UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

JOÃO PAULO DOMEZI

**Efeito das células endoteliais mediadas pelo LTB₄
em células ósseas**

**BAURU
2018**

JOÃO PAULO DOMEZI

**Efeito das células endoteliais mediadas pelo LTB₄
em células ósseas**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no programa de Ciências Odontológicas aplicadas, na área de concentração Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

BAURU

2018

Domezi, João Paulo

Efeito das células endoteliais mediadas pelo LTB₄
em células ósseas / João Paulo Domezi. -- Bauru, 2018.
78. p. : il. ; 31cm.

Dissertação. (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia
de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por
processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº: 006/2017

Data: 10/07/2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu grande herói e Pai Antônio João Domezi, que sempre me amou incondicionalmente, me motivou e apoiou em todas as fases da minha vida.

Pai você sempre me ensinou a ser gentil com as pessoas, ter simplicidade, amar a Deus e a família sempre em primeiro lugar, a não julgar as pessoas e sempre me ensinou que o mais importante em nossas vidas é a educação e os estudos.

Você foi um homem humilde que veio da roça e trabalhou desde cedo para ajudar seus pais e incentivar seus 9 irmãos a estudarem para terem um futuro melhor em suas vidas. Nunca vi o senhor descuidar um dia sequer da sua família. Sempre batalhou desde muito cedo.

Vi o senhor se esforçar muito para realizar o seu sonho de estudar e se tornar enfermeiro para ajudar a salvar vidas e amenizar o sofrimento das pessoas, e com perseverança e muita dedicação o senhor conseguiu, pois via você acordar todos os dias de madrugada para ir ao trabalho duro e cansativo mas com um sorriso sempre no rosto, pois você amava o que fazia, que era cuidar do próximo com muito amor e dedicação.

Na cidade você era conhecido como “Toninho do Gesso”, pois você ajudou a consertar muitos braços e pernas de pacientes, os quais ficavam extremamente gratos pela sua dedicação, amor e paciência perante a dor do próximo.

Me lembro até hoje quando chegou a hora do vestibular e eu decidi que queria seguir para a área de saúde pois, queria ser igual a você, ajudar a cuidar do próximo e você foi o primeiro a me apoiar e a incentivar a seguir meus sonhos.

Acabei a faculdade e decidi que gostaria de continuar estudando e prestar a prova de mestrado, e muitos diziam que era difícil e o melhor era que eu entrasse para o mercado de trabalho, mas nesse mesmo instante o senhor olhou pra mim e falou: “eu estou contigo pra tudo e enquanto eu for vivo, a minha maior alegria é ver você estudando e se sentindo realizado, eu confio em você e sei que você vai conseguir

passar nessa fase”. Fiz a inscrição para a prova, você me apoiou e me trouxe até Bauru para realizar o exame.

Após alguns dias saiu o resultado e você foi correndo para o computador olhar o resultado junto comigo. Eu estava nervoso e você extremamente confiante de que ia dar tudo certo. Olhamos o resultado e meu nome estava na lista dos aprovados, e foi uma festa lá em casa, a gente comemorou e você correu ligar para contar pra todo mundo.

Preparamos a documentação necessária para fazer a matrícula e eu me lembro como se fosse ontem que você veio junto comigo para fazer a matrícula e conhecer o Campus onde eu iria estudar. Nessa mesma semana você também veio pra Bauru para alugar um apartamento onde eu pudesse morar e ter um conforto. Você me apoiou e pensou em todos os detalhes e não mediu esforços para me ajudar e me ver feliz, pois mesmo aposentado e cansado o senhor ainda trabalhava para poder bancar meus estudos.

Você sempre me disse que ver um filho no caminho bom, bem educado e focado nos estudos, era a melhor alegria para um pai.

Você também sempre me dizia que enquanto você fosse vivo, iria me apoiar nos estudos e me ajudar no que fosse preciso, pois quando chegasse a hora de você partir, você deixaria a melhor coisa pra mim: que é uma boa educação, ser humilde e gentil com as pessoas, sempre ajudar ao próximo e ter estudo, pois você dizia que essas coisas ninguém pode tirar de nós, diferente de todo o resto que é material e um dia acaba.

Exatamente 1 mês depois que havia ingressado no mestrado, me veio a triste notícia que você havia falecido. Me lembro desse dia como se fosse ontem, era uma sexta feira e eu estava em aula e feliz por ser sexta feira e no final do dia eu voltar pra nossa casa pra ver vocês e matar a saudade, quando de repente toca o meu telefone dizendo que você havia acabado de falecer inesperadamente devido a um infarto fulminante.

Nem tive tempo de me despedir de você e dizer que você é e sempre será meu herói e o quanto eu sou grato por tudo que fez por mim e que eu amo você.

Me lembro da última vez que eu vi e falei com você pessoalmente olhando nos seus olhos, era um domingo no final da tarde onde eu estava terminando de arrumar minha mala para vir pra Bauru começar a semana, ai antes de sair de casa eu me despedi do senhor dizendo que já estava indo pra Bauru e você olhou bem no fundo dos meus olhos e disse: vai com Deus meu filho, que Deus abençoe a sua semana lá em Bauru. Depois disso tudo ficou cinza, em silêncio e triste sem você.

Foi muito difícil voltar à rotina, pois havia perdido o meu maior incentivador, e por muitas vezes chorava e pensava em desistir, mas então eu me lembrava de você, dos esforços que você fazia para me apoiar e me manter estudando e do apoio que você sempre me deu, e isso me dava forças para continuar e seguir em frente nessa caminhada.

Você cumpriu grandemente sua missão aqui na terra e foi morar ao lado do papai do Céu e ter o seu merecido descanso.

Saiba que eu tenho muito orgulho de ser seu filho e que eu quero ser igual a você, sempre ajudar ao próximo, amar o que faz, e sempre ir trabalhar com um sorriso no rosto não importa o que aconteça.

Se eu cheguei até aqui foi graças a você que me amou e me apoiou em tudo e nunca me deixou cair, pois desde sempre estava ali para segurar minhas mãos e dizer eu sou contigo. Por isso dedico este trabalho a você que foi o meu maior incentivador e me deu forças mesmo quando não estava mais aqui de corpo presente.

Te amo muito Pai, descansa em paz meu guerreiro, pois um dia iremos nos encontrar novamente e dar aquele abraço bem apertado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo amor incondicional, por sempre aumentar minha fé nos momentos mais difíceis da minha vida, por sempre olhar por mim e me proteger, por colocar pessoas boas em meu caminho e me dar capacidade para superar os obstáculos que tive que passar durante esta caminhada para chegar até aqui.

Agradeço imensamente a meus pais Antônio João Domezi e Maria de Lourdes Pissuto Domezi pelo amor incondicional, por sempre me apoiarem em todas as fases de minha vida e nunca me deixarem desistir. Vocês são meus maiores exemplos na vida de simplicidade, bondade, amor, fé e carinho. Sempre observei vocês a lutarem por aquilo que queriam com muita força, garra e fé e sempre ajudando ao próximo. Vocês nunca mediram esforços pra me ver feliz e muitas vezes trabalhavam incansavelmente para que eu pudesse ter um bom estudo e de qualidade. Vocês são e sempre serão o meu maior espelho, pois tenho muito orgulho da história de vida de vocês. Deus me presenteou com os melhores pais do mundo que são vocês, por isso sou eternamente grato por tudo o que sou graças a vocês. Muito Obrigado mãe e pai, eu amo vocês.

Agradeço a minha irmã Lilian Cristina Domezi Del Bianchi, Táta se eu pudesse escolher uma irmã neste mundo, com certeza seria você, pois nós somos extremamente companheiros um do outro, conversamos horas no telefone, você sempre me dá conselhos e me apoia em tudo. As vezes a gente briga por ciúmes bobo, como todo irmão faz, mais a gente se ama. Você sempre me incentivou a estudar, morar fora e a realizar meus sonhos. Sempre quando eu estava fora de Jau por conta dos estudos, você sempre cuidava do pai e da mãe por mim e sempre me tranquilizou. Jamais vou esquecer quando o pai veio a falecer e você me deu todo o apoio e suporte que eu precisava para ter forças para voltar a estudar e abriu mão da sua rotina e casa por um tempo para cuidar da nossa mãezinha até as coisas se acertarem lá em casa. Você também me deu o melhor presente da vida que é ser tio de três sobrinhos lindos que é a coisa que eu mais amo nessa vida. Amo você táta e obrigado por tudo.

Agradeço ao meu cunhado Adriano Del Bianchi que também sempre me incentivou a estudar, sempre cuida da minha mãe com muito carinho, sempre foi atencioso e preocupado com a gente lá em casa e sempre me fez as comidas que eu mais gosto pra me animar quando eu estava triste e me ver feliz. Obrigado por ser esse marido bom para minha irmã e este pai maravilhoso para meus sobrinhos.

Agradeço as três pessoas que eu mais amo nessa vida que são meus três sobrinhos Adriano Del Bianchi Junior, Julia Del Bianchi e Giovana Del Bianchi, vocês são minha alegria de viver, sempre que eu estou cansado ou triste, basta eu olhar pra vocês que já recarrego minhas energias e fico sempre feliz. Vocês são o melhor presente que ganhei nessa vida, e o tio não mede esforços pra ver vocês sempre bem e felizes. Contem sempre comigo, pois sempre vou cuidar e amar vocês.

Agradeço aos meus amigos da cultura: Flávia, Cíntia, Adriana, Gabriela, Mariana Santesso, Mariana Sanches, Carlinhos, Camila, Adriano, Ana Ligia e Vanessa. Trabalhar com vocês foi extremamente gratificante pra mim, pois nós formamos uma equipe extremamente unida. Vocês sempre me ajudaram nos experimentos, me davam conselhos, riamos muito nos corredores do laboratório e sempre pude contar com a ajuda de vocês. Trabalhar com vocês é muito bom, pois fizemos do laboratório a nossa segunda casa e formamos aqui uma família. Sem a ajuda de todos vocês eu jamais teria conseguido realizar este trabalho, pois vocês sempre estiveram ali comigo em todos os momentos. Sempre vou levar vocês no meu coração e que Deus continue abençoando cada vez mais essa equipe maravilhosa e que deem muitos frutos e excelente trabalhos, pois todos são extremamente competentes e que sempre se ajudam de coração.

Agradeço em especial a duas pessoas que foram fundamentais pra mim durante o mestrado que são:

Flávia Amadeu de Oliveira, Flá você é minha maior inspiração, pois a maioria das coisas que eu sei sobre cultura de células eu aprendi com você, pois você sempre me ensinou tudo desde a iniciação científica com muito carinho e dedicação. Vejo em você amor pelo seu trabalho e você transmite isso para todos nós. Me espelho em ser um profissional como você é dedicada, inteligente, focada e que ama o que faz. Você além de me ensinar muita coisa, sempre me auxiliou durante todo o meu mestrado,

me ajudou nos experimentos, me ajudou a escrever o meu projeto e também sempre me deu conselhos e acreditou em mim. Muito do que sei hoje devo a você e sua dedicação comigo. Obrigado por sempre me auxiliar e me ajudar mesmo quando você não estava no laboratório. A você deixo a minha eterna gratidão e minha admiração pela sua pessoa e trabalho.

