UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

AMANDA AMARAL PEREIRA DE OLIVEIRA

Avaliação do efeito do flúor na osteoclastogênese *in vitro*

BAURU
2015

AMANDA AMARAL PEREIRA DE OLIVEIRA

Avaliação do efeito do flúor na osteoclastogênese *in vitro*

Dissertação/Tese 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^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Versão corrigida

BAURU
2015

Ol4a Oliveira, Amanda Amaral Pereira de
Avaliação do efeito do flúor na osteoclastogênese
in vitro / Amanda Amaral Pereira de Oliveira. –
Bauru, 2015.
107 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Profª. Drª. Marília Afonso Rabelo
Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação/tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP.

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: 24/2012
Data: 08/10/2012

DEDICATÓRIA

À Deus,

Pelo amor incondicional. Por direcionar os meus caminhos, pela onipresença, onipotência e onisciência em minha vida. Por me conhecer melhor do que eu mesma e me iluminar no momento tão difícil de fazer escolhas. Por me dar forças para continuar quando as minhas já se esgotaram.

Aos meus pais Sidney e Angela,

Por serem os arquitetos do meu desenvolvimento pessoal, por lutarem e abdicarem de muitas coisas para me proporcionar uma boa educação. Pai e mãe, vocês são TUDO pra mim. Meu alicerce, meu porto seguro, meu exemplo de vida. Sou muito grata por ser filha de um casal tão abençoado. A vocês, meu eterno amor e gratidão.

À minha única irmã Andréia,

Que sempre encontrou uma maneira de me fazer rir das minhas perdas, erros e derrotas, mostrando estar aliviada porque “o pai não ia achar que você também teria que conseguir de primeira”. Pelo amor e companheirismo, por me defender sempre (mesmo não sendo necessário - risos).

Ao meu esposo Ronie,

Pelo amor sincero, companheirismo e compreensão. Por me apoiar sempre, pela paciência nos momentos de estresse de final de mestrado, assim como nos momentos de ausência, acreditando que estamos plantando para colhermos bons frutos no futuro. Sou imensamente grata por seu amor e dedicação. Eu te amo!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À querida Profª Drª Camila Peres Buzalaf,

Uma orientadora e amiga que vou levar para toda a vida. Você me ensinou com toda a dedicação e amor, acreditando em meu potencial. Agradeço pela oportunidade de ter te conhecido, por todos os ensinamentos desde os primeiros passos na pesquisa até o momento, e acredito que o aprendizado continua!

Você é um exemplo de profissional e de pessoa, competente, dedicada, persistente e generosa, ajudando não só a mim, mas a todos que pedem seu auxílio. Sou eternamente grata por ter te conhecido e aprendido muito com você. Tenho certeza que suas ações estão sendo vistas e serão recompensadas por Deus.

À amiga e companheira de pesquisa Msª Talita Mendes da Silva Ventura,

Agradeço por ter estado presente em todas as etapas deste trabalho, me ajudando com os experimentos, no sacrifício de animais, nas altas horas da noite no CIP, nos finais de semana, me acalmando nos momentos de desespero, com sua frase típica, *“Amandinha, vai dar tudo certo!”*

Nunca vou esquecer o que você fez por mim, Talita. Obrigada pelo auxílio, pela disponibilidade, pelas conversas e, maiormente, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf, pela orientação e apoio nos momentos de dificuldade, pela contribuição para que este trabalho fosse desenvolvido, pela oportunidade de fazer parte da equipe da Bioquímica, sempre abrindo portas para novos conhecimentos. Sua generosidade e profissionalismo são inspiradores. Obrigada pela dedicação e confiança.

Aos professores do departamento de Bioquímica, em especial, Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, Dra. Ana Carolina Magalhães e Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf, agradeço pela oportunidade de assistir suas aulas, pelo aprendizado adquirido no PAE, enfim, agradeço por todos os ensinamentos que vocês me proporcionaram. A competência, o dom e a vontade de ensinar que vocês mostram são exemplos para nós, alunos.

Aos amigos e funcionários da Bioquímica, em especial à especialista Aline de Lima Leite, obrigada pela paciência, ensinamentos, apoio e dedicação. Muito obrigada por toda a sua ajuda!

Aos funcionários do Biotério da FOB, Luis Carlos Silva, Elias, Erasmo e Richard, por toda a ajuda e auxílio prestados. Muito obrigada pela atenção, dedicação e excelência em atendimento.

Aos amigos do CIP, Cíntia Kasuko Tokuhara, Talita Ventura, Flávia Amadeu, Priscila Salomão, Heliton Gustavo de Lima, Karen Pinke, Taiane Gardizane e Pepe Burgos pelo apoio, conversas, ajuda, aprendizado e amizade.

À Talita Ventura e Julia Marina, por todo auxílio, dedicação e ajuda para realizar os experimentos, além dos altos papos e risadas!

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e funcionários do Centro Integrado de Pesquisa, obrigada por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho e por toda a ajuda com os experimentos.

Aos amigos do “fundão” e à chefia do setor de agendamento do HRAC,
obrigado por me ajudar a organizar meus horários de trabalho, para que eu
pudesse realizar este sonho de cursar o mestrado, mesmo trabalhando.

À *TODOS* que contribuíram, de maneira direta ou indireta, para a realização
deste trabalho, **muito obrigada!**

*“Inclina o teu ouvido e ouve as palavras dos sábios, e aplica o teu
coração à minha ciência.”*

Provérbios, 22-17

RESUMO

O tecido ósseo possui alto grau de rigidez e resistência à pressão, característica relacionada às suas funções de proteção, sustentação e locomoção. Patologias como periodontite, artrite reumatóide e osteoporose decorrem do desequilíbrio da dinâmica óssea, que ocorre quando os osteoclastos estão em maior atividade em relação aos osteoblastos. O fluoreto (F^-) é incorporado nos tecidos mineralizados após ingestão e a sua administração aumenta a formação óssea *in vivo*, de maneira dependente da dose e da linhagem dos animais. As linhagens A/J e 129P3/J possibilitam a análise dos fenômenos moleculares envolvidos na suscetibilidade e resistência de células ósseas aos efeitos do F^- no osso. Neste estudo, avaliou-se a administração *in vitro* de F^- na osteoclastogênese, através da análise da atividade da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), contagem de células TRAP-positivas e quantificação da atividade das metaloproteinases MMP-2 e -9. Para tal, células hematopoiéticas provenientes da medula óssea de camundongos das linhagens 129P3/J e A/J foram cultivadas com M-CSF e RANKL em associação ou não com F^- , nas concentrações de 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M. Os dados mostraram que a atividade da TRAP foi semelhante entre as células das duas linhagens de animais, independente do F^- . Concomitante à diferenciação osteoclástica, o tratamento das células com F^- , independente da concentração, aumentou significativamente a atividade da TRAP em células da linhagem A/J. O aumento da atividade de TRAP foi associada com o aumento do número de osteoclastos formados, na concentração de 10^{-3} M F^- . Já em células dos animais 129P3/J, o F^- não alterou a atividade da TRAP bem como a osteoclastogênese. A atividade de MMP-9 foi aumentada em relação à da MMP-2, porém ambas não foram moduladas pelo F^- , independente da linhagem. Assim, concluiu-se que as células de ambas as linhagens não diferem com relação à diferenciação de osteoclastos, mas respondem diferentemente ao F^- , sendo as células dos animais A/J e 129P3/J sensíveis e resistentes à osteoclastogênese induzida pelo F^- , respectivamente.

Palavras-chave: Osteoclastogênese. Fluoreto. Reabsorção Óssea.

ABSTRACT

Fluoride affects *in vitro* osteoclastogenesis

The bone tissue has a high degree of rigidity and pressure resistance, characteristic related to its protection, support and locomotion functions. Diseases such as periodontitis, osteoporosis and rheumatoid arthritis arise from dynamic bone imbalance that occurs when osteoclasts present increased activity compared to osteoblasts. Fluoride (F^-) is incorporated in mineralized tissues after ingestion and its administration increases *in vivo* bone formation in dose and strain-dependent manner. The strains A/J and 129P3/J make possible the analysis of molecular phenomena involved in susceptibility and resistance of bone cells to the effect of F^- in bone. In this study, we evaluated the effect of F^- on the *in vitro* osteoclastogenesis, by analyzing the fosfatase tartrate-resistant acid (TRAP) activity, TRAP positive cell counts and the activity of MMP-2 and -9 measurements in A/J and 129P3/J differentiated hematopoietic stem cells. Hematopoietic cells were differentiated with M-CSF and RANKL and treated or not with F^- in the concentrations of 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M. The data show that TRAP activity, an osteoclast marker, was similar between cells from both strains of mice, regardless of F^- . In addition, the treatment of A/J cells with F^- significantly increased TRAP activity, in a dose-independent manner. This was accompanied by the increased TRAP⁺-osteoclast counts, at 10^{-3} M F^- dose. However, while the MMP-9 activity was augmented when compared to MMP-2, it was not altered by F^- , regardless of the strain. Thus, we concluded that cells from both strains do not differ regarding the osteoclast differentiation potential, but they respond differently to F^- , whereas A/J and 129P3/J cells are sensitive and resistant to F^- -induced osteoclastogenesis, respectively.

Keywords: Osteoclastogenesis. Fluoride. Bone Resorption.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

Figura 1 - Esquema das diferentes fases do remodelamento ósseo.....	29
Figura 2 - Esquema da interação entre osteoblastos-osteoclastos para a indução da osteoclastogênese.....	35
Figura 3 - Obtenção de células da medula óssea de camundongos.....	50
Figura 4 - Microscópio invertido equipado com câmera Leica/DM IRBE.....	52
Figura 5 – Incubação das células para a quantificação da atividade enzimática de TRAP.....	53
Figura 6 – Imagem ilustrativa dos passos da técnica de zimografia.....	54
Figura 7 - Comparação da atividade da TRAP entre as linhagens de camundongos.....	59
Figura 8A Efeito do F^- na atividade da TRAP em osteoclastos da linhagem A/J.....	61
Figura 8B Efeito do F^- na atividade da TRAP em osteoclastos da linhagem 129P3/J.....	62
Figura 9A Efeito do F^- na formação de osteoclastos na linhagem A/J.....	64
Figura 9B Efeito do F^- na formação de osteoclastos na linhagem A/J.....	65
Figura 9C Efeito do F^- na formação de osteoclastos na linhagem 129P3/J.....	66
Figura 9D Efeito do F^- na formação de osteoclastos na linhagem 129P3/J.....	67
Figura 10 Gel representativo do padrão zimográfico das formas pró-ativas e ativas das MMP – 2 e -9.....	69
Figura 11 Efeito do F^- na atividade de MMP-2 e MMP-9 em osteoclastos provenientes da linhagem A/J.....	70
Figura 12 Efeito do F^- na atividade de MMP-2 e MMP-9 em osteoclastos provenientes da linhagem 129P3/J.....	71

Figura 13	Efeito do F^- na atividade de MMP-2 em osteoclastos provenientes das linhagens A/J e 129P3/J.....	72
Figura 14	Efeito do F^- na atividade de MMP-9 em osteoclastos provenientes das linhagens A/J e 129P3/J.....	73
Figura 15	Esquema da hipótese do efeito diferencial do F^- em osteoblastos e osteoclastos de animais com diferentes suscetibilidades aos seus efeitos.....	75

.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

Akt – proteína quinase B
ALP – fosfatase alcalina
ATP – adenosina trifosfato
ATP6V0d2 - isoforma da subunidade d na V- ATPase
Bcl - *B-cell lymphoma*
BPs - Bifosfonatos
BSP - sialoproteína óssea
c-Fms / CSF1-R - receptor do fator estimulador de colônias 1
c-Fos - membro da família do fator de transcrição AP-1
c-IAP1 – *Baculoviral IAP repeat-containing protein 2*
c-IAP2 - *Baculoviral IAP repeat-containing protein3*
CLC – Canais de Cloro
cm² – centímetros quadrados
c-Src – *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase*
CTS-K – catepsina K
DC-STAMP – proteína transmembrana célula dendrítica-específica
ERK – quinase regulada por sinal extracelular
F – Flúor
F⁻ - fluoreto
FEX – exportador F-específico
Fluc - *Fluc-type F(-) channels*
GBC – granada permanente
IFN-γ – Interferon-gama
IL - Interleucina
JNK – *c-Jun N-terminal kinases*
g - grama
L - litro
m – mili
M – molar
MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno
M-CSF – Fator estimulador de colônia de macrófagos
miRNAs – microRNAs

MITF- fator de transcrição associado à microftalmia
MMP – metaloproteinase de matriz
NaF – fluoreto de sódio
NFATc1 – fator nuclear de células T ativas
NF- κ B – Fator nuclear kappa B
ng - nanograma
OCN – osteocalcina
OPG - osteoprotegerina
OPN - osteopontina
p-38 quinase – proteína quinase 38 ativada por mitógeno
PGE₂ – Prostaglandina E₂
pH – potencial hidrogeniônico
PI3K – Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato-3-quinase
PI3K/Akt – Via de sinalização intracelular
PTH - Paratormônio
PU.1 – fator de transcrição da família das ETs
RANK - Ativador do Receptor do Fator Nuclear $\kappa\beta$
RANKL - Ligante do Ativador do Receptor do Fator Nuclear $\kappa\beta$
RECK - *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*
ROS - Espécies reativas do oxigênio
Runx2 - *Runt related transcription factor 2*
SBF – Soro Bovino Fetal
SPARC – osteonectina
TIMP – inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF – fator de necrose tumoral
TNFR – receptor do fator de necrose tumoral
TNF- α – Fator de necrose tumoral
TRAF6 – fator de transcrição 6
TRAP – Fosfatase ácida resistente ao tartarato
Wnts - *Drosophila Wingless and mouse Int-1*
 α -MEM - *Minimum Essential Medium Alpha*

LISTA DE SÍMBOLOS

α alfa

β beta

μ micro

$\pm$ mais ou menos

ε épsilon

$\times$ vezes

* significância estatística ($p < 0,05$)

** significância estatística ($p < 0,01$)

*** significância estatística ($p < 0,001$)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	O TECIDO ÓSSEO	27
2.1.1	Células do tecido ósseo	29
2.1.2	Formação e ativação dos osteoclastos	32
2.1.3	Metaloproteinases de matriz associadas à atividade dos osteoclastos	36
2.2	FLÚOR NOS TECIDOS MINERALIZADOS	38
3	PROPOSIÇÃO	45
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	ANIMAIS	49
4.2	CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOCLASTOS	49
4.2.1	Cultura primária de osteoclastos para ensaios da atividade e da contagem de células TRAP-positivas	50
4.2.2	Cultura primária de osteoclastos para zimografia	51
4.3	MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA DA TRAP	51
4.4	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRAP	52
4.5	ZIMOGRFIA	53
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5	RESULTADOS	59
5.1	AS LINHAGENS A/J E 129P3/J NÃO DIFEREM QUANTO AO POTENCIAL OSTEOCLASTOGÊNICO	59
5.2	O F ⁻ MODULA A OSTEOCLASTOGÊNESE DE MANEIRA DEPENDENTE DA LINHAGEM	60
5.3	O F ⁻ AUMENTA A FORMAÇÃO DE OSTEOCLASTOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM A/J	62
5.4	A ATIVIDADE DE MMP-2 E -9 POR OSTEOCLASTOS DE AMBAS AS LINHAGENS NÃO FORAM MODULADAS PELO F ⁻	67
5.5	HIPÓTESE DO EFEITO DO F ⁻ EM CÉLULAS ÓSSEAS DE ANIMAIS COM DIFERENTES SUSCETIBILIDADES AOS SEUS EFEITOS	74
6	DISCUSSÃO	79
7	CONCLUSÕES	87

REFERÊNCIAS

91

ANEXOS

107

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A homeostasia do tecido ósseo, formado por células e matriz óssea calcificada, deve-se ao processo dinâmico e equilibrado denominado remodelamento ósseo, resultado da atividade dos osteoblastos, células responsáveis pela formação óssea, e dos osteoclastos, células responsáveis pela reabsorção óssea. O remodelamento ósseo é, portanto, um processo fundamental para o crescimento e manutenção do tecido ósseo. Alterações na sua homeostasia podem levar ao aparecimento de doenças osteodegenerativas como osteoporose, osteomalácia, osteopenia e osteopetrose (JENSEN et al., 2010).

