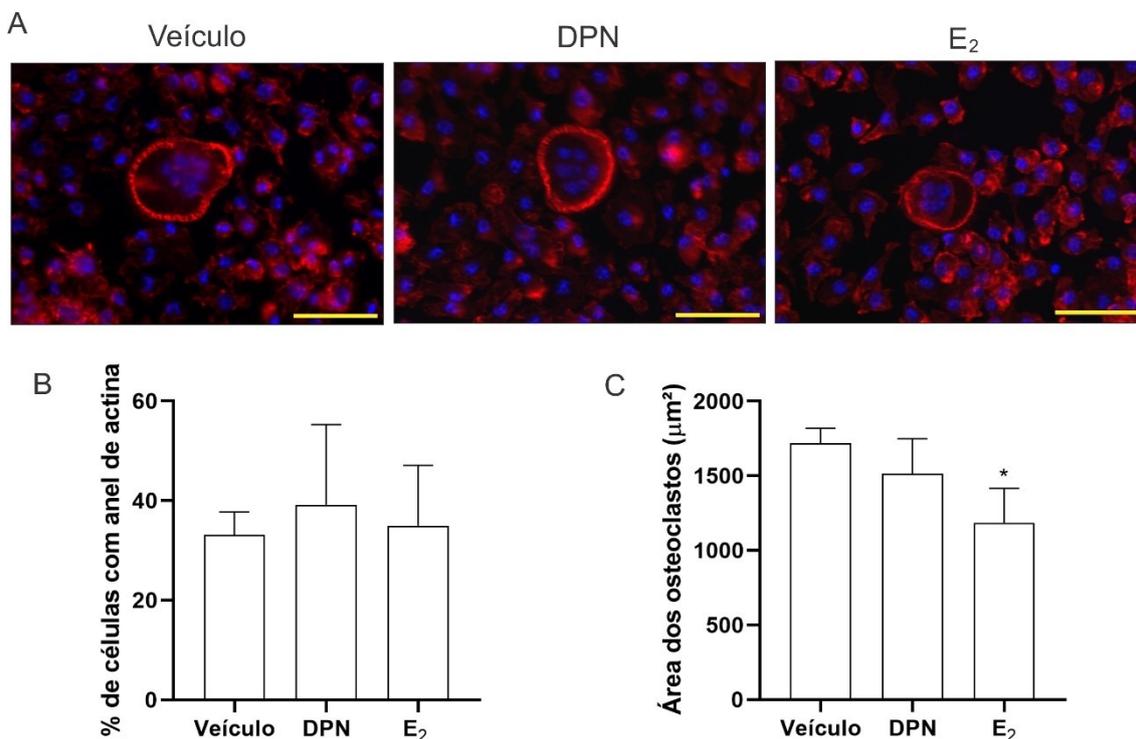


Figura 5. Marcação do anel de actina em osteoclastos. (A) Microscopia por fluorescência destacando a marcação da actina (vermelho) e núcleo (azul) dos osteoclastos. A escala amarela representa 50µm. (B) Porcentagem de células por poço que apresentaram actina polarizada em forma de anel. (C) Gráfico da área dos osteoclastos em µm². As barras correspondem a média ±SEM. * representa $p < 0.05$ em relação ao veículo.

4.4 E₂ afeta capacidade de reabsorção dos osteoclastos

O ensaio de *osteoclast assay* demonstrou que apenas o E₂ reduziu a área de matriz reabsorvida, indicando menor capacidade de reabsorção dos osteoclastos ($p < 0.05$). O DPN não alterou a área de reabsorção (Figura 6). O grupo veículo foi utilizado como referência para comparação.

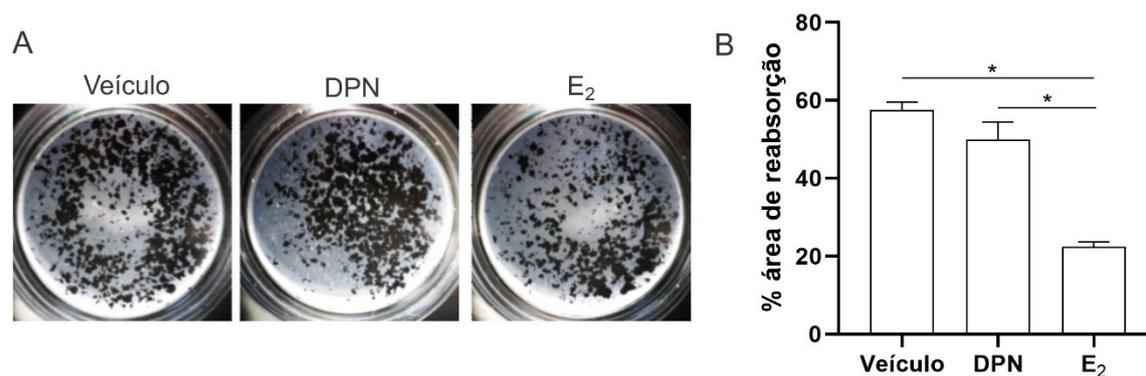


Figura 6. Porcentagem da área reabsorvida por osteoclastos. (A) Fotos representativas dos poços do *osteoclast assay* reabsorvidos por osteoclastos. As manchas escuras representam a atividade reabsorvente dessas células. (B) Gráfico da porcentagem da área reabsorvida para DMSO, DPN e E₂. As barras representam a média ± SEM. * significa p<0,05 em comparação com veículo; * representa p<0,05.

5 DISCUSSÃO

Os efeitos do estrógeno em osteoclastos de forma geral são menos estudados do que nos osteoblastos. A dificuldade na obtenção e isolamento de osteoclastos dificultou o começo dos estudos desse receptor quanto a ação e função nessa célula. Com a técnica de imuno-histoquímica usando anticorpos desenvolvidos especificamente para ER β foi possível identificar a expressão dessa isoforma no núcleo e citoplasma de osteoclastos (BORD et al., 2001; BRAIDMAN et al., 2001). Além disso, outro estudo mostrou a presença do ER β tanto em precursores como em osteoclastos maduros de humano (SØRENSEN et al., 2006). Porém, as fontes na literatura sobre a expressão de ER β durante a osteoclastogênese são escassas.

Os resultados do presente trabalho mostraram por meio da PCR que a expressão do gene que codifica o ER β aumentou ao longo da osteoclastogênese em macrófagos derivados de células da medula óssea de camundongos. A maioria dos artigos mostram apenas a presença do ER β em precursores e/ou nas células diferenciadas em osteoclastos, mas não avaliam a sua expressão semi-quantitativa ao longo da osteoclastogênese (VIDAL; KINDBLOM; OHLSSON, 1999; BRAIDMAN et al., 2001; SØRENSEN et al., 2006). Uma pesquisa mostrou que a expressão gênica do ER β não foi alterada durante o processo de diferenciação de osteoclastos humanos (DENGER; REID; GANNON, 2008). Provavelmente o resultado foi diferente pelo fato de ser usado células de organismos diferentes, camundongo e humano. Assim, o resultado encontrado no presente trabalho

forneceu uma nova informação sobre a expressão de ER β durante a osteoclastogênese induzida a partir de células da medula óssea de camundongo.

Para avaliar a ação de ER β durante a osteoclastogênese, o DPN, que é um agonista seletivo para o ER β , foi usado como uma ferramenta para ativar a sinalização intracelular do receptor durante o ensaio *in vitro* de osteoclastogênese. O tratamento com DPN não afetou o número ou a área dos osteoclastos formados, sugerindo então que possivelmente a isoforma beta não influencie na diferenciação dos mesmos. No entanto, há um trabalho que mostra que a genisteína, um fitoestrógeno com afinidade maior por ER β , foi capaz de reduzir a osteoclastogênese induzida por RANKL em células RAW264.7 (LEE; KIM; JANG, 2014). Essa diferença pode ocorrer devido a diferença de linhagem celular utilizada, uma vez que a RAW264.7 é derivada de um tumor e não necessita do acréscimo de M-CSF para que ocorra a diferenciação em osteoclasto, pois a própria célula produz o necessário para sua proliferação e sobrevivência. Já foi relatado que estrógeno pode afetar além da sinalização de RANKL, a via do M-CSF nessa linhagem celular por reduzir a expressão dos respectivos receptores, RANK e c-Fms (GALAL et al., 2007). Assim, a RAW264.7 pode ser mais sensível a ação do fitoestrógeno genisteína, sendo observado menor diferenciação. Outro fator é que a genisteína tem seletividade de apenas 20 vezes maior para ER β do que para ER α , enquanto o DPN tem seletividade de aproximadamente 170 vezes maior. Em razão disso, pode ser que a genisteína tenha ativado também o ER α e por isso há diferença de resposta em relação ao DPN (KUIPER et al., 1998; WEISER; WU; HANDA, 2009).

O E₂ na concentração de 10 nM também não foi capaz de afetar a diferenciação dos osteoclastos. Esse resultado foi diferente do encontrado na literatura que demonstrou que o E₂ não afetou o tamanho dos osteoclastos, mas reduziu a formação deles *in vitro* (SHEVDE et al., 2000; GARCIA PALACIOS et al., 2005; SAINTIER et al., 2006; SØRENSEN et al., 2006). Esses resultados contraditórios podem ser devidos a diferentes linhagens celulares usadas para avaliar os efeitos do E₂. Neste estudo, foi utilizada a cultura primária de células da medula óssea de camundongo, enquanto os estudos da literatura usaram a linhagem celular imortalizada de macrófagos RAW264.7 e célula mononuclear do sangue periférico humano diferenciado em osteoclasto. Em comparação com a RAW264.7, um estudo mostra que diferentes concentrações de estrógeno alteram a expressão de receptores importantes para a sinalização da osteoclastogênese, como o RANK e o c-Fms (GALAL et al., 2007). Esse efeito não foi avaliado nas células da medula óssea de camundongo, porém é possível que a expressão desses receptores não

tenha sido alterada pela concentração de E₂ utilizada nesse trabalho. Além disso, a RAW264.7 é derivada de tumor e é uma linhagem imortalizada que difere das células de cultura primária obtida da medula óssea de camundongo por apresentar alteração de vias de sinalização que permitem a sua proliferação (SHORE; TANTRAVAH; REDDY, 2002). Sendo assim, um estudo demonstra que durante a osteoclastogênese induzida por RANKL há diferenças entre os dois tipos celulares quanto a ativação de moléculas que influenciam em vias de sinalização relacionadas a apoptose, ciclo celular e reorganização do citoesqueleto (NG et al., 2018). Portanto, o mesmo estímulo pode gerar respostas diferentes entre esses tipos celulares. Quanto a diferença entre as células humanas e murinas, sabe-se que receptores de estrógeno de diferentes espécies podem exibir preferência e afinidade por compostos estrogênicos em proporções diferentes (MATTHEWS et al., 2000). Tal efeito pode ser devido à sequência de aminoácidos presentes no domínio de ligação do receptor que podem ser diferentes para cada espécie (WHITE et al., 1987; MATTHEWS et al., 2000). Nesse caso, cada tipo celular pode ter uma variação na sensibilidade para a mesma substância devido a diferença de afinidade ao E₂.