Cintia Kazuko Tokuhara, Cíntia você é um exemplo de pessoa e profissionalismo pra todos nós, pois você é extremamente inteligente, competente, focada e ama o que faz. Você é sempre a primeira pessoa a chegar no laboratório e a última a sair. Desde que cheguei na FOB estou admirado com a pessoa de coração bom que você é, pois você ajuda a todo mundo e nunca espera nada em troca. Quantas vezes vi você deixar de fazer suas coisas para ajudar ao próximo, quantas vezes vi você torcer de todo o seu coração pelo próximo. Vejo amor pelo que você faz nos seus olhos. Você é um exemplo pra todos nós e nunca vou me esquecer de todo apoio e carinho que você me deu durante todo o mestrado. Todos os experimentos você estava ali ao meu lado me ajudando e ensinando com muita paciência. Não há palavras que expressem a gratidão que sinto por você, e por Deus colocar pessoas bondosas como você em nosso caminho.

Que Deus te abençoe cada vez mais e te de em dobro tudo de bom que você sempre faz pelo próximo, pois sem você e sua dedicação nosso laboratório não seria o mesmo. Minha eterna gratidão a você. Continue sendo essa pessoa maravilhosa e dedicada, pois você será um exemplo par muito mais gente.

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, que me proporcionou a oportunidade de realizar o mestrado, a oportunidade de trabalhar com esta equipe maravilhosa de cultura de células e pela confiança nos experimentos e trabalho.

Agradeço a Professora Dra. Camila Peres Buzalaf que foi a primeira pessoa que acreditou em mim na época da graduação e me concedeu a oportunidade de fazer iniciação científica me apresentando a área da pesquisa, e foi ai que conheci o mundo da cultura de células e comecei a trabalhar com esta equipe que eu tanto admiro e gosto aqui na FOB.

Agradeço em especial a três amigas que eu ganhei durante o mestrado e que sempre me ajudaram muito:

Daiana Moreli, miga Daia, nós entramos juntos no mestrado e nossa amizade só cresceu a cada dia mais, fizemos todas as disciplinas juntos, fizemos os trabalhos e seminários juntos, estudávamos para as provas de bioquímica juntos e até pra academia a gente ia juntos também. Obrigado por ser essa amiga parceira, que sempre me ouvia e me aconselhava em todos os momentos e obrigado pela torcida e apoio sempre. Desejo toda sorte a você nessa nova fase da sua vida.

Even Akemi Taira, miga Even, obrigado pela parceria de sempre, pois você sempre me ouviu e apoiou em tudo, a gente ia juntos pras festinhas, sempre almoçamos juntos no bandeirão e quando as coisas não estavam muito bem a gente se reunia e ria de tudo pra se divertir. Obrigado pela nossa amizade e parceria.

Tatiana Martini, miga Tati, o que falar sobre você, a pessoa com quem mais eu me identifiquei durante o mestrado, você é a pessoa que mais me entende e apoia, sempre me anima, chora e ri junto comigo em todos os momentos, minha confidente em quem eu confio e me sinto à vontade ao seu lado. Obrigado por todas as vezes que você cuidou de mim, por todos os conselhos e por estar ao meu lado em tudo. Você é uma pessoa extremamente iluminada e que mesmo de longe vamos continuar tendo essa sintonia e empatia. Sem teu apoio tudo seria mais difícil. Obrigado de todo o meu coração pelos momentos vividos, pelos roles, pelas jantares, pelos brigadeiros quando estava triste e principalmente pelas risadas e momentos felizes. Você sempre terá um lugar especial em meu coração, independente de lugar que eu for.

Agradeço a minha melhor amiga Amanda Carreira Devides por sempre me apoiar e me acompanhar em tudo. Você é minha irmã do coração e sempre está comigo em todos os momentos. Agradeço a Deus sempre pela nossa amizade e parceria e por sempre poder contar com você.

Agradeço aos meus amigos e compadres Jéssica Martins e Otávio Avante, pela amizade, parceira e companheirismo de sempre. Os finais de semana não seriam os mesmo sem os nossos churrascos e conversas.

Agradeço as funcionárias do laboratório de bioquímica Thelma Lopes Silva e Larrisa Grizzo Thomassian por sempre nos auxiliar em tudo, desde ajuda com equipamentos, como também com matérias. A ajuda de vocês foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço ao Thiago José Dionísio, técnico do laboratório de farmacologia que sempre nos concedeu ajuda nos experimentos de PCR-RT e nos emprestava o shaker para a realização do Western.

Agradeço a Dalva Ribeiro de Oliveira que sempre nos ajudou em tudo no departamento, sempre estava disposta a tirar nossas duvidas, nos ajudar com documentação e tudo o que fosse preciso com muito carinho.

Agradeço aos Professores da Bioquímica Ana Carolina Magalhães, Marília Afonso Rabelo Buzalaf e Rodrigo Cardoso de Oliveira por sempre estarem dispostos a tirar nossas duvidas, nos ensinar e pela utilização das dependências do laboratório e equipamentos.

Agradecimentos institucionais:

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. Processos N° 2016/14885-2 e 2016/08890-3.

A faculdade de Odontologia de Bauru-FOB/USP por ter utilizado as dependências da instituição e equipamentos para a realização deste projeto e por fazer parte de uma instituição de ensino renomada.

Agradeço Imensamente ao Biotério da Universidade do Sagrado Coração, aos Funcionários do biotério e a Professora Dra. Dulce Helena Jardim Constantino que me concedeu a doação dos animais para que fosse realizado a pesquisa.

A todos o meu carinho e o meu mais sincero agradecimento.

RESUMO

Os vasos sanguíneos são formados, entre outros componentes, por células endoteliais as quais fazem parte da microvasculatura óssea e são capazes de regular o desenvolvimento ósseo tendo em vista de que os processos de osteogênese e angiogênese estão interligados. Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos envolvidos no recrutamento de leucócitos e na regulação da síntese de citocinas. O tratamento com o leucotrieno B₄ (LTB₄) induz a angiogênese pela superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Assim, o objetivo do trabalho foi investigar o efeito das células endoteliais reguladas pelo LTB₄ na diferenciação osteogênica. Para isso, células endoteliais primárias de aorta foram isoladas e cultivadas por até 4 dias e, quando apropriado, foi realizado o tratamento das mesmas com o LTB₄. O meio condicionado das células endoteliais foi armazenado para os experimentos com osteoblastos. Células osteoblásticas foram isoladas da calvária e cultivadas por até 21 dias, avaliando-se, portanto, os efeitos das células endoteliais reguladas ou não pelo LTB₄ e a resposta dos estímulos exógenos LTB₄, o inibidor da síntese de LTs MK 886 e o antagonista do receptor do LTB₄, o U75302. Tais respostas foram observadas na fase de crescimento celular, por meio da viabilidade, proliferação e produção de marcadores osteogênicos e angiogênicos como o RANKL, OPG e o VEGF por meio da redução do MTT, citometria de fluxo e western blotting, respectivamente. A diferenciação foi avaliada por meio dos ensaios de fosfatase alcalina (ALP) e expressão gênica por meio de ensaio enzimático e qRT-PCR e mineralização por Vermelho de alizarina. Resultados mostraram que tanto as células endoteliais, mediadas ou não pelo LTB₄, quanto os estímulos exógenos não foram capazes de modular a proliferação dos osteoblastos. Porém, durante a diferenciação, o LTB₄ inibiu a atividade da ALP, a expressão gênica do BLT1, ALP, BGLAP (osteocalcina) e OPG (osteoprotegerina) foi aumentada, e os genes RANKL e VEGF tiveram a sua expressão diminuída pelo tratamento com o meio condicionado das células endoteliais, mediadas ou não pelo LTB₄ (P<0,05). Além disso, a mineralização dos osteoblastos foi aumentada pelas células endoteliais e diminuída pelas células endoteliais mediadas pelo LTB₄ (P<0,05). Assim, podemos concluir que os fatores angiogênicos das células endoteliais, mediadas ou não pelo LTB₄, exercem um papel importante na regulação da diferenciação osteogênica e formação óssea contribuindo, portanto, para a compreensão de mecanismos que regulam a patofisiologia de doenças ósseas.

Palavras-chave: Leucotrienos. LTB₄. Angiogênese. Osteogênese. VEGF.

ABSTRACT

Endothelial cells make blood vessels and are involved in the regulation of tissue metabolism. Endothelial cells from bone microvasculature are capable of regulating bone development in view of the fact that the processes of osteogenesis and angiogenesis are interconnected. Leukotrienes (LTs) are lipid mediators involved in leukocyte recruitment and regulation of cytokine synthesis. It is known that the treatment with LTB₄ induces angiogenesis by overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF). Thus, the aim of this study was to investigate the effect of LTB₄-regulated endothelial cells on osteogenic differentiation. For this, primary endothelial cells from aorta were isolated and cultured for up to 4 days and, where appropriate, the treatment with LTB₄ was done. The conditioned medium of these cells was stored for osteoblast experiments. Osteoblastic cells were isolated from calvaria and cultured for up to 21 days, assessing the effects of endothelial cells regulated or not by LTB₄ and the response of exogenous LTB₄ stimuli, the inhibitor of LTs synthesis MK 886 and the antagonist of LTB₄ receptor, U75302. Such responses were observed in the cell growth phase through the viability, proliferation and production of osteogenic and angiogenic markers such as RANKL, OPG and VEGF by MTT assay, flow cytometry and western blotting, respectively. The cell differentiation was evaluated by alkaline phosphatase (ALP), gene expression and mineralization assay through ALP enzymatic assay, qRT-PCR and Alizarin Red staining. Results showed that both endothelial cells, mediated or not by LTB₄ and exogenous stimuli were not able to modulate the osteoblasts proliferation. However, during the differentiation, LTB₄ inhibited ALP activity, the gene expression of BLT1, ALP, BGLAP (osteocalcin) and OPG (osteoprotegerin) was increased, and the RANKL and VEGF genes had their expression decreased by the treatment with the endothelial cells conditioned medium, mediated or not by LTB₄ (P <0.05). In addition, the osteoblasts mineralization was increased by endothelial cells conditioned medium (CM-EC) and decreased by LTB₄-mediated endothelial cells conditioned medium (CM-EC-LTB₄) (P <0.05). Thus, we can conclude that the angiogenic factors of the endothelial cells, mediated or not by LTB₄, play an important role in the regulation of osteogenic differentiation and bone formation, thus contributing to the understanding of mechanisms that regulate the pathophysiology of bone diseases.