O controle do equilíbrio ósseo dá-se por fatores relacionados às células das linhagens osteoblásticas e osteoclásticas, além de outras células da medula óssea, que interagem com reguladores locais e sistêmicos da função das células ósseas. Nesse sentido, trabalhos demonstraram que diferenças na produção de mediadores solúveis como hormônios e citocinas, na expressão de receptores para essas substâncias e nos mecanismos de transdução de sinais são determinantes na indução de patologias (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

Os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas, formadas a partir da fusão de células mononucleadas de origem hematopoiética. A osteoclastogênese é regulada pelo contato célula-célula entre osteoblastos/células estromais e progenitores de osteoclastos, no microambiente ósseo. *In vitro*, a cocultura destas células ou a cultura de células progenitoras hematopoiéticas na presença de determinados fatores de crescimento, induzem a expressão de níveis elevados da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), um marcador dos osteoclastos maduros. Os mediadores envolvidos na diferenciação de osteoclastos incluem a osteoprotegerina (OPG), o Ligante do Ativador do Receptor do Fator Nuclear $\kappa\beta$ Ligante (RANKL) e o Ativador do Receptor do Fator Nuclear $\kappa\beta$ (RANK) (LACEY et al., 1998). O RANKL liga-se ao receptor de membrana RANK expresso em precursores de osteoclastos, ativando várias vias de sinalização intracelulares, tais como MAPK, PI3K e NF- κ B que, a seguir, regulam vários fatores de transcrição envolvidos na diferenciação, maturação e sobrevivência dos osteoclastos. Esse processo é regulado por diferentes citocinas, fatores de crescimento e hormônios, incluindo M-CSF, RANKL, hormônios sexuais e o paratormônio (PTH). A ativação

dos osteoclastos maduros é também positivamente regulada por citocinas como as interleucinas (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α) e o medidor lipídico prostaglandina E₂ (PGE₂). Outras citocinas como IFN- γ , IL-4 e IL-10, porém, têm a função de inibir a ativação dos osteoclastos, por atuarem inibindo macrófagos presentes na medula óssea, células precursoras de osteoclastos (SILVEIRA; FRANCO; NASCIMENTO, 2009).

A investigação dos mecanismos moleculares envolvidos na diferenciação osteoclástica bem como na regulação da sua função patológica é, portanto, de interesse da comunidade científica, que visa melhor compreender e/ou inibir o surgimento de doenças osteodegenerativas como a osteoporose. Diversas possibilidades de tratamento foram descritas e são atualmente utilizadas na terapia da osteoporose, como os bifosfonatos (BPs) e a calcitonina, os quais inibem a reabsorção óssea através da inibição da formação dos osteoclastos além de promoverem a apoptose dessas células *in vivo* e *in vitro* (PLOTKIN et al., 1999; SUTHERLAND, 2009). Embora esses compostos tenham aplicação importante no tratamento de doenças ósseas, por modularem negativamente a apoptose de osteoclastos, procuram-se novos compostos, além das citocinas e hormônios, com potencial de regulação da diferenciação e ativação dos osteoclastos.

O flúor (F) é um micronutriente importante presente nos tecidos mineralizados, tais como dentes e ossos, e alterações nas suas composições químicas, podem promover patologias como a fluorose dentária e fluorose esquelética, respectivamente (YAN et al., 2007).

Diversos estudos mostraram que o F tem efeito anabólico nos ossos, dependente da dose e da linhagem genética utilizada. Nesse sentido, foi demonstrado que os ossos de camundongos da linhagem A/J foram altamente alterados após o tratamento dos animais com F, enquanto os ossos dos camundongos da linhagem 129P3/J não foram afetados pelo tratamento (MOUSNY et al., 2006; 2008). A partir desses dados, a linhagem A/J foi considerada suscetível e a 129P3/J resistente aos efeitos do F no osso. Com base nestas linhagens, torna-se possível a análise dos fenômenos moleculares envolvidos na suscetibilidade e resistência de células ósseas aos efeitos do F no osso. Recentemente, trabalho do nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento com F aumentou a formação óssea *in vivo* apenas em animais da linhagem 129P3/J e não alterou em animais A/J, revelada pelas análises de histomorfometrias estática e dinâmica do osso

(KOBAYASHI et al., 2014). Além disso, dados de proteômica pela técnica “label-free” mostraram que proteínas ósseas relacionadas aos osteoblastos e osteoclastos foram moduladas pelo F, de maneira linhagem e dose dependente. Esses resultados sugeriram que ambos, osteoblasto e osteoclasto, podem ser alvos do potencial regulador do F nessas linhagens de camundongos. Utilizando osteoblastos primários obtidos das linhagens A/J e 129P3/J, diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais, mostrou-se que a diferenciação osteoblástica, incluindo a proliferação de precursores osteoblásticos, a formação da matriz óssea e a mineralização foram aumentados pelo F em células de ambas as linhagens. Esses efeitos dependeram apenas do tempo de exposição das células ao F, onde as células da linhagem 129P3/J se mostraram mais precoces enquanto as da linhagem A/J, mais tardias aos efeitos do F (Peres-Buzalaf et al., 2015 dados não publicados).

Em conjunto, esses dados sugerem que os osteoclastos sejam células-alvo do F e que esse efeito seja dependente da linhagem de camundongos. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito direto do F na diferenciação e ativação dos osteoclastos *in vitro*, bem como a influência da constituição da linhagem genética sobre essas respostas.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TECIDO ÓSSEO

O esqueleto pode ser definido como o conjunto de ossos e cartilagens que se interligam para formar o arcabouço do corpo dos vertebrados terrestres, com funções principais de sustentação e conformação do corpo, proteção de órgãos vitais, armazenamento de minerais e íons, movimentação corporal, produção de células sanguíneas e homeostase mineral (DANGELO; FATTINI, 2007; ZAIDI, 2007).

O tecido ósseo, constituinte do esqueleto, é um tipo de tecido conjuntivo especializado, formado por células como os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, e material extracelular calcificado denominado matriz óssea mineralizada. Os osteoblastos são as células que produzem as partes orgânica e inorgânica da matriz, os osteócitos situam-se no interior da matriz e os osteoclastos são células gigantes, multinucleadas e móveis que desempenham a função de reabsorção da matriz mineralizada (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2006).

Na porção inorgânica da matriz óssea são encontrados principalmente os íons fosfato e cálcio, e outros em menor quantidade, como os íons bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato, sendo que a união de fosfato e cálcio resulta na formação dos cristais de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Já a porção orgânica é formada na sua maior parte por fibras colágenas, principalmente colágeno tipo I, e por uma pequena quantidade de proteoglicanas e glicoproteínas adesivas (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

O osso é classificado macroscopicamente em compacto ou esponjoso. A porção compacta não apresenta cavidades visíveis, representa a porção periférica, também chamada de cortical, enquanto a porção esponjosa ou trabecular apresenta muitas cavidades visíveis a olho nu e abriga a medula óssea. As superfícies ósseas são revestidas interna e externamente pelo endóstio e perióstio, constituídos por células osteogênicas e tecido conjuntivo, respectivamente (RUIMERMAN et al., 2005).

A homeostasia do tecido ósseo depende da atuação coordenada, sincronizada e equilibrada da atividade dos osteoblastos e osteoclastos. Por serem

estruturas altamente dinâmicas, os ossos crescem, remodelam-se e mantêm-se ativos durante toda a vida do indivíduo. Para desempenhar suas funções, o tecido ósseo é sintetizado e reabsorvido constantemente, através do processo de remodelamento ósseo; o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é crucial para o desenvolvimento e manutenção deste tecido. Esse processo tem a participação das células ósseas, matriz óssea e reguladores locais e sistêmicos (HARADA; RODAN, 2003; GURLEK; PITTELKOU; KUMAR, 2002) como hormônios, citocinas e fatores de crescimento, os quais atuam no controle da proliferação, recrutamento, diferenciação, atividade, sobrevivência e função das células ósseas. Assim, diferenças na produção desses mediadores solúveis, bem como na expressão de receptores para essas substâncias, e nos mecanismos de transdução de sinais são determinantes na indução de patologias como periodontites, artrites reumatóides, doenças osteoporóticas primárias ou secundárias e tumores ósseos (ANDIA; CERRI; SPOLIDORIO, 2006).

O remodelamento ósseo apresenta três fases consecutivas: reabsorção, reversão e formação. As duas fases iniciais são de curta duração, enquanto a fase de formação é mais prolongada, caracterizada pela síntese de matriz celular por osteoblastos (PARFITT, 2008). O processo de remodelação ósseo inicia-se com a formação e ativação dos osteoclastos. As células progenitoras osteoclásticas são atraídas aos sítios de reabsorção a partir de estímulos quimiotáticos, proliferam e diferenciam-se em osteoclastos. Entretanto, para que ocorra a maturação osteoclástica, células de revestimento ósseo e osteoblastos sintetizam collagenase e expõem a matriz mineralizada aos osteoclastos, que se tornam ativos em contato direto com a matriz mineralizada (LACEY et al., 1998). Os osteoclastos, então, desempenham a função de dissolver as porções inorgânica e orgânica da matriz óssea. Em seguida, ocorre a deposição de matriz celular pelos osteoblastos, células derivadas das células-tronco mesenquimais (RUIMERMAN, 2005). O esquema do remodelamento ósseo está ilustrado na **Figura 1**.

Condições patológicas do esqueleto podem ocorrer em decorrência do desequilíbrio do metabolismo ósseo a favor da atividade dos osteoclastos, resultando em reabsorção excessiva, e consequentemente, danos à microarquitetura óssea, com aumento da fragilidade dos ossos e da suscetibilidade a fraturas (YU et al., 2004; VAANANEN; LAITALA-LEINONEN, 2008).

Figura 1: Esquema das diferentes fases do remodelamento ósseo. O processo tem início com a reabsorção óssea promovida pelos osteoclastos, células diferenciadas a partir de células-tronco hematopoiéticas. A seguir, a fase de reversão tem início com a síntese de matriz osteóide por osteoblastos diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais. Essa matriz osteóide sofre, por fim, o processo de mineralização, última fase do remodelamento ósseo.

2.1.1 Células do tecido ósseo

Os osteoblastos são as células que produzem a parte orgânica da matriz óssea; participam do processo de mineralização da matriz concentrando fosfato de cálcio, além de atuarem na regulação dos osteoclastos (CANHÃO; FONSECA; QUEIROZ, 2005). São células mononucleares, de origem mesenquimal, localizadas nas superfícies ósseas, posicionados lado a lado. Quando em intensa atividade sintética, são cuboide e apresentam citoplasma basófilo. Quando em atividade reduzida, os osteoblastos apresentam formato achatado, com menor basofilia (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2006).

As células de linhagem osteoblástica passam por diversos estágios de diferenciação e maturação. Originam-se de células-tronco mesenquimais que diferenciam-se inicialmente em precursores de osteoblastos e posteriormente em osteoblastos maduros e osteócitos (KATO et al., 2001). Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) desempenham um importante papel durante a diferenciação de osteoblastos (SIEBER et al., 2009; MANOLAGAS, 2000), ativando a via das Wnts (*Drosophila Wingless and mouse Int-1*) (DAVIS; ZOU; GOSH, 2008), o fator de transcrição *Runx related transcription factor 2* (Runx2) (KOMORI et al.; OTTO, 1997) e a via das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKS) (KOLCH, 2000).

A formação óssea também é caracterizada por vários marcadores, incluindo a fosfatase alcalina óssea (ALP), proteínas da matriz extracelular como

colágeno tipo I, osteonectina (SPARC), osteocalcina (OCN), osteopontina (OPN), sialoproteína óssea (BSP) e proteoglicanas (YOUNG et al., 1992; BIANCO et al., 1993; MUNDLOS; OLSEN, 1997).

Em adição à produção de matriz óssea, os osteoblastos são essenciais para sua mineralização, por regularem as concentrações locais de cálcio e fosfato promovendo a formação de hidroxiapatita (BOSKEY, 1996, 1998). Osteoblastos e pré-osteoblastos apresentam, na superfície de suas membranas celulares, níveis elevados da enzima ALP, que, quando liberada, contribui para o processo de mineralização e o progressivo aumento dos cristais de hidroxiapatita (MUNDY, 1991; ARANA-CHAVES; SOARES; KATCHBURIAN, 1995). Estruturas denominadas vesículas de matriz, originadas da membrana plasmática de osteoblastos, se aloca na matriz extracelular, contendo glicoproteínas em seu interior e exibindo forte marcação em sua membrana para fosfatase alcalina (ALP). A partir da atividade desta enzima e dos fosfolípidos da membrana destas vesículas, ocorre uma supersaturação de fosfato e cálcio, resultando em precipitação. Posteriormente, ocorre o rompimento da membrana das vesículas e a mineralização espalha-se pela matriz extracelular (MARKS; POPOFF, 1988; ARANA-CHAVES; SOARES; KATCHBURIAN, 1995; KATCHBURIAN; CERRY, 2002).

Apesar da pobre atividade metabólica, os osteócitos são considerados células indispensáveis para a manutenção da homeostase óssea, uma vez que a sua apoptose atrai os osteoclastos, aumentando a reabsorção óssea (ANDIA; CERRY; SPOLIDORIO, 2006). Estudos recentes mostraram um papel regulatório dos osteócitos na formação óssea em resposta à carga mecânica e no remodelamento ósseo (BONEWALD; JOHNSON, 2008; ATKINS; FINDLAY, 2012). Além disso, os osteócitos atuam como mecanossensores orientando os osteoclastos e osteoblastos nos processos de reabsorção e formação óssea, respectivamente (MANOLAGAS, 2000). Isso ocorre devido à liberação de fatores parácrinos por essas células como a esclerostina (WINKLER et al., 2003) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANKL) (NAKASHIMA et al., 2011), regulando localmente a formação e a reabsorção, respectivamente.

Os osteoclastos originam-se a partir de células mononucleares hematopoiéticas; são multinucleados, gigantes, móveis, com citoplasma granuloso, além de extensamente ramificados. Células precursoras da linhagem monocítica-macrofágica fundem-se para formar as células multinucleadas positivas à fosfatase

ácida resistente ao tartarato (TRAP), uma enzima intracelular que termina a degradação do colágeno internalizado em vesículas transcitóticas dos osteoclastos (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; CHAPPARD et al., 2010).