Neste estudo a área dos osteoclastos não foi afetada por DPN, mas E₂ foi capaz de reduzir o tamanho dos mesmos, o que pode ser um indicativo da ação desse hormônio sobre o processo de fusão celular que ocorre durante a osteoclastogênese, Uma vez que E₂ possa retardar a fusão de células, este efeito pode secundariamente reduzir o nível de reabsorção dos osteoclastos, já que a capacidade de reabsorção pode ser correlacionada com a área superficial destas células (LEES; SABHARWAL; HEERSCH, 2001). Possivelmente houve redução na produção de DC-STAMP, proteína relacionada à fusão dos precursores de osteoclastos, uma vez que o OC-STAMP, gene importante que regula expressão de outros relacionados à fusão de precursores de osteoclasto, é inibido pela ação do estrógeno (YAGI et al., 2005; WITWICKA et al., 2015). Portanto, é possível sugerir que o ER β não influencie nas proteínas de fusão, uma vez que DPN não alterou o tamanho dos osteoclasto, sendo essa atividade atribuída ao ER α .

O citoesqueleto dos osteoclastos é essencial para garantir sua adesão à matriz, permitindo sua atividade de reabsorção (TEITELBAUM, 2011; HAN; ZUO; HOLLIDAY, 2019). Nesse processo, a reorganização do citoesqueleto de actina forma estruturas com aspectos de anéis (ou zonas de vedação) que permitem que a membrana plasmática dos osteoclastos entre em contato com a superfície óssea e facilita a reabsorção da matriz óssea (UEHARA; UDAGAWA; KOBAYASHI, 2018). De acordo com essas

informações, avaliou-se a formação do anel de actina em células incubadas com DPN e E₂. Os resultados demonstraram que não houve diferença na porcentagem de células que apresentavam o anel de actina formado por DPN e E₂, sendo assim, não foram capazes de alterar a polimerização dos anéis de actina que conferem maior adesão aos osteoclastos. Porém, as células foram diferenciadas em superfície sem contato com qualquer matriz que fornecesse estímulo para sua atividade, talvez por isso não houve diferença na polimerização da actina em relação ao uso de DPN e E₂. Para obter uma melhor resposta quanto à atividade dos osteoclastos, o ideal é fazer com que as células sejam diferenciadas em contato com algo que possa mimetizar a matriz óssea (MARINO et al., 2014). Por esse motivo, foi realizado também o *osteassay*.

A maior expressão de ER β na fase final da diferenciação (72 horas após o estímulo com RANKL) poderia sugerir que essa isoforma do receptor estaria mais relacionada à atividade dos osteoclastos e não ao processo de diferenciação. Isso pode explicar a ausência da atividade do DPN nos momentos iniciais da osteoclastogênese, que seria a fusão dos precursores. Portanto, foi realizado o *osteassay* para avaliar a capacidade de reabsorção dos osteoclastos em uma matriz que estimula a atividade dessas células. Nesse ensaio, o DPN, agonista seletivo para o ER β , não afetou a atividade de reabsorção dos osteoclastos, pois a porcentagem da área reabsorvida foi semelhante ao do veículo. Este é um indicativo de que essa isoforma pode não ter ação sobre a atividade dos osteoclastos também. Existem poucas informações sobre a relação ER β e osteoclastos na literatura. Um estudo sugere que o ER β induz a apoptose de osteoclastos maduros, como demonstrado pela co-localização do ER β e das regiões apoptóticas (CRUSODE DE SOUZA; SASSO-CERRI; CERRI, 2009). O DPN não foi capaz de afetar a osteoclastogênese e nem mesmo a capacidade de reabsorção dos osteoclastos, então talvez a ação do receptor esteja mais relacionada ao tempo de vida dos osteoclastos.

E₂ apesar de não ter afetado o número de osteoclastos formados, ele gerou osteoclastos menores e com baixa capacidade de reabsorção óssea. Como foi visto, a porcentagem da área reabsorvida por células tratadas com E₂ foi estatisticamente menor se comparado ao DPN e ao veículo. Esses dados corroboram com outros apresentados na literatura, em que o E₂ afetou a capacidade de reabsorção de osteoclastos maduros (KAMEDA et al., 1997; MANO; HAKEDA; KUMEGAWA, 2001). Apesar disso, há estudo que tem mostrado efeito contrário, em que estrógeno diminuiu a diferenciação dos osteoclastos, mas não afetou a reabsorção por osteoclastos maduros (SØRENSEN et al., 2006). A diferença dos resultados pode ser devido ao fato que este último estudo faz a

análise de atividade de osteoclastos por meio da mensuração de um peptídeo de colágeno que é liberado no sobrenadante da cultura pela matriz reabsorvida, enquanto os trabalhos previamente citados avaliam diretamente a área reabsorvida.

Portanto, no presente trabalho apenas o E₂ demonstrou seus efeitos que possivelmente são gerados principalmente por meio da ação do ER α , assim como a maioria dos artigos já atribuem os efeitos do estrógeno ao ER α , como na diferenciação, na atividade e na viabilidade dos osteoclastos (MANO; HAKEDA; KUMEGAWA, 2001; SØRENSEN et al., 2006; NAKAMURA et al., 2007). Apesar de haver aumento na expressão gênica do ER β ao longo da osteoclastogênese, o tratamento com DPN não apresentou quaisquer efeitos sobre a diferenciação, tamanho e capacidade reabsortiva dos osteoclastos, possivelmente por causa da ação da droga ou sensibilidade desse receptor nas células utilizadas ou mesmo pela participação do ER β nesses processos. Sendo assim, com esse estudo foi possível sugerir que o ER β não tem influência sobre a osteoclastogênese e atividade dos osteoclastos.

6 CONCLUSÃO

A expressão de ER β é aumentada ao longo da osteoclastogênese induzida por RANKL. No entanto, a atividade desse receptor ou de DPN não influencia na diferenciação e atividade de osteoclastos derivados de células da medula óssea de camundongos.

7 REFERÊNCIAS

BORD, S.; HORNER, A.; BEAVAN, S.; COMPSTON, J. Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 86, n. 5, p. 2309-2314, 2001.

<https://doi.org/10.1210/jcem.86.5.7513>

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

<https://doi.org/10.1038/nature01658>

BRAIDMAN, I. P.; HAINEY, L.; BATRA, G.; SELBY, P. L.; SAUNDERS, P. T.; HOYLAND, J. A. Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 2, p. 214-220, 2001.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.2.214>

CHEN, X.; WANG, Z.; DUAN, N.; ZHU, G.; SCHWARZ, E. M.; XIE, C. Osteoblast-osteoclast interactions. **Connective Tissue Research**, v. 59, n. 2, p. 99-107, 2018.

<https://doi.org/10.1080/03008207.2017.1290085>

CRUSODE DE SOUZA, M.; SASSO-CERRI, E.; CERRI, P. S. Immunohistochemical detection of estrogen receptor beta in alveolar bone cells of estradiol-treated female rats: possible direct action of estrogen on osteoclast life span. **Journal of Anatomy**, v. 215, n. 6, p. 673-681, 2009.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2009.01158.x>

DENGER, S.; REID, G.; GANNON, F. Expression of the estrogen receptor during differentiation of human osteoclasts. **Steroids**, v. 73, n. 7, p. 765-774, 2008.

<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.02.013>

DOS SANTOS, E. G.; DIEUDONNE, M. N.; PECQUERY, R.; LE MOAL, V.; GIUDICELLI, Y.; LACASA, D. Rapid nongenomic E2 effects on p42/p44 MAPK, activator protein-1, and cAMP response element binding protein in rat white adipocytes. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 930-940, 2002.

<https://doi.org/10.1210/endo.143.3.8678>

FISTAROL, M.; REZENDE, C. R.; FIGUEIREDO CAMPOS, A. L.; KAKEHASI, A. M.; GEBER, S. Time since menopause, but not age, is associated with increased risk of osteoporosis. **Climacteric : the journal of the International Menopause Society**, v. 22, n. 5, p. 523-526, 2019.

<https://doi.org/10.1080/13697137.2019.1634046>

FUENTES, N.; SILVEYRA, P. Estrogen receptor signaling mechanisms. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v. 116, p. 135-170, 2019.

<https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>

GALAL, N.; EL-BEIALY, W. R.; DEYAMA, Y.; YOSHIMURA, Y.; SUZUKI, K.; TOTSUKA, Y. Novel effect of estrogen on RANK and c-fms expression in RAW 264.7 cells. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 20, n. 1, p. 97-101, 2007.

<https://doi.org/10.3892/ijmm.20.1.97>

GARCIA PALACIOS, V.; ROBINSON, L. J.; BORYSENKO, C. W.; LEHMANN, T.; KALLA, S. E.; BLAIR, H. C. Negative regulation of RANKL-induced osteoclastic differentiation in RAW264.7 Cells by estrogen and phytoestrogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 14, p. 13720-13727, 2005.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M410995200>

GORSKI, J.; TOFT, D.; SHYAMALA, G.; SMITH, D.; NOTIDES, A. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 24, p. 45-80, 1968.