Keywords: Leukotrienes. LTB₄. Angiogenesis. Osteogenesis. VEGF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Síntese de prostaglandinas e leucotrienos.....	29
Figura 2.	Representação esquemática da ligação das diferentes moléculas do VEGF a seus receptores e ativação das diferentes rotas bioquímicas envolvidas no processo angiogênico.....	31
Figura 3.	Cultura primária de células endoteliais da aorta dos animais C57BL/6J.....	40
Figura 4.	Cultura primária de osteoblastos obtidos da calvária de animais C57BL/6J.....	41
Figura 5.	Ensaio de viabilidade celular em osteoblastos tratados ou não (controle) com LTB_4 10^{-8} M, seu inibidor MK 886 10^{-6} M, o antagonista do BLT1 U75302 a 10^{-7} M, CM-EC-Controle 4 dias e CM-EC- LTB_4 10^{-8} M 4 dias. Representação de 3 experimentos independentes (N=8). *Representa diferenças estatísticas onde o $P < 0,05$, comparando-se entre o grupo controle e tratados. Anova-1 critério ($*P < 0,05$)	49
Figura 6.	Histogramas e quantificação do efeito do LTB_4 , seu inibidor e antagonista na proliferação de osteoblastos realizados por citometria de fluxo no período de 72 horas. A) Representação do perfil proliferativo do grupo controle nos tempos 0 (cinza), 2 dias (laranja) e 4 dias (azul). B) Comparações entre os grupos controle e LTB_4 , com 2 dias. C) Comparações entre o controle e MK 886, 2 dias. D) Comparações entre o controle e U75302, 2 dias. E) Comparações entre os grupos controle e LTB_4 , com 4 dias. F) Comparações entre o controle e MK 886, 4 dias. G) Comparações entre o controle e U75302, 4 dias. H) Quantificação da proliferação com 2 e 4 dias. Os resultados da triplicata experimental representam a média $\pm$ SD dos valores. N=3. Anova-1 critério ($P > 0,05$)	51

-
-
- Figura 7.** Atividade de fosfatase alcalina de osteoblastos primários suplementados com meio osteogênico por 4, 7 e 14 dias. As células foram tratadas com o LTB₄ nas doses de 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁹ M a cada 3 dias. Os resultados representam a média da atividade enzimática em nmol de p-NP/minuto pela quantidade de proteína total em mg ±SD. Representação de 3 experimentos independentes (N=3). Anova-1 critério. *Representa diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controle (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001)..... 52
- Figura 8.** Mineralização de osteoblastos primários no período de 21 dias, por vermelho de alizarina. A-B) Imagens da deposição de cálcio dos osteoblastos tratados ou não com LTB₄ (10⁻⁸ M), MK886 (10⁻⁶ M), U75302 (10⁻⁷ M), CM-EC e CM-EC-LTB₄. C) Quantificação dos nódulos mineralizados produzidos pelos osteoblastos. Representação de 1 experimento independente (N=3). *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (**P<0,01) 53
- Figura 9.** Expressão gênica em osteoblastos primários de animais C57BL/6J tratados ou não com LTB₄, MK886, U75302, meio condicionado de células endoteliais (CM OBL) e meio condicionado das células endoteliais que foram tratadas com LTB₄ (CM-OBL-LTB₄) nos períodos de 4 e 14 dias. A-B) Alox-5, C-D) BLT1, E-F) ALP, G-H) BGLAP (OCN), I-J) RANKL, K-L) OPG, M-N) VEGF. Os dados apresentados são resultados da média, ±SD de 2 experimentos independentes (N=3). *Representa diferenças estatísticas. Anova-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001)..... 55
- Figura 10.** Expressão protéica em osteoblastos tratados ou não (controle) com LTB₄, MK886, U75302, meio condicionado de células endoteliais (CM-OBL) e meio condicionado das células endoteliais que foram tratadas com LTB₄ (CM-OBL-LTB₄) nos períodos de 4 dias, por Western blotting. A) Imagem representativa dos blottings para RANKL, OPG, VEGF e α-tubulina. B) Análise densitométrica do RANKL. C) OPG. D) VEGF. Os valores foram normalizados pela α-tubulina (N=3). Os dados apresentados são resultados da média, ±SD de 3 experimentos independentes (N=3). *Representa diferenças estatísticas em relação ao controle. Anova-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001)..... 56
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS

5 LO	5-lipoxigenase
5HPETE	Ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico
AA	Ácido Aracldônico
ALP	Fosfatase Alcalina
Alpl	gene da Fosfatase Alcalina
bFGF	Fator de Crescimento Fibroblástico básico
BLT1	Receptor 1 do Leucotrieno B4
BLT2	Receptor 2 do Leucotrieno B4
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
Capg	<i>Capping Actin Protein</i>
CEEPA	Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
cFms	Receptor expresso na superfície celular
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EC	Células Endoteliais
ECGS	Ssuplemento para o Ccrescimento de Células Endoteliais
FBS	Soro Fetal Bovino
FLAP	Proteína Ativadora de 5-lipoxigenase
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HBSS	Solução de Salina Equilibrada com Hank
HIF	Fator Induzido por Hipóxia
LTA4	Leucotrieno A4
LTB4	Leucotrieno B4
LTB4	EC-CM- Meio condicionado das células endoteliais tratadas com leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
LTs	Leucotrienos

M-CSF	Fator Estimulador de Colônia de Macrófagos
MK 886	Inibidor da síntese de leucotrienos
MMP	Metaloproteinase de Matriz
MSC	Células Tronco Mesenquimais
NOS3	Óxido Nítrico Sintetase 3
OBL	Osteoblastos
OCL	Osteoclastos
OPG	Osteoprotegerina
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
qRT-PCR	<i>Real Time Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-Kappa B Ligand gene</i>
TA	Temperatura Ambiente
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato
U75302	Antagonista do receptor BLT1
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VSMC	Células Vasculares do Músculo Liso
α MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	Formação dos vasos sanguíneos	25
2.2	Tecido ósseo	25
2.3	Osteócitos	26
2.4	Osteoblastos	27
2.5	Osteoclastos	27
2.6	Leucotrienos	28
2.7	Envolvimento dos leucotrienos em células ósseas	29
2.8	Envolvimento dos leucotrienos no tecido vascular	30
2.9	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)	30
3.	PREPOSIÇÃO	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1	Isolamento e cultura de células endoteliais de aorta	39
4.2	Isolamento de osteoblastos de calvaria	40
4.3	Tratamento das células com indutores osteogênicos, LTS, Inibidores e Antagonistas	41
4.4	Preparo do meio condicionado das células endoteliais e tratamento dos osteoblastos	42
4.5	Ensaio de viabilidade celular por MTT	42
4.6	Análise da proliferação celular por citometria de fluxo	42
4.7	Ensaio da atividade de fosfatase alcalina	43
4.8	Ensaio de mineralização	43
4.9	qRT-PCR	44
4.10	Western Blot	45
4.11	Análise estatística	45
5.	RESULTADOS	49
5.1	Avaliação da viabilidade celular	49
5.2	Proliferação celular	50

5.3	Fosfatase Alcalina	52
5.4	Efeito do LTB ₄ na mineralização de osteoblastos	53
5.5	Efeito do LTB ₄ na expressão gênica de osteoblastos.....	54
5.6	Wester Blotting	56
6.	DISCUSSÃO	59
7.	CONCLUSÃO	65
8.	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS	77
	Anexo A- Aprovação referente ao comitê de ética animal (CEEPA- FOB/USP).....	77
	Anexo B- Termo de doação dos animais da Universidade do Sagrado Coração-USC	78

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O sistema vascular, formado por artérias, veias e capilares é essencial para a saúde e a manutenção de todos os tecidos e organismos biológicos (North & Sinclair 2012). A demanda por oxigênio, a distribuição de nutrientes para as células e a eliminação de resíduos metabólicos requer o desenvolvimento do sistema vascular durante a embriogênese (Stocum 2006). Além disso, a regeneração do sistema vascular é crítica e ubíqua para o reparo de todos os tecidos (Stocum 2006) (Prisby 2017). Os vasos sanguíneos são formados, entre outros componentes, por células endoteliais que possuem funções especializadas como a capacidade de comunicação entre tecidos/células circundantes, fornecendo-lhes fatores essenciais, tais como citocinas, fatores de angiocina, quimiocinas e outros metabólitos.

O tecido ósseo é altamente vascularizado devido as diversas funções que os vasos sanguíneos ósseos desempenham neste tecido e também na medula óssea. O sistema vascular é crítico para o desenvolvimento, manutenção e reparo ósseo, fornecendo O₂, nutrientes, hormônios sistêmicos, células precursoras para a remodelação óssea, além de realizar a eliminação de resíduos. Além disso, os vasos sanguíneos ósseos servem como rotas de entrada e saída de sangue e células imunes na medula óssea (Prisby 2017).

As células endoteliais, presentes na vasculatura óssea, são capazes de regular o desenvolvimento ósseo (GEUDENS e GERHART, 2011; IRANI et al., 1997; KOBAYASHI et al., 2010; RIBATTI et al., 2002).

Sabe-se que os processos de osteogênese e angiogênese são interligados: as células endoteliais e ósseas trabalham em conjunto por mecanismo de *feedback* positivo (efeito parácrino), estabelecendo, portanto, o desenvolvimento adequado do esqueleto (KUSUMBE, RAMASAMY e ADAMS, 2014; ROMASAMY et al., 2014). Essas células secretam vários fatores que ajudam a comunicarem-se umas com as outras em condições fisiológicas. Moléculas como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator induzido por hipóxia (HIF), metaloproteínase de matriz (MMP), fator de transcrição relacionado ao Runx 2 (Runx2), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) são liberados pelas

células ósseas que regulam a sobrevivência e a função das células endoteliais, e promovem a vascularização durante a formação óssea endocondral. Além disso, VEGF, osteoprotegerina (OPG), óxido nítrico sintetase 3 (NOS3), BMP-2, fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) e o Noggin são liberados pelas células endoteliais para regular funções osteoblásticas e osteoclásticas, na sobrevivência e formação do osso metafisário (HORWITZ, 2010; CLARKIN e OLSEN, 2010; GOTZ, 2012). Assim, a comunicação entre células ósseas e endoteliais é essencial para a homeostasia óssea. A regulação imperfeita de suas interações resulta na formação óssea defeituosa (HORWITZ, 2010; CLARKIN e OLSEN, 2010; GOTZ, 2012).

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos envolvidos no recrutamento de leucócitos e na regulação da síntese de citocinas (MEDEIROS et al., 2004). Eles são derivados do ácido araquidônico pela via 5-lipoxigenase (5-LO) apresentando um papel fundamental na resposta inflamatória e na defesa do hospedeiro contra patógenos. Durante a sua síntese, o ácido araquidônico (AA) liberado é transformado em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), que por ser instável, é rapidamente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) pela ação da 5-LO. Essa enzima é translocada do citosol para a membrana nuclear e ativada pela proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) (MILLER et al., 1990). Ao final da via da 5-LO, o LTA₄ é enzimaticamente hidrolisado e transformado em LTB₄ pela ação da LTA₄ hidrolase, ou em LTC₄ intracelular pela ação da enzima LTC₄ sintase, que catalisa a conjugação de LTA₄ com glutathione reduzida. LTC₄ intracelular é transportado através da membrana e convertido, pela ação da gama-glutamyltransferase, em LTD₄ e LTE₄ (LEWIS & AUSTEN, 1984).