Para reabsorver o osso, os osteoclastos fixam-se fortemente à superfície óssea, formando uma zona de selamento. Este processo, necessário para a polarização e ativação dos osteoclastos, é dependente da sinalização mediada pela integrina e do remodelamento do citoesqueleto de actina (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; TEITELBAUM, 2011). A superfície irregular dos osteoclastos, também chamada de borda pregueada, localiza-se dentro da zona de selamento, voltada para a matriz óssea e apresenta bombas de prótons e canais de cloreto, os quais promovem a acidificação da lacuna de reabsorção, nome dado à área sob a borda pregueada (COXON; TAYLOR, 2008). É comumente aceito que a formação da borda pregueada e da lacuna de absorção ocorra a partir da secreção e fusão de inúmeras vesículas intracelulares (ZAHO; PATRICK, 2007). LACOMBE; KARSENTY; FERRON (2013) sugeriram que a origem das vesículas intracelulares dos osteoclastos é lisossomal, devido à presença de diversas proteínas lisossomais e ocorrência de pH ácido na borda pregueada e na lacuna de reabsorção, além das evidências encontradas na atividade dos lisossomos na reabsorção óssea.

No processo de reabsorção óssea, a porção mineral da matriz é dissolvida no ambiente ácido criado pela ação da bomba de prótons impulsionada por ATP (H^+ - ATPase vacuolar) localizada na borda da membrana pregueada dos osteoclastos. Inicialmente, ocorre a dissolução de hidroxiapatita e a descarboxilação da osteocalcina, tornando-a ativa, pela ação dos lisossomos (FERRON et al, 2010). Conforme a porção mineral da matriz extracelular é dissolvida, os componentes orgânicos ficam cada vez mais expostos e suscetíveis à degradação por proteases, que se tornam ativas na presença de pH baixo (LACOMBE; KARSENTY; FERRON, 2013).

Diversos estudos têm sugerido o envolvimento de proteases cisteínicas na remodelação de matriz óssea. Entre elas, a catepsina-K (CTS-K), também de origem lisossomal, destaca-se por sua capacidade de degradar fibras de colágeno tipo I (BOSSARD et al., 1996), assim como as metaloproteinases de matriz (MMPs) e TRAP. HENRIKSEN et al. (2006) mostraram que as MMPs mediam a liberação da telopeptidase C-terminal do colágeno tipo I na ausência de atividade de catepsina K. TRAP é utilizada como marcador específico para osteoclastos diferenciados. É uma

metalo fosfatase glicosilada, ativada por clivagem proteolítica, geralmente envolvendo atividade de catepsina K (LJUSBERG et al., 2005), abundante na borda pregueada e em organelas secretoras, como lisossomos (REINHOLT et al., 1990). HAYMAN et al. (1996) mostraram que camundongos deficientes em TRAP exibiram um leve fenótipo de osteopetrose e mineralização deficiente da cartilagem em ossos em desenvolvimento.

2.1.2 Formação e ativação dos osteoclastos

A osteoclastogênese é regulada pelo contato célula-célula entre osteoblastos/células estromais e células progenitoras de osteoclastos no microambiente ósseo, sendo a maturação dos osteoclastos dependente da síntese e da liberação de mediadores essenciais por estas células. Estes incluem a osteoprotegerina (OPG), o RANKL e o receptor do ativador do fator nuclear $\kappa\beta$ (RANK) (LACEY et al., YASUDA et al., 1998; MATSUO; IRIE, 2008) (**Figura 2**).

RANKL é uma proteína de 317 aminoácidos que pertence à superfamília dos fatores de necrose tumoral (TNF). A principal função do RANKL na fisiologia óssea é estimular a diferenciação/ativação de células osteoclásticas (LACEY et al., 1998). Camundongos depletados (*Knockout*) de RANKL apresentaram grave osteopetrose, com completa ausência de osteoclastos (KONG et al., 1999). Em condições fisiológicas ideais, esta proteína é expressa na forma associada à membrana em osteoblastos e células estromais (IKEDA et al., 2001).

O receptor natural do RANKL, denominado RANK, é uma proteína transmembrana de 616 aminoácidos pertencente à família dos receptores TNF (TNFR). O receptor RANK é expresso em diferentes tipos celulares, entre eles, células precursoras de osteoclastos e osteoclastos maduros, enquanto o seu ligante, RANKL, é expresso por osteoblastos e células T ativadas. A ligação RANK-RANKL é essencial para a diferenciação e ativação de osteoclastos (TEITELBAUM, 2011). A OPG é um receptor solúvel sintetizado inicialmente como uma proteína de 401 aminoácidos, posteriormente clivado para ficar com uma composição final de 380 aminoácidos (KHOSLA, 2001). Após a clivagem, a OPG perde seus domínios transmembrana e citoplasmático, sendo liberada por células estromais e/ou

osteoblastos, como uma proteína solúvel. A OPG compete com RANK pela ligação com RANKL, atuando deste modo como repressor deste (LACEY et al., 1998).

A osteoclastogênese é dividida em estágios sequenciais associados ao comprometimento em relação à diferenciação da linhagem monocítica-macrofágica, fusão, e reabsorção. No estágio de comprometimento, as células-tronco de origem mielóide derivadas das células-tronco hematopoiéticas são comprometidas com a linhagem osteoclástica através da sinalização via moléculas PU.1, MITF e M-CSF. As células comprometidas são então diferenciadas em osteoclastos mononucleares através da sinalização RANK/RANKL, e ativação dos fatores de transcrição TRAF6 e NFATc1. A seguir, os osteoclastos mononucleares sofrem fusão intracelular via DC-STAMP e ATP6V0d2. Por fim, os osteoclastos multinucleados reabsorvem, de maneira organizada, a matriz óssea através de duas estruturas exclusivas, a borda pregueada e o anel de actina, que isola o microambiente em reabsorção do espaço extracelular circundante (YAVROPOULOU; YOVOS, 2008; TEITELBAUM; ROSS, 2003).

Além das proteínas OPG/RANK e RANKL, outras moléculas produzidas principalmente pelo estroma da medula óssea ou pelos osteoblastos estão envolvidas na diferenciação, maturação e ativação dos osteoclastos. Dentre eles, pode-se destacar o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), as interleucinas (IL)-1, IL-6, fator de necrose tumoral (TNF- α), prostaglandina E₂ (PGE₂) e paratormônio (PTH) (**Figura 2**). Outras citocinas como interferon (IFN)- γ , IL-4 e IL-10, no entanto, têm a função de inibir a ativação dos osteoclastos, por atuarem inibindo a ativação dos macrófagos presentes na medula óssea, células precursoras dos osteoclastos (SILVEIRA; FRANCO; NASCIMENTO, 2009).

Dois fatores principais envolvidos na diferenciação e função dos osteoclastos são o M-CSF e RANKL. M-CSF liga-se ao receptor do fator estimulador de colônias 1 (c-Fms / CSF1-R) em precursores de osteoclastos e promove a sua sobrevivência e proliferação através da ativação de ERK e PI3K/Akt. M-CSF também estimula a expressão de RANK em precursores de osteoclastos (KHOSLA, 2001). RANKL, que é produzido principalmente por condrócitos e osteócitos hipertróficos, liga-se a RANK em osteoclastos precursores e osteoclastos maduros, induzindo o recrutamento de moléculas adaptadoras, incluindo o fator 6 associado aos receptores de TNF (TRAF6) (LOMAGA et al., 2009; KOBAYASHI et al., 2001; ARMSTRONG; LEES, 2002).

TRAF6 então ativa múltiplas vias de sinalização intracelulares, tais como o NF- κ B e MAPKs, incluindo JNK, p38-quinase e ERK (FRANZOSO, 1997). TRAF6 também interage com c-Src para ativar a via PI3K/Akt. Além disso, o RANKL induz a expressão de c-Fos, um membro da família do fator de transcrição AP-1. Espécies reativas do oxigênio (ROS), gerados após a estimulação de RANKL, regulam as vias de sinalização RANK, incluindo Akt, MAPK e NF- κ B, promovendo, assim, a osteoclastogênese (KIM et al., 2010). Estas vias desempenham papéis essenciais na osteoclastogênese, de tal modo que a não produção e/ou função de um único fator pode alterar a diferenciação dos osteoclastos e a reabsorção do osso (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

Recentemente, atenção tem sido dada ao papel regulatório pelos microRNAs (miRNAs) na reabsorção osteoclástica, ampliando os conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na diferenciação dessas células. Isso porque os miRNAs desempenham um papel importante em numerosos processos celulares, incluindo a diferenciação celular e apoptose, por regulação pós-transcricional de genes. Nesse sentido, vários miRNAs foram descritos como reguladores da diferenciação, função e sobrevivência dos osteoclastos (SUGATANI; VACHER; HRUSKA, 2011; SUGATANI; HRUSKA, 2013; LEE et al., 2013). Atualmente, embora a literatura apresente um amplo conhecimento sobre os mecanismos regulatórios envolvidos na diferenciação dos osteoclastos, pouco é conhecido sobre os mecanismos que modulam a função destas células (CHAMBERS, 2000; TAKAYANAGI, 2005; FULLER; KIRSTEIN; CHAMBERS, 2006).

Figura 2: Esquema da interação entre osteoblastos-osteoclastos para a indução da osteoclastogênese. Células estromais e de linhagem osteoblástica sintetizam fatores essenciais para a indução da osteoclastogênese e sua regulação. Células comprometidas com a linhagem osteoclástica são diferenciadas em osteoclastos através da sinalização RANK/RANKL. A OPG é liberada por osteoblastos/células estromais como uma proteína solúvel e compete com RANK pela ligação com RANKL. Os osteoblastos/células estromais ainda sintetizam outras moléculas, que também estão envolvidas na diferenciação e ativação de osteoclastos, como IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α e PGE₂.

Sabendo-se que os osteoclastos estão envolvidos na reabsorção óssea, é de interesse da comunidade científica, portanto, promover novas terapias para doenças osteodegenerativas, objetivando inibir a formação e/ou ativação dessas células. Diversas possibilidades de tratamento foram descritas e são atualmente utilizadas na terapia da osteoporose, como os bifosfonatos (BPs) e a calcitonina, os quais inibem a reabsorção óssea através da inibição da formação dos osteoclastos, além de promoverem a apoptose dessas células *in vivo* e *in vitro* (PLOTKIN et al., 1999; SUTHERLAND et al., 2009).

A deficiência estrogênica causa a diminuição de massa óssea. Este processo é resultante de um aumento da remodelação óssea, sendo a reabsorção maior que a neoformação (TANAKA et al., 2002). Em estudos experimentais realizados com ratas ovariectomizadas e submetidas ao tratamento com reposição de estrógeno, observou-se redução significativa no número de osteoclastos em

relação àquelas não submetidas ao tratamento, sugerindo que o estrógeno inibe a formação e a atividade de osteoclastos. Além disso, as células exibiram a cromatina condensada, característica de morte celular (HUGHES et al., 1996). Pode-se inferir, então, que o efeito terapêutico da reposição com estrógeno na osteoporose é mediado pela regulação negativa da sobrevivência de osteoclastos ativados (HUGHES et al., 1996; FALONI, 2006).

A apoptose celular desempenha papel importante nos processos fisiológicos por manter e regular a formação e a função das células nos tecidos (GEWIES; GRIMM, 2003). Vários genes e proteínas atuam na regulação da apoptose, seja estimulando, como as caspases (FAN et al., 2005), ou inibindo, como as c-IAP1, c-IAP2 e as codificadas pelos genes Bcl. O ácido ascórbico, IL-1 e M-CSF inibem a apoptose de osteoclastos através da inibição da atividade das caspases ou aumento da expressão de proteínas inibidoras da apoptose (NOXON et al., 2001).

2.1.3 Metaloproteinases de matriz associadas à atividade dos osteoclastos

A degradação da matriz extracelular é um evento de grande importância no processo de morfogênese e reparo do tecido ósseo, visto que o desequilíbrio entre produção e reabsorção de osso é a causa de diversas patologias ósseas (NAGASE; TANAKA, 2006).

As enzimas que degradam a matriz extracelular são conhecidas como MMPs, que compõem a família das endopeptidases Zn^{2+} - dependente e requerem Ca^{+2} para sua estabilidade e atividade. Os componentes desta família são secretados como proenzimas, liberadas por macrófagos, neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células tumorais frente a inúmeros estímulos. Aproximadamente 25 proteínas são encontradas na família das MMPs, entre elas as gelatinases A e B, conhecidas como MMP-2 e -9, respectivamente, que degradam colágeno (ARAÚJO et al., 2011).

A MMP-9 é expressa principalmente em osteoclastos, e apresenta importante papel na reabsorção óssea, com capacidade de degradar fibrilas de colágeno da matriz óssea em conjunto com a MMP-1 e proteinases cisteínicas (OKADA et al., 1995). Trabalhos realizados com cultura de macrófagos alveolares,

neutrófilos, trofoblastos, queratinócitos, células tumorais e linfócitos T humanos mostraram a expressão de MMP-9. Osteoclastos que expressam gelatinase B geralmente apresentam marcação positiva para TRAP (REPONEN et al., 1994).

A matriz extracelular é degradada pelas MMPs com a finalidade de liberar espaço, facilitar a migração celular, regular a arquitetura do tecido ósseo, produzir fragmentos com função biológica, influenciar processos fisiológicos, como o processo de reparo, entre outros. Os fragmentos de colágeno são liberados a partir da ação das collagenases, e, posteriormente, são degradados pelas gelatinases. A MMP-2 apresenta peso molecular de 72-kD enquanto a MMP-9 tem peso molecular de 92-kD (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007).

É conhecido na literatura que a falta de MMP-9 reflete no atraso de reparo das fraturas ósseas (COLNOT et al., 2003), e MMP-9 assim como a MMP-13 estão relacionadas a defeitos no desenvolvimento ósseo (STICKENS et al., 2004). MMP-14 mostrou relação com defeitos no remodelamento do esqueleto, além de inibir a erupção do dente e alongamento da raiz (HOLMBECK et al., 2005; BIRKEDAL et al., 1993; GUO et al., 2004). Já a MMP-2, que é predominantemente expressa em osteoblastos, quando tem seus genes codificantes mutados, apresenta relação com nódulos cutâneos, artropatia, osteólise focal e síndromes que incluem malformação da face, baixa estatura e perda de massa óssea em humanos (INOUE et al., 2006).

As MMPs apresentam inibidores teciduais (TIMPs) que constituem uma família de pelo menos 4 proteínas com peso molecular de 20-29 kDa, com função de inibir as metaloproteinases de maneira reversível. Os TIMPs agem localmente e podem promover crescimento celular, independente da sua atividade inibitória. Estudos sugeriram que a proteína RECK tem participação na regulação de atividade de MMPs a partir da interação com MMP-2 e -9 (SASAHARA et al., 2002; NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006).