<https://doi.org/10.1016/B978-1-4831-9827-9.50008-3>

GREEN, S.; WALTER, P.; GREENE, G.; KRUST, A.; GOFFIN, C.; JENSEN, E.; SCRACE, G.; WATERFIELD, M.; CHAMBON, P. Cloning of the human oestrogen receptor cDNA. **Journal of Steroid Biochemistry**, v. 24, n. 1, p. 77-83, 1986.

[https://doi.org/10.1016/0022-4731\(86\)90035-X](https://doi.org/10.1016/0022-4731(86)90035-X)

GU, Q.; MOSS, R. L. 17 beta-Estradiol potentiates kainate-induced currents via activation of the cAMP cascade. **Journal of Neuroscience**, v. 16, n. 11, p. 3620-3629, 1996.

<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-11-03620.1996>

HAN, G.; ZUO, J.; HOLLIDAY, L. S. Specialized Roles for Actin in Osteoclasts: Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. **Biomolecules**, v. 9, n. 1, p., 2019.

<https://doi.org/10.3390/biom9010017>

HARRIS, H. A.; ALBERT, L. M.; LEATHURBY, Y.; MALAMAS, M. S.; MEWSHAW, R. E.; MILLER, C. P.; KHARODE, Y. P.; MARZOLF, J.; KOMM, B. S.; WINNEKER, R. C.; FRAIL, D. E.; HENDERSON, R. A.; ZHU, Y.; KEITH, J. C., JR. Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. **Endocrinology**, v. 144, n. 10, p. 4241-4249, 2003.

<https://doi.org/10.1210/en.2003-0550>

JI, M. X.; YU, Q. Primary osteoporosis in postmenopausal women. **Chronic Diseases and Translational Medicine**, v. 1, n. 1, p. 9-13, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.cdtm.2015.02.006>

KAMEDA, T.; MANO, H.; YUASA, T.; MORI, Y.; MIYAZAWA, K.; SHIOKAWA, M.; NAKAMARU, Y.; HIROI, E.; HIURA, K.; KAMEDA, A.; YANG, N. N.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 4, p. 489-495, 1997.

<https://doi.org/10.1084/jem.186.4.489>

KHALID, A. B.; KRUM, S. A. Estrogen receptors alpha and beta in bone. **Bone**, v. 87, p. 130-135, 2016.

<https://doi.org/10.1016/j.bone.2016.03.016>

KHOSLA, S.; OURSLER, M.J.; MONROE, D.G. Estrogen and the skeleton. **Trends in endocrinology and metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576-581, 2012

<https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.03.008>

KIM, J. H.; KIM, N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 1, p. 12-17, 2016.

<https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.12>

KLINGE, C. M. Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 14, p. 2905-2919, 2001.

<https://doi.org/10.1093/nar/29.14.2905>

KUIPER, G. G.; ENMARK, E.; PELTO-HUIKKO, M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**, v. 93, n. 12, p. 5925-5930, 1996.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.12.5925>

KUIPER, G. G.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; VAN DER SAAG, P. T.; VAN DER BURG, B.; GUSTAFSSON, J. A. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.

<https://doi.org/10.1210/endo.139.10.6216>

LEE, S. H.; KIM, J. K.; JANG, H. D. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10605-10621, 2014.

<https://doi.org/10.3390/ijms150610605>

LEES, R. L.; SABHARWAL, V. K.; HEERSCHE, J. N. Resorptive state and cell size influence intracellular pH regulation in rabbit osteoclasts cultured on collagen-hydroxyapatite films. **Bone**, v. 28, n. 2, p. 187-194, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(00\)00433-6](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(00)00433-6)

LOSEL, R.; WEHLING, M. Nongenomic actions of steroid hormones. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 1, p. 46-56, 2003.

<https://doi.org/10.1038/nrm1009>

MANO, H.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Estrogen directly down-regulates the bone-resorbing activity of mature osteoclasts through nuclear estrogen receptor alpha. **Cytotechnology**, v. 35, n. 1, p. 17-23, 2001.

<https://doi.org/10.1023/A:1008188120766>

MARINO, M.; ACCONCIA, F.; TRENTALANCE, A. Biphasic estradiol-induced AKT phosphorylation is modulated by PTEN via MAP kinase in HepG2 cells. **Mol Biol Cell**, v. 14, n. 6, p. 2583-2591, 2003.

<https://doi.org/10.1091/mbc.e02-09-0621>

MARINO, S.; LOGAN, J. G.; MELLIS, D.; CAPULLI, M. Generation and culture of osteoclasts. **Bonekey Rep**, v. 3, p. 570, 2014.

<https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.65>

MATTHEWS, J.; CELIUS, T.; HALGREN, R.; ZACHAREWSKI, T. Differential estrogen receptor binding of estrogenic substances: a species comparison. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 74, n. 4, p. 223-234, 2000.

[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(00\)00126-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(00)00126-6)

NAKAMURA, T.; IMAI, Y.; MATSUMOTO, T.; SATO, S.; TAKEUCHI, K.; IGARASHI, K.; HARADA, Y.; AZUMA, Y.; KRUST, A.; YAMAMOTO, Y.; NISHINA, H.; TAKEDA, S.; TAKAYANAGI, H.; METZGER, D.; KANNO, J.; TAKAOKA, K.; MARTIN, T. J.; CHAMBON, P.; KATO, S. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 811-823, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.07.025>

NG, A. Y.; TU, C.; SHEN, S.; XU, D.; OURSLER, M. J.; QU, J.; YANG, S. Comparative Characterization of Osteoclasts Derived From Murine Bone Marrow Macrophages and

RAW 264.7 Cells Using Quantitative Proteomics. **JBMR Plus**, v. 2, n. 6, p. 328-340, 2018.

<https://doi.org/10.1002/jbm4.10058>

NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J. A. Biological role of estrogen and estrogen receptors. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 1-28, 2002.

<https://doi.org/10.1080/10409230290771438>

OMOTO, Y.; IWASE, H. Clinical significance of estrogen receptor beta in breast and prostate cancer from biological aspects. **Cancer Science**, v. 106, n. 4, p. 337-343, 2015.

<https://doi.org/10.1111/cas.12613>

REGINSTER, J. Y.; SARLET, N.; DEROISY, R.; ALBERT, A.; GASPARD, U.; FRANCHIMONT, P. Minimal levels of serum estradiol prevent postmenopausal bone loss. **Calcified Tissue International**, v. 51, n. 5, p. 340-343, 1992.

<https://doi.org/10.1007/BF00316876>

RIGGS, B. L. The mechanisms of estrogen regulation of bone resorption. **Journal of Clinical Investigation**, v. 106, n. 10, p. 1203-1204, 2000.

<https://doi.org/10.1172/JCI11468>

SAINTIER, D.; KHANINE, V.; UZAN, B.; EA, H. K.; DE VERNEJOL, M. C.; COHEN-SOLAL, M. E. Estradiol inhibits adhesion and promotes apoptosis in murine osteoclasts in vitro. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 99, n. 4-5, p. 165-173, 2006.

<https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2006.01.009>

SANDHU, S. K.; HAMPSON, G. The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis. **Journal of Clinical Pathology**, v. 64, n. 12, p. 1042-1050, 2011.

<https://doi.org/10.1136/jcp.2010.077842>

SCHWABE, J. W.; TEICHMANN, S. A. Nuclear receptors: the evolution of diversity. **Science's STKE: signal transduction knowledge environment**, v. 2004, n. 217, p. pe4, 2004.

<https://doi.org/10.1126/stke.2172004pe4>

SHEVDE, N. K.; BENDIXEN, A. C.; DIENGER, K. M.; PIKE, J. W. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. **Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, p. 7829-7834, 2000.

<https://doi.org/10.1073/pnas.130200197>

SHORE, S. K.; TANTRAVAHU, R. V.; REDDY, E. P. Transforming pathways activated by the v-Abl tyrosine kinase. **Oncogene**, v. 21, n. 56, p. 8568-8576, 2002.

<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206084>

SOMJEN, D.; KATZBURG, S.; SHARON, O.; GRAFI-COHEN, M.; KNOLL, E.; STERN, N. The effects of estrogen receptors alpha- and beta-specific agonists and

antagonists on cell proliferation and energy metabolism in human bone cell line. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 112, n. 2, p. 625-632, 2011.

<https://doi.org/10.1002/jcb.22959>

SØRENSEN, M. G.; HENRIKSEN, K.; DZIEGIEL, M. H.; TANKÓ, L. B.; KARSDAL, M. A. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. **DNA and cell biology**, v. 25, n. 8, p. 475-483, 2006.

<https://doi.org/10.1089/dna.2006.25.475>

SOZEN, T.; OZISIK, L.; BASARAN, N. C. An overview and management of osteoporosis. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, n. 1, p. 46-56, 2017.

<https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>

STARK, Z.; SAVARIRAYAN, R. Osteopetrosis. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 4, p. 5, 2009.

<https://doi.org/10.1186/1750-1172-4-5>

TEITELBAUM, S. L. The osteoclast and its unique cytoskeleton. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1240, p. 14-17, 2011.

<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06283.x>

UEHARA, S.; UDAGAWA, N.; KOBAYASHI, Y. Non-canonical Wnt signals regulate cytoskeletal remodeling in osteoclasts. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 75, n. 20, p. 3683-3692, 2018.

<https://doi.org/10.1007/s00018-018-2881-1>

VIDAL, O.; KINDBLOM, L. G.; OHLSSON, C. Expression and localization of estrogen receptor-beta in murine and human bone. **Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research**, v. 14, n. 6, p. 923-929, 1999.