Para que ocorram as ações biológicas do LTB₄ é necessária a sua ligação aos receptores de membranas BTL1 e BTL2, acoplados a proteína G, sendo o primeiro de alta e o segundo de baixa afinidade (YOKOMIZO et al., 2000). Além disso, o grupo dos cistenil-LTs sinalizam por dois receptores específicos: cisLT1 e cisLT2 (AKINO et al., 2006).

A ação de LTB₄ foi amplamente estudada em várias condições inflamatórias e constitui um dos principais alvos de muitas doenças inflamatórias incluindo a perda óssea na condição de artrite (KUWABARA et al., 2002; GRIFFITHS et al., 1995).

É sabido que o LTB₄ pode ser produzido por células ósseas incluindo osteoblastos e osteoclastos (GARCIA et al., 1996; LEE et al., 2012; CHEN et al., 2012; PAREDES et al., 2002). Um dos primeiros estudos *in vitro* sobre o papel deste metabólito demonstrou que os LTs estimulam a reabsorção óssea (MEGHJI et al., 1988). Estudos posteriores, utilizando células isoladas de medula óssea de aves, confirmaram este resultado, indicando que metabólitos da via 5-LO estimulam osteoclastos a reabsorver a matriz óssea *in vitro*, verificado pelo aumento da atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador clássico de osteoclastos (GALLAWITZ et al., 1993; FLYNN et al., 1999).

A administração de LTB₄ na calvária de camundongos *in vivo* aumentou a reabsorção óssea por induzir a formação de osteoclastos (GARCIA et al., 1996).

As células endoteliais expressam o receptor de LTB₄, BLT1 e respondem ao LTB₄ exógeno. O tratamento com LTB₄ induziu a angiogênese pela superexpressão do VEGF (KIM et al., 2009). As respostas individuais de células endoteliais e ósseas ao LTB₄ foram demonstradas, mas como essas células respondem juntas ao LTB₄ ainda não foi estudado.

A contribuição da ação de LTB₄ derivado das células endoteliais na osteoblastogênese é desconhecida e pouco se sabe sobre o papel do LTB₄ na interação entre células endoteliais e osteoblásticas. Além disso, a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos nesta interação é pouco conhecida. Nesse contexto, o VEGF pode ser o alvo da ligação entre células endoteliais-osteoblastos, tendo em vista que ambas células podem secretar LTs e o tratamento com LTB₄ exógeno aumenta a expressão de VEGF em células endoteliais. Além disso, foi demonstrado que as células ósseas expressam receptor de VEGF (TOMBRAN-TINK e BARNSTABLE, 2004).

O VEGF é descrito na indução da expressão de RANKL em osteoblastos e durante a osteoclastogênese (NAKAGAWA et al., 2000; NAKAI et al., 2009). Curiosamente, LEE e colaboradores demonstraram que a produção de LTs aumenta a perda óssea mediada por RANKL *in vivo* (LEE et al., 2012). Assim, buscamos investigar a contribuição do LTB₄ pelas células endoteliais na osteogênese.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FORMAÇÃO DOS VASOS SANGUÍNEOS

Os vasos sanguíneos estão presentes em todos os órgãos participando e regulando o crescimento e a homeostasia. Eles são divididos em: 1) veias, que levam ao coração sangue vindo do corpo e suas paredes são mais finas que as das artérias; 2) as artérias, que levam sangue do coração a todo o corpo e suas paredes são espessas e dilatáveis e 3) capilares, que levam sangue aos tecidos, para fornecer oxigênio as células, estes ligam artérias as veias (DVORAK, 2002; BATES DO, HARPER SJ, 2002).

A angiogênese é o processo de formação de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, que ocorre em condições fisiológicas e patológicas. É um fenômeno complexo no qual participam inúmeras moléculas que estimulam e inibem a formação dos neovasos (SAGHIRI, 2015).

As células endoteliais estão presentes dentro dos vasos sanguíneos, apresentando a capacidade de se comunicar com tecidos e células vizinhas, fornecendo citocinas, fatores de angiocina, quimicinas, entre outros metabólicos (GEUDENS e GERHART, 2011). Estudos demonstram que as células endoteliais regulam o desenvolvimento ósseo e que os processos de angiogênese e osteogênese estão interligados, ou seja, as células ósseas e sanguíneas trabalham em conjunto, no que é chamado de feedback positivo estabelecendo o desenvolvimento adequado do esqueleto (KUSUMBE, RAMASAMY e ADAMS, 2014).

2.2 TECIDO ÓSSEO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo, formado por células da matriz óssea, que é um componente extracelular mineralizado. As funções do osso são: dar suporte para os tecidos moles, proteção aos órgãos vitais, reservatório de cálcio e fósforo e também participa da hematopoiese. O osso é formado por uma rede de hidroxapatita e proteínas que compõe a matriz óssea. Sua estrutura é renovada por células que

compõe este tecido: osteoblastos, que tem a função de formar o osso, sintetizando a parte orgânica da matriz, os osteoclastos que reabsorvem o tecido ósseo e os osteócitos, responsáveis pela manutenção da matriz óssea (WATROUS, 1989; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Os marcadores de formação óssea são produzidos por células osteoblásticas ou derivados do metabolismo do procolágeno, já os marcadores de reabsorção são derivados da degradação de moléculas, produtos de osteoclastos ou degradação do colágeno (HLAING, COMPSTON, 2014).

2.3 OSTEÓCITOS

Os osteócitos possuem um papel importante no controle dos osteoblastos e osteoclastos (DATTA et al.; 2008; XIAO et al.; 2016). Estas células são fusiformes e achatadas e se localizam no interior das lamelas do osso trabeculado e cortical. São envolvidos por uma matriz extracelular que formam lacunas e estão ligadas por uma rede de canais finos chamados de canalículos, os quais são ocupados por finas extensões do citoplasma dos osteócitos, permitindo o contato com as células ao redor (CAPULLI et al.; 2014; STAINS et al.; 2014). Os canalículos possuem um papel importante na vitalidade destas células, pois é através deles que ocorrem as trocas metabólicas entre as células e os fluidos orgânicos (STAINS et al.; 2014).

O osteócito é formado a partir de um osteoblasto envolto por um osteóide. O osteoblasto, agora chamado de osteócito, tem atividade reduzida, apresentando um contato fundamental com as outras células e mantendo a integridade óssea (GUO et al.; 2010).

A transformação do osteoblasto em osteócitos requer uma série de mudanças morfológicas no recém-formado osteócito e a formação de prolongamentos é uma das primeiras mudanças. Durante o processo de transição, as células diminuem a expressão de fosfatase alcalina, aumentam a expressão de osteocalcina e passam a expressar metaloproteínases MT1-MMP, relacionadas ao número e tamanho dos prolongamentos celulares, além de outras moléculas importantes como a Capping actin protein (CapG), necessária para que ocorra o rearranjo do citoesqueleto (GUO et al.; 2010; STAINS et al.; 2014).

A atividade funcional e morfologia variam de acordo com o tempo da célula. Osteócitos jovens apresentam muitas características de osteoblastos, porém com menor atividade de síntese e volume celular. Osteócitos mais velhos, localizados mais profundamente, nas lacunas do osso calcificado, apresentam volume celular mais reduzido e grande acúmulo de glicogênio no citoplasma (CAPULLI et al.; 2014; FLORENCIO-SILVA et al.; 2015).

2.4 OSTEOLASTOS

Os osteoblastos representam de 4 a 6 % das células presentes no osso, tendo a função de formação da matriz óssea formando os ossos em duas etapas: 1. Deposição da matriz orgânica e 2. Sua mineralização (CAPULLI et al.; 2014).

Os osteoblastos são originários das células tronco mesenquimais (MSC). Durante seu desenvolvimento ocorre a diferenciação celular e deposição da matriz óssea, por meio de vias de sinalização e reguladores transcricionais que regulam a diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoprogenitoras. Esta diferenciação também é estimulada por vários fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos nos diferentes estágios de manutenção celular (DATTA et al.; 2008; MOTTYL et al.; 2017).

2.5 OSTEOLASTOS

Os osteoclastos são células que tem a função de reabsorção da matriz óssea. Pré-osteoclastos mononucleares são recrutados para locais onde a matriz óssea será reabsorvida e depois passam por um processo de fusão via DC-STAMP e/ou ATP6V0d2, formando osteoclastos maduros multinucleares oriundos da linhagem de monócitos/macrófagos (CAPULL et al.; 2014).

Os osteoclastos multinucleados são encontrados apenas em contato com a superfície do osso, ou dentro de uma lacuna na matriz óssea formada por sua própria atividade reabsorvida (lacuna de Howship), não circulando na corrente sanguínea (CHARLES, ALIPRANTIS, 2014; FLORENCIO-SILVA et al.; 2015).

O processo de formação de osteoclastos, também conhecido como osteoclastogênese, é um mecanismo que ocorre pela regulação do sistema RANK/RANKL/OPG a partir da proliferação de células progenitoras hematopoiéticas, devido a ligação do M-CSF ao receptor exposto na superfície celular (cFms). A ligação do M-CSF induz a autofosforilação do receptor, promovendo interações com proteínas adaptadoras e indução de diferentes vias de sinalização intracelular como ERK 1/2; PI3K e MAPKS (NAKAMICH et al.; 2017; XIAO et al.; 2016).

2.6 LEUCOTRIENOS

Os LTs são derivados do ácido aracdônico (AA) pela via 5-lipoxigenase (5-LO) (Figura 1) envolvidos no recrutamento de leucócitos e na regulação da síntese de citocinas (MEDEIROS et al., 2004). Durante a sua síntese, o AA liberado é transformado, no envelope nuclear, em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que, por ser instável, é rapidamente convertido em leucotrieno A₄ (LTA₄) pela ação da 5-LO.

Essa enzima é transposta do citosol para a membrana nuclear e ativada pela Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP) (MILLER et al., 1990). Ao final da via da 5-LO, o LTA₄ é enzimaticamente hidrolisado e transformado em LTB₄, pela ação da LTA₄ hidrolase, ou em LTC₄ intracelular pela ação da enzima LTC₄ sintase, que catalisa a conjugação de LTA₄ com glutathione reduzida. LTC₄ intracelular é transportado através da membrana e convertido, pela ação da gama-glutamilttransferase, em LTD₄ e LTE₄ (LEWIS & AUSTEN, 1984) (Figura 1). Para que ocorram as ações biológicas do LTB₄ é necessária a sua ligação aos receptores de membranas, BTL1 e BTL2, acoplados a proteína G, sendo o primeiro de alta e o segundo de baixa afinidade (YOKOMIZO et al., 2000). Além disso, o grupo dos cistenil-LTs sinalizam por meio dos receptores específicos cisLT1 e cisLT2.

Figura 1. Síntese de prostaglandinas e leucotrienos.