2.2. FLÚOR NOS TECIDOS MINERALIZADOS

O elemento químico flúor (F) tem seu nome originado da palavra *fluere* do latim, que significa fluir. Em condições normais de temperatura e pressão, é um elemento gasoso de cor amarelada, representado pela letra F, número atômico 9, peso atômico 19, ponto de fusão -219,62 e ponto de ebulição -188,12°C. Por ser o elemento mais eletronegativo e reativo da tabela periódica, o íon fluoreto se liga mais facilmente a qualquer outra molécula, e esta ligação é mais estável do que uma ligação entre dois átomos de flúor (F₂) (SMITH; EKSTRAND, 1996a; PEIXOTO, 1998; BUZALAF; CARDOSO, 2008).

O íon fluoreto (F⁻) é o 13º dos elementos mais abundantes na crosta terrestre, presente no solo, rochas e água. Apresenta-se em concentrações variadas na litosfera, atmosfera, biosfera e hidrosfera. Na natureza, geralmente é encontrado na sua forma inorgânica. Já em organismos biológicos, é considerado um elemento traço, uma vez que sua concentração apresenta-se em partes por milhão (ppm) (SMITH; NINCI, 1996).

O F⁻ é considerado um micronutriente importante para o crescimento e desenvolvimento de plantas e animais quando presente em níveis adequados, assim como para a manutenção e integridade dos dentes e ossos (LEVY, 2003). Acumula-se nos tecidos mineralizados, podendo alterar a composição química dos mesmos e causar alterações patológicas, como a fluorose dentária e esquelética (YAN et al., 2007).

O F⁻ desempenha um papel fundamental no controle da cárie dentária, porém, exposição à quantidades elevadas desse elemento pode causar reações adversas, de intensidades e formas de manifestação dose-dependentes (BUZALAF, 2008). As principais fontes de exposição sistêmica ao fluoreto são representadas pela dieta (água e alimentos) e produtos dentais contendo F⁻ (TUBERT et al., 2011).

Aproximadamente 80-90% do F⁻ ingerido é absorvido a partir do trato gastrointestinal por difusão passiva sem o requerimento de transportadores específicos (WHITFORD, 1996). Entretanto, a descoberta recente de canais baseados em proteínas denominadas “Fluc”, a partir da sua purificação em bicamadas lipídicas, com alta especificidade para F⁻ em relação ao íon Cl⁻, aponta para novas possibilidades da interação entre o F⁻ e as células (STOCKBRIDGE et

al., 2013). Recentemente, foi demonstrado, em células bacterianas, que o transporte de F^- em lipossomos é dependente de proteínas transportadoras tipo “CLC” (STOCKBRIDGE et al., 2012). Além disso, a existência de um exportador de F^- denominado “FEX”, responsável por promover o efluxo de F^- , foi descrito em células eucarióticas (LI et al., 2013). A importância desse exportador F^- -específico está baseada em permitir a sobrevivência de organismos como, por exemplo, os fungos em ambientes com concentrações tóxicas de F^- . Embora a expressão de nenhum desses canais tenha sido descrita em células de mamíferos, eles abrem novas perspectivas com relação ao transporte inter e intracelular de F^- (LI et al., 2013).

O F^- tem efeito na parte mineral do osso, assim como nas células e arquitetura ósseas (GRYNPAS, et al., 2000). Estudos avaliando o F^- como agente terapêutico para doenças degenerativas do tecido ósseo mostraram que em baixas doses, o F^- pode levar a um aumento na massa óssea (RICH; ENSINCK, 1961; JOWSEY et al., 1972; BRIANCON; MEUNIER, 1981; DE LA SOTA et al., 1997). Embora tenha sido mostrado um efeito positivo do F^- na densidade óssea axial, o mesmo não contemplou todos os pacientes, sendo que um terço dos mesmos não foi responsivo ao tratamento. (DEQUEKER; DECLERCK, 1993). Além da concentração do fluoreto ser um importante parâmetro relacionado à toxicidade, outros fatores podem influenciar no desenvolvimento de fluorose dentária e esquelética, como gênero, idade, e origem da população de estudo (RUSSEL, 1962; BUTLER; SEGRETO; COLLINS, 1985; YODER et al., 1998; CHOUBISA S; CHOUBISA L; CHOUBISA D, 2001). Sugeriu-se, portanto, que determinantes genéticos podem influenciar na suscetibilidade ou resistência de um indivíduo frente ao tratamento com F^- (MOUSNY et al., 2006).

Em modelos experimentais, EVERETT et al. (2002) avaliaram se determinantes genéticos poderiam influenciar a resistência ou suscetibilidade ao F^- no desenvolvimento de fluorose dentária. A avaliação de 12 linhagens isogênicas de camundongos mostrou diferenças na suscetibilidade ou resistência à fluorose dentária, embora as linhagens mostrassem a mesma concentração de F^- nos tecidos mineralizados. Nesse contexto, a linhagem AJ mostrou-se altamente suscetível ao efeito do F^- , com início rápido e desenvolvimento de fluorose dentária severa, enquanto a linhagem 129P3/J foi menos afetada, apresentando fluorose dentária mínima. Esses dados confirmaram a hipótese de contribuição de um componente genético na suscetibilidade/resistência ao tratamento com F^- . Além disso, mostrou-se

que a maior suscetibilidade nos animais A/J não está relacionada com maior absorção e/ou menor excreção de F^- (CARVALHO et al., 2009).

Com o objetivo de avaliar o efeito do F^- na formação óssea *in vivo* em animais com diferentes suscetibilidades aos efeitos do F^- , KOBAYASHI et al. (2014) avaliaram o perfil global de proteínas do osso das linhagens AJ e 129P3/J, utilizando uma abordagem proteômica “label-free”, em associação com a avaliação da formação de osso *in vivo* sob exposição dos animais ao F^- . Os resultados mostraram aumento significativo da formação óssea apenas nos animais da linhagem 129P3/J e não em animais A/J. Além disso, as proteínas moduladas pelo F^- estão relacionadas à função de ambos, osteoblasto e osteoclasto, e ainda se mostram ser dependentes na linhagem e da dose de F^- . Com relação aos osteoblastos, diversos estudos têm demonstrado que o F^- , em níveis fisiológicos, promove a proliferação de osteoblastos, enquanto em níveis elevados, levam à apoptose (ALLOLIO; LEHMANN, 1999). Para compreender a contribuição individual dos osteoblastos como células-alvo da ação do F^- nessas linhagens de animais, osteoblastos primários diferenciados a partir de células-tronco mesenquimais de animais A/J e 129P3/J, foram submetidos ao tratamento com F^- seguido da avaliação da diferenciação osteoblástica, incluindo a proliferação de precursores osteoblásticos, a formação da matriz óssea e a mineralização. De maneira inesperada, todas as fases foram positivamente moduladas pelo F^- em células de ambas as linhagens. Esses efeitos dependeram apenas do tempo de exposição das células ao F^- , onde as células da linhagem 129P3/J se mostraram mais precoces enquanto as da linhagem A/J, mais tardias aos efeitos do F^- (Peres-Buzalaf et al., 2015 dados não publicados).

Com relação ao efeito do F^- nos osteoclastos e a relação com o *background* genético, até o momento, muito pouco se sabe. Dados *in vitro* mostram resultados controversos. A cultura de osteoclastos *in vitro* na presença de F^- aumentou a atividade de TRAP, promovendo a formação de osteoclasto e o aumento da capacidade de reabsorção óssea (HUA et al., 2003; DEBINSKI; NOWICKA., 2004). Outros trabalhos, porém, mostraram que o fluoreto em excesso reduz o número de osteoclasto e diminui a reabsorção óssea (OKUDA; KANEHISA; HEERSCHE, 1990; HUA; BU; LI, 2003).

PEI et al. 2012 estudaram o efeito do F^- na formação, função e regulação de osteoblastos, a partir de osteoclastos provenientes da medula óssea de camundongos, sob o tratamento com o receptor ativador do ligante NF- κ B e fator

estimulador de colônia de macrófagos. Os resultados mostraram que o F^- , na concentração de 8 mg/L não teve efeito na formação de osteoclastos. No entanto, a reabsorção de osteoclastos foi significativa na dose de 0.5 mg/L.

YAN et al. (2007) realizaram um estudo *in vivo* com camundongos fêmeas das linhagens C57BL/6J (B6) e C3H/HEJ (C3H), tratadas com NaF na água de beber nas concentrações de 0, 50 e 100 ppm de F^- , por 3 semanas. Os resultados mostraram um efeito anabólico do F^- em B6, enquanto em C3H foi observado um aumento da osteoclastogênese.

Esses dados sugerem que os osteoclastos sejam as células-alvo do F^- , e que o efeito do tratamento com F^- seja dependente da linhagem de camundongos, mas nada se sabe sobre seu envolvimento na osteoclastogênese de células dos animais A/J e 129P3/J.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o efeito do F^- na regulação da diferenciação e ativação de osteoclastos primários obtidos de camundongos com diferentes suscetibilidades aos efeitos do F^- nos ossos.

Objetivo Específico:

- Avaliar, em células provenientes de animais A/J e 129P3/J, o efeito do tratamento com F^- na diferenciação de osteoclastos através da contagem de células TRAP-positivas, bem como na ativação, através da quantificação da atividade das enzimas TRAP, MMP-2 e -9.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos (fêmeas ou machos) pertencentes às linhagens A/J e 129P3/J com 6-10 semanas de idade, provenientes do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru, FOB, Universidade de São Paulo, Bauru, SP. Essas linhagens de animais isogênicos não são geneticamente modificadas e a sua utilização deve-se ao fato das mesmas apresentam propriedades mecânicas dos ossos e de formação óssea, diferentemente moduladas após tratamento *in vivo* com F^- (MOUSNY et al., 2006; KOBAYASHI et al., 2014). Camundongos A/J não têm aumento significativo de formação óssea e apresentam profundas alterações nas propriedades mecânicas dos ossos, como elevada compressão vertebral e fraturas de fêmur após exposição ao F^- . Já os camundongos 129P3/J aumentam a formação óssea e não apresentam nenhuma alteração mecânica. Os animais foram mantidos com livre acesso à água deionizada e ração comercial com baixo teor de F^- (< 1,0 ppm) até o momento da eutanásia para a coleta das células da medula óssea. Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais da FOB-USP (processo nº24/2012, anexo 1).

4.2 CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOCLASTOS

A cultura de osteoclastos foi realizada a partir das células-tronco hematopoiéticas obtidas da medula óssea (SUDA et al., 1999). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. A seguir, os ossos longos (fêmur e tíbia) foram retirados assepticamente por procedimento cirúrgico e mantidos no gelo em meio de cultura α -MEM (Gibco, SP, Brasil) acrescido de 2% de penicilina/streptomicina (Gibco, SP, Brasil). As epífises dos ossos longos foram cortadas, e a obtenção das células totais da medula óssea foi realizada utilizando-se a técnica de “*flushing out*” com meio α -MEM contendo 10% de soro bovino fetal

(SBF) e 1% de penicilina/streptomicina (α -MEM/ 10% SBF) (MIURA et al., 2004). A suspensão de células foi centrifugada por 10 minutos a 1200 rpm, 4°C. O *pellet* foi lavado com tampão de lise de hemácias (0,83% NH_4Cl) por duas vezes e ressuspenso em α -MEM/ 10% SBF. A suspensão foi então incubada em meio α -MEM/ 10% SBF acrescido do fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) (R&D Systems, Minneapolis, MN) na concentração de 50 ng/ml em garrafas de 25 cm^2 por 24 horas a 37°C/5% CO_2 . A continuação do protocolo de cultivo celular nos dias subsequentes é descrita nos itens a seguir, de acordo com cada procedimento experimental.

Figura 3 – Obtenção de células da medula óssea de camundongos. Fêmur e tíbia obtidos de animais A/J e 129P3/J tiveram o músculo removido e as epífises cortadas para a coleta das células totais da medula óssea.

4.2.1 Cultura primária de osteoclastos para ensaios da atividade e da contagem de células TRAP-positivas

Após as 24h de incubação em meio α -MEM/ 10% SBF acrescido de 50 ng/ml M-CSF, as células em suspensão foram removidas da garrafa, contadas e novamente plaqueadas na densidade de 1×10^5 células/poço em placas de 96 poços e cultivadas em meio α -MEM/10% SBF acrescido de M-CSF (50 ng/ml) e RANKL (50 ng/ml) (Peprotec Brasil-Funpec, São Paulo, Brasil) na presença ou não de F em diferentes concentrações (10^{-3} , 10^{-4} , 5×10^{-5} , 1×10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} e 10^{-9} M) por mais 6 dias na estufa a 37°C 5% CO_2 . O F foi administrado na forma de NaF (Merck KGaA, Darmstadt, Germany). O meio contendo os fatores de diferenciação acrescido ou não de F foram trocados a cada 72 h. A avaliação da atividade da TRAP e a fixação das células para a contagem de osteoclastos foi realizada no 7º dia após o início da cultura, descritos nos itens 4.4 e 4.3, respectivamente.

4.2.2 Cultura primária de osteoclastos para zimografia

Após as 24h de incubação em meio α -MEM/ 10% SBF e 50 ng/ml M-CSF em garrafas de 25 cm² a 37°C/5% CO₂, as células não aderentes foram coletadas e transferidas para uma nova garrafa de 25 cm² contendo meio α -MEM/ 10% SBF e 50 ng/ml M-CSF, por 3 dias a 37°C/5% CO₂. No 4º dia de cultura, as células em suspensão foram descartadas e as células aderentes foram consideradas macrófagos derivados da medula óssea, os quais foram plaqueados em placas de 24 poços na densidade de 2x10⁵ células/poço e tratados com meio α -MEM sem SBF acrescido de M-CSF (50 ng/ml) e RANKL (50 ng/ml) na presença ou não de F em diferentes concentrações (10⁻³ e 10⁻⁵ M) por 24 h a 37°C/5% CO₂. A atividade das MMPs foi avaliada naquelas produzidas e liberadas no meio de cultura. Para tanto, os sobrenadantes foram coletados e as proteínas totais foram quantificadas por ensaio de Bradford. A seguir, as amostras foram armazenadas para posterior análise por zimografia.

4.3 MARCAÇÃO HISTOQUÍMICA DA TRAP

A formação do número de osteoclastos foi avaliada por meio do kit de fosfatase ácida-leucócitos (Procedimento n° 386, Sigma Aldrich, Missouri, EUA). O protocolo para este ensaio foi adaptado de BELLESINI (2010). Em resumo, após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas uma vez com água deionizada e fixadas com solução de citrato/acetona durante 30 segundos à temperatura ambiente. Posteriormente, os poços foram lavados mais uma vez com água deionizada e secos ao ar durante pelo menos 15 minutos. Em seguida, as células foram incubadas com uma solução de coloração composta por água destilada pré-aquecida, solução de acetato, solução de ácido fosfórico naftol AS-BI, solução de tartaratos e sal de granada permanente GBC, de acordo com as instruções do kit, durante 1 h a 37°C, ao abrigo da luz. Após o período de incubação, os poços foram lavados com água deionizada durante 3 minutos e na sequência, foi

feita a coloração com hematoxilina ácida por 3 minutos. Os poços foram posteriormente lavados com água deionizada por 3 minutos e deixados secar ao ar.

De acordo com o kit comercial, o naftol AS-BI, liberado pela hidrólise enzimática, acopla-se imediatamente à granada permanente GBC formando depósitos insolúveis de coloração castanha-avermelhada apenas em células resistentes ao tartarato.