<https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.6.923>

WANG, Y.; BROOKS, P.J.; JANG, J.J.; SILVER, A.S.; ARORA, P.D.; MCCULLOCH, C.A.; GLOGAUER, M. Role of actin filaments in fusopod formation and osteoclastogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v.1853, n. 7, p. 1715-1724, 2015.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.04.001>

WEISER, M. J.; WU, T. J.; HANDA, R. J. Estrogen receptor-beta agonist diarylpropionitrile: biological activities of R- and S-enantiomers on behavior and hormonal response to stress. **Endocrinology**, v. 150, n. 4, p. 1817-1825, 2009.

<https://doi.org/10.1210/en.2008-1355>

WHITE, R.; LEES, J. A.; NEEDHAM, M.; HAM, J.; PARKER, M. Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 1, n. 10, p. 735-744, 1987.

<https://doi.org/10.1210/mend-1-10-735>

WITWICKA, H.; HWANG, S. Y.; REYES-GUTIERREZ, P.; JIA, H.; ODGREN, P. E.; DONAHUE, L. R.; BIRNBAUM, M. J.; ODGREN, P. R. Studies of OC-STAMP in

Osteoclast Fusion: A New Knockout Mouse Model, Rescue of Cell Fusion, and Transmembrane Topology. **PLoS One**, v. 10, n. 6, p. e0128275, 2015.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128275>

YAGI, M.; MIYAMOTO, T.; SAWATANI, Y.; IWAMOTO, K.; HOSOGANE, N.; FUJITA, N.; MORITA, K.; NINOMIYA, K.; SUZUKI, T.; MIYAMOTO, K.; OIKE, Y.; TAKEYA, M.; TOYAMA, Y.; SUDA, T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 3, p. 345-351, 2005.

<https://doi.org/10.1084/jem.20050645>

CAPÍTULO 2

1 INTRODUÇÃO

A reabsorção óssea ocorre através de um desequilíbrio entre a atividade osteoclástica e osteoblástica em favor da formação de osteoclastos, fenômeno conhecido como osteoclastogênese (ZAIDI, 2007). O aumento da osteoclastogênese e da atividade dos osteoclastos são as principais causas de doenças relacionadas a reabsorção óssea, como a osteoporose. Essa é uma doença que afeta milhares de pessoas por ano e causa fraturas principalmente no quadril, pulso e coluna vertebral (SOZEN; OZISIK; BASARAN, 2017). A osteoporose não tem cura e, portanto, elucidar as vias de sinalização e fatores que contribuem para a reabsorção óssea é importante para ajudar tanto no seu tratamento assim como no tratamento de enfermidades que acometem o tecido ósseo.

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas da linhagem hematopoiética e são formadas a partir da fusão de células mononucleadas, como monócitos e macrófagos. A diferenciação em osteoclastos ocorre quando as células progenitoras recebem estímulos externos, principalmente da combinação do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e do ativador de receptor do fator nuclear kappa B ligante (RANKL) (CHEN et al., 2011; BOSTROM; LUNDBERG, 2013). A ligação do RANKL ao seu receptor RANK, presente na superfície das células mononucleadas, pode gerar diversas sinalizações internas, incluindo o recrutamento do fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6) para o domínio citoplasmático de RANK. O TRAF6 ativa a via de sinalização mediada por proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), incluindo c-Jun N-terminal quinase (JNK), p38 MAP quinase (p38) e quinase regulada por sinal extracelular (ERK) (GREENBLATT et al., 2010; KIM, J. M. et al., 2019) e também ativa a via do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (BOYCE et al., 2015). Essas vias ativam o fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), o principal regulador gênico na diferenciação de osteoclastos. O NFATc1 transloca-se para o núcleo para controlar a expressão de genes relacionados com a diferenciação em osteoclastos (figura 1).

A sinalização gerada por RANKL/RANK é capaz de ativar parcialmente o NFATc1. Neste momento, existem sinais co-estimulatórios que auxiliam na ativação desse importante regulador osteoclastogênico por meio de oscilações de cálcio intracelular (figura 1). Os sinais co-estimulatórios são mediados por imunorreceptores ativados por tirosina (ITAM), como OSCAR e a ativação de fosfolipase C γ 1 (PLC γ 1) (KOGA et al., 2004). Alguns pesquisadores relatam que a ativação PLC γ promove a

geração de inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) que mobiliza cálcio intracelular que, por sua vez, ativa a fosfatase dependente de calmodulina, calcineurina. A calcineurina desfosforila diretamente resíduos serina no NFATc1, permitindo sua rápida translocação para o núcleo e subsequente ativação (FU et al., 2015).

NFATc1 ativa a transcrição de genes relacionados a osteoclastogênese, como o gene da fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) e proteína transmembranar específica de célula dendrítica (DC-STAMP) (HOLLBERG et al., 2002; YAGI et al., 2005). Além disso, NFATc1 é importante na ativação de genes relacionados a atividade dos osteoclastos, como catepsina K e metaloproteinase 9 (MMP-9), que são proteases secretadas e responsáveis pela degradação da matriz óssea (TROEN, 2004; CHRISTENSEN; SHASTRI, 2015).

Outra via ativada a partir da ligação de RANKL ao seu receptor RANK é a da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células precursoras de osteoclastos por um mecanismo que envolve o TRAF6, GTPase Rac 1 (RAC1) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NOX) (BEDARD; KRAUSE, 2007; KIM, M. S. et al., 2010; BRANDES; WEISSMANN; SCHRODER, 2014; KIM, J. H.; KIM, 2014) (figura 1). Estudos prévios indicaram que quantidades moderadas de ROS participam como segundo mensageiro para diferentes receptores, e tem importância na diferenciação em osteoclastos. Isso ocorre uma vez que ROS geradas por Rac1 levam à ativação de longo prazo da fosfolipase C gama 1 (PLC γ 1) que é necessária para gerar oscilações de cálcio. Neste cenário, o cálcio ativa uma fosfatase chamada calcineurina, que por sua vez ativa o NFATc1 por desfosforilação (KIM, M. S. et al., 2010; KIM, J. H.; KIM, 2014; 2016). Sendo assim, a presença de ROS participa na ativação da osteoclastogênese por meio da via co-estimulatória que leva a oscilações intracelulares de cálcio a partir do retículo endoplasmático (figura 1).

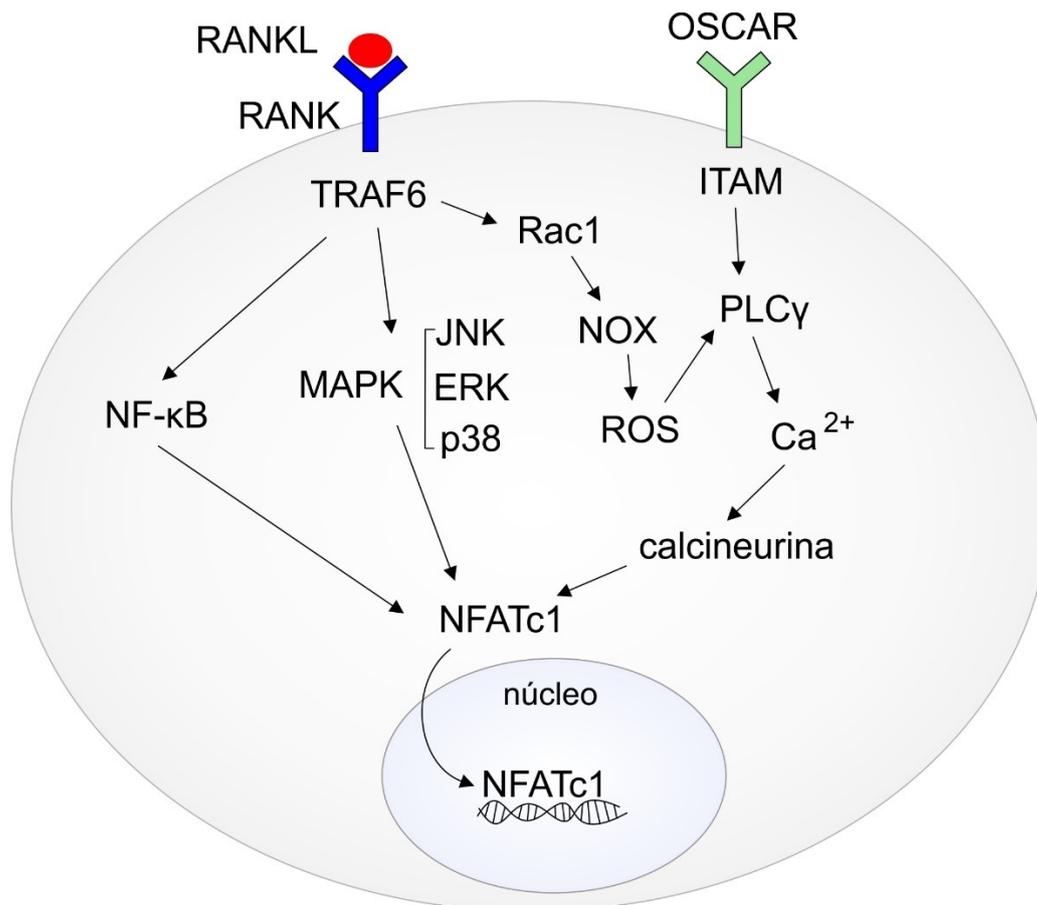


Figura 1. Vias de sinalização que leva a osteoclastogênese por meio da ligação RANKL/RANK e sinal co-estimulatório derivado de anticorpo OSCAR. A partir da ligação de RANK ao seu receptor ocorre o recrutamento de TRAF6 que ativa NF-κB, MAPK e Rac1. A via de NF-κB e MAPK levam à ativação de NFATc1. Já a via Rac1/NOX/ROS leva a ativação de PLCγ, assim como o sinal co-estimulatório derivado do iunorreceptor OSCAR. A mobilização de cálcio intracelular gerada por PLCγ, ativa calcineurina que por sua vez ativa NFATc1.