Fonte: <http://www.ufrgs.br/laprotox/eicosanoids.htm>

2.7 ENVOLVIMENTO DOS LEUCOTRIENOS EM CÉLULAS ÓSSEAS

Os LTs estão relacionados com o favorecimento da reabsorção e estudos mostraram que estes mediadores suprimem a formação óssea pela modulação da função dos osteoclastos e/ou osteoblastos (HIKIJ et al., 2009). Com isso, há vários estudos que mostram o papel dos LTs na reabsorção óssea mediada por osteoclastos, devido ao aumento do número e atividade de osteoclastos (MOURA et al.; 2014; GARCIA et al.; 1996; GALLWINTZ et al.; 1993).

Os estudos sugerem que o LTB₄ atua diretamente na reabsorção óssea por meio da modulação positiva do número e/ou atividade dos osteoclastos. HIKIJ et al.,

(2009) mostraram que os osteoclastos expressam BLT1, mais não BLT2 e produzem LTB₄. Além disso, a sinalização via BLT1 acoplada a proteína G α i; e por meio da ativação da proteína Rac1 aumenta a ativação de osteoclastos. A inibição do BLT1 diminui o desenvolvimento de doenças envolvendo reabsorção óssea como a osteoporose (MOURA et al.; 2014; GARCIA et al.; 1996; GALLWINTZ et al.; 1993).

2.8 ENVOLVIMENTO DOS LEUCOTRIENOS NO TECIDO VASCULAR

A ativação da via da 5-LO no âmbito vascular requer a presença de novas formas de comunicação com genes transmissores, resultando na geração de metabólitos produzidos pela 5-LO e no aumento da expressão de receptores para os metabólitos nas células vasculares. Os LTs, os principais produtos dessa via, são mediadores da inflamação vascular iniciada pelos leucócitos e sustentados ou propagados por geração amplificada de metabólitos e pelo efeito nas células endoteliais e células musculares lisas vasculares. Os LTs atuam aumentando a permeabilidade celular, o estresse oxidativo e modulando a migração de células musculares lisas vasculares e o tônus arterial. A ativação da 5-LO também está relacionada ao progresso da placa, à estabilidade da placa, à ativação de metaloproteinases de matriz, à propensão a eventos coronarianos e cerebrovasculares e à evolução dos aneurismas da aorta. As variáveis genéticas na ativação da proteína têm sido associadas ao aumento do risco cardiovascular (OSHER et al., 2006). Além disso, o tratamento com LTB₄ induz a angiogênese pela superexpressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (KIM et al.; 2009).

2.9 FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR (VEGF)

O VEGF é membro de uma família de citocinas que exercem funções críticas na angiogênese fisiológica, patológica e na linfangiogênese. Estudos iniciais descreveram a purificação parcial de uma proteína capaz de induzir permeabilidade vascular em pele de cobaia. Essa proteína foi nomeada fator de permeabilidade vascular (VPF) e foi apresentada como reguladora específica de permeabilidade de vasos sanguíneos tumorais (DVORAK, 2002).

Em 1989, Ferrara e cols. relataram a purificação e sequenciamento de um mitógeno de célula endotelial específico que chamaram de fator de crescimento do endotélial vascular (VEGF). No mesmo ano, Connolly e cols descreveram a clonagem do cDNA do VPF (FERRARA, 2002).

O VEGF pertence a um grupo de glicoproteínas diméricas das quais fazem parte o fator de crescimento placentário (PGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E VEGFF (Figura 2). Eles compartilham uma estrutura comum de oito resíduos de cisteína no domínio de homologia do VEGF. Destes, o VEGF-A, ou apenas VEGF, é o fator mais bem estudado e compreendido. A ativação do VEGF desencadeia diversas rotas de sinalização intracelular que resultam em proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação das células endoteliais, assim como sua atuação no aumento da permeabilidade vascular. A transcrição do mRNA do VEGF pode ser induzida pela secreção de diferentes fatores de crescimento e citocinas, incluindo, PDGF, EGF, TNF- α , TGF- α e IL-1. (FERRARA, 2003).

Figura 2. Representação esquemática da ligação das diferentes moléculas do VEGF a seus receptores e ativação das diferentes rotas bioquímicas envolvidas no processo angiogênico.

Fonte: <http://hdl.handle.net/10183/163460>

O VEGF induz a angiogênese atuando diretamente nas células endoteliais ao se ligar e ativar receptores de membrana pertencentes à família de receptores tirosina quinase. Eles são conhecidos como VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 ou Flt-1), VEGFR-2 (fetal liver kinase, Flk-1 ou KDR) e VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, Flt4). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos nas células do endotélio vascular. VEGFR-2 e VEGFR-3 são os principais receptores da sinalização nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente. Além desses, também atuam como receptores para alguns membros da família VEGF as neuropilinas 1 (NRP-1) e 2 (NRP-2) que são receptores para semaforinas (proteínas de membrana que agem no crescimento do cone axonal) (ROY,2006).

O VEGF pode ser o alvo da ligação entre células endoteliais-ósseas. Isso acontece porque ambas células secretam o LTB₄ e o tratamento com LTB₄ exógeno aumenta a expressão de VEGF em células endoteliais (TOMBRAN-TINK e BARNSTABLE, 2004).

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

3.1 OBJETIVO GERAL

Neste estudo avaliamos a contribuição do LTB₄ pelas células endoteliais na osteogênese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigamos a resposta dos osteoblastos frente aos tratamentos:

1. Com o meio condicionado das células endoteliais que foram submetidas ou não ao estímulo com LTB₄ exógeno.
2. Com o LTB₄ exógeno, seu inibidor MK 886 e o antagonista do receptor BLT1, U75302.

Assim, foram realizados os ensaios de viabilidade e proliferação celular por meio do MTT e citometria de fluxo, os funcionais de diferenciação e mineralização por meio da atividade da fosfatase alcalina e Alizarina Red, respectivamente; a expressão de marcadores inflamatórios, de formação óssea e angiogênese por meio do qRT-PCR e western blotting.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os experimentos com animais foram realizados após aprovação da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais da Faculdade de Odontologia de Bauru (CEEPA-FOB/USP), Processo N°006/2017.

4.1 ISOLAMENTO E CULTURA DE CÉLULAS ENDOTELIAIS DE AORTA

Camundongos C57BL/6J, com 8 semanas de idade foram eutanasiados com dose letal de anestésico (Tiopental 150 mg/Kg + Lidocaína 10 mg/ml) via intraperitoneal e utilizados para o isolamento das células endoteliais como previamente descrito por KOBAYASHI et al., (2005). O abdômen foi incisado e o tórax aberto para expor o coração e os pulmões. A aorta foi lavada com solução de heparina 1000 U/mL em PBS e dissecada do arco aórtico até a aorta abdominal. Após isso, a mesma foi imersa em meio de cultura contendo 20% de soro fetal bovino (FBS) e 1000 U/mL de heparina. Os tecidos conectivo e adiposo foram removidos rapidamente com o auxílio de pinças. Em seguida, a aorta foi cortada em pequenos pedaços, colocada em placas de petri em solução de collagenase tipo II (2mg/mL de collagenase em meio sem soro) e incubadas por 45 minutos a 37° C. Após a incubação, os pedaços do tecido foram centrifugados a 1200 rpm por 5 minutos em TA e então o precipitado foi ressuspensionado em DMEM suplementado com 20% de FBS e colocado em garrafas de cultivo previamente tratadas com colágeno tipo I. Após 2 horas de incubação, o meio foi trocado, para remover as células vasculares do músculo liso (VSMC), em DMEM suplementado com 20% de FBS, 2 mM de L-glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina, aminoácidos não essenciais 1x, piruvato de sódio 1x, 25 mM de HEPES (pH 7,0 – 7,6), 100 µg/mL de heparina e 100 µg/mL do suplemento para o crescimento de células endoteliais ECGS. As células aderentes foram cultivadas por 10 dias a fim de aumentar o número de células para os experimentos posteriores (Figura 3).

Figura 3. Cultura primária de células endoteliais da aorta dos animais C57BL/6J.

4.2 ISOLAMENTO DE OSTEOLASTOS DE CALVARIA

Animais C57BL/6J entre 7 e 9 dias de idade foram eutanasiados e suas calvárias foram removidas como previamente descrito por Marzia et al. 2000. Após remoção das calvárias as mesmas foram colocadas em HBSS e digeridas em solução de 2,5 mg/mL de collagenase e 1 mg/mL de tripsina por três vezes em agitação no banho maria a 37°C. A primeira digestão foi realizada por 15 minutos, e após isso a solução foi descartada (por conter fibroblastos). A segunda digestão foi realizada por 30 minutos, seguido de centrifugação a 1250 rpm à temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio de cultura completo (DMEM+10% de soro fetal bovino (SFB)), colocado em garrafas de cultura e mantido em estufa de CO₂. A terceira digestão foi realizada por 45 minutos e após esse tempo foram realizados os mesmos procedimentos das células obtidas na segunda digestão. As células foram plaqueadas e cultivadas em condições padrão, em DMEM contendo 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina (Figura 4).

Figura 4. Cultura primária de osteoblastos obtidos da calvária de animais C57BL/6J).

4.3 TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM INDUTORES OSTEOGÊNICOS, LTs, INIBIDORES E ANTAGONISTAS

Após a adesão celular, os osteoblastos foram tratados com meio osteogênico (MO) (DMEM com 10% de FBS, 1% de antibiótico e suplementado com 50μg/mL de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerofosfato) para a diferenciação celular. Em seguida as células foram tratadas ou não (controle) com LTB₄ a 10⁻⁸ M (JIANG et al., 2005), o inibidor da síntese de LTs MK 886 na concentração de 10⁻⁶ M e com o antagonista do receptor do LTB₄, U75302 na dose de 10⁻⁷ M e, dos receptores dos CysLTs, MK 571 na concentração de 10⁻⁶ M (SECATTO et al., 2014; PERES et al., 2007) pelos períodos de 4 até 21 dias. No grupo controle, as células foram incubadas com a mesma porcentagem de veículo controle (DMSO ou etanol). O meio de cultura foi trocado a cada três dias de cultivo celular. O tratamento das células endoteliais foi realizado nas mesmas condições dos osteoblastos, porém sem a adição dos indutores da osteogênese ácido ascórbico e β-glicerofosfato.

4.4 PREPARO DO MEIO CONDICIONADO DAS CÉLULAS ENDOTELIAIS E TRATAMENTO DOS OSTEOLASTOS

Células endoteliais primárias foram previamente tratadas (CM-EC-LTB₄) ou não (CM-EC) com LTB₄ a 10⁻⁸M e incubadas por até 4 dias. Após incubação o meio condicionado foi coletado e armazenado adequadamente a -80°C para os experimentos posteriores. Para o tratamento dos osteoblastos, o meio condicionado de 4 dias foi diluído em 50% em meio de cultura fresco DMEM suplementado com 10% de FBS e as células foram cultivadas por até 21 dias. O meio foi trocado a cada 3 dias.