Para a contagem dos osteoclastos, foram selecionados aleatoriamente 10 campos por poço. Células resistentes ao tartarato e multinucleadas apresentando 2 ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos, utilizando microscópio invertido equipado com câmera (Leica/DM IRBE) na objetiva de 40x (Figura 4).

Figura 4 – Microscópio Invertido equipado com câmera Leica/DM IRBE

4.4 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE TRAP

O ensaio da atividade da enzima TRAP foi adaptado de TINTUT et al. (2002). Em resumo, as células, no 7º dia de cultura, tiveram o sobrenadante removido, foram lavadas com PBS 1x, seguido da adição de 80 µl de tampão de lise contendo 90 mM citrato (pH 4,8), 0,1% Triton X-100 e 80 mM tartarato de sódio durante 10 minutos. A seguir, 80 µl da solução de substrato contendo 20 mM de fosfato de p-nitrofenil acrescido da solução de lise foram adicionados e as células

foram incubadas a 37 °C, sob leve agitação em equipamento “Thermomixer” (Eppendorf) (Figura 5) para permitir a ocorrência da reação. O tempo foi cuidadosamente cronometrado. Após a observação da coloração amarela (aproximadamente 5 min), resultado da formação do p-nitrofenol formado pela reação entre a fosfatase ácida presente na amostra e o substrato adicionado no ensaio, a reação foi paralisada com a adição de 40 µl de 0,5 M NaOH. A leitura da absorbância do produto final (p-nitrofenol) foi feita em leitor de microplaca Synergy H1, Biotek, com o auxílio do programa Gen 52.06, no comprimento de onda de 405 nm ($\epsilon = 18,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os resultados foram expressos como a unidade enzimática (EU) específica ($\text{nmol p-nitrophenol min}^{-1}$), calculada usando a equação $\text{UE} = (\text{absorbância} \times \text{volume final (mL)}) / (\text{volume da amostra (uL)} \times \epsilon \times \text{tempo de reação por minuto})$.

Figura 5 – Incubação das células para a quantificação da atividade enzimática de TRAP

4.5 ZIMOGRÁFIA

A atividade de MMP-2 e -9 foi detectada em gel de zimografia, adaptado de WEI et al. (2013). As amostras (20 µg de proteína total) e as proteínas recombinantes rMMP-2 e rMMP-9 (Calbiochem, San Diego, CA, EUA) (2,5 µg), foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 11% SDS copolimerizado

com 1% de gelatina (**Figura 6A**). Depois da eletroforese, os géis foram lavados 3 vezes no tampão de lavagem (125 ml de Triton X-100, 10ml de NaN_3 a 10% em 5 litros de água deionizada) e incubados no tampão de incubação (12,11 g de Tris base; 1,47 g de CaCl_2 ; 200 μl de ZnCl_2 a 10mM; 4 ml de NaN_3 a 10% em 2 litros de água deionizada, pH 7,5) a 37° por 18 horas. Os géis foram corados com 0,1% Coomassie blue R250 (30% metanol, 10% ácido acético glacial, 0,1% Coomassie Blue R250 em água deionizada) e descorados com solução descorante (30% metanol e 10% ácido acético em água deionizada) (**Figura 6B**). As gelatinases A e B foram detectadas como bandas transparentes resultantes da capacidade de digerir o substrato (gelatina) que contrastam com o restante do gel, que apresenta substrato intacto e fortemente corado de azul (**Figura 6C**). O gel foi digitalizado com o auxílio do scanner Loccus Biotecnologia – modelo DS - 6000 utilizando o programa Lab Image 1D. A análise da densitometria foi obtida a partir do programa ImageJ (NIH, Bethesda, EUA).

Figura 6 – Imagem ilustrativa dos passos da técnica de zimografia

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism (version 4.0 for Windows, GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Os experimentos foram realizados pelo menos 3 vezes. Ambos os ensaios da TRAP foram realizados em sextuplicata. Para a análise da zimografia, em cada experimento, utilizou-se o *pool* de quatro amostras independentes para cada grupo experimental. Inicialmente, os resultados foram submetidos ao teste de normalidade utilizando o programa Instat. A seguir, os resultados foram submetidos ao teste paramétrico ANOVA *One-way* ou *Two-way* seguido do teste Bonferroni *post hoc* para comparações entre pelo menos 3 grupos experimentais. O teste *t* foi aplicado na análise estatística de dois grupos experimentais. A significância estatística foi considerada para valores de $p < 0,05$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 AS LINHAGENS A/J E 129P3/J NÃO DIFEREM QUANTO AO POTENCIAL OSTEOCLASTOGÊNICO

Inicialmente, o objetivo foi comparar o potencial osteoclastogênico entre as células das linhagens A/J e 129P3/J, pela determinação da atividade de TRAP. Como mostrados na Figura 7, as células das linhagens A/J e 129P3/J não diferiram com relação à atividade TRAP de osteoclastos diferenciados *in vitro* na presença de meio osteoclastogênico, no 7º dia de cultura.

Figura 7 – Comparação da atividade da TRAP entre as linhagens de camundongos. As células não aderentes derivadas da medula óssea dos animais A/J e 129P3/9 foram cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) e RANKL (50 µg/ml) em meio α -MEM/10%SBF por 7 dias. A atividade da enzima TRAP foi determinada a partir da utilização do substrato p-nitrofenilfosfato, seguida da leitura em espectrofotômetro. A unidade enzimática (UE) é dada em nmol p-nitrophenol min⁻¹, calculada usando a equação $UE = (\text{absorbância} \times \text{volume final (mL)}) / (\text{volume da amostra (uL)} \times \epsilon \times \text{tempo de reação por minuto})$. Os dados são mostrados como a Média $\pm$ desvio padrão da UE de um experimento representativo (sextuplicata), de três realizados independentemente.

5.2 O F^- MODULA A OSTEOCLASTOGÊNESE DE MANEIRA DEPENDENTE DA LINHAGEM

A seguir, avaliou-se o efeito do F^- nas concentrações de 10^{-9} , 10^{-7} , 10^{-5} , 5×10^{-5} , 10^{-4} e 10^{-3} M na atividade específica da TRAP em células de ambas as linhagens estudadas (**Figura 8A e 8B**). Foi demonstrado que o tratamento das células obtidas dos animais A/J com F^- associado aos fatores de crescimento e diferenciação aumentou significativamente a atividade da TRAP quando comparado com as células cultivadas na ausência de F^- (**Figura 8A**). Observou-se que esse efeito do F^- não se mostrou dependente da concentração uma vez que todas as concentrações testadas (de 10^{-9} a 10^{-3} M) aumentaram significativamente a atividade da TRAP em relação as células dos animais A/J tratadas apenas com as proteínas recombinantes, exceto a concentração de 10^{-4} M. Essa última induziu o aumento da atividade enzimática, porém, não houve diferença significativa (**Figura 8A**). Além disso, não houve diferença significativa nas comparações entre as doses, exceto aquelas que envolvem a concentração de 10^{-4} M F^- . Diferentemente, as células dos animais 129P3/J não tiveram a atividade enzimática da TRAP alterada significativamente por nenhuma concentração de F^- utilizada em relação às células controle (**Figura 8B**). Esses resultados sugerem que o F^- aumenta a osteoclastogênese em células dos animais A/J, mas não altera em células do 129P3/J.

Figura 8A - Efeito do F⁻ na atividade da TRAP em osteoclastos da linhagem A/J. As células não aderentes da medula óssea dos animais da linhagem A/J foram cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) e RANKL (50 µg/ml) acrescidas das concentrações indicadas de F⁻ em meio α-MEM/10%SBF por 7 dias. A unidade enzimática (UE) é dada em nmol p-nitrophenol min⁻¹, calculada usando a equação $UE = (absorbância \times volume\ final\ (mL) / (volume\ da\ amostra\ (uL) \times \epsilon \times tempo\ de\ reação\ por\ minuto)$. Os dados são mostrados como a Média +/- desvio padrão da UE de um experimento representativo (sextuplicata), de três realizados independentemente.

*** p<0,001; ** p<0,01 e * p<0,05 representam diferenças significativas entre os grupos tratados com F⁻ nas respectivas doses e o grupo controle cultivado na presença apenas das proteínas recombinantes M-CSF e RANKL.

Figura 8B - Efeito do F⁻ na atividade da TRAP em osteoclastos da linhagem 129P3/J. As células não aderentes da medula óssea dos animais da linhagem 1293/J foram cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) e RANKL (50 µg/ml) acrescidas ou não das concentrações indicadas de F⁻ em meio α-MEM/10%SBF por 7 dias. A unidade enzimática (UE) é dada em nmol p-nitrophenol min⁻¹, calculada usando a equação $UE = (\text{absorbância} \times \text{volume final (mL)}) / (\text{volume da amostra (uL)} \times \epsilon \times \text{tempo de reação por minuto})$. Os dados são mostrados como a Média $\pm$ desvio padrão da UE de um experimento representativo (sextuplicata), de três realizados independentemente.

5.3 O F⁻ AUMENTA A FORMAÇÃO DE OSTEOCLASTOS EM CÉLULAS DA LINHAGEM A/J

Uma vez que o efeito do F⁻ na atividade de TRAP mostrou-se ser dependente da linhagem, aumentando em células da linhagem A/J, independente da concentração testada, e não alterando em 129P3/J, o próximo passo foi verificar se essas concentrações de F⁻ também modulam a formação de osteoclastos. Baseado no fato de que o efeito do tratamento com F⁻ em osteoblastos primários obtidos das mesmas linhagens de animais está sendo avaliado nas concentrações de 10⁻⁵ e

10^{-3} M em outro trabalho do grupo de pesquisa, optou-se por restringir a análise a seguir nas referidas concentrações, para fins comparativos.

As fotomicrografias das células nos diferentes grupos experimentais estão mostradas nas **figuras 9A e 9B**, por marcação histoquímica para TRAP usando kit comercial específico. Como observado na **figura 9A e B**, o tratamento com F^- , na concentração de 10^{-3} M, em associação às proteínas recombinantes, aumentou significativamente o número de osteoclastos diferenciados a partir de células da linhagem A/J, em relação às células do grupo controle. A concentração de 10^{-5} M F^- também aumentou a contagem de osteoclastos formados, porém a análise estatística não mostrou significância (**Figura 9C**). Foram considerados osteoclastos diferenciados as células com marcação positiva para TRAP contendo pelo menos 2 núcleos. É interessante ressaltar que a morfologia das células A/J tratadas com F^- se mostraram intensamente alteradas, como revelado pelo aumento do número de vacúolos citoplasmáticos nos osteoclastos, um fenômeno mais proeminente na concentração de 10^{-3} M F^- (**Figura 9A**). Com relação às células 129P3/J, o tratamento com F^- não aumentou significativamente o número de osteoclastos formados em ambas as concentrações testadas (**Figura 9B e D**). Além disso, não houve alteração na morfologia dos osteoclastos diferenciados a partir das células dos animais 129P3/J frente ao F^- , diferente do observado para as células A/J (**Figura 9B**).

Figura 9A: Efeito do F⁻ na formação de osteoclastos na linhagem A/J. As imagens representam a fotomicrografia de osteoclastos por meio da marcação histoquímica para TRAP. As células não aderentes da medula óssea dos animais da linhagem A/J foram cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) e RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻³ e 10⁻⁵M de F⁻ em meio α-MEM/10%SBF por 7 dias. A formação de osteoclastos foi avaliada através do kit de fosfatase ácida-leucócito (procedimento n°386, Sigma Aldrich). Para a contagem dos osteoclastos, foram selecionados 10 campos para cada poço aleatoriamente. Células TRAP⁺ multinucleadas apresentando 2 ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos (indicadas pelas setas). As fotomicrografias representativas foram obtidas em aumento de 40x, no microscópio de fase invertida Leica/DM IRBE equipado com câmera. Os dados são mostrados como um experimento representativo (em sextuplicata), de três realizados independentemente.

Figura 9B: Efeito do F⁻ na formação de osteoclastos na linhagem A/J. A figura representa a contagem de osteoclastos por meio da marcação histoquímica para TRAP. As células não aderentes da medula óssea dos animais da linhagem A/J foram cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) e RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻³ e 10⁻⁵ M de F⁻ em meio α-MEM/10%SBF por 7 dias. A formação de osteoclastos foi avaliada através do kit de fosfatase ácida-leucócito (procedimento n°386, Sigma Aldrich). Para a contagem dos osteoclastos, foram selecionados 10 campos para cada poço aleatoriamente. Células TRAP⁺ multinucleadas apresentando 2 ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos e portanto contadas em microscópio de fase invertida. Os dados são mostrados como um experimento representativo (em sextuplicata), de três realizados independentemente. * p<0,05 representa diferença significativa entre os grupos tratados com F⁻ nas respectivas doses e o grupo controle cultivado na presença apenas das proteínas recombinantes M-CSF e RANKL.

Figura 9C: Efeito do F^- na formação de osteoclastos na linhagem 129P3/J. As imagens representam a fotomicrografia de osteoclastos por meio da marcação histoquímica para TRAP. As células não aderentes da medula óssea dos animais da linhagem 129P3/J foram cultivadas na presença de M-CSF (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e RANKL (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) acrescidos das concentrações 10^{-3} e 10^{-5} M de F^- em meio α -MEM/10%SBF por 7 dias. A formação de osteoclastos foi avaliada através do kit de fosfatase ácida-leucócito (procedimento n°386, Sigma Aldrich). Para a contagem dos osteoclastos, foram selecionados 10 campos para cada poço aleatoriamente. Células TRAP+ multinucleadas apresentando 2 ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos e portanto contadas em microscópio de fase invertida. Os dados são mostrados como um experimento representativo (em sextuplicata), de três realizados independentemente.

Figura 9D: Efeito do F⁻ na formação de osteoclastos na linhagem 129P3/J. A figura representa a contagem de osteoclastos por meio da marcação histoquímica para TRAP. As células não aderentes da medula óssea dos animais da linhagem 129P3/J foram cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) e RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻⁵ e 10⁻³ M de F⁻ em meio α-MEM/10%SBF por 7 dias. A formação de osteoclastos foi avaliada através do kit de fosfatase ácida-leucócito (procedimento n°386, Sigma Aldrich). Para a contagem dos osteoclastos, foram selecionados 10 campos para cada poço aleatoriamente. Células TRAP+ multinucleadas apresentando 2 ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos e, portanto, contadas em microscópio de fase invertida. Os dados são mostrados como um experimento representativo (em sextuplicata), de três realizados independentemente.

5.4 A ATIVIDADE DE MMP-2 E -9 POR OSTEOCLASTOS DIFERENCIADOS A PARTIR DE AMBAS AS LINHAGENS NÃO FORAM MODULADAS PELO F⁻

Avaliou-se o efeito do F⁻ nas concentrações de 10⁻⁵ e 10⁻³ M na atividade das gelatinases MMP-2 e -9 (nas formas pró-enzima e enzima ativa) através da técnica de zimografia por osteoclastos provenientes da linhagem A/J (**Figuras 11A, 11B**) e 129P3/J (**Figuras 12A, 12B**). Os resultados referentes à densitometria das enzimas pró e ativa comparando-se as linhagens são mostrados nas **figuras 13A e**

13B, respectivamente (para a MMP-2) e **figuras 14A e 14B** (para a MMP-9). Gel representativo contendo amostras de ambas as linhagens é mostrado na **figura 10**.