Fonte: autoria própria

Uma das fontes de ROS é o complexo NOX, que é formado por diferentes subunidades que diferem no nível de expressão e liberação de ROS (BRANDES; WEISSMANN; SCHRODER, 2014). Existem sete subunidades descritas para NOX, são elas NOX1, NOX2 (também conhecida como gp91phox), NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2 (BEDARD; KRAUSE, 2007). Para ativação do complexo NOX, o evento inicial é a fosforilação de p47phox no domínio citoplasmático. A fosforilação causa uma alteração conformacional em sua estrutura, permitindo sua ligação com p67phox, que já está complexado com p40phox (BABIOR, 2004; RASTOGI et al., 2016). O complexo citosólico trimérico (p47phox-p40phox-p67phox) transloca-se para a membrana pela assistência de p47phox que se liga principalmente a p22phox. Por fim, a GTPase Rac transloca-se para o complexo para montagem e ativação de NOX

(BRANDES; WEISSMANN; SCHRODER, 2014; RASTOGI et al., 2016). Uma vez formado este complexo NOX, o NADPH é oxidado, reduzindo o oxigênio e formando um ânion superóxido, uma das principais espécies reativas de oxigênio (WADDINGTON; MOSELEY; EMBERY, 2000; BABIOR, 2004; BEDARD; KRAUSE, 2007; SASAKI et al., 2009a) (figura 2).

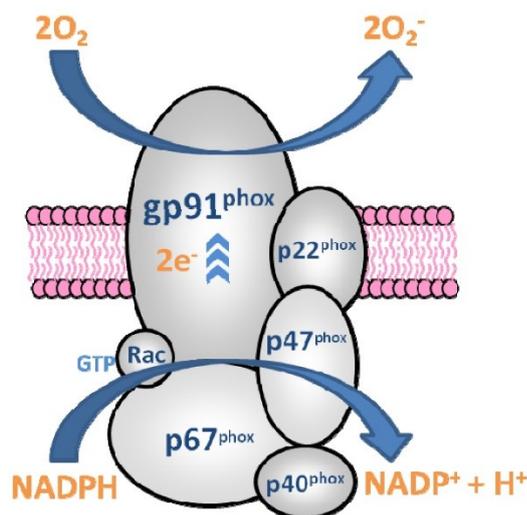


Figura 2. NOX ativada e suas subunidades. A partir do acoplamento das subunidades gp91phox, p22phox, p47phox, p67phox, p40phox e a GTPase Rac é que o complexo enzimático fica ativado e capaz de reduzir o oxigênio formando ROS a partir da oxidação de NADPH.

Fonte: adaptado de MCCANN; ROULSTON, 2013

As diferentes isoformas de NOX são expressas em quantidades diferentes dependendo do tipo celular. NOX1, NOX2 e NOX4 foram encontradas em células ósseas, como os osteoclastos, e são consideradas as principais isoformas influenciadoras na via da osteoclastogênese por meio da produção de ROS (AGIDIGBI; KIM, 2019). Ainda que os estudos sejam controversos quanto à participação de cada isoforma de NOX na formação dos osteoclastos, a NOX2 foi identificada como a principal isoforma expressa em macrófagos derivados de medula óssea que são precursores de osteoclastos (LEE et al., 2005). Em razão disso tem sido estudado qual o papel de NOX2 tanto na formação como na atividade dessas células. O presente trabalho tem como objetivo avaliar a participação da NOX2 na osteoclastogênese.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a osteoclastogênese e atividade de reabsorção em células da medula óssea de animais knockout para NOX2 (NOX2^{-/-}) e tipo selvagem (WT).

2.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar o número de osteoclastos diferenciados a partir de células da medula óssea de camundongos NOX2^{-/-} e tipo selvagem (WT).
- b) Avaliar a área de osteoclastos diferenciados.
- c) Avaliar a mobilização de cálcio intracelular durante a osteoclastogênese induzida pelo estímulo com RANKL.
- d) Determinar a expressão gênica de catepsina K e RANK em osteoclastos.
- e) Avaliar a capacidade de reabsorção dos osteoclastos a partir da análise de *osteassay*.

3 METODOLOGIA

3.1 Diferenciação *in vitro* das células de medula óssea de camundongo em osteoclasto

As células da medula óssea foram obtidas da tíbia e fêmur de camundongos C57BL/6 (B6.129S6-Cybbtm1Din/J) tipo selvagem (WT) e *knockout* para NOX2 (NOX2^{-/-}). Os animais foram fornecidos e mantidos pela Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) sob o regime de 12 horas no claro e 12 horas no escuro, dieta ad libitum e temperatura de 25 C°. O projeto foi executado conforme a aprovação pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) sob número de projeto 024/15.

As células foram lavadas com solução de lise de hemácias e depois plaqueadas em placa Petri no total de $1,3 \times 10^7$ células por placa. As células foram cultivadas com meio α -MEM (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA) suplementado com 1% de penicilina/estreptomicina (1000 U / mL) (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA), 0,1% de gentamicina (Invitrogen), 10% de soro fetal bovino (GibcoTM, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Para a obtenção de macrófagos, as células da medula óssea foram estimuladas com 30 ng/mL de proteína recombinante murino M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, MN) por 3 dias. Após esse período, os macrófagos foram plaqueados em placa de 96

poços na quantidade de 2×10^4 células por poço. Novamente foram estimuladas com 30 ng/mL de M-CSF, dessa vez acrescido de 10 ng/mL de proteína recombinante RANKL murino (R&D Systems). O RANKL é necessário para fazer a diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. O estímulo com RANKL foi conduzido por 5 dias, com renovação de meio a cada 2 dias (MARINO et al, 2014).

3.2 Confirmação da diferenciação de osteoclastos por reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato

Os osteoclastos formados foram identificados por meio da reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), enzimas típicas dessas células multinucleadas. Para isso o meio foi removido e as células fixadas com solução de acetona, citrato e formol. Em seguida as células foram incubadas com a solução para TRAP que foi preparada de acordo com a recomendação do fabricante (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células TRAP positivas foram aquelas que tinham grânulos citoplasmáticos marcados por depósitos de vermelho escuro a roxo. Foi realizado a contagem dos osteoclastos formados por poço, sendo considerado como osteoclastos as células multinucleadas positivas para a TRAP com 3 ou mais núcleos. As imagens foram obtidas com aumento de 5x usando o microscópio FSX 100 (Olympus Corporation, Tóquio, Japão). A medição das áreas de osteoclastos foi realizada usando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

3.3 Mensuração de cálcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$)

O cálcio é um importante mediador para a osteoclastogênese, fundamental na ativação de NFATc1, que é o principal regulador para transcrição de genes que possibilitam a diferenciação em osteoclastos. A determinação da concentração citoplasmática de Ca^{2+} livre foi feita por fluorescência, usando a sonda fluorescente Fura-Red (Thermo Fisher). Os macrófagos (1×10^5 células) foram estimulados com 10 ng/mL de RANKL e 30 ng/mL de M-CSF por 1h e cultivados em placas de 96 poços em solução tampão HBSS e incubados a $37^\circ C$, com a sonda Fura Red a 400 ng/mL durante 60 min. Após este período de incubação, o Fura Red que não foi internalizado foi eliminado por lavagens com o tampão HBSS. As células foram ressuspensas em HBSS e submetidas à leitura por fluorescência. As determinações da fluorescência emitida pela sonda foram feitas utilizando o espectrofotômetro Glomax (Promega, Wisconsin, USA). As células foram excitadas a 405nm e a emissão de fluorescência foi registrada no comprimento

495nm. Os dados foram apresentados como a porcentagem de fluorescência maior que o branco (células sem a sonda Fura Red).

3.4 Extração de RNA e PCR em tempo real

Para esse experimento foram coletadas as células no dia 3 (0h de estímulo com RANKL) para o tempo de 0h e no dia 5 (após a renovação do meio com RANKL por 1h) correspondendo ao tempo de 49h. Esse tempo foi escolhido por ter apresentado o melhor resultado de expressão gênica.

O RNA total foi isolado usando o kit de extração Maxwell (Promega, Wisconsin, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Após o isolamento do RNA, o DNA complementar (cDNA) foi sintetizado usando PrimeScript RT Mix (Promega, Wisconsin, EUA). A qPCR foi realizada utilizando o kit GoTaq® Master Mix qPCR (Promega, Wisconsin, EUA). Primers para análises de qPCR foram sintetizados com base no banco de dados do GenBank e estão listados na tabela 1. A qPCR foi conduzida no sistema de detecção de seqüência StepOne™ (Applied Biosystems, Thermo Fisher) usando primers para *TNFRSF11A* (gene que codifica RANK) e *CTSK* (gene que codifica catepsina K). O gene da β 2-microglobulina foi usado como gene endógeno. Os resultados de qPCR são expressos como quantificação relativa obtida pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Este índice expressa a variação relativa do gene do estudo no grupo experimental em relação ao grupo não estimulado (sem estímulo com RANKL).

Tabela 1. Sequência de primers usados na PCR em tempo real

Primers	Sequência
β 2-microglobulina	Forward: 5'- GCAGTTACTCATCTTTGGTCTA-3' Reverse: 5'- GCACAGTGACAGACTTCAA – 3'
<i>TNFRSF11A</i> (RANK)	Forward: 5'- CTGGTTCACCTGCTCCTAATC-3' Reverse: 5'- TGGCTTAAACTGTCGTTCTC-3'
<i>CTSK</i> (Catepsina K)	Forward: 5'-TGGATGAAATCTCTCGGCGT-3' Reverse: 5'-TCATGTCTCCCAAGTGGTTC-3'

3.5 Ensaio de reabsorção óssea (*osteassay*)

Macrófagos derivados da medula óssea (2×10^4 células por poço) de camundongos do tipo selvagem (C57BL/6) e $\text{NOX2}^{-/-}$ foram cultivados com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL) na superfície de poços recobertos por material sintético mimético a osso formado a partir de cristais inorgânicos de fosfato de cálcio (Corning Life Science, Corning, NY, EUA), seguindo orientações do fabricante. Após 5 dias de cultura, o experimento foi finalizado e a área de reabsorção (área preta) foi medida considerando porcentagem da área total usando o software ImageJ (Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, MD).