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR POR MTT

Para avaliar a viabilidade das células, por meio do ensaio de MTT, os osteoblastos foram cultivados e incubados a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ até atingirem a subconfluência. Após isso, as células foram tripsinizadas e plaquedas em placas de 96 poços na densidade celular de 3x10³. Após 48 horas de adesão, as células foram tratadas ou não (controle) com o LTB₄, seu inibidor, antagonista ou meio condicionado das células endoteliais (CM-EC ou CM-EC-LTB₄) e cultivadas por 4 dias. Após isso, os poços foram lavados com 200 µL de PBS e foi adicionado à solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura sem soro). As células foram incubadas por 4 horas e após isso, foi adicionado 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço para a diluição dos cristais de formazan produzidos. Após 30 minutos, foi realizada a leitura das placas em espectrofotômetro a 550 nm.

4.6 ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A proliferação celular foi realizada por meio da marcação das células com o composto fluorescente CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) e avaliada por citometria de fluxo. Para tanto, osteoblastos na densidade de 1x10⁵ (por condição experimental), foram marcados com CFSE (concentração de 10 µM) por 10 min a 4°C, conforme o protocolo do fabricante (MOLECULAR PROBES, EUGENE,

OR, USA). Após a lavagem com PBS 1X as células marcadas foram plaqueadas em placas de 6 poços e após 48 horas de adesão o meio foi substituído pelo meio de cultura contendo os tratamentos com LTB₄, MK 886, U75302, CM-EC ou CM-EC-LTB₄. Após 48 horas do início do tratamento, as células foram tripsinizadas e adquiridas subsequencialmente em citometro de fluxo (FACSCALIBUR™, BD BIOSCIENCE, SAN DIEGO, CA). As análises foram feitas pelo programa CellQuest (CellQuest software, BD).

4.7 ENSAIO DA ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (ALP)

Para avaliar se o LTB₄ exógeno modula a diferenciação de osteoblastos, as células foram cultivadas ou não (controle) com LTB₄ em diferentes concentrações (10⁻⁷M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁹ M), por 4, 7 e 14 dias. Assim, as células foram fixadas em 4% de paraformaldeído por 10 minutos e lavadas por duas vezes com PBS. O lisado celular foi obtido pela adição de 200µL de tampão contendo 10mM de Tris pH 7,5; 0,5 mM MgCl₂ e 0,1% Triton X-100. A atividade da ALP foi determinada através do meio de reação (solução contendo tampão glicina (25mM, pH 9,4), acrescido de 2mM de MgCl₂ e 1mM de pNPP). As placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C e em seguida 50µL de amostra (diluição da amostra 1:1) foi adicionada ao meio de reação. A placa foi mantida a 37°C por 30 minutos. A reação foi paralisada com NaOH 1M e o produto final (p-nitrofenol) foi quantificado a 405nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos como atividade em nmol de p-nitrofenol x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína (OLIVEIRA et al., 2017).

4.8 ENSAIO DE MINERALIZAÇÃO

Osteoblastos foram plaqueados na densidade de 4 x 10⁴ em placas de 24 poços. Após a aderência, as mesmas foram tratadas ou não com LTB₄, MK 886, U75302, CM-EC ou CM-EC-LTB₄. A mineralização foi avaliada por coloração com Alizarina Red S (Sigma®). Após 21 dias de cultivo, os sobrenadantes foram descartados e as células foram lavadas com PBS 1X seguido da fixação com

formaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente (TA). As células foram incubadas com solução de alizarina 2% pH 4,2 por 10 minutos TA seguido de 3 lavagens com H₂O ultrapura. As placas foram fotografadas utilizando a câmera El Logic 100 Imaging System e analisadas pelo programa Kodak, Molecular Imaging software v.4.5.

A análise quantitativa da coloração foi avaliada pelo método colorimétrico segundo Da Silva et al. (2011). Após as placas estarem totalmente secas, foram adicionados 280 µL de ácido acético a 10% diretamente em cada poço corado com vermelho de alizarina. A placa foi submetida à agitação por 30 minutos à TA. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo eppendorf, que foram aquecidos a 85° C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 20.000g por 15 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada tubo foi transferido para poços de placas com 96 poços. Posteriormente, foi adicionado 40 µL de hidróxido de amônia a 10% em cada poço para neutralização do ácido. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 405 nm, sendo a formação de matriz mineralizada expressa como densidade óptica (D.O.).

4.9 qRT-PCR

Para avaliar a expressão gênica de marcadores inflamatórios, de formação óssea e de angiogênese, como o Alox5, BLT1, ALP, BGLAP (osteocalcina), OPG (osteoprotegerina), RANKL e VEGF, o mRNA dos osteoblastos foi isolado utilizando-se o Kit de extração RNeasy mini kit-74106 e DNase-79254 (Qiagen). 2 µg de RNA foram reversamente transcritos e o equivalente a 0,1 µg foi utilizado para reações de PCR. qRT-PCR foi realizado utilizando-se o Sensi mix Hi-Rox SYBR Green (Bioline). Os resultados foram expressos como vezes de aumento no qRT-PCR e normalizados pelo gene constitutivo GAPDH.

4.10 WESTERN BLOT

Para a extração de proteína total, osteoblastos e células endoteliais foram lisados em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 0,5% Deoxicolato de sódio, 0,1% SDS) contendo um cocktail de inibidores de protease. As amostras foram coletadas e congeladas a -80°C para posterior análise. Posteriormente, as proteínas extraídas foram corridas em gel de acrilamida a 10% no sistema de SDS-PAGE e transferidas para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF). Os blots foram incubados overnight com o anticorpo primário para VEGF, RANKL e OPG. Após isso, os mesmos foram lavados e incubados com o anticorpo secundário conjugado com HRP por 1 hora em TA. As membranas foram reveladas pelo kit de quimioluminescência (ECL), escaneadas e as bandas foram analisadas por meio do Programa Image J.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de acordo com o método de Kolmogorov e Smirnov, onde o valor de $p > 0,10$ utilizando o programa *GraphPad Prism*. Posteriormente, os resultados foram analisados e submetidos à análise de variância ANOVA, seguido pelo teste de Tukey (*GraphPad Prism*). A significância foi dada quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Com o intuito de avaliar o efeito do LTB₄ na viabilidade dos osteoblastos frente aos estímulos exógenos e ao meio condicionado das células endoteliais, foi realizado o ensaio de MTT no período de 4 dias. Os resultados do MTT mostraram uma diminuição da viabilidade pelo inibidor de LTB₄ MK 866 em relação ao controle e um aumento da viabilidade celular no grupo tratado com o CM-EC-LTB₄ quando comparado ao MK 866 ($P < 0.05$) (Figura 5)

Figura 5: Ensaio de viabilidade celular em osteoblastos tratados ou não (controle) com LTB₄ 10⁻⁸ M, seu inibidor MK 886 10⁻⁶ M, o antagonista do BLT1 U75302 a 10⁻⁷ M, CM-EC-Control 4 dias e CM-EC-LTB₄ 10⁻⁸ M 4 dias. Representação de 3 experimentos independentes (N=8). *Representa diferenças estatísticas onde o $P < 0,05$, comparando-se entre o grupo controle e tratados. Anova-1 critério (* $P < 0,05$).

5.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação dos osteoblastos foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o composto fluorescente CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl Ester). O CFSE se difunde passivamente pelas células e é transferido às células-filhas, de maneira que a cada divisão a intensidade de fluorescência é dividida pela metade. A figura 6 mostra o perfil das células no tempo 0 (imediatamente posterior a marcação com CFSE), com 2 e 4 dias (tempo de análise da proliferação) tratadas ou não com os estímulos exógenos. A figura 6A mostra o histograma do perfil de proliferação dos osteoblastos controle, com 0, 2 e 4 dias. No momento 0, a intensidade de fluorescência é da ordem de 10^3 , e após 4 dias, está é da ordem de 10^1 , demonstrado pelo deslocamento à esquerda da curva, que houve extensa proliferação celular durante esse período. As figuras 6B-D revelam histogramas dos grupos LTB₄, MK 886 e U75302 em comparação com o controle, respectivamente, no período de 2 dias e, as figuras 6E-G representam histogramas da proliferação de osteoblastos tratados com os mesmos estímulos, porém, com 4 dias. Os resultados da triplicata mostram que o tratamento com LTB₄ ou seu inibidor e antagonista não promoveu um aumento significativo da proliferação celular em relação ao controle ($P>0,05$) (Figura 6H).

Figura 6: Histogramas e quantificação do efeito do LTB4, seu inibidor e antagonista na proliferação de osteoblastos realizados por citometria de fluxo no período de 72 horas. **A)** Representação do perfil proliferativo do grupo controle nos tempos 0 (cinza), 2 dias (laranja) e 4 dias (azul). **B)** Comparações entre os grupos controle e LTB4, com 2 dias. **C)** Comparações entre o controle e MK 886, 2 dias. **D)** Comparações entre o controle e U75302, 2 dias. **E)** Comparações entre os grupos controle e LTB4, com 4 dias. **F)** Comparações entre o controle e MK 886, 4 dias. **G)** Comparações entre o controle e U75302, 4 dias. **H)** Quantificação da proliferação com 2 e 4 dias. Os resultados da triplicata experimental representam a média $\pm$ SD dos valores. N=3. Anova-1 critério ($P>0,05$).

5.3 FOSFATASE ALCALINA

A figura 7 mostra a atividade da ALP de osteoblastos primários de animais C57BL/6J suplementados com meio osteogênico, nos períodos de 4, 7 e 14 dias. Os resultados mostraram que houve uma diminuição da atividade de ALP nos períodos de 4 e 7 dias quando os osteoblastos foram tratados com LTB₄ na concentração de 10⁻⁷M (P<0,05). As menores concentrações de LTB₄ (10⁻⁸ M e 10⁻⁹ M) não modularam a atividade da ALP quando comparadas ao controle. (P<0,05). No entanto, com 7 dias, a atividade da ALP foi diminuída pelo LTB₄ a 10⁻⁷ M quando comparada ao controle e depois grupos tratados (P<0,05). No período de 14 dias não houve diferença significativa entre os grupos (P>0,05).

Figura 7. Atividade de fosfatase alcalina de osteoblastos primários suplementados com meio osteogênico por 4, 7 e 14 dias. As células foram tratadas com o LTB₄ nas doses de 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁹ M a cada 3 dias. Os resultados representam a média da atividade enzimática em nmol de p-NP/minuto pela quantidade de proteína total em mg $\pm$ SD. Representação de 3 experimentos independentes (N=3). Anova-1 critério. *Representa diferenças estatísticas entre os grupos tratados e controle (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

5.4 EFEITO DO LTB₄ NA MINERALIZAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS

Investigamos aqui se o LTB₄, seu inibidor, antagonista do receptor BLT1 e principalmente se as células endoteliais, que foram tratadas ou não com LTB₄ são capazes de modular a mineralização óssea, por meio do ensaio colorimétrico vermelho de alizarina. As células foram tratadas com o meio osteogênico e avaliadas por até 21 dias. Os resultados demonstraram que houve um aumento da deposição de cálcio promovida pelo tratamento com o CM-EC, e inibição da mineralização sob o estímulo com CM-EC-LTB₄ quando comparados ao controle ($P < 0,05$). Os osteoblastos dos demais grupos estudados não foram modulados pelos tratamentos exógenos ($P < 0,05$) (Figura 8).