Pela análise densitométrica semi-quantitativa, a forma ativa da enzima MMP-2 encontra-se significativamente diminuída em relação à forma pró-enzima, independente da linhagem e do tratamento com F^- (**Figura 11A e 12A**). No entanto, as atividades das formas pró-enzima e ativa da MMP-9 permaneceram inalteradas, sugerindo que a ativação da MMP-9 nessas células foi superior à da MMP-2.

A análise pela *One-way* ANOVA mostrou que o tratamento com F^- não alterou a atividade das formas pró-ativa e ativa de ambas MMP-2 (**Figura 11A e 12A**) e MMP-9 (**Figura 11B e 12B**), em células obtidas de animais A/J e 129P3/J.

A seguir, para analisar a interação entre as variáveis linhagens e doses, foi aplicado o teste *Two-way* ANOVA. Entre todas as comparações foi observado que houve interação entre as linhagens e as doses apenas para a atividade da pró-MMP-2 ($F=19,59$) (**Figura 13A**). A atividade da pró-MMP-2 se mostrou significativamente aumentada na concentração de 10^{-5} e 10^{-3} M F^- nas células dos animais 129P3/J, quando comparado com as células dos animais A/J nas respectivas concentrações. Independente das formas da MMP-9, específica de osteoclastos, não foi observado interação entre as linhagens A/J e 129P3/J e as concentrações de F^- utilizadas.

Figura 10 – Gel representativo do padrão zimográfico das formas pró-ativas e ativas das MMP -2 e -9. As bandas com perfil das gelatinases A e B, indicadas na figura, representam as formas pró-ativa (peso molecular ~92 kDa) e ativa (~82 kDa) da MMP-9 e as formas pró-ativa (~72 kDa) e ativa (~62 kDa) da MMP-2. O equipamento Scan Loccus biotecnologia – modelo DS – 6000 foi utilizado para escanear o gel, com o auxílio do programa Lab Image 1D.

Figura 11 - Efeito do F⁻ na atividade de MMP-2 e MMP-9 em osteoclastos provenientes da linhagem A/J. Atividade das formas ativa e pró-ativa da MMP-2 (A) e MMP-9 (B) produzidas pelos osteoclastos da linhagem A/J. O gel foi confeccionado com amostras de proteínas totais do sobrenadante de células da medula óssea dos animais A/J cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) em meio α-MEM/10%SBF por 3 dias. No 4º dia, as células foram plaqueadas na densidade de 2x10⁵ em placas de 24 poços e tratadas com M-CSF (50 µg/ml), RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻⁵ e 10⁻³ M de F⁻ por 24 h. Os gráficos representam os valores da densitometria obtida através do Software Image J. Os valores densitométricos do grupo controle foram considerados como o número arbitrário 1 e os demais são relativos. Os dados são mostrados como a Média +/- desvio padrão dos números arbitrários de um experimento representativo (n=4), de três experimentos realizados independentemente. *** p<0,001 e ** p<0,01 representam diferenças significativas na atividade de MMP-2 nas formas pró-enzima e enzima ativa.

Figura 12 - Efeito do F⁻ na atividade de MMP-2 e MMP-9 em osteoclastos provenientes da linhagem 129P3/J. Atividade das formas ativa e pró-ativa da MMP-2 (A) e MMP-9 (B) produzidas pelos osteoclastos da linhagem A/J. O gel foi confeccionado com amostras de proteínas totais do sobrenadante de células da medula óssea dos animais A/J cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) em meio α-MEM/10%SBF por 3 dias. No 4º dia, as células foram plaqueadas na densidade de 2x10⁵ em placas de 24 poços e tratadas com M-CSF (50 µg/ml), RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻³ e 10⁻⁵ M de F⁻ por 24 h. Os gráficos representam os valores da densitometria obtida através do Software Image J. Os valores densitométricos do grupo controle foram considerados como o número arbitrário 1 e os demais são relativos. Os dados são mostrados como a Média +/- desvio padrão dos números arbitrários de um experimento representativo (n=4), de três experimentos realizados independentemente. *** p<0,001 e ** p<0,01 representam diferenças significativas na atividade de MMP-2 nas formas pró-enzima e enzima ativa.

Figura 13 - Efeito do F⁻ na atividade de MMP-2 em osteoclastos provenientes das linhagens A/J e 129P3/J. Atividade das formas ativa (B) e pró-ativa da MMP-2 (A) produzidas pelos osteoclastos das linhagens A/J e 129P3/J. O gel foi confeccionado com amostras de proteínas totais do sobrenadante de células da medula óssea dos animais A/J cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) em meio α-MEM/10%SBF por 3 dias. No 4º dia, as células foram plaqueadas na densidade de 2x10⁵ em placas de 24 poços e tratadas com M-CSF (50 µg/ml), RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻³ e 10⁻⁵ M de F⁻ por 24 h. Os gráficos representam os valores da densitometria obtida através do Software Image J. Os valores densitométricos do grupo controle foram considerados como o número arbitrário 1 e os demais são relativos. Os dados são mostrados como a Média +/- desvio padrão dos números arbitrários de um experimento representativo (n=4), de três experimentos realizados independentemente. *** p<0,001 e * p<0,05 representam diferenças significativas entre os grupos tratados com F⁻ nas respectivas doses das linhagens A/J e 129P3/J.

Figura 14 - Efeito do F⁻ na atividade de MMP-9 em osteoclastos provenientes das linhagens A/J e 129P3/J. Atividade das formas ativa (B) e pró-ativa da MMP-9 (A) produzidas pelos osteoclastos das linhagens A/J e 129P3/J. O gel foi confeccionado com amostras de proteínas totais do sobrenadante de células da medula óssea dos animais A/J cultivadas na presença de M-CSF (50 µg/ml) em meio α-MEM/10%SBF por 3 dias. No 4º dia, as células foram plaqueadas na densidade de 2x10⁵ em placas de 24 poços e tratadas com M-CSF (50 µg/ml), RANKL (50 µg/ml) acrescidos das concentrações 10⁻³ e 10⁻⁵ M de F⁻ por 24 h. Os gráficos representam os valores da densitometria obtida através do Software Image J. Os valores densitométricos do grupo controle foram considerados como o número arbitrário 1 e os demais são relativos. Os dados são mostrados como a Média +/- desvio padrão dos números arbitrários de um experimento representativo (n=4), de três experimentos realizados independentemente.

5.5 HIPÓTESE DO EFEITO DO F^- EM CÉLULAS ÓSSEAS DE ANIMAIS COM DIFERENTES SUSCETIBILIDADES AOS SEUS EFEITOS

O esquema representando a hipótese conclusiva do efeito F^- nas células ósseas é demonstrado na **figura 15**. O remodelamento ósseo, que é resultado do equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos e osteoclastos, para a manutenção da integridade óssea, é modulado diferentemente pelo F^- em células das linhagens A/J e 129P3/J. A atividade dos osteoblastos tanto de animais A/J quanto de animais 129P3/J é aumentada após tratamento *in vitro* com F^- , sendo esse efeito mais expressivo e mais rápido nas células do 129P3/J. No entanto, a formação e atividade de osteoclastos são aumentadas pelo tratamento com F^- apenas nas células dos animais A/J e inalteradas em células do 129P3/J. A modulação do F^- em células hematopoiéticas e precursoras de osteoclastos se dá através do aumento da formação de osteoclastos e da atividade de TRAP, de maneira linhagem dependente. A participação da MMP-9 na resposta ao F^- não foi confirmada e permanece desconhecida. Em conjunto, esses resultados utilizando populações celulares individualmente podem explicar o fato de o tratamento com F^- aumentar significativamente a formação óssea *in vivo* em animais 129P3/J e não em A/J (KOBAYASHI et al., 2014).

Figura 15 – Esquema da hipótese do efeito diferencial do F^- em osteoblastos e osteoclastos de animais com diferentes suscetibilidades aos seus efeitos. O sinal positivo indica modulação positiva e número de repetições representa intensidade. O símbolo X indica não modulação.

6-Discussão

6 DISCUSSÃO

A atividade dos osteoclastos é extremamente necessária para remodelamento ósseo, e não está restrita somente à função de reabsorção óssea (KARSENTY; KRONENBERG; SETTEMBRE, 2009; TEITELBAUM, 2000). Além de manter a homeostase de íons cálcio e fosfato (SCHINKE et al., 2009), a função reabsortiva dos osteoclastos parece ter relação com a formação de nichos de células-tronco hematopoiéticas na medula óssea (MANSOUR et al., 2012; LYMPERI et al., 2010; KOLLET et al., 2006; MIYAMOTO et al., 2011; TAKAMATSU et al., 1998). Além disso, trabalhos recentes mostraram que osteoclastos têm implicação no controle do metabolismo da glicose e fertilidade masculina por meio da regulação do hormônio osteocalcina. A ativação da osteocalcina pelos osteoclastos se dá por meio da descarboxilação não enzimática, dependente do pH ácido gerado durante a reabsorção óssea (FERRON et al., 2010; OURY et al., 2013). Recentemente, foi sugerido que a atividade dos osteoclastos na reabsorção óssea tem papel na regulação de formação óssea pelos osteoblastos (LOTINUN et al., 2013). Dada à variabilidade de funções fisiológicas dependente da capacidade reabsortiva dessas células, fica evidente a importância em se estudar o processo de formação e diferenciação dos osteoclastos.

Neste trabalho foi mostrado que os osteoclastos obtidos a partir de animais das linhagens A/J e 129P3/J apresentam similar atividade da TRAP. Além disso, o F^- aumenta ou não altera a atividade da TRAP, de maneira independente da concentração e dependente da linhagem de camundongos. Esses dados sugerem que os osteoclastos das duas linhagens não possuem diferenças intrínsecas pelo menos em relação à atividade da TRAP, mas diferem na presença de F^- , sendo o A/J sensível e o 129P3/J resistente aos seus efeitos. Embora tenha sido demonstrado que a qualidade do osso de camundongos A/J foi profundamente alterada após tratamento com F^- enquanto a dos animais 129P3/J permaneceu inalterada, pouco se sabe sobre a contribuição específica dos diferentes tipos de células ósseas em determinar tais diferenças. Recentemente, foi mostrado que o tratamento de animais A/J com 50 ppm de F^- na água de beber aumentou o potencial osteoclastogênico em células da medula óssea e as concentrações séricas

de sRANKL e hormônio paratireóide (iPTH), marcadores da osteoclastogênese (YAN et al., 2011). Embora os autores não tenham avaliado os mesmos parâmetros na linhagem 129P3/J, eles mostraram que o mesmo efeito não ocorreu em outras linhagens estudadas como por exemplo nas linhagens BALB/c e C57Bl/6. Assim, nossos dados corroboram a informação de que o efeito do F^- na osteoclastogênese depende do *background* genético. Isso pode explicar o fato de que apenas 1/3 dos pacientes que receberam terapia com F^- não respondem satisfatoriamente (DEQUEKER; DECLERCK, 1993). Além disso, foi mostrado que aproximadamente 40% da população que vive em áreas onde a concentração de F^- é naturalmente elevada não foram afetados pela fluorose esquelética (CHOUBISA S; CHOUBISA L; CHOUBISA D, 2001) e 5% não desenvolveram fluorose dentária (GROBLER et al, 2009). Essas duas patologias se devem à incorporação excessiva de F^- nos ossos e dentes. O papel do F^- é melhor estudado com relação ao seu impacto anabólico, embora ainda haja muitas controvérsias sobre a qualidade do osso formado (BRUN; PERA; RIGALI, 2010; REGINSTER et al, 1998). Assim, a eficácia da terapia com F^- em doenças como a osteoporose é ainda complicada, uma vez que esse íon parece ter uma resposta bifásica dose-dependente em células ósseas, estimulando a formação óssea em doses baixas e a toxicidade em altas doses (CHENG; BADER; GRYNPAS, 1995; EVERETT, 2011). Além da dose, os fatores genéticos também influenciam a ação do F^- no tecido ósseo. A administração de F^- em camundongos A/J e 129P3/J afetaram diferentemente as propriedades mecânicas dos ossos corticais e trabeculares. Testes mecânicos mostraram que o F^- promove significativa diminuição na qualidade óssea em A/J, enquanto não altera em 129P3/J (MOUSNY et al., 2006).

Em relação à formação de osteoclastos, os resultados deste trabalho mostraram que o tratamento com F^- , na concentração de 10^{-3} M, em associação às proteínas recombinantes, aumentou significativamente o número de osteoclastos diferenciados a partir de células da linhagem A/J, em relação às células do grupo controle. Durante o período de cultura, as células mononucleares foram diferenciadas em osteoclastos gigantes multinucleados através da fusão contínua de células circundantes. É importante salientar que não somente o número de células, mas a morfologia dos osteoclastos foi profundamente alterada pelo F^- , com depósito de vacúolos que assemelham aos lisossomos. A importância dos lisossomos no processo de remodelamento ósseo dá-se pela eficiência dessa organela em

promover a acidificação da lacuna de reabsorção, assim como a degradação da matriz óssea (LACOMBE; KARSENTY; FERRON, 2013).

Nesse sentido, com o objetivo de investigar o efeito do F^- na formação, função e regulação de osteoclastos, PEI et al. (2012) mostraram, em cultura de osteoclastos provenientes de macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6, que o padrão de formação de células osteoclásticas gigantes ocorre pelo processo de fusão com as células circundantes, com presença de vacúolos.

A fusão durante a formação dos osteoclastos é mediada por uma proteína retroviral denominada sincicina-1 (SOE et al., 2011). Devido às características dessa proteína, foi sugerida sua participação nos mecanismos envolvidos na efetiva da bicamada lipídica dos osteoclastos.

O efeito *in vitro* do F^- em osteoclastos ainda parece contraditório na literatura. Alguns dados revelam que o F^- , quando em excessiva concentração, aumenta a atividade da TRAP, promove a formação de osteoclastos e aumenta a capacidade de reabsorção óssea (HUA; BU; LI, 2003; DEBINSKI; NOWICKA, 2004). Entretanto, outros autores mostraram que altas concentrações de F^- diminuíram o número de osteoclastos e a consequente reabsorção óssea (OKUDA; KANEHISA; HEERSCHE, 1990; PEI et al., 2012).

Recentemente, PEI et al. (2012) mostram que o F^- , na concentração de 8 mg/L, não alterou a formação de osteoclastos diferenciados a partir de macrófagos da medula óssea de camundongos C57BL/6. No entanto, o F^- na concentração de 0.5 mg/L diminuiu significativamente a atividade de reabsorção por essas células. Esse efeito ocorreu por mecanismo dependente da inibição da expressão do (NFAT)c1, e de genes que codificam proteínas da via *downstream* de sinalização como o c-Src, da isoforma d2 do domínio v0 da ATPase vacuolar (H1), da MMP-9 e catepsina K. Essas alterações são responsáveis pela diminuição da acidificação pelos osteoclastos, reduzida da secreção de enzimas proteolíticas e da reabsorção óssea.