3.6 Análise estatística

O teste de Kolmogorov Smirnov foi aplicado para verificar se as variáveis estudadas possuíam uma distribuição normal. Para comparar dois grupos foi usado o teste T de Student e para mais de dois grupos foi usado teste de análise da variância univariada (*One-way ANOVA*) seguido por teste Post-hoc de Tukey. A diferença foi considerada estatística se o valor de p for menor do que o alfa escolhido para o estudo (0,05).

4 RESULTADOS

4.1 Ausência de NOX2 não influencia a diferenciação dos osteoclastos

O número de osteoclastos obtidos por poço não foi diferente entre os grupos WT e o $\text{NOX2}^{-/-}$ ($p > 0.05$) (Figura 3A e 3B). Da mesma forma, a ausência da proteína NOX2 também não interferiu no tamanho médio dos osteoclastos formados, não havendo diferença estatística da área dos osteoclastos entre os grupos WT e $\text{NOX2}^{-/-}$ (Figuras 3A e 3C).

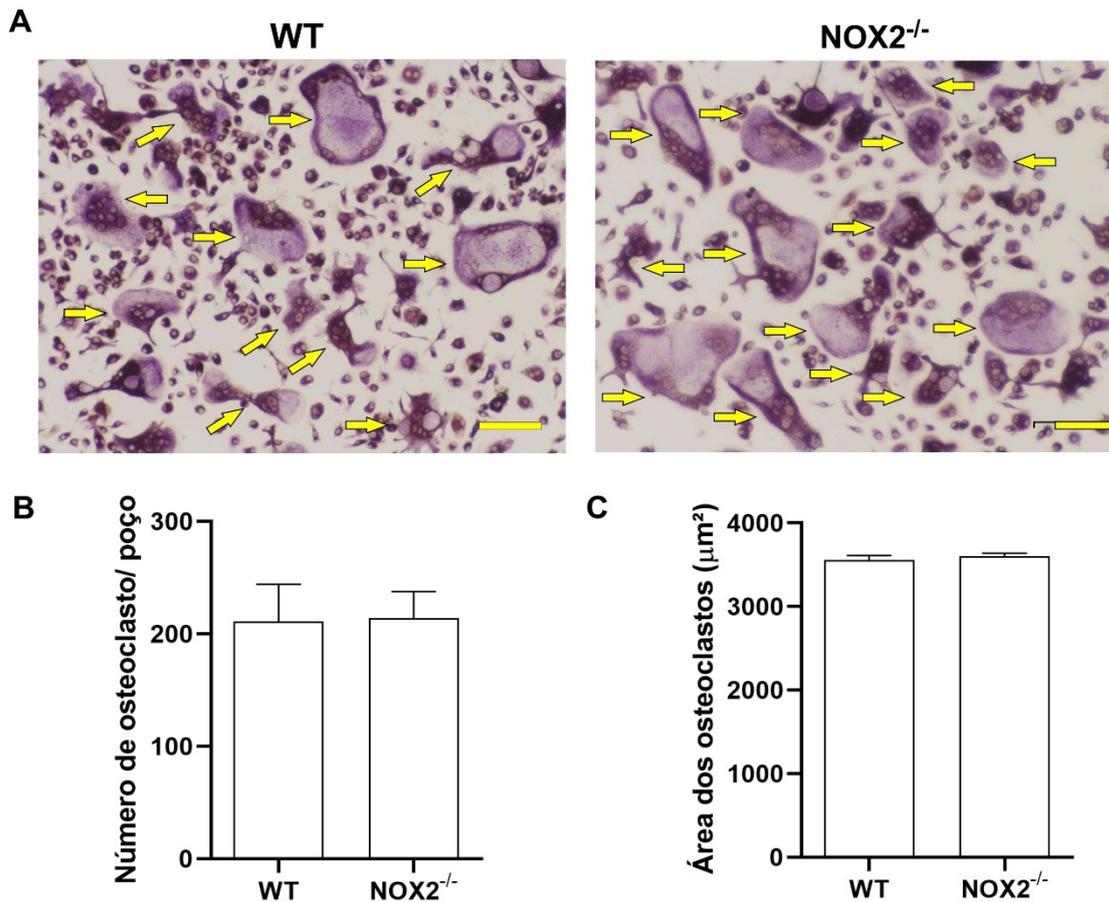


Figura 3. Número e área de osteoclastos derivados de células de camundongo WT e NOX2^{-/-}. (A) Fotos representativas de osteoclastos formados a partir de células de camundongo WT e NOX2^{-/-} após 4 dias de tratamento com RANKL. As setas amarelas indicam os osteoclastos. Escala em cor amarela representa 100µm. (B) Gráfico do número de osteoclastos por poço. (C) Área dos osteoclastos em µm². As barras representam a média ± SEM.

4.2 A ausência de NOX2 promove aumento no influxo de cálcio intracelular

Foi constatada maior intensidade de fluorescência da sonda Fura Red nas células do camundongo NOX2^{-/-} em relação ao camundongo WT ($p < 0.05$), indicando maior mobilização de cálcio intracelular nas células do camundongo NOX2^{-/-} após 1 hora de estímulo com RANKL (Figura 4).

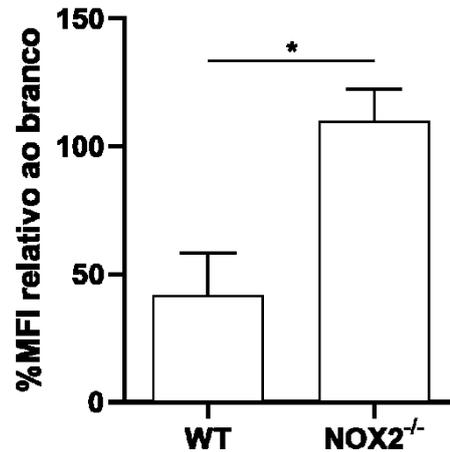


Figura 4. Influxo de cálcio após estímulo de RANKL por 1 hora. Influxo de cálcio intracelular induzidos por RANKL em macrófagos derivados de célula da medula óssea de camundongo NOX2^{-/-} e WT. MFI significa mediana da intensidade de fluorescência que foi calculada em porcentagem relativa ao branco. As barras representam a média \pm SEM. * representa $p < 0,05$.

4.3 Ausência de NOX2 influencia a expressão gênica de catepsina K

A expressão de catepsina K foi maior no tempo de 49h nas células do camundongo NOX2^{-/-} em relação ao tempo de 0h deste grupo e em relação ao tipo selvagem, em ambos os tempos (Figura 5A). Já a expressão gênica de RANK não foi estatisticamente diferente para nenhum tempo de estímulo com RANKL, tanto para as células de camundongo NOX2^{-/-} quanto para WT (Figura 5B).

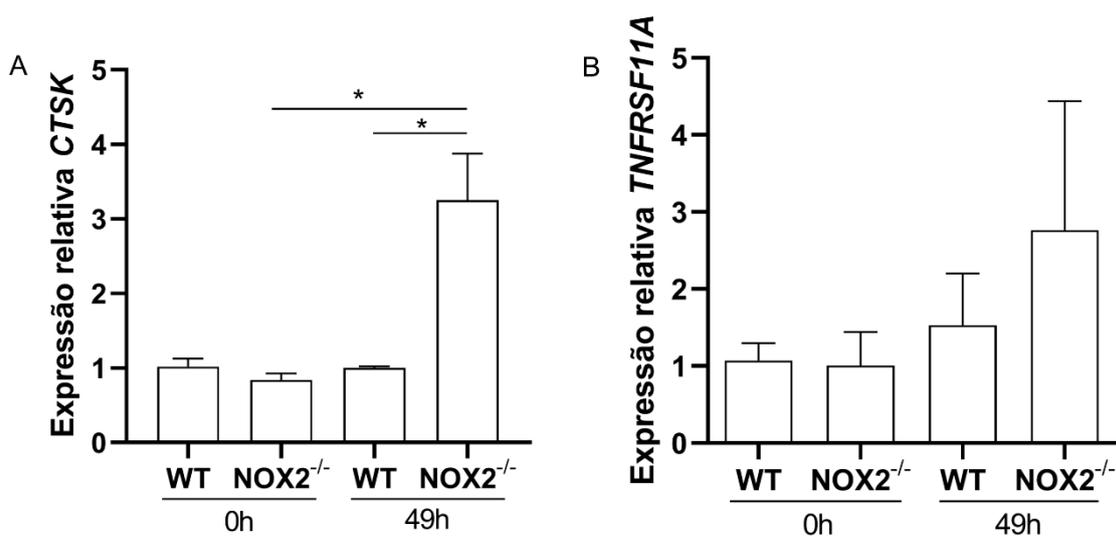


Figura 5. Expressão gênica relativa nos tempos de 0h e 49h após estímulo com RANKL. (A) Catepsina K. (B) RANK. As barras representam a média \pm SEM.* representa $p < 0,05$.