Figura 8: Mineralização de osteoblastos primários no período de 21 dias, por vermelho de alizarina. A-B) Imagens da deposição de cálcio dos osteoblastos tratados ou não com LTB₄ (10⁻⁸ M), MK886 (10⁻⁶ M), U75302 (10⁻⁷ M), CM-EC e CM-EC-LTB₄. C) Quantificação dos nódulos mineralizados produzidos pelos osteoblastos. Representação de 1 experimento independente (N=3). *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (** $P < 0,01$).

5.5 EFEITO DO LTB₄ NA EXPRESSÃO GÊNICA DE OSTEOLASTOS

A análise da expressão gênica em osteoblastos foi realizada após o estímulo com LTB₄ a 10⁻⁸ M, MK 886 10⁻⁶ M, U75302 10⁻⁷ M, CM-EC e CM-EC-LTB₄ em períodos iniciais (4 dias) e tardios (14 dias) da diferenciação osteogênica avaliando-se, 1. O efeito das células endoteliais mediadas ou não pelo LTB₄, e 2. O efeito dos estímulos exógenos (LTB₄, MK 886 e U75302) na diferenciação osteoblástica.

Resultados mostraram que o tratamento com o meio condicionado das células endoteliais estimuladas ou não com o LTB₄ aumentou a expressão do receptor BLT1 com 4 dias (Figura 9C), ALP com 4 e 14 dias (Figura 9E-F), BGLAP (Figura 9H) e OPG (Figura 9L) com 14 dias e diminuiu a expressão de RANKL (Figura 9J) e VEGF (Figura 9N) ambos no período de 14 dias em relação ao controle e aos demais grupos tratados (P<0,05). Em adição, não houve modulação da expressão do Alox5 em osteoblastos estimulados pelo CM-EC ou CM-EC-LTB₄ (P>0,05) (Figura 9A-B). Com relação aos efeitos dos estímulos exógenos, o tratamento com LTB₄, MK 866 e U75302 aumentou a expressão do Alox5 em osteoblastos com 4 dias de cultivo (Figura 9A). Além disso, o inibidor da síntese de LTB₄, MK 866 inibiu a expressão de VEGF em relação ao controle (P<0,05) (Figura 9N).

Figura 9: Expressão gênica em osteoblastos primários de animais C57BL/6J tratados ou não com LTB₄, MK886, U75302, meio condicionado de células endoteliais (CM OBL) e meio condicionado das células endoteliais que foram tratadas com LTB₄ (CM-OBL-LTB₄) nos períodos de 4 e 14 dias. A-B) Alox-5, C-D) BLT1, E-F) ALP, G-H) BGLAP (OCN), I-J) RANKL, K-L) OPG, M-N) VEGF. Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 2 experimentos independentes (N=3). *Representa diferenças estatísticas. Anova-1critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

5.6 WESTERN BLOTTING

Resultados da análise densitométrica dos *blottings* demonstraram que o meio condicionado das células endoteliais aumentou a produção de RANKL quando comparado ao controle ($P < 0,05$) (Figura 10B). Porém, os estímulos com LTB₄, MK 886, U75302 ou MC-OBL-LTB₄, não modularam a produção de RANKL, OPG, VEGF durante a diferenciação osteogênica ($P > 0,05$) (Figura 10B-D).

Figura 10: Expressão protéica em osteoblastos tratados ou não (controle) com LTB₄, MK886, U75302, meio condicionado de células endoteliais (CM-OBL) e meio condicionado das células endoteliais que foram tratadas com LTB₄ (CM-OBL-LTB₄) nos períodos de 4 dias, por Western blotting. A) Imagem representativa dos blottings para RANKL, OPG, VEGF e α-tubulina. B) Análise densitométrica do RANKL. C) OPG. D) VEGF. Os valores foram normalizados pela α-tubulina (N=3). Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 3 experimentos independentes (N=3). *Representa diferenças estatísticas em relação ao controle. Anova-1critério (* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$).

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que as propriedades pró-angiogênicas das células endoteliais, submetidas ou não ao tratamento com o LTB₄, podem regular a formação óssea. A liberação de seus mediadores no meio de cultura parece desempenhar um papel importante na modulação dos osteoblastos. Diversos trabalhos comprovaram a ligação entre células ósseas e endoteliais, mostrando a regulação da angiogênese pelo tecido ósseo, sob condições fisiológicas ou patológicas, mas pouco se sabe sobre a mediação da osteogênese pelas células endoteliais.

A conexão entre o osso e a vasculatura foi relatada pela literatura, onde células endoteliais e ósseas trabalham em conjunto por meio de sinalização parácrina ajudando entre si a estabelecer o desenvolvimento adequado do esqueleto (KUSUMBE et al., 2014; RAMASAMY et al., 2014). Mediadores como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator induzido por hipóxia (HIF), metaloproteínas de matriz (MMPs), fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (Runx2), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-BB) são liberados pelas células ósseas, regulando a sobrevivência e a função das células endoteliais, além de promoverem a vascularização durante a formação óssea endocondral. Além disso, os mediadores VEGF, OPG, óxido nítrico sintase 2 (NOS2), BMP-2, fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e o Noggin são liberados pelas células endoteliais para regular funções osteoblásticas e osteoclásticas, a sobrevivência e formação do osso metafisário (HORWITZ et al., 2010; CLARKIN et al., 2010; GOTZ et al., 2012). Assim, a comunicação entre células ósseas e endoteliais é essencial para a homeostasia óssea, e a regulação imperfeita de suas interações resultam na formação óssea defeituosa/incompleta (HORWITZ et al., 2010; CLARKIN et al., 2010; GOTZ et al., 2012).

A angiogênese é necessária para o desenvolvimento, remodelação e reparação da maioria dos tecidos, incluindo o osso. No esqueleto, o surgimento de osteoclastos e condroclastos, células que reabsorvem osso e cartilagem respectivamente, coincide com a invasão de vasos sanguíneos. Assim, a formação de

novos capilares e a reabsorção da matriz mineralizada são eventos essenciais para a morfogênese e crescimento ósseo (NAKAGAWA,2000).

O LTB₄ é considerado o mais potente entre os demais LTs, possuindo efeitos imunomodulatórios e pró-inflamatórios, como a indução de quimiotaxia de leucócitos, produção de espécies reativas de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL) -1, IL-6 e interferon- γ , além de induzir a produção de citocinas antiinflamatórias, como IL-4 e IL-10 (LOPES et al., 2018).

O papel dos LTs no contexto ósseo e angiogênico foi estudado separadamente. A produção de LTs é estimulada em doenças inflamatórias como artrite reumatóide (KLICKSTEIN et al., 1980, DAVIDSON et al. 1983, AHMADZADEH et al., 1991), osteoartrite (PELLETIER et al., 2001, LAUFER 2003) e periodontite (TSAI et al., 1998, BAROUKH et al., 1990) e possuem um papel importante no remodelamento atuando no processo de reabsorção óssea (OLIVEIRA 2017). As células endoteliais expressam o receptor de LTB₄ chamado BLT1 e respondem ao LTB₄ exógeno. O tratamento com LTB₄ induziu a angiogênese pela superexpressão do VEGF, o mediador mais importante e essencial para a angiogênese (KIM et al., 2009).

Resultados do presente estudo mostraram que o estímulo com o LTB₄ inibiu a atividade da ALP, considerada um marcador inicial de formação óssea, evidenciando, portanto, o seu papel na remodelação óssea. A análise da expressão gênica de osteoblastos revelou que as células endoteliais promoveram a superexpressão de genes relacionados à formação óssea como ALP, BGLAP e OPG e, inibiram mediadores relacionados a reabsorção óssea como RANKL e VEGF.

O papel do VEGF no contexto ósseo está relacionado ao aumento da reabsorção óssea e à sobrevivência de osteoclastos maduros (NAKAGAWA 2000). Recente um estudo revelou a expressão de receptores de VEGF em condroclastos, bem como em células endoteliais. Além disso, foi demonstrado que o VEGF induziu osteoclastogênese com uma combinação de RANKL. Estes achados sugerem que o VEGF pode regular a diferenciação dos osteoclastos, bem como a angiogênese (NAKAGAWA 2000). Nossos resultados também mostraram que a inibição do LTB₄ pelo MK 886, inibiu a expressão de VEGF, evidenciando o seu papel modulatório neste fator pré-angiogênico. Além disso, outros fatores produzidos pelas células endoteliais, presentes no meio condicionado inibiram a expressão do VEGF,

sugerindo a promoção da formação óssea por esses mediadores. Além disso, este estudo demonstrou que as células endoteliais (CM-EC), mas não as células endoteliais mediadas pelo LTB₄ (CM-EC-LTB₄), aumentaram a mineralização óssea, observados pelo aumento da deposição de cálcio em cultura de osteoblastos murinos primários. Tais dados reforçam o papel dos LTs na osteoclastogênese já descritos na literatura (NAKAGAWA 2000).

Curiosamente, esse mesmo perfil regulatório durante a diferenciação não foi observado no processo de proliferação osteoblástica. Os fatores angiogênicos produzidos pelas células endoteliais e até mesmo os estímulos exógenos parecem não modular a produção de RANKL, OPG, VEGF e a proliferação celular nos períodos iniciais da diferenciação osteogênica.

Essa interrelação entre a reabsorção óssea/cartilaginosa e a angiogênese também ocorre em desordens ou patologias ósseas, como metástase óssea e artrite reumatoide. Assim, o aparecimento simultâneo da reabsorção óssea/cartilaginosa e a invasão por vasos sanguíneos sugerem que pode haver um modulador comum que regula tanto a angiogênese como a reabsorção óssea/cartilaginosa (NAKAGAWA et al., 2000). Portanto, a compreensão dos mecanismos de ligação entre esses tecidos é de suma importância no contexto de doenças osteoinflamatórias e/ou condições de reabsorção óssea.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Baseado em nossos resultados, além de considerar os limites do trabalho, podemos concluir:

- Mediadores secretados pelas células endoteliais podem regular a diferenciação osteogênica.
- As células endoteliais mediadas pelo LTB₄ inibiram a mineralização óssea.
- As células endoteliais mediadas ou não pelo LTB₄ modularam os osteoblastos durante a diferenciação, mas não na proliferação celular.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AKINO, K., T. MINEDA, et al. (2006). "Attenuation of cysteinylleukotrienes induces human mesenchymal stem cell differentiation." **Wound Repair Regen** 14(3): 343-9.
- BATES DO, HARPER SJ. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors. **Vascul Pharmacol**. 2002;39:225-37
- CAPULLI, PAONER R, RUCCI N. Osteoblast and Osteocyte: games without frontiers. **Arch Biochen Biopys**, V.561, p.3-12, Nov 2014.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. Guia brasileiro de boas práticas para eutanásia em animais-Conceitos e procedimentos recomendados. 1 ed. Brasília: CFMV, 2012.
- CHARLES J.F, ALIPRANTIS, A.O. Osteoclasts: more than "bone eaters". **Trends Mol. Med.**, V.20, n.8, p.449-459, Aug 2014.
- CHEN ZK, LV HS, JIANG J. LTB4 can stimulate human osteoclast differentiation dependent of RANKL. **Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol**. 38(1):52-56, 2010.
- CLARKIN C, OLSEN BR. On Bone-forming Cells and Blood Vessels In Bone Development. **Cell Metab**. 6;12(4): 314–316, 2010.
- DA SILVA AP, PETRI AD, CRIPPA GE, STUANI AS, STUANI AS, ROSA AL, STUANI MB. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. **Lasers Med Sci**. 2012;27 (4):777-83. doi: 10.1007/s10103-011-0968-0.
- DATTA H.K. et al. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, V.61, n.5, p.577-589, May 2008.
- DVORAK HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. **J Clin Oncol**. 2002; 20:4368-80
- FERRARA N. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. **Nat Rev Cancer**. 2002; 2:795-803
-

FERRARA N, GERBER HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptor. **Nat Med.** 2003; 9:669-79.

FLORENCIO-SILVA R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Res Int**, V.2015, p. 421-746, 2015

GARCIA C, BOYCE BF, GILLES J, DALLAS M, QIAO M, MUNDY GR, BONEWALD LF. Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. **J Bone Miner Res.** 11(11):1619-1627, 1996.

GEUDENS I, GERHARDT H. Coordinating cell behaviour during blood vessel formation. **Development** 138 (21):4569-4583, 2011.

GUO D. et al. Identification of osteocyte-selective proteins. **Proteomics**, V.10, n.20, p.3688-98

GRIFFITHS RJ, PETTIPHER ER, KOCH K, FARRELL CA, BRESLOW R, CONKLYN MJ, SMITH MA, HACKMAN BC, WIMBERLY DJ, MILICI AJ, et al. Leukotriene B4 plays a critical role in the progression of collagen-induced arthritis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 17;92 (2):517-521, 1995.

GÖTZ W, REICHERT C, CANULLO L, JÄGER A, HEINEMANN F. Coupling of osteogenesis and angiogenesis in bone substitute healing - a brief overview. **Ann Anat.** 20;194 (2):171-173, 2012.

HORWITZ EM. Building bone from blood vessels. **Nat Med.** 16(12):1373-1374, 2010.

HLAING T. T, COMPSTON J.E. Biochemical markers of bone tumor- uses and limitations. **Ann Clin Biochem**, V.51, n. Pt 2, p.189-202, mar 2014

IRANI K, XIA Y, ZWEIER JL, et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. **Science** 275:1649-1652, 1997.

J Periodontol. 2017 Dec 5. doi: 10.1902/jop.2017.170210.

Inhibition of 5lipoxigenase attenuates inflammation and BONE resorption in lipopolysaccharide-induced periodontal disease. Lopes DEM¹, Jabr CL¹, Dejani NN², Saraiva AC², de Aquino SG^{1,3}, Medeiros AI², Rossa Junior C¹.

KIM GY, LEE JW, CHO SH, SEO JM, KIM JH. Role of the low-affinity leukotriene B4 receptor BLT2 in VEGF-induced angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 29(6):915-920, 2009.

KOBAYASHI H, BUTLER JM, O'DONNELL R, KOBAYASHI M, DING BS, BONNER B, CHIU VK, NOLAN DJ, SHIDO K, BENJAMIN L, RAFII S. Angiocrine factors from Akt-activated endothelial cells balance self-renewal and differentiation of haematopoietic stem cells. **Nat Cell Biol.** 12(11):1046-1056, 2010.

Kim GY, Lee JW, Cho SH, Seo JM, Kim JH. Role of the low-affinity leukotriene B4 receptor BLT2 in VEGF-induced angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 29(6):915-920, 2009.

KUSUMBE AP, RAMASAMY SK, ADAMS RH. Coupling of angiogenesis and osteogenesis by a specific vessel subtype in bone. **Nature** 20;507 (7492):323-328, 2014.

KUWABARA K, JYOYAMA H, FLEISCH JH, HORI Y. Inhibition of antigen-induced arthritis in guinea pigs by a selective LTB4 receptor antagonist LY293111Na. **Inflamm Res.** 51(11):541-550, 2002.

LEE JM, PARK H, NOH AL, KANG JH, CHEN L, ZHENG T, LEE J, JI SY, JANG CY, SHIN CS, HA H, LEE ZH, PARK HY, LEE DS, YIM M. 5-Lipoxygenase mediates RANKL-induced osteoclast formation via the cysteinyl leukotriene receptor 1. **J Immunol.** 1;189 (11):5284-5292, 2012.

LEWIS, R. A. AND K. F. AUSTEN (1984). "Molecular determinants for functional responses to the sulfidopeptideleukotrienes: metabolism and receptor subclasses." **J Allergy Clin Immunol** 74(3 Pt 2): 369-72.

MARINO, S, LOGAN, JG, MELLIS, D, CAPULLI, M. Generation and culture of osteoclasts. **Bonekey Rep.** 3, 570, 2014.

MARZIA M, SIMS NA, VOIT S, MIGLIACCIO S, TARANTA A, BERNARDINI S, FARAGGIANA T, YONEDA T, MUNDY GR, BOYCE BF, BARON R, TETI A. Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. **J Cell Biol.** 16;151 (2):311-320, 2000.

MEDEIROS, A. I., A. SA-NUNES, et al. (2004). "Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis." **Infect Immun** 72(3): 1637-44.

MILLER, D. K., J. W. GILLARD, et al. (1990). "Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production". **Nature** 343(6255): 278-81.

NAKAGAWA M, KANEDA T, ARAKAWA T, MORITA S, SATO T, YOMADA T, HANADA K, KUMEGAWA M, HAKEDA Y. Vascular endothelial growth factor (VEGF)

directly enhances osteoclastic bone resorption and survival of mature osteoclasts. **FEBS Lett.** 12;473 (2):161-164, 2000.

NAKAI T, YOSHIMURA Y, DEYAMA Y, SUZUKI K, IIDA J. Mechanical stress up-regulates RANKL expression via the VEGF autocrine pathway in osteoblastic MC3T3-E1 cells. **Mol Med Rep.** 2(2):229-234, 2009.

NAKAMICHI Y. et al. Mechanisms involved in bone resorption regulated by vitamin D. **J Steroid Biochem Mol. Biol.**, Nov 2017.

OLIVEIRA F A, et al.; Low level laser therapy modulates viability, alkaline phosphatase and metalloproteinase-2 activities of osteoblast. **J Photochem Photobiol B.** Apr, 169:35-40, 2017.

Osher E¹, Weisinger G, Limor R, Tordjman K. . The 5 lipoxygenase system in the vasculature: emerging role in health and disease 2006 Jun 27;252(1-2):201-6.

PAREDES Y, MASSICOTTE F, PELLETIER JP, MARTEL-PELLETIER J, LAUFER S, LAJEUNESSE D. Study of the role of leukotriene B4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. **Arthritis Rheum.** 46(7):1804-1812, 2002.

RAMASAMY SK, KUSUMBE AP, WANG L, ADAMS RH. Endothelial Notch activity promotes angiogenesis and osteogenesis in bone. **Nature** 20;507 (7492):376-380, 2014.

RIBATTI D, NICO B, VACCA A, RONCALI L, DAMMACCO F. Endothelial cell heterogeneity and organ specificity. **J Hematother Stem Cell Res.** 11(1):81-90, 2002.

ROY H, BHARDWAJ S, YLA-HERTTUALA S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett.** 2006; 580:2879-87

SAGHIRI MA, ASATOURIAN A, SORENSON CM, SHEIBANI N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. **J Endod** 2015;41: 797-803.

STAINS J.P, ET AL. Molecular mechanisms of osteoblast/osteocyte regulation by connexin 43. **Calcif Tissue Int**, V.94, n.1, p.55-67, Jan 2014.

TOMBRAN-TINK J, BARNSTABLE CJ. Osteoblasts and osteoclasts express PEDF, VEGF-A isoforms, and VEGF receptors: possible mediators of angiogenesis and

matrix remodeling in the bone. **Biochem Biophys Res Commun.** 2;316 (2):573-579, 2004.

XIAO W, et al.; Cellular and Molecular Aspects of Bone Remodeling. **Front Oral Biol.** 18:9-16, 2016

WATROU DA, ADREWS BS. The metabolism and immunology of bone. **Semin Arthritis Rheum.** 1989 Aug; 19 (1): 45-65.

YOKOMIZO, T., K. KATO, et al. (2000). "A second leukotriene B4 receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders". **J Exp. Med** 192(3): 421-32.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A- Aprovação referente ao comitê de ética animal (CEEPA-FOB/USP)

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

**Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais**

CEEPA-Proc. N° 005/2017.

Bauru, 10 de julho de 2017.

Senhor Professor,

Informamos que Projeto de Pesquisa denominado **"Efeito das células endoteliais mediadas pelo LT64 em células ósseas"** tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), 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), foi analisado e considerado APROVADO ad referendum desta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA).

Vigência do projeto:	Maio/2017 a Setembro/2018
Espécie/Linhagem:	Camundongo C57BL/6J – calvárias do rato Wistar
Nº de animais:	(20M e 20F – 7 dias) + (4M e 4F – 56 dias) + 20 calvárias rato Wistar
Peso/Idade:	8g e 50g
Sexo:	Machos e Fêmeas
Origem:	Biotério da Universidade do Sagrado Coração

Esta CEEPA solicita que ao final da pesquisa seja enviado um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Cassia Maria Fischer Rubira
Profª Drª Cassia Maria Fischer Rubira

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, em exercício

Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO B- Termo de doação dos animais da Universidade do Sagrado Coração-
USC-Bauru

UNIVERSIDADE DO
**SAGRADO
CORACÃO**
A UNIVERSIDADE DO CORAÇÃO

PRÓ-REITORIA DE
PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO

Comissão de Ética no
Uso de Animais

TERMO DE DOAÇÃO DE ANIMAIS

A Universidade do Sagrado Coração, inscrita no CNPJ 61.015.087/0008-31, situada(o) à Rua/Av. Irmã Arminda 10-50, na cidade de Bauru, estado de São Paulo, telefone (14) 21077000, e-mail: centraldeatendimento@usc.br, DOA, por este instrumento, a quantidade de 48 camundongos da linhagem C57BL/6J, para desenvolvimento da pesquisa intitulada "Efeito das células endoteliais mediadas pelo LTB₄ em células ósseas", sob responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Bauru, 20 de março de 2017.

Professora Dra. Dulce Helena Jardim Constantino
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade do Sagrado Coração-USC