A osteogênese, assim como o remodelamento ósseo, são processos MMP-dependentes, visto que osteoblastos e osteoclastos expressam MMPs (MOSIG et al., 2007). A maior parte das MMPs é sintetizada na forma de precursores inativos, e torna-se ativada por clivagem proteolítica de um pró-peptídeo N-terminal. As gelatinases, denominadas MMP-2 e -9, desempenham função importante na proteólise e disjunção de membranas basais, de colágeno, fibronectinas, elastinas,

assim como outros componentes da matriz extracelular (STERNLICHT; WERB, 2001). Trata-se de proteases lisossomais que contribuem para o processo de degradação da matriz óssea e medeia a liberação do peptídeo C- terminal do colágeno tipo I na ausência da atividade da catepsina K (HENRIKSEN et al., 2006).

Vários trabalhos da literatura mostram que as gelatinases contribuem com a reabsorção óssea por degradarem pequenos fragmentos de colágeno (PAGE-McCAW; EWALD; WERB, 2007) e por regularem a migração dos osteoclastos para os sítios de atividade de reabsorção (YU et al., 2003; BLAVIER; DELAISSÉ, 1995).

No presente trabalho foi mostrado que os osteoclastos diferenciados a partir das células de ambas as linhagens A/J e 129P3/J apresentam atividade de MMP-9 em níveis superiores aos de MMP-2. No entanto, as formas pró-enzima (não ativa) e ativas não foram alteradas pelo tratamento com F^- , independente da linhagem. NYMAN et al. (2011) mostraram, em ossos adultos, que MMP-9 é predominantemente expressa por osteoclastos e precursores dessas células. Foi demonstrado que a falta de MMP-9 reflete no atraso de reparo das fraturas ósseas (COLNOT et al., 2003). Além disso, a perda de MMP-13 e/ou MMP-9 resulta em defeitos do remodelamento ósseo, e aumento da densidade trabecular (STICKENS et al., 2004). LAUSCH et al. (2009) relataram que a perda da função da MMP-9 e a mutação pontual no alelo dominante da MMP-13 resultaram no desenvolvimento de anadislplasia metafisária em humanos, doenças de caráter autossômica recessiva e dominante, respectivamente. No entanto, em camundongos ausentes de MMPs e nessa doença não foram observadas alterações na atividade dos osteoclastos. Esses dados sugerem, portanto, que a contribuição da atividade de MMP-9 na reabsorção óssea *in vivo* ainda não está estabelecida. Assim, é possível que outra MMP, que não a MMP-9, e até mesmo outras enzimas sejam responsáveis pela capacidade reabsortiva desses osteoclastos neo-formados. Independentemente, embora nossos resultados demonstrem que a atividade da MMP-9 permaneceu inalterada pelo tratamento com F^- , não excluímos sua participação na capacidade reabsortiva dessas células. Isso porque a atividade foi determinada por zimografia, uma análise sensível, porém de caráter semi-quantitativo, onde pequenas alterações podem ser indetectáveis. Além disso, as MMPs foram avaliadas apenas no período de 24h de cultura, baseado em WEI et al., (2013). Assim, é possível supor que em outros períodos, estas possam apresentar diferenças quantitativas. Em osteoclastos diferenciados, a expressão de MMP-9 se mostrou sujeita à regulação negativa pelo

F⁻ por mecanismo dependente de NFATc1. A cinética de expressão demonstrou que o mRNA variou de um valor aproximado de zero após as primeiras 24h para aproximadamente 150 no 3º dia, com declínio no 5º dia (PEI et al., 2012). Já a MMP-2 é sintetizada principalmente por osteoblastos e regula uma diversidade de processos incluindo a diferenciação osteogênica (BARTHELEMI et al., 2012) e a absorção óssea (KUSANO et al., 2013). No entanto, a atividade da MMP-2 em osteoclastos parece ser irrelevante, de acordo com a ausência da expressão da forma ativa dessa enzima independente da linhagem. Esses dados sugerem que o envolvimento da MMP-2 no processo de formação, a partir de precursores osteoclásticos, bem como na ativação dos osteoclastos seja desprezível (BARTHELEMI et al., 2012).

PEI et al. (2012) investigaram o efeito de diferentes doses de F⁻ (0, 0.5, 2 e 8 mg/L) na formação, função e regulação de osteoclastos. A análise da cinética demonstrou que no 3º dia de cultura, o número total de osteoclastos do grupo tratado com 8 mg/L F⁻ (corresponde a 5×10^{-4} M) foi menor do que nos grupos tratados com as doses inferiores (controle, 0,5, e 2 mg/L). No entanto, a quantidade de osteoclastos gigantes aumentou significativamente comparada aos demais grupos, o que implicou em quantidades semelhantes entre os grupos, no 5º dia de cultura. Os autores concluíram que concentrações ≤ 8 mg/ml de F não alterou a formação de osteoclastos *in vitro* porém teve impacto negativo em sua função reabsortiva. No entanto, nossos resultados demonstram que a formação e/ou atividade dos osteoclastos, pelo menos no que se refere à atividade de TRAP, foi aumentada mesmo em concentrações muito inferiores, na ordem de 10^{-9} M. Enquanto não tenhamos demonstrado a dependência da concentração nessa resposta, esse fenômeno foi totalmente dependente da linhagem dos animais. Com relação à formação de osteoclastos, pelo ensaio da marcação de células TRAP+, a significância estatística se deu apenas no grupo de 10^{-3} M F⁻ (que corresponde a 19 mg/L F), embora aumento também tenha sido observado no grupo de 10^{-5} M (0,19 mg/L), porém não significativo. A escolha pela concentração de 10^{-5} M se deu pelo fato dessa corresponder à concentração de 50 ppm administrada na água de beber, utilizada nos protocolos de tratamento *in vivo*. Para fins comparativos, uma concentração 100 vezes maior (10^{-3} M) foi utilizada para avaliação do potencial citotóxico, não observado em nenhum experimento.

Assim, pode-se concluir que o F^- modula a formação e a morfologia dos osteoclastos por mecanismo dependente do *background* genético. Com relação ao potencial osteoclastogênico em resposta ao F^- , as células dos animais A/J são sensíveis enquanto a dos animais 129P3/J, são resistentes. A atividade das células neo-formadas também foi modulada pelo F^- , pelo menos em relação ao aumento da atividade da TRAP, para as células do A/J. Se esses dados estão relacionados com aumento da capacidade reabsortiva das osteoclastos na linhagem A/J, ainda não se pode afirmar. Com o esse objetivo, espera-se em um futuro próximo, realizar um ensaio de reabsorção por meio da cultura de osteoclastos diferenciados a partir das células de ambas as linhagens e na presença dessas concentrações de F^- ou não, sobre uma matriz contendo lâminas de osso bovino. Uma vez confirmada a maior capacidade de reabsorção na linhagem A/J, poder-se-ia explicar o mecanismo celular responsável pelo aumento da formação óssea *in vivo* induzida pelo F^- , nos animais 129P3/J e não nos animais A/J (KOBAYASHI et al., 2014).

7-Conclusões

7 CONCLUSÕES

Conclui-se que as células de ambas as linhagens não diferem com relação à diferenciação de osteoclastos, mas respondem diferentemente ao F^- , sendo as células dos animais A/J sensíveis e 129P3/J resistentes à osteoclastogênese *in vitro* induzida pelo F^- . Em células da linhagem A/J, a formação de osteoclastos bem como a ativação evidenciada pelo aumento da TRAP foi regulada positivamente pelo tratamento com F^- . Nas células da linhagem 129P3/J, estas respostas permaneceram inalteradas, independente da exposição a esse elemento. Além disso, a ativação da MMP-9 foi superior à da MMP-2, porém esse fenômeno não foi dependente da linhagem e da concentração de F^- .

Conclusões

Referências

REFERÊNCIAS

Allolio B, Lehmann R. Drinking water fluoridation and bone. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association*. 1999;107(1):12-20.

Andia, DC, Cerri OS, Spolidorio LC. Tecido ósseo: aspectos morfológicos e histofisiológicos. *Revista de Odontologia da UNESP*. 2006; 35(2): 191-98.

Arana-Chaves VE, Soares AMV, Katchburian E. Junctions between early developing osteoblasts of rat calvaria as revealed by freeze-fracture and ultrathin section electron microscopy. *Arch Histol Cytol*. 1995;58:285-92.

Araújo RVS; Silva FO; Melo-Junior MR; Porto, ALF. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *Rev. de Ciências Médicas e Biológicas*. 2011;10(1):82-88.

Armstrong S, Lees P. Effects of carprofen (R and S enantiomers and racemate) on the production of IL-1, IL-6 and TNF-alpha by equine chondrocytes and synoviocytes. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2002;25(2):145-53.

Atkins GJ, Findlay DM. Osteocyte regulation of bone mineral: a little give and take. *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2012; 23(8):2067-79.

Barthelemi S, Robinet J, Garnotel R, Antonicelli F, Schittly E, Hornebeck W, et al. Mechanical forces-induced human osteoblasts differentiation involves MMP-2/MMP-13/MT1-MMP proteolytic cascade. *Journal of cellular biochemistry*. 2012;113(3):760-72.

Bellesini, LS. Efeito do TAK-778 na interação osteoblasto-osteoclasto [tese]. Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2010.

Bianco P, Riminucci M, Bonucci E, Termine JD, Robey PG. Bone sialoprotein (BSP) secretion and osteoblast differentiation: relationship to bromodeoxyuridine incorporation, alkaline phosphatase, and matrix deposition. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1993;41(2):183-91.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A, et al. Matrix metalloproteinases: a review. Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists. 1993;4(2):197-250.

Blavier L, Delaisse JM. Matrix metalloproteinases are obligatory for the migration of preosteoclasts to the developing marrow cavity of primitive long bones. Journal of cell science. 1995;108 (Pt 12):3649-59.

Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone. 2008;42(4):606-15.

Boskey AL. Biomineralization: conflicts, challenges, and opportunities. Journal of cellular biochemistry Supplement. 1998;30-31:83-91.

Boskey AL. Matrix proteins and mineralization: an overview. Connective tissue research. 1996;35(1-4):357-63.

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, et al. Proteolytic activity of human osteoclast cathepsin K. Expression, purification, activation, and substrate identification. The Journal of biological chemistry. 1996;271(21):12517-24.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. Nature. 2003;423(6937):337-42.

Briancon D, Meunier PJ. Treatment of osteoporosis with fluoride, calcium, and vitamin D. The Orthopedic clinics of North America. 1981;12(3):629-48.

Brun LR, Pera LI, Rigalli A. Bone morphometry and differences in bone fluorine containing compounds in rats treated with NaF and MFP. Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. 2010;64(1):1-6.

Butler WJ, Segreto V, Collins E. Prevalence of dental mottling in school-aged lifetime residents of 16 Texas communities. American journal of public health. 1985;75(12):1408-12.

Buzalaf MAR, Cardoso VES. Destinos do fluoreto no organismo. In: Buzalaf MAR. Fluoreto e Saúde Bucal. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2008.

-
- Buzalaf, MAR. Fluoretos e saúde bucal. São Paulo: Livraria Santos Editora; 2008.
- Canhão H, Fonseca JE, Queiroz MV. Epidemiologia da osteoporose. Mecanismos de remodelação óssea e fatores protetores do osso. *Acta Reumatol Port*, 2005;30:225-240.
- Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *Journal of dental research*. 2009;88(11):1054-8.
- Chambers TJ. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *The Journal of pathology*. 2000;192(1):4-13.
- Chappard D, Libouban H, Mindeholm L, Basle MF, Legrand E, Audran M. The cathepsin K inhibitor AAE581 induces morphological changes in osteoclasts of treated patients. *Microscopy research and technique*. 2010;73(7):726-32.
- Cheng PT, Bader SM, Grynpas MD. Biphasic sodium fluoride effects on bone and bone mineral: a review. *Cells Mater*. 1995;(5):271-282.
- Choubisa SL, Choubisa L, Choubisa DK. Endemic fluorosis in Rajasthan. *Indian journal of environmental health*. 2001; 43(4):177-89.
- Colnot C, Thompson Z, Miclau T, Werb Z, Helms JA. Altered fracture repair in the absence of MMP9. *Development*. 2003; 130(17):4123-33.
- Coxon FP, Taylor A. Vesicular trafficking in osteoclasts. *Seminars in cell & developmental biology*. 2008;19(5):424-33.
- Dangelo JG, Fattini CA. *Anatomia Humana Sistêmica e Segmentar*. Ed.3. São Paulo, Rio de Janeiro, Belo Horizonte: Atheneu; 2007.
- Davis EK, Zou Y, Ghosh A. Wnts acting through canonical and noncanonical signaling pathways exert opposite effects on hippocampal synapse formation. *Neural development*. 2008; 3:32.
- De la Sota M, Puche R, Rigalli A, Fernandez LM, Benassati S, Boland R. [Changes in bone mass and in glucose homeostasis in subjects with high spontaneous fluoride intake]. *Medicina*. 1997; 57(4):417-20.

Debinski A, Nowicka G. [Effect of sodium fluoride on ectopic induction of bone tissue]. *Annales Academiae Medicae Stetinensis*. 2004; 50 Suppl 1:23-7.

Dequeker J, Declerck K. Fluor in the treatment of osteoporosis. An overview of thirty years clinical research. *Schweizerische medizinische Wochenschrift*. 1993; 123(47):2228-34.

Everett E. Fluoride and caries. *European journal of oral sciences*. 2011; 119 Suppl 1:25-31.

Everett ET, McHenry MA, Reynolds N, Eggertsson H, Sullivan J, Kantmann C, et al. Dental fluorosis: variability among different inbred mouse strains. *Journal of dental research*. 2002; 81(11):794-8.

Faloni APS. Morte celular de osteoclasto do osso alveolar de ratas tratadas com estrógeno [dissertação]. São Paulo (SP): Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo; 2006.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2005; 37(11):719-27.

Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, DePinho RA, Teti A, et al. Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism. *Cell*. 2010; 142(2):296-308.

Franzoso G, Carlson L, Xing L, Poljak L, Shores EW, Brown KD, et al. Requirement for NF-kappaB in osteoclast and B-cell development. *Genes & development*. 1997; 11(24):3482-96.

Fuller K, Kirstein B, Chambers TJ. Murine osteoclast formation and function: differential regulation by humoral agents. *Endocrinology*. 2006;147(4):1979-85.

Gelb BD, Shi GP, Chapman HA, Desnick RJ. Pycnodysostosis, a lysosomal disease caused by cathepsin K deficiency. *Science*. 1996;273(5279):1236-8.

Gewies A, Grimm S. Cathepsin-B and cathepsin-L expression levels do not correlate with sensitivity of tumour cells to TNF-alpha-mediated apoptosis. *British journal of cancer*. 2003;89(8):1574-80.

Grobler SR, Louw AJ, Chikte UM, Rossouw RJ, van WKTJ. The relationships between two different drinking water fluoride levels, dental fluorosis and bone mineral density of children. *The open dentistry journal*. 2009; 3:48-54.

Grynpas MD, Chachra D, Limeback H. The action of fluoride on bone. In: Henderson JE, Goltzman D, editors. *The osteoporosis primer*. Cambridge University Press; 2000.

Guo LJ, Luo XH, Su X, Zhou HD, Liao EY. [Recombinant MMP-14 catalytic domain inducing the apoptosis of human osteoblastic SaOS-2 cells]. *Zhong nan da xue xue bao Yi xue ban = Journal of Central South University Medical sciences*. 2004; 29(4):389-92.