4.4 Ausência de NOX2 promove maior atividade reabsortiva dos osteoclastos

Foi observado que a porcentagem da área reabsorvida por osteoclastos formados a partir de células obtidas de camundongo $\text{NOX2}^{-/-}$ foi maior em relação ao do camundongo WT ($p < 0,05$) (Figura 6)

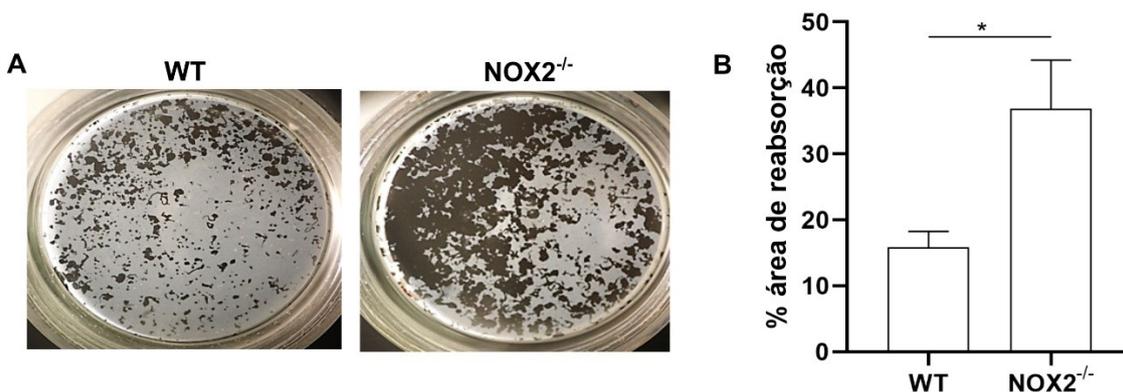


Figura 6. Área de reabsorção formada por osteoclastos derivados de células da medula óssea de camundongo WT e $\text{NOX2}^{-/-}$. (A) Fotos representativas dos poços reabsorvidos pelos osteoclastos. As manchas escuras representam a parte reabsorvida. (B) Gráfico que representa a porcentagem da área reabsorvida por osteoclastos formados. As barras representam a média \pm SEM.* representa $p < 0,05$.

5 DISCUSSÃO

A relação de NOX com a osteoclastogênese está pautada principalmente pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que em quantidade moderada funcionam como mensageiros secundários para diversas sinalizações intracelulares. No caso dos osteoclastos, ROS atua promovendo a osteoclastogênese e também estimulando a reabsorção óssea. Dentre as diversas isoformas de NOX, a NOX2 é a que tem maior expressão em células precursoras de osteoclastos (RAHMAN et al., 2018). Para compreender os efeitos de NOX2 na osteoclastogênese, foram usados camundongos *knockout* para NOX2.

O resultado obtido a partir da diferenciação das células de camundongo $\text{NOX2}^{-/-}$ e do tipo selvagem (WT), demonstram que a ausência de NOX2 não afetou a formação dos osteoclastos, uma vez que o número dessas células foi semelhante entre os grupos.

Entretanto, um estudo relata influência do NOX2 na osteoclastogênese, mostrando uma diminuição na formação de osteoclastos de camundongos com deficiência de NOX2, devido à regulação negativa do NFATc1 (KANG; KIM, 2016). Apesar dessa pesquisa, há outro trabalho que corrobora com os dados obtidos pelo presente estudo, em que as células obtidas de camundongos *knockout* para NOX2 não se diferenciam menos ou produzem menos ROS em resposta ao RANKL comparado às células de camundongo WT (SASAKI et al., 2009a). Além disso, o estímulo de RANKL atenua a expressão de NOX2 durante a osteoclastogênese, indicando que a ausência de NOX2 não afeta a osteoclastogênese e que provavelmente ela não é essencial para a diferenciação dos osteoclastos (SASAKI et al., 2009a).

Outras formas da NOX já foram relatadas como sendo importantes para indução da osteoclastogênese. Uma delas é a NOX4 que é expressa em um nível mais alto nos osteoclastos do que nas células precursoras, sugerindo que a expressão dessa isoforma seja aumentada durante a diferenciação e o desenvolvimento dos osteoclastos (YANG et al., 2004). Além disso, pesquisas com camundongos NOX4^{-/-} apresentaram 46% menos osteoclastos no osso em comparação aos camundongos WT. A indução de precursores de osteoclasto com M-CSF e RANKL resultou em 56% menos células multinucleadas positivas para TRAP em camundongos NOX4^{-/-} em comparação com células precursoras derivadas de camundongos WT (SASAKI et al., 2009a). As células-tronco hematopoiéticas que são as progenitoras dos osteoclastos expressam NOX4, e quase 30% de ROS nessas células são espontaneamente geradas por NOX4 (SASAKI et al., 2009b). A ROS derivada de NOX4 parece ser mais significativa no processo de diferenciação dos osteoclastos do que o NOX2. Apesar de NOX2 ser altamente expressa em precursores de osteoclastos, não parece ser a isoforma mais importante para a diferenciação dos mesmos.

NOX1 é outra isoforma que também desempenha um papel essencial na diferenciação de osteoclastos maduros, como foi constatado em um estudo que há aumento da expressão de NOX1 com estímulo de RANKL, enquanto a expressão de NOX2 é atenuada (LEE, S. H.; KIM; JANG, 2014). Além disso, estudo sugere que exista uma capacidade compensatória entre as isoformas de NOX para produção de ROS (SASAKI et al., 2009b). Embora essa pesquisa não tenha avaliado a expressão de NOX 1 e NOX4, a atividade compensatória flexível entre as isoformas de NOX deve existir para contribuir para a diferenciação dos osteoclastos na ausência de NOX2.

Após ser constatado que a ausência de NOX2 não afetou a osteoclastogênese, foi feito *osteoclast assay* para verificar se influenciaria na atividade dos osteoclastos. Os

resultados mostraram que houve maior área reabsorvida por osteoclastos formados a partir de camundongos NOX2^{-/-}, indicando que a ausência de NOX2 promove maior atividade dessas células. Uma das vias pelo qual NOX pode afetar os precursores de osteoclasto é a partir da regulação de canais intracelulares de cálcio. Isso ocorre a partir de ROS gerada por NOX que promove oscilação na concentração de cálcio intracelular (KIM, M. S. et al., 2010), que por sua vez ativa o NFATc1. Esse regulador transloca-se do citoplasma para o núcleo e promove a transcrição de genes específicos importantes para diferenciação e atividade dos osteoclastos (TAKAYANAGI, 2007). Dessa forma, foi avaliado o influxo de cálcio intracelular em células tratadas por uma hora com RANKL. O resultado demonstrou maior influxo de cálcio em células derivadas de camundongo NOX2^{-/-} em relação ao WT, sendo assim, a ausência de NOX2 parece promover maior mobilização de cálcio.

A sinalização de Ca²⁺ representa um componente essencial da indução da expressão de catepsina K. (WADDINGTON; MOSELEY; EMBERY, 2000; BATSIR; GEIGER; KAM, 2017). Catepsina K é uma protease altamente ativa na degradação do colágeno tipo I e osteonectina em pH baixo. Portanto, sua expressão indica uma alta atividade osteolítica mediada pela ação de osteoclastos (LEE, N. K. et al., 2005; HORDIJK, 2006). Nossos resultados demonstraram uma alteração na concentração de Ca²⁺ uma hora após o tratamento com RANKL, o que possivelmente promoveu maior expressão gênica de catepsina K em células de camundongo NOX2^{-/-}. Os resultados obtidos indicam que a ausência de NOX2 promoveu alta taxa de reabsorção por causa da maior expressão de catepsina K devido a mobilização de cálcio intracelular. Um estudo mostra o efeito contrário ao ser observado menor atividade de reabsorção dos osteoclastos derivados de camundongo *knockout* para NOX2 (KANG; KIM, 2016). Porém, o trabalho demonstrou que havia menor formação de osteoclastos, o que conseqüentemente afetou na área reabsorvida. Diferentemente deste trabalho que não foi constatada alteração no número de osteoclastos diferenciados.

Uma possível explicação para os resultados obtidos é que há indícios de que ROS poderia afetar a sinalização do fator de transcrição NF-κB, que é importante para a diferenciação do osteoclasto (SUMIMOTO et al., 1996). Sendo assim, embora a literatura demonstre que o NFATc1 seja sub-regulado em camundongos *knockout* para NOX2, o NF-κB não é afetado (KANG; KIM, 2016). A partir desse dado da literatura, sugere-se que NF-κB possa estar relacionado à manutenção da expressão de catepsina K. Além disso, a expressão de catepsina K em células derivadas de camundongo NOX2^{-/-} pode

também estar relacionada à atividade compensatória de outras isoformas de NOX por deficiência da NOX2 (SASAKI et al., 2009b).

Portanto, este estudo mostrou que a ausência de NOX2 não interfere na diferenciação dos osteoclastos e com isso altera a quantidade de células TRAP positivas formadas a partir de camundongos NOX2^{-/-}, mas demonstrou maior atividade de reabsorção osteolítica. Não se sabe por qual mecanismo isso acontece, e mais estudos são necessários. Sugerimos que os NOX1 e NOX4 possam suprir a ausência de ROS derivados de NOX2 como um mecanismo compensatório para a deficiência de NOX2. Uma vez que são isoformas já relatadas como importantes para a diferenciação dos osteoclastos. Além disso, a alteração do influxo de Ca²⁺ e expressão de catepsina K significativamente mais alta corroboram com maior atividade de reabsorção vista nas células de camundongo NOX2^{-/-}. Esses processos podem ser derivados da sinalização de NOX1 e NOX4 que contribuem com a produção de ROS e por um mecanismo compensatório pela falta de NOX2.

6 CONCLUSÃO

A ausência de NOX2 não influencia a diferenciação dos osteoclastos, mas há aumento no influxo de cálcio e maior expressão gênica de catepsina K. Com isso, observou-se aumento da atividade reabsortiva em osteoclastos derivados de camundongo NOX2^{-/-}.