Gurlek A, Pittelkow MR, Kumar R. Modulation of growth factor/cytokine synthesis and signaling by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3): implications in cell growth and differentiation. *Endocrine reviews*. 2002; 23(6):763-86.

Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003; 423(6937):349-55.

Hayman AR, Jones SJ, Boyde A, Foster D, Colledge WH, Carlton MB, et al. Mice lacking tartrate-resistant acid phosphatase (Acp 5) have disrupted endochondral ossification and mild osteopetrosis. *Development*. 1996; 122(10):3151-62.

Henriksen K, Sorensen MG, Nielsen RH, Gram J, Schaller S, Dziegiel MH, et al. Degradation of the organic phase of bone by osteoclasts: a secondary role for lysosomal acidification. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2006; 21(1):58-66.

Holmbeck K, Bianco P, Pidoux I, Inoue S, Billingham RC, Wu W, et al. The metalloproteinase MT1-MMP is required for normal development and maintenance of osteocyte processes in bone. *Journal of cell science*. 2005; 118(Pt 1):147-56.

Hua K, Bu LS, Li GS. [Effects of fluoride on osteoclastic activity of rats in vitro]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]*. 2003;37(4):256-8.

Hugues JN, Miro F, Smyth CD, Hillier SG. Effects of growth hormone releasing hormone on rat ovarian steroidogenesis. *Human reproduction*. 1996;11(1):50-4.

Ikeda T, Kasai M, Utsuyama M, Hirokawa K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. *Endocrinology*. 2001;142(4):1419-26.

Inoue K, Mikuni-Takagaki Y, Oikawa K, Itoh T, Inada M, Noguchi T, et al. A crucial role for matrix metalloproteinase 2 in osteocytic canalicular formation and bone metabolism. *The Journal of biological chemistry*. 2006;281(44):33814-24.

Jensen ED, Pham L, Billington CJ, Jr., Espe K, Carlson AE, Westendorf JJ, et al. Bone morphogenic protein 2 directly enhances differentiation of murine osteoclast precursors. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;109(4):672-82.

Jowsey J, Riggs BL, Kelly PJ, Hoffmann DL. Effect of combined therapy with sodium fluoride, vitamin D and calcium in osteoporosis. *The American journal of medicine*. 1972;53(1):43-9.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. Ed. 11. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annual review of cell and developmental biology*. 2009;25:629-48.

Katchburian E, Cerri PS. Formação e destruição óssea. In: Cardoso RJA, Gonçalves EAN. *Cirurgia para implantes*. São Paulo: Artes Médicas; 2002. p. 437-45.

Kato Y, Boskey A, Spevak L, Dallas M, Hori M, Bonewald LF. Establishment of an osteoid preosteocyte-like cell MLO-A5 that spontaneously mineralizes in culture. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(9):1622-33.

Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*. 2001;142(12):5050-5.

Kobayashi CA, Leite AL, Peres-Buzalaf C, Carvalho JG, Whitford GM, Everett ET, et al. Bone response to fluoride exposure is influenced by genetics. *PloS one*. 2014;9(12):e114343.

Kolch W. Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *The Biochemical journal*. 2000;351 Pt 2:289-305.

Kollet O, Dar A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Lapid K, Sztainberg Y, et al. Osteoclasts degrade endosteal components and promote mobilization of hematopoietic progenitor cells. *Nature medicine*. 2006;12(6):657-64.

Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*. 1997;89(5):755-64.

Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*. 1999;397(6717):315-23.

Kusano K, Miyaura C, Inada M, Tamura T, Ito A, Nagase H, et al. Regulation of matrix metalloproteinases (MMP-2, -3, -9, and -13) by interleukin-1 and interleukin-6 in mouse calvaria: association of MMP induction with bone resorption. *Endocrinology*. 1998;139(3):1338-45.

Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*. 1998;93(2):165-76.

Lacombe J, Karsenty G, Ferron M. Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts. *Cell cycle*. 2013;12(17):2744-52.

Lausch E, Keppler R, Hilbert K, Cormier-Daire V, Nikkel S, Nishimura G, et al. Mutations in MMP9 and MMP13 determine the mode of inheritance and the clinical spectrum of metaphyseal anadysplasia. *American journal of human genetics*. 2009;85(2):168-78.

Lee Y, Kim HJ, Park CK, Kim YG, Lee HJ, Kim JY, et al. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. *Bone*. 2013;56(2):383-9.

Levy, SM. Na Update on fluorides and fluorosis. *J. Can Den Assoc*. 2003; (69):286-291.

Li YP, Zhao Q, Yang HR, Liu SJ, Liu XM, Zhang YH, et al. A new ditopic ratiometric receptor for detecting zinc and fluoride ions in living cells. *The Analyst*. 2013;138(18):5486-94.

Ljusberg J, Wang Y, Lang P, Norgard M, Dodds R, Hultenby K, et al. Proteolytic excision of a repressive loop domain in tartrate-resistant acid phosphatase by cathepsin K in osteoclasts. *The Journal of biological chemistry*. 2005;280(31):28370-81.

Lomaga MA, Polak S, Grushka M, Walsh S. Results of patch testing in patients diagnosed with oral lichen planus. *Journal of cutaneous medicine and surgery*. 2009;13(2):88-95.

Lotinun S, Kiviranta R, Matsubara T, Alzate JA, Neff L, Luth A, et al. Osteoclast-specific cathepsin K deletion stimulates S1P-dependent bone formation. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(2):666-81.

Lymperi S, Ersek A, Ferraro F, Dazzi F, Horwood NJ. Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood*. 2011;117(5):1540-9.

Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocrine reviews*. 2000;21(2):115-37.

Mansour A, Abou-Ezzi G, Sitnicka E, Jacobsen SE, Wakkach A, Blin-Wakkach C. Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *The Journal of experimental medicine*. 2012;209(3):537-49.

Marks JR SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988; 183:1-44.

Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):201-9.

Miura M, Chen XD, Allen MR, Bi Y, Gronthos S, Seo BM, et al. A crucial role of caspase-3 in osteogenic differentiation of bone marrow stromal stem cells. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(12):1704-13.

Miyamoto T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *The Keio journal of medicine*. 2011;60(4):101-5.

Mousny M, Banse X, Wise L, Everett ET, Hancock R, Vieth R, et al. The genetic influence on bone susceptibility to fluoride. *Bone*. 2006;39(6):1283-9.

Mousny M, Omelon S, Wise L, Everett ET, Dumitriu M, Holmyard DP, et al. Fluoride effects on bone formation and mineralization are influenced by genetics. *Bone*. 2008;43(6):1067-74.

Mundlos S, Olsen BR. Heritable diseases of the skeleton. Part I: Molecular insights into skeletal development-transcription factors and signaling pathways. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 1997;11(2):125-32.

Mundy GR. Inflammatory mediators and the destruction of bone. *J Periodontal Res*. 1991;26:213-7.

Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*. 2006;69(3):562-73.

Nagase Y, Tanaka S. [Osteopetrosis]. *Nihon rinsho Japanese journal of clinical medicine*. 2006;Suppl 2:152-5.

Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, Kurata K, Oh-Hora M, Feng JQ, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. *Nature medicine*. 2011;17(10):1231-4.

Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2001;120(5):466-76.

Nyman JS, Lynch CC, Perrien DS, Thiolloy S, O'Quinn EC, Patil CA, et al. Differential effects between the loss of MMP-2 and MMP-9 on structural and tissue-level properties of bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2011;26(6):1252-60.

Okada Y, Tsuda Y, Mu Y, Hirano K, Okamoto H, Okamoto Y, et al. Amino acids and peptides. XXXIX. Synthesis of iNoc-Gln-Val-Val-Ala-Ala-pNA and its action on thiol proteinases. *Chemical & pharmaceutical bulletin*. 1995;43(1):96-9.

Okuda A, Kanehisa J, Heersche JN. The effects of sodium fluoride on the resorptive activity of isolated osteoclasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1990;5 Suppl 1:S115-20.

Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*. 1997;89(5):765-71.

Oury F, Ferron M, Huizhen W, Confavreux C, Xu L, Lacombe J, et al. Osteocalcin regulates murine and human fertility through a pancreas-bone-testis axis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(6):2421-33.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(3):221-33.

Parfitt AM. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: Implications for the understanding of osteoporosis. In: Marcus M, Feldman D, Nelson DA, Rosen CJ, eds. *Osteoporosis*. San Diego: Elsevier Academic Press; 2008, p.71-89.

Pei J, Li B, Gao Y, Wei Y, Zhou L, Yao H, et al. Fluoride decreased osteoclastic bone resorption through the inhibition of NFATc1 gene expression. *Environmental toxicology*. 2014;29(5):588-95.

Peixoto EMA. Elemento químico flúor. *Química Nova*. 1998; 8:43.

Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, Roberson PK, Manolagas SC, Bellido T. Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin. *The Journal of clinical investigation*. 1999;104(10):1363-74.

Reginster JY, Ben Sedrine W, Gosset C. [Bone-specific treatment design in the treatment of postmenopausal osteoporosis. Pharmacoeconomic aspects]. *Revue medicale de Liege*. 1998;53(5):290-3.

Reinholt FP, Widholm SM, Ek-Rylander B, Andersson G. Ultrastructural localization of a tartrate-resistant acid ATPase in bone. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 1990;5(10):1055-61.

Reponen P, Sahlberg C, Munaut C, Thesleff I, Tryggvason K. High expression of 92-kD type IV collagenase (gelatinase B) in the osteoclast lineage during mouse development. *The Journal of cell biology*. 1994;124(6):1091-102.

Rich C, Ensink J. Effect of sodium fluoride on calcium metabolism of human beings. *Nature*. 1961;191:184-5.

Ruimerman R, Van Rietbergen B, Hilbers P, Huiskes R. The effects of trabecular-bone loading variables on the surface signaling potential for bone remodeling and adaptation. *Annals of biomedical engineering*. 2005;33(1):71-8.

Russell AL. Dental fluorosis in Grand Rapids during the seventeenth year of fluoridation. *Journal of the American Dental Association*. 1962;65:608-12.

Sasahara RM, Brochado SM, Takahashi C, Oh J, Maria-Engler SS, Granjeiro JM, et al. Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. *Cancer detection and prevention*. 2002;26(6):435-43.

Sieber C, Kopf J, Hiepen C, Knaus P. Recent advances in BMP receptor signaling. *Cytokine & growth factor reviews*. 2009;20(5-6):343-55.

Silveira DM; Franco FCM; Nascimento ILO. Pesquisa de interferon gama em tecido periodontal de ratos submetidos à movimentação dentária induzida. *Rev. Dental Press Ortodon Ortop Facial*. 2009;14(2):39-44.

Smith CE, Nanci A. Protein dynamics of amelogenesis. *Anat Rec*. 1996; 245(2): 186-207.

Smith F, Ekstrand J. The occurrence and the chemistry of fluoride. *Fluoride in dentistry*. 1996a;17-26.

Soe K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard B, Larsson LI, Delaisse JM. Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone*. 2011;48(4):837-46.

Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology*. 2001;17:463-516.

Stickens D, Behonick DJ, Ortega N, Heyer B, Hartenstein B, Yu Y, et al. Altered endochondral bone development in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *Development*. 2004;131(23):5883-95.

Stockbridge RB, Lim HH, Otten R, Williams C, Shane T, Weinberg Z, et al. Fluoride resistance and transport by riboswitch-controlled CLC antiporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(38):15289-94.

Stockbridge RB, Robertson JL, Kolmakova-Partensky L, Miller C. A family of fluoride-specific ion channels with dual-topology architecture. *eLife*. 2013;2:e01084.

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocrine reviews*. 1999;20(3):345-57.

Sugatani T, Hruska KA. Down-regulation of miR-21 biogenesis by estrogen action contributes to osteoclastic apoptosis. *Journal of cellular biochemistry*. 2013;114(6):1217-22.

Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood*. 2011;117(13):3648-57.

Sutherland KA, Rogers HL, Tosh D, Rogers MJ. RANKL increases the level of Mcl-1 in osteoclasts and reduces bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis in vitro. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(2):R58

Takamatsu Y, Simmons PJ, Moore RJ, Morris HA, To LB, Levesque JP. Osteoclast-mediated bone resorption is stimulated during short-term administration of granulocyte colony-stimulating factor but is not responsible for hematopoietic progenitor cell mobilization. *Blood*. 1998;92(9):3465-73.

Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *Journal of molecular medicine*. 2005;83(3):170-9.

Tanaka M, Ejiri S, Toyooka E, Kohno S, Ozawa H. Effects of ovariectomy on trabecular structures of rat alveolar bone. *Journal of periodontal research*. 2002;37(2):161-5.

Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(8):638-49.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
Teitelbaum SL. The osteoclast and its unique cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1240:14-7.

Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL. 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand (RANKL)-

dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(16):14221-6.

Tubert-Jeannin S, Auclair C, Amsallem E, Tramini P, Gerbaud L, Ruffieux C, et al. Fluoride supplements (tablets, drops, lozenges or chewing gums) for preventing dental caries in children. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(12):CD007592.

Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, et al. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(18):7260-4.

Vaananen HK, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Archives of biochemistry and biophysics*. 2008;473(2):132-8.

Wei ZF, Tong B, Xia YF, Lu Q, Chou GX, Wang ZT, et al. Norisoboldine suppresses osteoclast differentiation through preventing the accumulation of TRAF6-TAK1 complexes and activation of MAPKs/NF-kappaB/c-Fos/NFATc1 Pathways. Whitford GM. *The metabolism and toxicity of fluoride. Monographs in oral science*. 1996;16 Rev 2:1-153.

Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO journal*. 2003;22(23):6267-76.

Yan D, Gurumurthy A, Wright M, Pfeiler TW, Loba EG, Everett ET. Genetic background influences fluoride's effects on osteoclastogenesis. *Bone*. 2007;41(6):1036-44.

Yan D. et al. Phenotypic variation of fluoride responses between inbred strains of mice. *Cells, Tissues, Organs*. 2011; 194(2-4):261-7.

Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(7):3597-602.

Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*. 2008;8(3):204-16.

Yoder KM, Mabelya L, Robison VA, Dunipace AJ, Brizendine EJ, Stookey GK. Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. *Community dentistry and oral epidemiology*. 1998;26(6):382-93.

Young MF, Kerr JM, Ibaraki K, Heegaard AM, Robey PG. Structure, expression, and regulation of the major noncollagenous matrix proteins of bone. *Clinical orthopaedics and related research*. 1992(281):275-94.

Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(12):2065-77.

Zaidi M. Skeletal remodeling in health and disease. *Nature medicine*. 2007;13(7):791-801.

Zhao H, Patrick Ross F. Mechanisms of osteoclastic secretion. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1116:238-44.

Anexos

Anexo 1: Carta de aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc, Nº 024/2012
Bauru, 08 de outubro de 2012.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Avaliação do efeito do flúor na osteoclastogênese in vitro**, de autoria de Amanda Amaral Pereira, sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e considerado **APROVADO** "ad referendum" desta Comissão, nesta data.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Rompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Docente do Departamento de Ciências Biológicas

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-101 – C.P. 73
e-mail: mferran@fob.usp.br – Fone/FAX (0xx14) 3235-8356
<http://www.fob.usp.br>