7 REFERÊNCIAS

AGIDIGBI, T. S.; KIM, C. Reactive Oxygen Species in Osteoclast Differentiation and Possible Pharmaceutical Targets of ROS-Mediated Osteoclast Diseases. **International Journal of Molecular Science**, v. 20, n. 14, p., 2019.
<https://doi.org/10.3390/ijms20143576>

BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004.
<https://doi.org/10.1016/j.coi.2003.12.001>

BATSIR, S.; GEIGER, B.; KAM, Z. Dynamics of the sealing zone in cultured osteoclasts. **Cytoskeleton (Hoboken)**, v. 74, n. 2, p. 72-81, 2017.
<https://doi.org/10.1002/cm.21350>

- 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.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00044.2005>
- BOSTROM, E. A.; LUNDBERG, P. The newly discovered cytokine IL-34 is expressed in gingival fibroblasts, shows enhanced expression by pro-inflammatory cytokines, and stimulates osteoclast differentiation. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81665, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081665>
- BOYCE, B. F.; XIU, Y.; LI, J.; XING, L.; YAO, Z. NF-kappaB-Mediated Regulation of Osteoclastogenesis. **Endocrinology and Metabolism**, v. 30, n. 1, p. 35-44, 2015.
<https://doi.org/10.3803/EnM.2015.30.1.35>
- BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRODER, K. Nox family NADPH oxidases: Molecular mechanisms of activation. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 76, p. 208-226, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.046>
- CHEN, Z.; BUKI, K.; VAARANIEMI, J.; GU, G.; VAANANEN, H. K. The critical role of IL-34 in osteoclastogenesis. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18689, 2011.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018689>
- CHRISTENSEN, J.; SHASTRI, V. P. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by cathepsin K. **BMC research notes**, v. 8, p. 322-322, 2015.
<https://doi.org/10.1186/s13104-015-1284-8>
- FU, Y.; GU, J.; WANG, Y.; YUAN, Y.; LIU, X.; BIAN, J.; LIU, Z. P. Involvement of the Ca(2)(+) signaling pathway in osteoprotegerin inhibition of osteoclast differentiation and maturation. **Journal of Veterinary Science**, v. 16, n. 2, p. 151-156, 2015.
<https://doi.org/10.4142/jvs.2015.16.2.151>
- GREENBLATT, M. B.; SHIM, J. H.; ZOU, W.; SITARA, D.; SCHWEITZER, M.; HU, D.; LOTINUN, S.; SANO, Y.; BARON, R.; PARK, J. M.; ARTHUR, S.; XIE, M.; SCHNEIDER, M. D.; ZHAI, B.; GYGI, S.; DAVIS, R.; GLIMCHER, L. H. The p38 MAPK pathway is essential for skeletogenesis and bone homeostasis in mice. **Journal of Clinical Investigations**, v. 120, n. 7, p. 2457-2473, 2010.
<https://doi.org/10.1172/JCI42285>
- HOLLBERG, K.; HULTENBY, K.; HAYMAN, A.; COX, T.; ANDERSSON, G. Osteoclasts from mice deficient in tartrate-resistant acid phosphatase have altered ruffled borders and disturbed intracellular vesicular transport. **Experimental Cell Research**, v. 279, n. 2, p. 227-238, 2002.
<https://doi.org/10.1006/excr.2002.5612>
- HORDIJK, P. L. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. **Circulation Research**, v. 98, n. 4, p. 453-462, 2006.
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000204727.46710.5e>
- KANG, I. S.; KIM, C. NADPH oxidase gp91(phox) contributes to RANKL-induced osteoclast differentiation by upregulating NFATc1. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38014, 2016.

<https://doi.org/10.1038/srep38014>

KIM, J. H.; KIM, N. Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. **Journal of Bone Metabolism**, v. 21, n. 4, p. 233-241, 2014.

<https://doi.org/10.11005/jbm.2014.21.4.233>

KIM, J. H.; KIM, N. Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. **Chonnam Medical Journal**, v. 52, n. 1, p. 12-17, 2016.

<https://doi.org/10.4068/cmj.2016.52.1.12>

KIM, J. M.; YANG, Y. S.; PARK, K. H.; OH, H.; GREENBLATT, M. B.; SHIM, J. H. The ERK MAPK Pathway Is Essential for Skeletal Development and Homeostasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 8, p., 2019.

<https://doi.org/10.3390/ijms20081803>

KIM, M. S.; YANG, Y. M.; SON, A.; TIAN, Y. S.; LEE, S. I.; KANG, S. W.; MUALLEM, S.; SHIN, D. M. RANKL-mediated reactive oxygen species pathway that induces long lasting Ca²⁺ oscillations essential for osteoclastogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 10, p. 6913-6921, 2010.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051557>

KOGA, T.; INUI, M.; INOUE, K.; KIM, S.; SUEMATSU, A.; KOBAYASHI, E.; IWATA, T.; OHNISHI, H.; MATOZAKI, T.; KODAMA, T.; TANIGUCHI, T.; TAKAYANAGI, H.; TAKAI, T. Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. **Nature**, v. 428, n. 6984, p. 758-763, 2004.

<https://doi.org/10.1038/nature02444>

LEE, N. K.; CHOI, Y. G.; BAIK, J. Y.; HAN, S. Y.; JEONG, D. W.; BAE, Y. S.; KIM, N.; LEE, S. Y. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. **Blood**, v. 106, n. 3, p. 852-859, 2005.

<https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3662>

LEE, S. H.; KIM, J. K.; JANG, H. D. Genistein inhibits osteoclastic differentiation of RAW 264.7 cells via regulation of ROS production and scavenging. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 6, p. 10605-10621, 2014.

<https://doi.org/10.3390/ijms150610605>

MARINO, S.; LOGAN, J. G.; MELLIS, D.; CAPULLI, M. Generation and culture of osteoclasts. **Bonekey Rep**, v. 3, p. 570, 2014.

<https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.65>

MCCANN, S. K.; ROULSTON, C. L. NADPH Oxidase as a Therapeutic Target for Neuroprotection against Ischaemic Stroke: Future Perspectives. **Brain Sciences**, v. 3, n. 2, p. 561-598, 2013.

<https://doi.org/10.3390/brainsci3020561>

RAHMAN, M. M.; EL JAMALI, A.; HALADE, G. V.; OUHTIT, A.; ABOU-SALEH, H.; PINTUS, G. Nox2 Activity Is Required in Obesity-Mediated Alteration of Bone Remodeling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 6054361, 2018.

<https://doi.org/10.1155/2018/6054361>

RASTOGI, R.; GENG, X.; LI, F.; DING, Y. NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, p. 301, 2016.

<https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00301>

SASAKI, H.; YAMAMOTO, H.; TOMINAGA, K.; MASUDA, K.; KAWAI, T.; TESHIMA-KONDO, S.; ROKUTAN, K. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species are essential for differentiation of a mouse macrophage cell line (RAW264.7) into osteoclasts. **Journal of Medical Investigation**, v. 56, n. 1-2, p. 33-41, 2009a.

<https://doi.org/10.2152/jmi.56.33>

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-kappaB ligand-induced mouse osteoclast differentiation is associated with switching between NADPH oxidase homologues. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 2, p. 189-199, 2009b.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.04.025>

SOZEN, T.; OZISIK, L.; BASARAN, N. C. An overview and management of osteoporosis. **European Journal of Rheumatology**, v. 4, n. 1, p. 46-56, 2017.

<https://doi.org/10.5152/eurjrheum.2016.048>

SUMIMOTO, H.; HATA, K.; MIZUKI, K.; ITO, T.; KAGE, Y.; SAKAKI, Y.; FUKUMAKI, Y.; NAKAMURA, M.; TAKESHIGE, K. Assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. Specific interaction of the N-terminal Src homology 3 domain of p47phox with p22phox is required for activation of the NADPH oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22152-22158, 1996.

<https://doi.org/10.1074/jbc.271.36.22152>

TAKAYANAGI, H. The role of NFAT in osteoclast formation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1116, p. 227-237, 2007.

<https://doi.org/10.1196/annals.1402.071>

TROEN, B. R. The role of cathepsin K in normal bone resorption. **Drug News and Perspectives**, v. 17, n. 1, p. 19-28, 2004.

<https://doi.org/10.1358/dnp.2004.17.1.829022>

WADDINGTON, R. J.; MOSELEY, R.; EMBERY, G. Reactive oxygen species: a potential role in the pathogenesis of periodontal diseases. **Oral Diseases**, v. 6, n. 3, p. 138-151, 2000.

<https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2000.tb00325.x>

YAGI, M.; MIYAMOTO, T.; SAWATANI, Y.; IWAMOTO, K.; HOSOGANE, N.; FUJITA, N.; MORITA, K.; NINOMIYA, K.; SUZUKI, T.; MIYAMOTO, K.; OIKE, Y.; TAKEYA, M.; TOYAMA, Y.; SUDA, T. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 3, p. 345-351, 2005.

<https://doi.org/10.1084/jem.20050645>

YANG, S.; ZHANG, Y.; RIES, W.; KEY, L. Expression of Nox4 in osteoclasts. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 92, n. 2, p. 238-248, 2004.
<https://doi.org/10.1002/jcb.20048>

ZAIDI, M. Skeletal remodeling in health and disease. **Nature Medicine**, v. 13, n. 7, p. 791-801, 2007.
<https://doi.org/10.1038/nm1593>

ANEXOS



Universidade Federal de Uberlândia
– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da influência do receptor de estrógeno beta na osteoclastogênese”, protocolo nº 005/19, sob a responsabilidade de **Marcelo José Barbosa Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **05 de Abril de 2019**.

(We certify that the project entitled “Avaliação da influência do receptor de estrógeno beta na osteoclastogênese”, protocol 005/19, under the responsibility of Marcelo José Barbosa Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of April 05th, 2019).

Vigência do Projeto	Início: 01/06/2019 Término: 01/06/2021
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico C57BL/6
Número de animais	30
Peso / Idade	25g/ 6 semanas
Sexo	Fêmea
Origem / Local	Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU)
Local onde serão mantidos os animais:	Biotério Central da REBIR

Uberlândia, 09 de Abril de 2019.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –

CERTIFICADO



Certificamos que o projeto intitulado “Avaliação da importância da produção de ros e do eixo de controle da liberação de cálcio na osteoclastogênese”, protocolo nº 024/15, sob a responsabilidade de Marcelo José Barbosa Silva – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de 04/09/2015.

(We certify that the project entitled "Avaliação da importância da produção de ros e do eixo de controle da liberação de cálcio na osteoclastogênese", protocol 024/15, under the responsibility of Marcelo José Barbosa Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of 04/09/2015).

Vigência do Projeto	Início: 25/10/2015 - Término: 20/02/2016
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongos C57BL/6 e NOX-/-
Número de animais	C57BL/6: 17 machos / NOX-/-: 17 machos
Peso / Idade	C57BL/6: 6-8 semanas e 25 g / NOX-/-: 6-8 semanas e 25 g
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 16 de setembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU