UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FLÁVIA AMADEU DE OLIVEIRA

**Mecanismos intracelulares induzidos por leucotrienos durante
a diferenciação osteogênica**

BAURU
2017

FLÁVIA AMADEU DE OLIVEIRA

**Mecanismos intracelulares induzidos por leucotrienos durante
a diferenciação osteogênica**

Tese apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira.

Versão Corrigida

BAURU
2017

OL4m Oliveira, Flávia Amadeu de
 Mecanismos intracelulares induzidos por
 leucotrienos durante a diferenciação osteogênica /
 Flávia Amadeu de Oliveira. – Bauru, 2017.
 125p. : il. ; 31cm.

 Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia
 de Bauru. Universidade de São Paulo

 Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de
 Oliveira

Nota: A versão original desta 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: 005/2017
Data: 18 de agosto de 2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

A Deus,

Pelo amor incondicional. Por direcionar os meus caminhos sempre para o bem e me dar força e esperança para continuar. Por me permitir encontrar pessoas maravilhosas com quem convivo e estar presente em todos os momentos da minha vida.

Aos meus amados pais Genésio e Cristina,

Que sempre fizeram e fazem o impossível para me proporcionar uma boa educação. Queridos pais, vocês me ensinaram tanto...cuidaram-me, deram-me amor, bons princípios, amizade, compreensão...lutaram por mim, para que eu pudesse ter uma vida confortável e me ensinaram valores, me ensinaram a ser forte, a batalhar pelos meus sonhos...obrigada por serem pais maravilhosos, exemplares, e pelo amor incondicional. A vocês meu eterno amor e gratidão.

À minha amada irmã, Fabiana,

Que sempre apoiou minhas escolhas e acreditou em meus sonhos. Somos irmãs, sobretudo de alma. Ajudamos, acreditamos, lutamos, vencemos, perdemos, choramos, sorrimos... sempre juntas. E como é maravilhoso ter você em minha vida minha Ri...você é um presente de Deus, é a alegria da nossa casa e sempre estará em meu coração. Obrigada pela nossa amizade...você é única.

À minha amada avózinha, Rosa

A senhora com a sua simplicidade, inocência e bondade me ensinou a enfrentar a vida de forma mais suave, com sabedoria e perseverança...a senhora é a flor mais bela do meu jardim e agradeço a Deus por ser sua neta...obrigada por todo amor, ensinamentos e carinho...te amarei para sempre...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Aos meus queridos amigos do lab,

Meus amigos, este trabalho é o resultado de muito amor à ciência, dedicação e trabalho em equipe. Ah essa turminha...foram muitos anos de trabalho intenso, mas eu me considero abençoada, pois estou exatamente no lugar onde eu gostaria de estar...que é a minha segunda casa, e com pessoas sensacionais que fazem o meu dia singular...Vocês fazem parte do meu crescimento intelectual, pessoal e como é gostoso trabalhar ao lado de pessoas tão boas! Eu me orgulho de fazer parte dessa equipe tão unida...cada um com seu jeitinho especial...Cintia, Dri, Mari Santesso, Johnes, Mari Liessa, Carlinhos, Gabis, Marcinha e o *Boss*, vocês são únicos e permanecerão sempre em meu coração! Obrigada por todo auxílio, disponibilidade, pelas risadas e pelo carinho...

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, sempre disposto a ajudar e abrindo portas para novos conhecimentos e oportunidades. Sua generosidade e exemplo de profissionalismo é uma inspiração para mim. Obrigada pela acolhida, dedicação e confiança durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Camila Peres Buzalaf, minha mestra e amiga, que não mede esforços para me ajudar, ensinar, que acredita em meu potencial para lecionar e fazer ciência. Obrigada pela orientação, paciência, dedicação e pelo apoio constante. Seu carisma e competência faz com que eu tenha vontade de melhorar a cada dia. Seus ensinamentos estarão comigo por toda minha vida, sempre.

À minha amiga de infância Jéssica Franciane Faria, uma menina que não mede esforços para me ajudar...sempre presente e disposta, uma verdadeira amiga para todas as horas...muito obrigada pelo carinho, companheirismo e amizade sincera de todos esses anos!

À Cintia Kazuko Tokuhara, uma amiga mais que especial. Sempre disposta a ajudar e pronta para o trabalho! Minhas palavras nunca conseguirão expressar a admiração e o carinho que eu tenho por você...Cintia, você mora no meu coração e eu só tenho a agradecer por tudo o que fez e faz por mim. Amo você minha grande amiga!

À Adriana Arruda Matos, amiga que vou levar para toda a vida. Sempre me incentivando e acreditando que tudo ia dar certo. Obrigada por todo auxílio, pela disponibilidade, pelas conversas e pelo carinho! Amo você!

Ao meu grande amigo Vimal Veeriah, agradeço a Deus por ter colocado você em minha vida. Em um dos momentos mais difíceis você me acolheu, me ofereceu a sua amizade, sua alegria contagiante, me ensinou tantas coisas que nem caberia listá-las aqui...Um menino que com sua simplicidade, carisma e paixão pela ciência conquistou o meu coração. Você é uma inspiração pra mim...um pesquisador de mente brilhante e coração grandioso.

À Priscila Maria Aranda Salomão, pela amizade e apoio constantes. Obrigada por tornar os dias de trabalho mais divertidos e estar sempre disposta a ajudar minha querida amiga.

À Mariana Rodrigues Santesso, uma menina meiga, alegre, de coração enorme e que sempre está disposta a ajudar os outros. Obrigada pelo auxílio e sobretudo por todos esses anos de amizade!

Ao meu amigo João Paulo Domezi, por toda ajuda na execução deste trabalho, pela parceria que temos e pelo carinho! Obrigada por sua amizade!

Ao meu querido amigo Pepe Burgos, pelo incentivo e apoio à pesquisa...por sempre ter um tempinho para mim, mesmo com tantas responsabilidades a cumprir... Obrigada pelas conversas incentivadoras e pela amizade!

Ao Zohaib Nisar Khan, pelo auxílio com a análise proteômica e sobretudo pelo companheirismo, carinho e por fazer parte da minha vida...

À Aline de Lima Leite, uma amiga sem igual. Sempre disposta a ajudar e não mede esforços para resolver meus problemas de laboratório, sanando minhas dúvidas e contribuindo para o meu crescimento profissional. Obrigada por toda a ajuda.

À minha “queurinha” Eliane Maria de Ávila, minha mãe do coração, que não mede esforços para me ajudar, e que sempre me apoiou e torceu pelo meu sucesso e conquistas profissionais... Você mora em meu coração...obrigada por tudo!

Ao meu amigo George de Ávila Ramos, que sempre acreditou em meu potencial como pesquisadora...sempre me apoiou em meus estudos, que reza pelo meu bem. Obrigada pelo carinho e amizade de sempre...

À amiga Mileni Fernandes pela disposição em ajudar e por tornar o ambiente de trabalho mais agradável.

Ao Thiago José Dionísio, pela boa vontade de ajudar nos experimentos de RT-PCR e por estar sempre disposto a sanar minhas dúvidas.

Ao Professor Willian Zambuzzi, por acreditar em mim e me proporcionar uma experiência profissional e sobretudo pessoal ímpares, no qual tive a oportunidade de aprender novas técnicas, crescer cientificamente, conhecer culturas diferentes e fazer novas amizades, as quais levarei para sempre em meu coração. A você minha eterna gratidão.

À Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, que juntamente com o meu orientador, permitiram-me a realização de um estágio na tão renomada Universidade de Cambridge. Agradeço pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal, e também por toda a ajuda durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Anna Teti pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional em seu renomado laboratório.

Ao Prof. Dr. Michael Edwardson pela grande oportunidade de aprender novas técnicas e crescer profissionalmente em seu laboratório. Sou eternamente grata por sua orientação e por ter tido a chance de trabalhar com uma pessoa grandiosa e de inúmeras qualidades.

A Tania Mary Cestari por todo empenho em ajudar, pelo belo trabalho que faz e pela amizade que conquistamos nesse período.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, Prof. Dr. Carlos Arterio Sorgi e a Dra. Ana Paula Ferranti Peti por todo auxílio prestado na realização da quantificação dos eicosanóides.

Ao Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte, pelo uso do micro-CT e pela disponibilidade.

Aos professores do Departamento de Ciências Biológicas Ana Carolina Magalhães, Marília Rabelo Afonso Buzalaf, Flávio Augusto Cardoso de Faria, Carlos Ferreira dos

Santos e Antônio de Castro Rodrigues, agradeço por ter tido a oportunidade de assistir suas aulas. A competência, o dom e a vontade de ensinar os tornam exímios no que fazem e me inspiram para melhorar cada vez mais minha didática.

Aos eternos amigos do CIP, Heliton Gustavo de Lima, Pepe Burgos, Karen Pinke, Nara Lígia Martins Almeida, Amanda Amaral, Taiane Gardizani, Márcia Graeff, Rafaela Alves da Silva, que proporcionaram um ótimo ambiente de trabalho, divertido e sempre dispostos a ajudar. Vocês estarão para sempre em meu coração.

Às funcionárias do laboratório de bioquímica Aline de Lima Leite, Thelma Lopes Silva e Larissa Grizzo Thomassian por estarem sempre dispostas a nos auxiliar.

Ao prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira e aos funcionários do Centro Integrado de Pesquisa, Márcia Graeff, Rafaela Alves da Silva e Marcelo Milanda Ribeiro Lopes pela disponibilidade.

À Dalva Ribeiro de Oliveira, por nos atender prontamente sempre que precisamos e pela disposição em ajudar.

Aos amigos e familiares, pelo carinho e compreensão nos momentos em que precisei estar ausente.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa. Processo nº. 2013/25770-3.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-CAPES, pelo apoio financeiro.

À Faculdade de Odontologia de Bauru – FOB/USP, pela oportunidade de fazer parte desta instituição tão renomada e pelo uso dos equipamentos e das dependências da Universidade.

Ao departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP e a todos os docentes, que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Ao Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - FCFRP/USP, sob supervisão da Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pelo uso dos equipamentos e das dependências da Universidade.

À Universidade do Sagrado Coração – USC Bauru, pelo uso dos serviços do Biotério.

Ao Departamento de Biotecnologia e ciências clínicas aplicadas da Universidade de L'Aquila – Univaq, Itália, sob a supervisão da Profa. Dra. Anna Teti, pela oportunidade de realização de doutorado sanduíche. Pelo uso dos equipamentos e das dependências da Universidade.

Ao Departamento de Farmacologia, da Universidade de Cambridge, Reino Unido, sob a supervisão do Prof. Dr. J. Michael Edwardson pela oportunidade de fazer parte desta instituição tão renomada mundialmente como pesquisadora visitante, pelo uso dos equipamentos e das dependências da Universidade.

*“Bom mesmo é ir à luta com determinação
Abraçar a vida com paixão
Perder com classe
E vencer com ousadia
Porque o mundo pertence a quem se atreve
E a vida é muito, para ser insignificante.”*

Charles Chaplin

RESUMO

Os leucotrienos (LTs) são mediadores inflamatórios derivados da via 5-lipoxigenase (5-LO), com contribuição relevante na reabsorção óssea. Neste estudo investigamos o papel dos LTs na diferenciação osteogênica e o seu impacto na osteoclastogênese. Assim, foi avaliado o perfil ósseo dos camundongos 129/Sv (WT) e 5-LO Knockout (5-LO KO) por meio de microtomografia computadorizada, evidenciando maior densidade óssea vertebral e trabéculas mais espessas em machos 5-LO KO. Após isso, osteoblastos primários (OBL) foram isolados e cultivados para determinar a atividade de fosfatase alcalina (ALP) e o potencial de mineralização. Resultados mostraram que OBL KO possui maior atividade de ALP e mineralização, em todos os períodos quando comparados com WT. Em adição, o tratamento com os LTs B₄ e D₄ inibiu a deposição de cálcio. Os inibidores da síntese de LTs e os antagonistas do BLT1/2 foram efetivos em recuperar a formação dos nódulos mineralizados. A cinética do Alox5 apresentou um aumento da expressão nos períodos de maior diferenciação celular em OBL WT. Além disso, a expressão de OCN, MMPs 2 e 9 e RANKL foram aumentadas em células 5-LO KO em quase todos os períodos avaliados. Em geral, o estímulo com LTs, seus inibidores e antagonistas diminuiu a expressão de Sp7, Col1a1, Opg e MMP-9 e aumentou RANKL em células KO. A sinalização por meio de segundos mensageiros também foi avaliada. Células 5-LO KO apresentam menor concentração de cálcio intracelular (Ca²⁺_i) em relação ao WT. No período de 14 dias, o estímulo com LTD₄ inibiu a liberação Ca²⁺_i independente da linhagem, em relação ao controle. Os níveis de cAMP foram menores em OBL 5-LO KO, em todos os grupos tratados ou controle. LTD₄ diminuiu a concentração de cAMP, mas não LTB₄, em OBL 5-LO KO. O estudo também quantificou a produção de LTB₄ e outros eicosanoides em osteoblastos mostrando a sua capacidade de síntese. A análise proteômica revelou 89 proteínas com expressão diminuída em OBL 5-LO KO, de um total de 154, sendo a maioria relacionada ao citoesqueleto e ao metabolismo energético. Também foram identificadas 59 proteínas exclusivas em OBL 5-LO KO e 06 unicamente expressas em células WT, revelando as diferenças intrínsecas de cada animal. O perfil osteoclastogênico de camundongos WT vs. 5-LO KO mostrou diferenças significativas na análise fenotípica, TRAP e na expressão gênica de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica. Após o estímulo

com M-CSF e RANKL, as células WT apresentaram osteoclastos gigantes multinucleados, porém, células 5-LO KO apresentaram uma população de células com formas e tamanhos variáveis, e menor grau de maturação. Em adição, os LTsexógenos não modularam a atividade da TRAP. O meio condicionado proveniente dos OBL WT e KO, retardaram o processo de formação dos osteoclastos. A análise da expressão gênica em osteoclastos mostrou diminuição da expressão de Alox5, Il-1b, Il-6 e TNFa em células 5-LO KO. BLT1/2, CysLt1 e os marcadores da diferenciação Acp5, Ctsk e Nfact1 não apresentaram diferenças entre os animais. Em adição, o LTB₄ diminuiu a expressão do Alox5 e a Il-1b foi aumentada em osteoclastos WT. Assim, os resultados demonstram que os LTs são capazes de modular o metabolismo ósseo, e a ausência do gene da 5-LO está relacionada ao maior perfil osteogênico.

Palavras-chave: Leucotrienos. 5-LO KO. Diferenciação osteogênica. Osteoclastogênese.

ABSTRACT

Leukotriene-induced intracellular mechanisms during osteogenic differentiation

Leukotrienes (LTs) are inflammatory mediators derived from the 5-lipoxygenase (5-LO) pathway, with a relevant contribution in bone resorption. In this study we investigated the role of LTs in osteogenic differentiation and its impact on osteoclastogenesis. Thus, the bone profile of the 129/Sv (WT) and 5-LO Knockout mice (5-LO KO) was evaluated by computerized microtomography, showing higher vertebral bone density and thicker trabeculae in 5-LO KO males. After that, primary osteoblasts (OBL) were isolated and cultured to determine alkaline phosphatase activity (ALP) and mineralization potential. Results showed that OBL KO has higher ALP activity and mineralization, in all periods when compared with WT. In addition, the treatment with LTB₄ and LTD₄ inhibited calcium deposition. Inhibitors of LT synthesis and BLT1/2 antagonists were effective to recover the mineralized nodules formation. The kinetics of Alox5 showed an increase in expression during cellular differentiation period in WT OBL. In addition, expression of OCN, MMPs 2 and 9 and RANKL were increased in 5-LO KO cells in almost all evaluated periods. In general, the stimulation with LTs, their inhibitors and antagonists decreased the expression of Sp7, Col1a1, Opg and MMP-9. But it increased the RANKL expression in KO cells. The second messengers signaling was also evaluated. 5-LO KO cells showed lower concentration levels of intracellular calcium (Ca²⁺ i) when compared to WT cells. In the 14-day period, the LTD₄ treatment inhibited the Ca²⁺i independent of the murine lineage, relative to the control. cAMP levels were lower in OBL 5-LO KO, in all treated or control groups. LTD₄ decreased the concentration of cAMP, but not LTB₄, in KO cells. The study also quantified the production of LTB₄ and other eicosanoids in osteoblasts showing their ability to synthesize those metabolites. The proteomic analysis revealed 89 downregulated proteins in OBL KO, out of a total of 154, most of them related to cytoskeleton and energy metabolism. Also 59 identified proteins were unique in OBL 5-LO KO and 06 exclusively expressed in WT cells, revealing the intrinsic differences of each strain. The osteoclastogenic profile of WT vs. 5-LO KO showed significant differences in phenotypic analysis, TRAP and in the gene expression of cells derived

from the monocyte-macrophage-lineage. After M-CSF and RANKL stimulation, WT cells showed multinucleated giant osteoclasts. However, 5-LO KO cells presented a population of cells with variable shapes and sizes, and a lower maturation stage. In addition, exogenous LTs did not modulate TRAP activity. The conditioned medium from OBL WT and 5-LO KO delayed the formation process of osteoclasts. Gene expression analysis in osteoclasts showed decreased expression of Alox 5, Il-1b, Il-6 and TNF α in 5-LO KO cells. BLT1/2, CysLT1 and the osteoclast differentiation markers Acp5, Ctsk and Nfact1 showed no differences between the strains. In addition, LTB₄ decreased the expression of Alox5, and IL-1b was increased in WT osteoclasts. Thus, the results demonstrate that the LTs are able to modulate the bone metabolism, and the absence of the 5-LO gene is related to the greater osteogenic profile.

Keywords: Leukotrienes. 5-LO KO. Osteogenic differentiation. Osteoclastogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1a –** Análise densitométrica de vértebras L5 em animais WT e 5-LO KO por μ CT. A,B) Imagens das vértebras nos planos frontal e transversal adquiridas pelo software Dataviewer. C) Representação gráfica da densidade óssea (BV/TV). D) Número de trabéculas (Tb.N). E) Espessura das trabéculas (Tb.Th). F) Separação das trabéculas (Th. Sp) E). (N=4). *Representa diferenças estatísticas entre WT vs. 5-LO KO, entre o mesmo gênero. Teste T de Student não pareado (*P<0,05)..... 70
- Figura 1b –** Análise densitométrica femural de animais WT e 5-LO KO por μ CT. A,B) Imagens dos fêmures nos planos coronal, sagital e axial adquiridas pelo software Dataviewer. C) Representação gráfica da densidade óssea (BV/TV). D) Número de trabéculas (Tb.N). E) Espessura das trabéculas (Tb.Th). F) Separação das trabéculas (Th. Sp). (N=4). *Representa diferenças estatísticas entre linhagens e diferenças entre gêneros. Teste T de Student não pareado (*P<0,05. **P<0,01)..... 71
- Figura 2 –** Atividade de ALP em osteoblastos murinos WT e 5-LO KO nos períodos de 4, 7, 10 e 14 dias. Os resultados representam a média da atividade enzimática em μ mol de p-NP/minuto pela quantidade de proteína total em mg $\pm$ SD. Representação de 3 experimentos independentes (n=5). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO. Teste T de Student não pareado (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001)..... 72
- Figura 3 –** Mineralização de osteoblastos murinos WT e 5-LO KO nos períodos de 14 e 21 dias, por vermelho de alizarina. A) Quantificação da deposição de cálcio dos osteoblastos WT e 5-LO
-
-

KO. B) Imagens da coloração com vermelho de alizarina de osteoblastos WT tratados com LTB₄ (10⁻⁸ M), LTD₄ (10⁻⁸ M), MK886 (10⁻⁶ M), MK591 (10⁻⁶ M), CP-105696 (10⁻⁶ M), U75302 (10⁻⁷ M), U75302+ LTB₄ (10⁻⁷ M; 10⁻⁸ M), MK571 (10⁻⁶ M), MK571 + LTD₄ (10⁻⁶ M; 10⁻⁸ M). C) Quantificação da deposição de cálcio dos OBL WT. D) Imagens das placas evidenciando a deposição de cálcio em OBL 5-LO KO tratados ou não com LTs B₄ e D₄, na concentração de 10⁻⁸ M. E) Quantificação de nódulos mineralizados dos OBL KO. Representação de 3 experimentos independentes (n=6). *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle e # referindo-se aos grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).....

74

Figura 4a – Níveis de expressão gênica em osteoblastos de animais WT e 5-LO KO. As figuras A-H foram apresentadas como o perfil gênico das duas linhagens (WT vs. KO), de marcadores da diferenciação osteogênica em diferentes tempos (0-14 dias). A) Alox-5; B) Alpl; C) Bglap (OCN); D) MMP-2; E) MMP-9; F) Tnfsf11 (RANKL); G) Tnfrsf11b (OPG); H) Razão RANKL/OPG. *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO. Teste T de Student não pareado (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001). Os dados apresentados são resultados da média, ±SD de 3 experimentos independentes (n=3). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).Níveis de expressão gênica em osteoblastos de animais WT e 5-LO KO.....

77

Figura 4b – Níveis de expressão gênica em osteoblastos de animais WT e 5-LO KO. As figuras I-Q foram apresentadas como resultados da expressão gênica frente ao tratamento com LTB₄ a 10⁻⁸ M ou com o antagonista U75302 a 10⁻⁷ M, com 4 e 14 dias de cultivo. I) Runx2; J) Sp7; K) Col1a1; L) Bglap (OCN); M) MMP-2; N) MMP-9;

O) Tnfsf11 (RANKL); P) Tnfrsf11b (OPG); Q) Razão RANKL/OPG. Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 3 experimentos independentes (n=3). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).....

78

Figura 5 – Resposta de cálcio intracelular em osteoblastos WT e 5-LO KO estimulados com LTs, nos períodos de 7 e 14 dias. Os níveis de cálcio intracelular foram determinados pelo ELISA e os dados foram apresentados como a média $\pm$ SD de Unidades de Fluorescência Relativa (RFU), de 1 experimento independente (n=6). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).....

79

Figura 6 – Resposta de cAMP intracelular em osteoblastos WT e 5-LO KO estimulados com LTs, nos períodos de 7 e 14 dias. Os níveis de cAMP foram determinados pelo ensaio imunoenzimático competitivo ELISA. Os dados foram apresentados como a média $\pm$ SD dos valores de cAMP em picomol/mL de 1 experimento independente (n=2). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).....

80

Figura 7 – *Heat maps* sobre a produção de eicosanoides em osteoblastos de animais 129/Sv (WT) e 5-LO KO estimulados com 5-20 μ M de ionóforo de Cálcio, por meio de espectrometria de massas. A) Comparação de um mesmo metabólito em diferentes grupos. B) Comparação de todos os metabólitos entre os grupos. A escala de cores indica o percentual da produção de cada metabólito entre 0-100%. O gradiente de cor padrão configura o menor valor no mapa

de calor como azul escuro, o maior valor como vermelho e valores intermediários como verde claro, com uma transição correspondente (ou gradiente) entre estes extremos. Os dados foram tratados nos *softwares PeakView e MultiQuant* e os *heat maps* realizados no programa Excel utilizando a média dos grupos. Principais eicosanoides quantificados: 11-HETE (*11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoic acid*); 6-Keto PGF 1 α (6-keto prostaglandina F1 α); AA (ácido araquidônico); EPA (ácido eicosapentaenoico); LTB4 (leucotrieno B4); PGA2 (prostaglandina A2); PGE2 (prostaglandina E2); PGF 1 α (prostaglandina F1 α); PGJ2 (prostaglandina J2)..... 81

Figura 8 – Caracterização fiuncional e network de proteínas identificadas na análise proteomica de osteoblastos de animais WT e 5-LO KO, no período de 14 dias. A) Distribuição funcional de proteínas identificadas com expressão diferencial nos grupos WT vs. KO. Categorias de proteínas com base em processos biológicos da GO. Termos significativos (Kappa = 0,03) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de associação de genes por meio do *plug-in* ClueGO, CYTOSCAPE®. GO: Ontologia genética. B) Subnetworks criadas para estabelecer a interação entre proteínas identificadas com expressão diferencial em grupos WT vs. 5-LO KO. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína com o seu código de acesso. Os nodos vermelho escuro e verde escuro indicam proteínas únicas para osteoblastos WT e KO, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo *plug-in* cluster marker, do programa CYTOSCAPE®, que não foram identificados no presente estudo, e os nodos verdes claros indicam superexpressão em OBL WT..... 88

Figura 9 – Análise morfológica comparativa da cultura de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais 129/Sv WT e 5-LO KO, com 11 dias de cultivo, estimuladas com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). A-B) Perfil osteoclastogênico dos animais WT. Osteoclastos gigantes multinucleados observados no aumento de 10x e 20x respectivamente. C-D) Perfil osteoclastogênico dos animais 5-LO KO no aumento de 10x e 20X respectivamente. Imagens representativas fotografadas em microscópio invertido Leica/DM IRBE, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany..... 89

Figura 10a– Morfologia e quantificação da atividade da TRAP de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais WT, após 10 dias de cultivo sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). A) Células WT foram tratadas ou não (controle) com LTs (B₄ e D₄) a 10⁻⁸ M. B) Células WT tratadas ou não (controle) com meio condicionado de osteoblastos dos animais WT (MC-OBL WT) e KO (MC-OBL-KO). *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001)..... 92

Figura 10b– Morfologia e quantificação da atividade da TRAP de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais WT, após 10 dias de cultivo sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). C) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais WT (controle: MC-OBL WT) e sob estímulo dos LTs exógenos B₄ e D₄ (MC-OBL WT_{ex}LTB₄ e MC-OBL WT_{ex}LTD₄ respectivamente), na dose de 10⁻⁸ M. D) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais KO (controle: MC-OBL KO) e sob estímulo dos LTs exógenos B₄ e D₄ (MC-OBL KO_{ex}LTB₄ e MC-OBL KO_{ex}LTD₄ respectivamente), na dose de 10⁻⁸ M. *Representa diferenças

estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).....	93
Figura 10c– Morfologia e quantificação da atividade da TRAP de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais 5-LO KO, após 10 dias de cultivo sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). E) Células KO foram tratadas ou não (controle) com LTs (B ₄ e D ₄) a 10 ⁻⁸ M. *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).....	94
Figura 11– Imagens do ensaio de reabsorção de osteoclastos derivados da linhagem monocítica-macrofágica de animais WT e 5-LO sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). Células WT e 5-LO KO foram cultivadas sobre discos ósseos e após 10 dias, as mesmas foram removidas e as áreas de reabsorção coradas com azul de toluidina a 1% (pH 4,5). A-C) Células tratadas ou não (controle) com LTs (B ₄ e D ₄) a 10 ⁻⁸ M. D-F) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais WT (controle: MC-OBL WT) e sob estímulo dos LTs exógenos B ₄ e D ₄ (MC-OBL WT-B ₄ e MC-OBL WT-D ₄ respectivamente), na concentração de 10 ⁻⁸ M. G-I) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais KO (controle: MC-OBL KO) e sob estímulo dos LTs exógenos B ₄ e D ₄ (MC-OBL KO-B ₄ e MC-OBL KO-D ₄ respectivamente), na concentração de 10 ⁻⁸ M. J-L) Células KO foram plaqueadas sobre discos ósseos e tratadas ou não (controle) com LTs (B ₄ e D ₄) a 10 ⁻⁸ M.....	95
Figura 12a– Níveis de expressão gênica em osteoclastos no período de 11 dias. As figuras A-J foram apresentadas como o perfil gênico das duas linhagens (WT vs. KO), de marcadores da diferenciação osteoclastogênica. A) Alox-5; B) BLT1; C) BLT2; D) CysLt1; E)	

Acp5; F) Ctsk; G) Nfatc1; H) Il-1b; I) Il-6; J) TNFa. *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO. Teste T de Student não pareado (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001). #Representa diferenças entre os grupos. ANOVA-1 critério (#P<0,05. ##P<0,01. ###P<0,001). Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 1 experimento independente (n=3).... 97

Figura 12b– Níveis de expressão gênica em osteoclastos no período de 11 dias. As figuras K-S foram apresentadas como resultados da expressão gênica frente ao tratamento com LTB₄ a 10⁻⁸ M ou com o antagonista U75302 a 10⁻⁷ M. K) Alox-5; L) BLT1; M) BLT2; N) Acp5; O) Ctsk; P) Nfatc1; Q) Il-1b; R) Il-6; S) TNFa; #Representa diferenças entre os grupos. ANOVA-1 critério (#P<0,05. ##P<0,01. ###P<0,001). Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 1 experimento independente (n=3)..... 98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Primers utilizados para qRT-PCR	59
Tabela 2 – Proteínas com mudanças significativas na expressão em WT vs. 5- LO KO.....	82
Tabela 3 – Proteínas identificadas exclusivamente em OBL WT.....	84
Tabela 4 – Proteínas identificadas exclusivamente em OBL 5-LO KO.....	84

-

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μA	Microampère
μCT	MicroCT
μg	Microgramas
μg/mL	Microgramas por Mililitro
μL	Microlitros
μmol	Micromol
11-HETE	11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoic acid
5-HETE	5-hidroxieicosatetraenoico
5-HPETE	5-monohidroperoxidoeicosotetraenoico
5-LO KO	Camundongos Knockout para 5-LO (Alox5 ^{tm1Fun})
5-LO	5-Lipoxigenase
6-Keto PGF 1α	6-keto prostaglandina F1α
AA	Ácido Araquidônico
Aa	<i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>
ACN	Acetonitrila
Acp5	<i>Acid Phosphatase 5 Gene, Tartrate Resistant</i>
Alox5	<i>Arachidonate 5-lipoxigenase Gene</i>
ALP	<i>Alkaline Phosphatase</i> (Fosfatase Alcalina)
Alpl	<i>Alkaline Phosphatase Gene</i>
AMBIC	Bicarbonato de amônio
ATP	Adenosina Trifosfato
Bglap	<i>Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein Gene</i> (Osteocalcina)
BLT1	<i>leukotriene B4 receptor 1</i>
BLT2	<i>leukotriene B4 receptor 2</i>
BV	<i>Bone Volume</i> (Densidade de Volume Ósseo)
Ca ²⁺	Cálcio
cAMP	<i>Cyclic Adenosine Monophosphate</i> (Adenosina Monofosfato Cíclico)
CEEPa	Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais
CM	Monocítica-macrofágica
CO ₂	Dióxido de Carbono (gás carbônico)
Colla1	<i>Type I Collagen Gene</i>
COX	Cicloxygenase

CP-105696	Antagonista dos Receptores LTB ₄
Ctsk	<i>Catepsin K Gene</i>
Cyslt1	<i>Cysteinyl leukotriene receptor 1 Gene</i>
cysLT2	<i>Cysteinyl leukotriene receptor 2 Gene</i>
DEPC	<i>Diethyl Pyrocarbonate</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	<i>Dithiothreitol</i>
EETs	Epoxieicosatrienoicos
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FLAP	Proteína adaptadora da 5-LO
fMLP	N-formil-metionil-leucil-fenilalanina
g	<i>g-force</i>
GAPDH	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
GEFs	<i>p115 Rho Guanine Exchange Factor Lsc</i>
GO	Ontologia Genética
GPCRs	Receptores acoplados à proteína G
Gαi	<i>Gi alpha subunit</i>
Gαq	<i>Gq alpha subunit</i>
H ₂ O	Água
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> (Solução Salina Balanceada de Hank)
HCl	Ácido Clorídrico
IL-12	Interleucina 12
IL-17	Interleucina 17
IL-1B	Interleucina 1B
IL-6	Interleucina 6
IL-6B	<i>Interleukin 6 Gene</i>
IL-8	Interleucina 8
kDA	Quilodalton
kV	Quilovolt
L5	Quinta Lombor
LOX	Lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA ₄	Leucotrieno A ₄

LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
M	Molar
m/v	Massa/Volume
MC OBL	Meio Condicionado dos Osteoblastos
MC	Meio Condicionado
M-CFS	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
mg/mL	Miligramas por Mililitro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MK 591	Inibidor da Síntese de Leucotrienos
MK 886	Inibidor da Síntese de Leucotrienos
MK571	Antagonista do Receptor CysLTs
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MMP-2	Metaloproteinase de Matriz 2
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9
MO	Meio Osteogênico
NaOH	Hidróxido de Sódio
Nfatc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells 1 Gene</i>
NF-kB	Fator Nuclear Kappa B
ng/mL	Nanograma por Mililitro
ng/μL	Nanograma por Microlitro
nm	Nanômetro
nmol	Nanomol
OBL	Osteoblasto
°C	Graus Celsius
OCN	Osteocalcina
OCL	Osteoclasto
OCL-like	Osteoclasto-like

OPG	<i>Osteoprotegerin Gene</i>
p	Nível de Significância
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i> (Tampão Fosfato-Salina)
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial de Hidrogênio Iônico
PLA	Fosfolipase A
PLGS	ProteinLynx Global Server
pmol/ µL	Picomol por Microlitro
pNPP	p-nitrofenilfosfato
PO	Precursoras de Osteoclastos
PTX	Toxina Pertussis
qRT-PCR	<i>Real Time-Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
Rac 1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RANKL	<i>Receptor Activator of NF-kappaB Ligand Gene</i>
rcf	<i>Relative centrifugal force</i>
RFU	Unidade de Fluorescência Relativa
rpm	Rotação por Minuto
Runx2	<i>Runt-related transcription factor 2 Gene</i>
SD	Standard Deviation
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Sp7	<i>Transcription factor Sp7 Gene</i> (Osterix)
TA	Temperatura Ambiente
TFA	Ácido Trifluoracético
Th.N	<i>Trabecular Number</i> (Número de trabéculas)
Th.Sp	<i>Separated Trabecular</i> (Separação das Trabéculas)
Th.Th	<i>Trabecular Thickness</i> (Espessura das Trabéculas)
TNF-α	<i>Tumoral Necrosis Factor Alpha</i> (Fator de Necrose Tumoral Alfa)
TRAP ⁻	<i>Negative Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
TRAP	<i>Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
TRAP ⁺	<i>Positive Tartrate-resistant acid phosphatase</i>
TV	<i>Trabecular Volume</i> (Volume Trabecular)
U75302	Antagonista do Receptor para LTB ₄
UNIPROT	<i>Universal Protein Resource</i>

WT	<i>Wild Type</i>
α MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification</i>
μ m	Micrômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DE LITERATURA	37
2.1	A BIOLOGIA CELULAR DO METABOLISMO ÓSSEO	37
2.1.1	Osteoblastos	38
2.1.2	Osteoclastos	40
2.1.3	Osteócitos	42
2.2	EICOSANÓIDES	43
2.2.1	Leucotrienos	44
2.2.2	Biosíntese dos Leucotrienos	45
2.3	ENVOLVIMENTO DOS LTS NO METABOLISMO ÓSSEO	46
3	PROPOSIÇÃO	51
4	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1	ANIMAIS	55
4.2	MICROTOMOGRÁFIA COMPUTADORIZADA (μ CT)	55
4.3	ISOLAMENTO DE OSTEÓBLASTOS PRIMÁRIOS	55
4.4	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO DAS CELULAS COM INDUTORES OSTEGÊNICOS, LTS, INIBIDORES E ANTAGONISTAS	56
4.5	PREPARO DO MEIO CONDICIONADO (MC)	56
4.6	FOSFATASE ALCALINA (ALP)	57
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL	57
4.8	MINERALIZAÇÃO	58
4.9	qRT-PCR	58
4.10	QUANTIFICAÇÃO DE CÁLCIO ENTRACELULAR	60
4.11	QUANTIFICAÇÃO DE cAMP INTRACELULAR	60
4.12	QUANTIFICAÇÃO DE EICOSANOÍDES A PARTIR DE SOBRENADANTE CELULAR POR ESPECTROFOTOMETRIA DE MASSAS	60
4.12.1	Coleta	60

4.12.2	Extração e concentração dos eicosanoides para a análise no espectrofotômetro de massas	61
4.13	ANÁLISE PROTEÔMICA	62
4.13.1	Extração de Proteínas	62
4.13.2	Cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)	63
4.14	ISOLAMENTO DE OSTEOCLASTOS	63
4.15	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E TRATAMENTO DAS CÉLULAS COM CITOCINAS	64
4.16	TRAP	64
4.17	ENSAIO DE REABSORÇÃO ÓSSEA	64
4.18	ANÁLISE ESTATÍSTICA	65
5	RESULTADOS	69
5.1	ANÁLISE DENSITOMÉTRICA	69
5.2	ATIVIDADE DE FOSFATASE ALCALINA (ALP)	72
5.3	POTENCIAL DE MINERALIZAÇÃO	72
5.4	EXPRESSÃO GÊNICA	75
5.5	CÁLCIO INTRACELULAR	79
5.6	cAMP	79
5.7	PRODUÇÃO DE EICOSANOIDES	80
5.8	PERFIL PROTÔMICO DE OSTEOBLASTOS E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DIFERENCIALMENTE EXPRESSAS	82
5.8.1	Ontologia genética e rede de interação proteína-proteína (Networks)	86
5.9	ANÁLISE FENOPÍTICA DOS OSTEOCLASTOS	89
5.10	ATIVIDADE DA TRAP	90
5.11	REABSORÇÃO ÓSSEA	94
5.12	EXPRESSÃO GÊNICA EM OSTEOCLASTOS	96
6	DISCUSSÃO	101
7	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS	115
	ANEXO	125

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado formado por células e pela matriz óssea, um componente extracelular mineralizado. O osso apresenta diversas funções, atuando principalmente como um suporte para os tecidos moles, proteção de órgãos vitais, reservatório de cálcio e fosfato, e um local para a hematopoiese. O osso consiste de uma rede de hidroxiapatita intercalada com uma variedade de proteínas que compõem a matriz óssea. A estrutura óssea é constantemente renovada por células que compõem esse tecido: osteoblastos, os quais são responsáveis pela formação do osso, sintetizando a parte orgânica da matriz e os osteoclastos, que reabsorvem o tecido ósseo. Os mecanismos pelos quais a modulação óssea ocorre são complexos e envolvem interações entre células, fatores locais e sistêmicos (WATROUS, 1989; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). Vários mediadores estão envolvidos nesses mecanismos regulatórios como hormônios, moléculas sinalizadoras, citocinas e mediadores lipídicos (PASCO et al., 2004; LAU et al., 2004; NAKASHIMA et al., 2002; DUCY et al., 1997).

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos com papel relevante na resposta inflamatória tecidual (HAMMARSTROM, 1983). Constituem produtos do metabolismo do ácido araquidônico (AA) liberados após ativação celular por toxinas (HERSCHMAN, 1996), complexos imunes (MORI et al., 1992) patógenos ou mediadores solúveis (MILLER e MARKS, 1993). Estes fatores produzem distúrbio da membrana celular e aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação da fosfolipase A2 citosólica para as membranas nuclear e citoplasmática, culminando na liberação do AA dos fosfolipídios de membrana. O AA liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem às prostaglandinas (PGs), tromboxanas, lipoxinas, ácido 15-hidroxi-eicosatetraenóico (15-HETE) e aos LTs (PERES et al., 2007).

Os LTs são produzidos a partir da ação da enzima 5-lipoxigenase (5-LO). Compreendem os leucotrienos LTB₄ e os cistenil-leucotrienos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) que sinalizam de maneira autócrina ou parácrina por meio da ligação nos receptores do tipo transmembrana acoplados a proteína G, denominados GPCRs. LTB₄ age nos receptores BLT1 e BLT2, sendo que o primeiro sinaliza por meio das proteínas G_{ai} e G_q, levando à inibição da adenilato ciclase e aumento do influxo de cálcio, respectivamente. O receptor BLT2 traduz sinais intracelulares similares, mas

apresenta menor afinidade de ligação que o BLT1. Os cistenil-LTs, por sua vez, apresentam dois subtipos de receptores, denominados CysLT1 e CysLT2. A sinalização induzida por ambos receptores é mediada pelo influxo de cálcio por estes estarem acoplados a proteínas do subtipo Gαq (PERES et al., 2007). Especificamente, o LTB4 é um potente mediador quimiotático do ácido araquidônico, responsável pelo recrutamento de leucócitos e amplificação da resposta inflamatória. É principalmente produzido por neutrófilos, macrófagos e mastócitos (LIAGREA et al., 1997; LEWIS et al., 1990) e está altamente presente no fluido sinovial e no soro de pacientes com doenças osteoinflamatórias como a artrite reumatóide (HOXHA, 2017).

O processo inflamatório no contexto ósseo está associado ao favorecimento da reabsorção óssea, podendo ser aumentada e comprometer a formação do osso na ausência de homeostasia. As citocinas pró-inflamatórias podem influenciar a osteoclastogênese. O fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kapa B (RANKL) são necessários para a osteoclastogênese. O RANKL, membro da família do fator de necrose tumoral-α (TNF-α), é um dos fatores osteoclastogênicos que atuam diretamente na formação e atividade dos osteoclastos assim como outras citocinas e mediadores pró-inflamatórios como as interleucinas (IL) 1, IL6, IL17 e a oncostatina M (BRIOT et al., 2017).

O principal papel dos LTs no metabolismo ósseo está relacionado com a supressão da formação óssea por meio da modulação da função dos osteoclastos e/ou osteoblastos (TRAIANEDES et al., 1998). Trabalhos demonstraram que a enzima 5-lipoxigenase (responsável pela síntese de LTs e codificada pelo gene Alox5) é um regulador negativo da densidade óssea, sugerindo seu papel como indutor de doenças osteodegenerativas, como a osteoporose (KLEIN et al., 2004), osteoartrite (PAREDES et al., 2002) e artrite reumatoide (HOXHA, 2017).

Nesse sentido, vários trabalhos demonstram seu papel na reabsorção óssea mediada por osteoclastos. A administração local de LTB4 na calvária de ratos aumentou a reabsorção óssea in vivo, sugerindo que o LTB4 atua por meio da modulação positiva do número e/ou atividade dos osteoclastos (GARCIA et al., 1996). Hikiji et al. (2009) mostraram que os osteoclastos expressam BLT1, mas não BLT2, além de sintetizarem LTB4. Também demonstraram que a sinalização via BLT1 - Gαi - Rac1 aumenta a ativação dessas células. Além disso, a inibição do BLT1 atenua o desenvolvimento de doenças relacionadas à reabsorção óssea como a osteoporose.

Com relação aos osteoblastos, foi demonstrado que células primárias humanas são capazes de sintetizar LTB₄ e possuem os receptores BLT1 e BLT2, responsáveis por sua ação biológica (PAREDES et al., 2002). Além disso, LTB₄ inibe a proliferação de osteoblastos primários de ratos (REN e DZIAK, 1991), a formação de nódulos mineralizados e a atividade de fosfatase alcalina (TRAIANEDES et al., 1998). A regulação negativa da formação óssea pelos metabólitos da via da 5-LO foi demonstrada pela inibição da capacidade de os osteoblastos formarem osso novo (TRAIANEDES et al., 1998). No entanto, ainda pouco se conhece sobre o papel dos LTs na regulação da diferenciação osteogênica, e o seu impacto na osteoclastogênese. A compreensão dos mecanismos orquestrados por mediadores inflamatórios que levam a diferentes respostas biológicas no tecido ósseo é de grande importância, podendo auxiliar no tratamento da perda óssea associada a doenças osteoinflamatórias, traumas nas áreas ortopédicas e odontológicas ou até mesmo neoplasias malignas ósseas.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A biologia celular do metabolismo ósseo

O osso é um órgão dinâmico no qual é continuamente remodelado por processos altamente coordenados. Ao longo da vida o osso antigo é substituído (reabsorção) por osso novo (formação) por meio de uma complexa rede de sinalização intercelular formado por diferentes tipos de células: osteoblastos, que produzem a matriz óssea, osteócitos, que regulam a homeostase óssea, osteoclastos, que reabsorvem o osso, e células do sistema imune inato e adaptativo que afetam o remodelamento ósseo (FLORENCIO-SILVA et al., 2015; NAKAMICHI et al., 2017). Este processo é regulado por mecanismos sistêmicos e locais, bem como por interações célula-célula, regulando e equilibrando as atividades celulares envolvidas no desenvolvimento ósseo, morfogênese e na remodelação (DATTA et al., 2008; XIAO et al., 2016).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo composto por uma matriz orgânica que corresponde a 35% da sua composição, e uma matriz inorgânica que compõe 65% deste tecido (DATTA et al., 2008). O colágeno é um elemento importante na estrutura óssea sendo o colágeno tipo I o mais predominante na composição da matriz orgânica. Outras proteínas não colágenas como osteocalcina (OC), glicoproteínas, proteoglicanos, proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento estão presentes em menores quantidades (HLAING, COMPSTON, 2014). Os elementos da matriz inorgânica são capazes de mineralizar a matriz orgânica por meio do cálcio e do fosfato que formam cristais na forma de hidroxiapatita (DATTA et al., 2008; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

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

2.1.1 Osteoblastos

Os osteoblastos são comumente conhecidos por sua função de formação óssea e representam 4-6% do total de células presentes no osso. Desempenham um papel fundamental na formação e manutenção da matriz óssea que é realizado pela interação com as outras células que compõe o tecido ósseo: osteoclastos e osteócitos (MOTYL et al., 2017; XIAO et al., 2016).

A construção óssea pelos osteoblastos implica duas etapas principais: deposição de matriz orgânica e sua posterior mineralização. O primeiro passo requer a secreção de proteínas de colágeno, principalmente colágeno tipo I, proteínas não colágenas, como osteocalcina (OCN), osteonectina (ON), sialoproteína óssea (BSP) e osteopontina (OPN), além de proteoglicanos. A matriz óssea recém-formada, não mineralizada, é chamada osteóide (CAPULLI et al., 2014).

A formação de hidroxiapatita acontece nos processos iniciais da mineralização, no lúmen celular, no interior das vesículas de matriz. Tais vesículas extracelulares são liberadas por brotação a partir de microvilosidades da superfície da membrana de osteoblastos, odontoblastos e condrócitos (CAPULLI et al., 2014; THOUVEREY et al., 2011).

Estudos revelam o papel dos osteoblastos como reguladores endócrinos uma vez que são capazes de liberar mediadores, demonstrado claramente na interação do Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF), que é uma citocina transmembrana, podendo ser secretada e produzida por osteoblastos, com o seu receptor C-Fms expresso na superfície de pré-osteoclastos, promovendo assim a sua proliferação e diferenciação. Esses novos achados retratam o osso como um tecido central na homeostase corporal (CAPULLI et al., 2014; LEE et al., 2017).

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

A importância do gene *Osf2/Cbfa1* na diferenciação dos osteoblastos e na formação óssea foi observada. Identificado bioquimicamente como um

transativador/modulador da expressão de OCN, gene específico dos osteoblastos. Experimentos realizados com ratos com deficiência no gene *Cbfa1* apresentaram ausência completa de osteogênese e falta de ossificação tanto endocondral quanto intermenbranosa (KARSENTY, 1998).

As células-tronco mesenquimais (MSC) seguem etapas programadas que exigem a expressão de genes específicos para a formação das células do tecido conjuntivo, as quais para a formação de osteoblastos, devem estar sob o controle de estímulos pré-osteogênicos. A síntese de Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs) e membros das vias *Wingless-ints* (Wnt) juntamente com a expressão dos fatores de transcrição *Distal-less homeobox 5* (Dlx5), *osterix* (Osx), bem como *Runx2*, são cruciais para a diferenciação osteoblástica (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

As Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs), desempenham papéis importantes na manutenção da massa óssea. Suas propriedades osteoindutoras regulam a diferenciação de células tronco mesenquimais (MSC) em componentes celulares do tecido ósseo, cartilagem ou tecido adiposo. Juntamente com a via das Wnts, as BMPs, são cruciais para o começo da osteoblastogênese, onde auxiliam no comprometimento das MSCs com a linhagem osteo/condroprogenitora (DYER et al., 2014). As BMPs conferem seus efeitos sobre os osteoblastos pela ativação dos receptores de membrana de BMPs e as suas vias de sinalização. Além disso, estão relacionadas à diferenciação endotelial, no qual estudos recentes mostraram que as BMPs regulam processos como a resposta endotelial à hipoxia e aos estímulos inflamatórios (YANG et al., 2014).

Runx-related transcription factor 2 (Runx-2) é um regulador fundamental para o desenvolvimento e formação óssea, este fator de transcrição modula vários genes relacionados aos osteoblastos, como por exemplo, OCN, OPN e BSP, fator de crescimento tumoral (TGF), incluindo o sistema RANKL/OPG, indicando que também poderia influenciar a atividade do osteoclastos. Além disso, a superexpressão de *Runx2* é capaz de inibir a adipogênese em MSCs e desencadear o estímulo as células precursoras de osteoblastos, aumentando a atividade da fosfatase alcalina (ALP) e a expressão de OCN (ZANATTA et al., 2012; ZHANG et al., 2006).

Osterix (Osx) é um fator de transcrição do tipo *zinc finger* que impulsiona a expressão dos genes alvos por meio da sua associação com a proteína de especificidade (Sp), que é expressa em células da linhagem osteoblástica e no

esqueleto em desenvolvimento, onde regula a expressão de uma série de genes osteoblásticos (BARBUTO, MITCHELL, 2013).

Dlx5 promove a osteogênese sob o controle de BMPs. Dlx5 é altamente expresso no esqueleto em desenvolvimento e também é induzido durante a cicatrização de fraturas (CAPULLI et al., 2014).

2.1.2 Osteoclastos

Os osteoclastos são células que tem como principal função a reabsorção da matriz óssea. Primeiramente, pré-osteoclastos mononucleares são recrutados para os locais onde a matriz óssea será reabsorvida, em seguida, passam por um processo de fusão via *DC-STAMP* e/ou *ATP6V0d2*, formando osteoclastos maduros multinucleados oriundos da linhagem de monócitos/macrófagos (CAPULLI et al., 2014; IVASHKIV, 2015).

Osteoclastos multinucleados são apenas encontrados em contato com a superfície do osso, ou dentro de uma lacuna na matriz óssea formada por sua própria atividade reabsortiva (lacuna de *Howship*), não circulando na corrente sanguínea. Possuem uma região denominada borda em escova, no interior da qual utilizam bombas de prótons para acidificar o compartimento extracelular. Essas bombas liberam na lacuna de *Howship* prótons H^+ e disponibilizam íons Cl^- gerados intracelularmente pela ação da enzima anidrase carbônica II, promovendo a formação de HCl e a diminuição do pH (CHARLES, ALIPRANTIS, 2014; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Nas extremidades da borda em escova existem zonas citoplasmáticas desprovidas de organelas, conhecidas como “zonas claras”, que são locais de adesão à matriz óssea. Essas regiões são ricas em filamentos de β -actina, formando um “anel de actina” que é um marcador de osteoclasto ativo. A interação entre o anel de actina e a matriz óssea forma a zona de selamento, composta pelas lacunas de *Howship* citadas anteriormente (IVASHKIV, 2015). Estas isolam o sítio de reabsorção no qual são secretadas enzimas proteolíticas, metaloproteinases de matriz (MMPs), fosfatase ácida târtaro-resistente (TRAP) e catepsina K. Esta última enzima é uma cisteína protease lisossomal expressa em osteoclastos, responsável pela degradação enzimática da porção orgânica da matriz óssea durante a atividade reabsortiva. A adesão de osteoclastos à superfície óssea é essencial para a reabsorção, sendo este

processo mediado pela ação de proteínas localizadas na superfície celular, principalmente ITGB3 (codificada pela $\alpha v\beta 3$ integrina), o qual é capaz de ligar-se a peptídeos contendo a sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp presentes em proteínas da matriz óssea como osteopontina e sialoproteína óssea, estando envolvida em interações célula-célula e célula-matriz (IVASHKIV, 2015; WANG et al., 2011).

O processo de formação de osteoclastos, também conhecido como osteoclastogênese, é um mecanismo mediado pela regulação do sistema RANK/RANKL/OPG. Inicia-se a partir da proliferação de células progenitoras hematopoiéticas, devido à ligação do M-CSF ao receptor expresso na superfície celular (cFms). A ligação do M-CSF induz a autofosforilação do receptor, promovendo interações com proteínas adaptadoras e indução de diferentes vias de sinalização intracelular como ERK1/2, PI3K e MAPKs (NAKAMICHI et al., 2017; XIAO et al., 2016). A depleção do c-Fms em camundongos causa o desenvolvimento de osteopetrose, evidenciando a importância funcional do receptor para a homeostase óssea (CHARLES, ALIPRANTIS, 2014).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL) é um membro da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF), expresso por osteoblastos, células estromais e linfócitos T e B ativados, o qual liga-se com o seu receptor, RANK, presente tanto em células precursoras como em osteoclastos multinucleados. A sinalização RANKL /RANK regula a diferenciação e fusão de células progenitoras em pré-osteoclastos e osteoclastos multinucleados, bem como a sua ativação e maturação (INDO et al., 2013).

O RANK ativa o receptor associado ao Fator de Necrose Tumoral-6 (TRAF6) que está relacionado com as vias de sinalização do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e das proteínas quinases ativadas por mitose (MAPKs). A ativação dessas vias induz a expressão do fator nuclear de células T ativadas- citoplasmático 1 (NFATc1) que regula positivamente a osteoclastogênese sob estímulo do RANKL (CAPULLI et al., 2014; INDO et al., 2013).

A expressão do RANKL por osteoblastos é regulada por diversas citocinas e hormônios, incluindo os andrógenos, os quais tem a capacidade de prevenir a osteoclastogênese tanto direta quanto indiretamente. Além disso, osteoblastos também expressam osteoprotegerina (OPG), a qual é uma proteína solúvel com elevada afinidade pelo RANK que bloqueia a ligação do RANKL e impede a diferenciação das células progenitoras em osteoclastos. Hormônios esteróides

sexuais regulam a expressão de OPG e RANKL *in vitro* e *in vivo*, sendo o eixo RANK/RANKL/OPG o principal regulador da osteoclastogênese (DATTA et al., 2008; WANG et al., 2011). Camundongos RANKL-*knockout* apresentaram grave osteopetrose, com completa ausência de osteoclastos (KONG et al., 1999).

2.1.3 Osteócitos

O osteócitos possuem um papel fundamental no controle de osteoblastos e osteoclastos (DATTA et al., 2008; XIAO et al., 2016). São células achatadas e fusiformes e estão localizadas no interior das lamelas do osso trabeculado e cortical. São envolvidos por matriz extracelular, formando lacunas. Essas estruturas estão interligadas por uma rede de canais finos (canalículos) os quais são ocupados por finas extensões do citoplasma dos osteócitos, permitindo o contato entre as células adjacentes. (CAPULLI et al., 2014; STAINS et al., 2014). Os canalículos são importantes na manutenção da vitalidade destas células, pois é através deles que se processam as trocas metabólicas entre as células e os fluidos orgânicos. Quando os canalículos são obstruídos, as células morrem, ficando as lacunas vazias (STAINS et al., 2014).

O osteócito é formado a partir de um osteoblasto envolto por osteóide. Os osteoblastos, agora chamados de osteócitos, apresentam atividade reduzida, apresentando fundamental contato com as demais células e mantendo a integridade do tecido ósseo (GUO et al., 2010).

A quantidade de osteócitos existentes por unidade de volume ósseo é dependente da velocidade do processo de formação óssea. Quanto maior for a rapidez de formação óssea maior será a quantidade de osteoblastos aprisionados que se transformarão, posteriormente, em osteócitos. Normalmente, o osso embrionário e o osso em fase de reparação contêm um número mais elevado de osteócitos do que o osso lamelar. Estas células ainda produzem proteínas de matriz e possuem uma grande quantidade de processos celulares ricos em filamentos que são organizados durante a formação da matriz e anterior ao processo de mineralização. Formam uma rede de contato com outros osteócitos por meio de finos prolongamentos que são responsáveis pelo transporte de moléculas e íons entre célula-célula (FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

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

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

2.2 Eicosanóides

Eicosanóides são compostos oxigenados formados a partir de ácidos graxos (SMITH e MURPHY, 2002). O principal precursor de eicosanoides é o ácido araquidônico (AA), um ácido graxo de 20 carbonos que está presente em vários tipos celulares. Sua estimulação por meio de vários agonistas celulares, incluindo agonistas mediados por receptores (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), interleucina-8 (IL-8) e fator de ativação de plaquetas), microorganismos, partículas fagocíticas e estímulos não específicos, como danos ou lesões (PIPER e VANE, 1971), ativa enzimas fosfolipases (PLA), predominantemente PLA₂, que liberam AA das reservas de fosfolípidos de membrana. Uma vez no citosol, AA pode ser metabolizado por três principais vias para formar os eicosanóides, que são liberados da célula de origem e atuam de maneira autocrina/paracrina em células alvo. Compreendem eicosanóides as prostaglandinas (PGs) e tromboxanas (denominados prostanóides), formados pela ciclooxigenase (COX); os leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs), sintetizados via lipoxigenases (LOXs; LOs) (SAMUELSSON et al., 1987; 13 SERHAN et al., 1984); e ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs), por enzimas do citocromo P450 (CYP) (CAPDEVILA et al., 1990; BENNETT et al. 2016).

2.2.1 Leucotrienos

Os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos biologicamente ativos, derivados da via da 5-lipoxigenase, do metabolismo do ácido araquidônico e são sintetizados por leucócitos, mastócitos, macrófagos e outros tecidos e células em resposta a estímulos imunológicos e não imunológicos (PERES et al., 2007; HAMMARSTROM, 1983). Eles estão relacionados a vários efeitos biológicos, como contração de músculos lisos brônquicos, estimulação da permeabilidade vascular, atração e ativação de eletrólitos. Desempenha um papel importante nas reações de hipersensibilidade imediata, possuindo ainda efeitos pro-inflamatórios pronunciados (SAMUELSSON, 1983). Comparado com a histamina, substância responsável pela constrição das vias aéreas e a formação de edema, os LTs são mais potentes e seus efeitos apresentam maior duração (HAMMARSTROM, 1983).

LTs constituem os LTB₄ e cistenil LTs (cysLTs). LTB₄ é um mediador lipídico que foi inicialmente reconhecido pelo seu envolvimento no recrutamento de neutrófilos e é um potente agente quimiotático, enquanto cysLTs (LTC₄, LTD₄ e LTE₄) (WAN et al., 2017) são conhecidos por suas propriedades broncoconstritoras (LEWIS et al., 1990).

LTs atuam por meio de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). LTB₄ age nos receptores específicos BLT tipo 1 (BLT1) e BLT tipo 2 (BLT2) e os cysLTs se ligam nos cysLT tipo 1 (cysLT1) e cysLT tipo 2 (cysLT2) (PERES et al., 2007).

Os GPCRs constituem uma grande classe de receptores que sinalizam a ativação de pequenas proteínas heterotriméricas G (G α , G β e G γ) (LANDRY et al., 2006). Estas proteínas G são classificadas em quatro famílias com base em suas subunidades α : G α_s , que ativa adenilato ciclase e tirosina quinase Src; G α_i , que inibe classicamente a adenilato ciclase, mas também pode ativar tirosina quinase Src; G α_q , no qual estimula a fosfolipase C e a tirosina quinase de Bruton; e G α_{12} , que ativa a tirosina quinase de Bruton, proteínas ativadoras de GTPase e os fatores de troca de nucleotídeos de guanina, também chamados GEFs (do inglês p115 *Rho guanine exchange factor* Lsc (LANDRY et al., 2006) (PERES et al., 2007). Com relação aos LTs, seus receptores podem acoplar-se às proteínas G α_i e G α_q , resultando em reduções sensíveis à toxina pertussis (PTX) do cAMP e aumento do Ca²⁺ intracelular, respectivamente (LYNCH et al., 1999; SARAU et al., 1999; PERES et al., 2007).

2.2.2 Biossíntese dos Leucotrienos

Os LTs são sintetizados predominantemente por células inflamatórias no envelope nuclear em resposta a inúmeros estímulos (BOUCHAREYCHAS et al., 2017). A ativação celular por um estímulo produz distúrbio da membrana e aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação da fosfolipase A₂ citosólica para as membranas nuclear e citoplasmática, culminando na liberação do AA dos fosfolípidios de membrana. A conversão dos AA livres para os LTs é catalisada pela 5-LO (GLOVER et al. 1995; 27 CLARK et al. 1995). Esta enzima de 78 KDa, em um primeiro momento, converte AA em ácido 5-monohidroperoxidoeicosotetraenoico (5-HPETE), que pode ser convertido em ácido 5-hidroxeicosatetraenoico (5-HETE). Para que ocorra a ativação da 5-LO se faz necessário a presença da proteína adaptadora da 5-LO (FLAP) (ABRAMOVITZ et al., 1993; 31 MANCINI et al., 1993). Sua principal função é aumentar a eficiência das reações da 5-LO por possuir um sítio de ligação para o AA, facilitando assim a transferência deste substrato para a enzima. O metabólito gerado pelo AA, LTA₄ é uma molécula intermediária instável que pode ser convertida em LTB₄, por meio da LTA₄ hidrolase (RADMARK et al., 1984). O intermediário LTA₄ quando não é convertido em LTB₄, sofre conjugação com a glutatona, processo mediado pela enzima glutatona S-transferase, para produção dos LTC₄ (BACH, 1984), que por sua vez sofre degradação sequencial do componente glutatona por peptidases para formação de LTs D₄ e E₄ (LTD₄ e LTE₄), também chamados de CysLts. (SMYTH & FITZGERALD, 2010).

2.3 Envolvimento dos LTs no metabolismo ósseo

O principal papel dos LTs está relacionado com o favorecimento da reabsorção, sugerindo que estes mediadores suprimem a formação óssea por meio da modulação da função dos osteoclastos e/ou osteoblastos (HIKIJ et al., 2009). Nesse sentido, vários trabalhos demonstram o papel dos LTs na reabsorção óssea mediada por osteoclastos, modulando esse processo, devido o aumento do número e atividade de osteoclastos (MOURA et al., 2014; GARCIA et al., 1996; GALLWITZ et al., 1993). Um recente estudo publicado mostrou que camundongos 5-LO KO não apresentaram perda óssea alveolar, demonstrando também um menor número de células TRAP-positivas nos tecidos periodontais, após a infecção com Aa (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) (MADEIRA et al., 2017).

A administração local de LTB₄ na calvária de ratos aumentou a reabsorção óssea *in vivo*, caracterizada pelo aumento da formação e ativação de osteoclastos (GARCIA et al., 1996). Desta forma, os trabalhos sugerem que o LTB₄ atua diretamente na reabsorção óssea por meio da modulação positiva do número e/ou atividade dos osteoclastos. Hikiji et al., (2009) mostraram que os osteoclastos expressam BLT1, mas não BLT2 e produzem LTB₄. Além disso, a sinalização via BLT1 acoplado à proteína G_{αi} e por meio da ativação da proteína Rac1 aumenta a ativação de osteoclastos. A inibição do BLT1 atenua o desenvolvimento de doenças envolvendo reabsorção óssea como a osteoporose.

Em relação ao seu envolvimento em doenças onde há perda de massa óssea, trabalhos da literatura demonstram que a inibição da enzima 5-LO atenua a inflamação e reabsorção óssea na doença periodontal induzida por LPS (LOPES et al., 2017), sugerindo seu papel como indutor de doenças osteodegenerativas, como a osteoporose.

Estudo recente mostrou que LTB₄ e o seu receptor BLT1 acentuam a inflamação sinovial *in vivo* e a reabsorção óssea *in vitro*, sugerindo que ambos poderiam ser marcadores para tratamento de doenças relacionadas com musculoesquelético. Além disso, em condições basais, o BLT1 regula de maneira negativa a osteoclastogênese por meio da via de sinalização NF-κB e Ca²⁺. (BOUCHAREYCHAS et al., 2016).

Com relação aos osteoblastos, foi demonstrado que células primárias humanas são capazes de sintetizar LTB₄ e possuem os receptores BLT1 e BLT2,

responsáveis por sua ação biológica (PAREDES et al., 2002). Além disso, LTB₄ inibe a proliferação de osteoblastos primários de ratos (REN e DZIAK, 1991), a formação de nódulos mineralizados e a atividade de fosfatase alcalina (TRAIANEDES et al., 1998). A regulação negativa da formação óssea pelos metabólitos da via 5-LO foi demonstrada pela inibição dos osteoblastos (TRAIANEDES et al., 1998).

Outro estudo recente mostrou que o 5-LO tem um duplo papel na osteoclastogênese durante o desenvolvimento da periodontite apical. No início, a sinalização de osteoclastogênese foi regulada pela inibição de 5-LO, mas a inibição de longo prazo não conseguiu prevenir a síntese de mediadores catabólicos que resultaram em aumento da perda óssea (PAULA-SILVA et al., 2016).

Vários estudos associam o aumento da produção de leucotrienos a doenças periodontais, entretanto a contribuição relativa para a destruição do tecido é desconhecida. Lopes et al., (2017) mostraram que a administração de inibidor de 5-LO reduziu a produção de LTB₄ e os níveis de TNF e IL-12 nos tecidos gengivais. Além disso, a redução dos níveis de LTB₄ nos tecidos gengivais foi associada a uma diminuição significativa na reabsorção óssea e a uma marcada redução no número de osteoclastos e células inflamatórias. A compreensão desses mecanismos é de suma importância no contexto de doenças osteoinflamatórias e/ou condições de reabsorção óssea.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo do trabalho foi avaliar o efeito dos leucotrienos na diferenciação osteogênica de animais 129/Sv e 5-LO KO e o seu impacto na osteoclastogênese.

Para isso foram avaliados:

- A densidade óssea dos camundongos 5-LO KO em comparação com os 129/Sv WT por μ -CT;
 - A atividade de ALP e potencial de mineralização em osteoblastos WT e 5-LO KO, por ensaio enzimático e ensaio colorimétrico com vermelho de alizarina;
 - A expressão gênica de marcadores de formação e reabsorção óssea, por qRT-PCR;
 - A quantificação dos 2º mensageiros cAMP e cálcio intracelular por kits de imunoenaios comerciais;
 - A quantificação dos eicosanoides em osteoblastos, por espectrometria de massas;
 - O perfil proteômico de osteoblastos das linhagens murinas WT e 5-LO KO por espectrometria de massas;
 - A contribuição dos LTs sintetizados pelos osteoblastos, ou LTs exógenos na osteoclastogênese, acompanhada pela atividade de TRAP, ensaio de reabsorção e expressão gênica.
-
-

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos 129/Sv, *wild type* (WT) e Alox5^{tm1Fun} (5-LO KO), ambos com 8 semanas de idade, foram obtidos do The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, EUA) e mantidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP, Universidade de São Paulo. As matrizes e os animais para os experimentos *in vivo* (ambos com 8 semanas) foram procedentes da FCFRP/USP e os animais de 7-9 dias (para os experimentos *in vitro*) do biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP. Todos os experimentos foram aprovados e conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da FOB/USP (CEEPA Proc. n. 005/2017) (**Anexo**).

4.2 Microtomografia Computadorizada (μ CT)

As imagens ósseas foram adquiridas no escaner SkyScan 1174 μ CT, com um tamanho voxel (volume e pixel) de 14,1 μ m para as vértebras (análise da vértebra lombar nº 5 (L5)) e 7,7 μ m para os fêmures (raio-X 50kV e 800 μ A). Os seguintes parâmetros foram avaliados utilizando o programa CT-An: densidade de volume ósseo (BV/TV), número de trabéculas (Th.N), espessura das trabéculas (Th. Th) e a separação das trabéculas (Th. Sp). As imagens 3D foram reconstruídas usando o programa CT-Vox.

4.3 Isolamento de osteoblastos primários

Para a obtenção dos osteoblastos, os animais das linhagens 129/Sv WT e 5-LO KO entre 7-8 dias de idade foram eutanasiados, e em seguida foram removidas as calvárias. As mesmas foram lavadas em HBSS e então foram digeridas em solução de 2,5 mg/mL de collagenase e 1 mg/mL de tripsina, por três vezes sob agitação em banho maria a 37°C. A primeira digestão foi realizada por 15 minutos, e após isso a solução foi descartada (por conter fibroblastos). A segunda digestão foi realizada por

30 minutos, seguido de centrifugação a 1250 rpm à temperatura ambiente (TA) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em meio de cultura completo (α MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB)), colocado em garrafas de cultura e mantido em estufa de CO₂ para os experimentos posteriores. A terceira digestão foi realizada por 45 minutos e após esse tempo foram realizados os mesmos procedimentos das células obtidas na segunda digestão (MARZIA et al., 2000).

4.4 Delineamento experimental e tratamento das células com indutores osteogênicos, LTs, inibidores e antagonistas

Para os experimentos com osteoblastos as células foram plaqueadas nas densidades de 5×10^3 , 2×10^4 e 3×10^5 células/poço para os ensaios de cálcio intracelular (placa de 96 poços), ALP e mineralização (placa de 24 poços), RT-PCR e cAMP (placa de 6 poços), respectivamente. Após 48 horas de adesão, as células foram tratadas com meio osteogênico (MO) (α MEM com 10% de FBS, 1% de antibiótico e suplementado com 50 μ g/mL de ácido ascórbico e 10mM de β -glicerofosfato) para a diferenciação celular. Em seguida os osteoblastos foram tratados ou não (controle) com LTB₄ e LTD₄ a 10^{-8} M (JIANG et al., 2005), os inibidores da síntese de LTs MK 886 e MK 591 nas concentrações de 10^{-6} M os antagonistas dos receptores do LTB₄, CP-105696 a 10^{-6} M e U75302 na dose de 10^{-7} M e, dos receptores dos CysLTs, MK 571 na concentração de 10^{-6} M (SECATTO et al., 2014; PERES et al., 2007) pelos períodos de 4 até 21 dias. No grupo controle, as células foram incubadas com a mesma porcentagem de veículo controle (DMSO ou etanol). O meio de cultura foi trocado a cada três dias de cultivo celular.

4.5 Preparo do meio condicionado (MC)

Os osteoblastos primários das linhagens murinas WT e 5-LO KO foram cultivados em MO e os sobrenadantes foram coletados com 14 dias, centrifugados a 1300 rpm por 10 minutos a 4° C, transferidos para um novo tubo (desprezando-se o pellet) e armazenados a -80° C. O meio condicionado dos osteoblastos (MC OBL) foi coletado e armazenado para ensaios posteriores de diferenciação osteoclastogênica. Para os experimentos, o MC foi utilizado na proporção de 1:1, ou seja, 50% de MC e

50% de MO fresco, sendo utilizado o MC de células com 14 dias de cultivo, período de maior diferenciação celular e de maior produção de LTs.

4.6 Fosfatase Alcalina (ALP)

O extrato protéico do lisado celular foi obtido por meio da adição de 200µL do tampão contendo 10mM de Tris pH 7,5; 0,5 mM MgCl₂ e 0,1% Triton X-100. A atividade da ALP é dada pela conversão do pNPP (p-nitrofenilfosfato), substrato da enzima, em p-nitrofenol, produto de coloração amarela em meio alcalino. Para tanto, o meio de reação foi adicionado em placa de 96 poços (solução contendo tampão glicina (25mM, pH 9,4), acrescido de 2mM de MgCl₂ e 1mM de pNPP) e incubado por 30 minutos a 37°C (tempo necessário para estabilização). Após isso, foram adicionados um volume de 50µL de amostra (diluição da amostra 1:1). A placa foi mantida a 37°C durante 30 minutos. A reação foi paralisada com NaOH 1M e o produto final (p-nitrofenol) foi quantificado a 405nm. Os resultados foram expressos como atividade em nmol de p-nitrofenol x min⁻¹ x mg⁻¹ de proteína (OLIVEIRA et al., 2017).

4.7 Quantificação de proteína total

A quantificação de proteínas totais foi determinada pelo Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Em placa de 96 poços, foi realizada uma curva padrão a partir de 1 mg/mL de albumina bovina sérica. As amostras foram diluídas (em volume final de 5µL) e pipetadas na placa. Após isso, adicionou-se 250µL do reagente de Bradford (BioRad) em todos os poços. A leitura da placa foi realizada a 405nm em espectrofotômetro após 10 minutos de incubação à TA.

4.8 Mineralização

A mineralização foi avaliada por coloração com Alizarina Red S (Sigma®). Após 14 e 21 dias de cultivo, os sobrenadantes foram descartados e as células lavadas com PBS 1X seguida da fixação com formalina a 10% por 10 minutos à TA. As células foram incubadas com solução de alizarina 2% pH 4,2 por 10 minutos em TA seguido de 3 lavagens com H₂O ultrapura. As placas foram fotografadas utilizando a câmera El Logic 100 Imaging System e quantificadas posteriormente.

A análise quantitativa da coloração foi avaliada pelo método colorimétrico segundo Da Silva et al. (2012). Após as placas estarem totalmente secas, foram adicionados 280 µL de ácido acético a 10% diretamente em cada poço corado com vermelho de alizarina. A placa foi submetida à agitação por 30 minutos à TA. O conteúdo de cada poço foi transferido para microtubos, que foram aquecidos a 85° C por 10 minutos e depois mantidos em gelo por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada tubo foi transferido para placas de 96 poços. Posteriormente, foi adicionado 40 µL de hidróxido de amônia a 10% em cada poço para neutralização do ácido. A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 405 nm.

4.9 qRT-PCR

O RNA total de osteoblastos e osteoclastos foi isolado pelo método de extração por colunas, utilizando-se o *RNeasy mini kit-74106* e *DNase-79254* (ambos da Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O pellet das amostras foi ressuspenso em 30µL de água DEPC e quantificado no Nanodrop. 2 µg de RNA foram reversamente transcritos e o equivalente a 0,1 µg foram utilizados para reações de PCR. qRT-PCR quantitativo foi realizado utilizando-se o Sensi mix Hi-Rox SYBR Green (Bioline). Os resultados foram expressos como vezes de aumento no qRT-PCR e normalizados pelo gene constitutivo GAPDH. A tabela 1 mostra os primers utilizados para o ensaio de expressão gênica dos marcadores de formação e reabsorção óssea, além de marcadores inflamatórios.

Tabela 1. Primers utilizados para qRT-PCR

GENE	PRIMERS
Acp5	Fw: 5'- CAGCAGCCAAGGAGGACTAC-3' Rv: 5'- ACATAGCCACACCGTTCTC-3'
Alox5	Fw: 5'- CTACGATGTCACCGTGGATG-3' Rv: 5'- GTGCTGCTTGAGGATGTGAA-3'
Alpl	Fw: 5'- CCAGCAGGAAACACACAAGG-3' Rv: 5'- CAGGGAGACACAACCAGAGC-3'
Bglap	Fw: 5'- AAGCAGGAGGGCAAAAAGGA-3' Rv: 5'- AGCAGCAGAGACAACCAAAC-3'
BLT1	Fw: 5'- ATGGCTGCAAACACTACATCTCCT-3' Rv: 5'- CACTGGCATACTGCTTATTCCAC-3'
BLT2	Fw: 5'- ACAGCCTTGGCTTTCTTCAG-3' Rv: 5'- TGCCCCATTACTTTTCAGCTT-3'
Col1a1	Fw: 5'- GCAAACGGGAACAGAACGAA-3' Rv: 5'- CAAACACGCCAAAGAAGCCA-3'
Ctsk	Fw: 5'- AAGTGGTTCAGAAGATGACGG-3' Rv: 5'- TCTTCAGAGTCAATGCCTCCG-3'
Cyslt1	Fw: 5'- CAA CGA ACT ATC CAC CTT CAC C-3' Rv: 5'- AGC CTT CTC CTA AAG TTT CCA C-3'
Gapdh	Fw: 5'- TGGCAAAGTGGAGATTGTTGC-3' Rv: 5'- AAGATGGTGATGGGCTTCCCG-3'
Il-1B	Fw: 5'- ATGGCAACTGTTCTGAACTCAAGT-3' Rv: 5'- CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTT-3'
Il-6	Fw: 5'- GAGGATACCACTCCCAACAGACC-3' Rv: 5'- AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA-3'
MMP-2	Fw: 5'- AAAAAGAGCCCAAGAAAGG-3' Rv: 5'- GCCCACCAGCCAGACACA-3'
MMP-9	Fw: 5'- AGAAACAGCAGGCAAAAGAG-3' Rv: 5'-GAGGAAAGCACGGAGGAGAA-3'
Nfatc1	Fw: 5'- TTGCGGAAAGGTGGTATCTC-3' Rv: 5'- TGGGAGATGGAAGCAAAGAC-3'
Tnfrsf11b (Opg)	Fw: 5'- AAAGCACCTGTAGAAAACA-3' Rv: 5'-CCGTTTTATCCTCTCTACTC-3'
Tnfsf11 (RANKL)	Fw: 5'- CCAAGATCTCTAACATGACG-3' Rv: 5'- CACCATCAGCTGAAGATAGT-3'
TNFA	Fw: 5'- GCAGGTCTACTTTGGAGTCATTGC-3' Rv: 5'- TCCCTTTGCAGAACTCAGGAATGG-3'
Runx2	Fw: 5'- AACCCACGGCCACCCAGAACACA-3' Rv: 5'-ACAGGCGGGGAGAAGGAAAAGGAG-3'
Sp7	Fw: 5'- AGCAACCCAAACCAAAAAGC-3' Rv: 5'- AGAAACCCAAACCCACACCA-3'

Fw: Forward; Rv: Reverse.

4.10 Quantificação de Cálcio Intracelular

O ensaio foi realizado utilizando o kit comercial Fluo4-NM Calcium Kit (Molecular Probes™) de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, o meio de cultura foi removido e as células foram previamente tratadas com 100 µL da solução do kit contendo probenecide a 2,5 mM. A placa foi incubada por 30-45 a 37° C e a seguir, LTB₄, LTD₄ ou o veículo foram adicionados aos poços específicos no momento da leitura. A média da intensidade de fluorescência foi avaliada na excitação a 494 e emissão a 516nm.

4.11 Quantificação de cAMP intracelular

A quantificação de AMPc intracelular foi realizada em osteoblastos WT e 5-LO KO tratados ou não com LTB₄ e LTD₄ no 7º e 14º dias. Antes da coleta, as células foram incubadas com LTB₄ e LTD₄ a 10⁻⁶ M por 15 minutos. Para tanto, os sobrenadantes foram descartados e as células lisadas pela incubação com 0.1 M HCl (22°C) por 20 min seguido da disrupção com *cell scraper*. Os níveis de cAMP foram determinadas pelo kit de imunensaio ELISA de acordo com as instruções do fabricante (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA).

4.12 Quantificação de eicosanoides a partir de sobrenadante celular por Espectrofotometria de Massas

4.12.1 Coleta

1x10⁶ células foram plaqueadas em placas de petri de 90mm x 15mm e mantidas com α-MEM a 10%SFB em estufa com 5% de CO₂ por 2, 7 e 14 dias. Após 48 horas de adesão celular as células foram cultivadas em meio osteogênico. Para a coleta as células foram lavadas com PBS e foi adicionado uma solução contendo 5, 10 e 20 µM de ionóforo de cálcio em HBSS com Ca⁺ e Mg⁺ por 30 minutos em incubação a 37°C, para estimular a produção de LTs. Após isso, o sobrenadante foi coletado e adicionado a mesma proporção de metanol (1:1). Em seguida as amostras foram armazenadas no freezer -80°C para posterior extração e concentração dos eicosanóides.

4.12.2 Extração e concentração dos eicosanoides para a análise no espectrofotômetro de massas

Nesta técnica, os eicosanoides dissolvidos no sobrenadante são separados de outros compostos presentes no meio de acordo com suas propriedades químicas e físicas, separando os compostos de baixa polaridade de compostos mais polares. A separação por extração em fase sólida (do inglês Solid phase extraction - SPE) depende da afinidade do analito de interesse dissolvido em um líquido (fase móvel) pela fase sólida que preenche o cartucho (fase estacionária). Os lipídeos presentes no meio aquoso são adsorvidos na fase hidrofóbica do cartucho de SPE (Strata-X, C18, HBL) enquanto que os componentes mais polares presentes no meio passam diretamente através do cartucho na fase aquosa durante a eluição, sem ficarem retidos. Para recuperar os eicosanoides que permaneceram adsorvidos na fase estacionária do cartucho SPE, utilizamos um solvente orgânico miscível com os lipídeos de interesse.

Em geral, os procedimentos da SPE contêm 5 etapas: 1. Ativação da fase estacionária, 2. condicionamento da fase estacionária, 3. Introdução da amostra, 4. Limpeza da fase estacionária, 5. Recuperação do analito. Para isso, foi adicionado em cada amostra 10 μ L da solução contendo os padrões internos (10ng de AA-d₈; 5ng de 6-KetoPGF_{2 α} -d₄, LTC₄-d₅, LTE₄-d₅; 2ng de 5-HETE-d₈, LTB₄-d₅, LTD₄-d₅, PGF_{2a}-d₄, PGE₂-d₄, PGD₂-d₄, TXB₂-d₄). As amostras foram agitadas e mantidas em gelo. Enquanto isso, os cartuchos SPE foram ativados com 4 mL de metanol e em seguida condicionados com o mesmo volume de água. Após isso, as amostras foram aplicadas nos cartuchos devidamente posicionados na cuba de extração e a bomba a vácuo ligada para auxiliar a passagem da amostra, de forma lenta, através do cartucho SPE. Após a passagem de toda a amostra pelo cartucho, o mesmo foi lavado com 5 mL de água ultra pura para remover possíveis interferentes (ainda não são os lipídeos) que possam ter ficado adsorvidos na fase estacionária. Os cartuchos devem ficar bem secos com o auxílio do vácuo. Após isso, foi encaixado à cuba de extração microtubos para recolher os lavados da eluição contendo os lipídeos. Então, foi realizada a eluição dos eicosanoides com 1 mL de metanol. Após isso, as amostras foram concentradas até ficarem totalmente secas e então o pellet foi ressuspensionado em 50 μ L da solução contendo metanol e H₂O (7:3). As amostras foram transferidas para os vials e em seguida inseridas no espectrômetro de massas (Nexera X2 TripleTOF 5600+ System, SCIEX).

4.13 Análise Proteômica

4.13.1 Extração de proteínas

As proteínas totais dos OBL WT e 5-LO KO foram extraídas com o tampão de lise (Ureia a 6 M, Thiureia 2 M, DTT 10 mM, AMBIC 50mM e SDS 0.1% (m/v)) em gelo por 10 minutos. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 15.000g, 4° C, por 10 min e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, a quantificação de proteínas foi realizada pelo Método de Bradford (Bio-Rad, Hercules, EUA) e 1µg/µL de proteínas foram então transferidos para um microtubo. A seguir, 10 µL de AMBIC a 50 mM foi adicionado à amostra seguido de 25 µL da solução RapiGest SF a 0.2 % (Waters, Milliford, USA). A solução foi incubada a 37° C por 60 minutos seguido de centrifugação no modo pulso. A seguir, foi adicionado 2,5µL de DTT a 100 mM, e as amostras foram homogeneizadas e incubadas em bloco aquecido (37°C) por 40 minutos. Após a amostra ter resfriado à temperatura ambiente, 2,5 µL de iodoacetamida a 300 mM foi adicionado e as amostras incubadas no escuro por 30 minutos.

A digestão proteolítica foi realizada com tripsina na concentração de 50 ng/µL, a 37°C *overnight*. Após a digestão, 10 µL de ácido trifluoroacético a 5% foi adicionado e as amostras foram agitadas e incubadas a 37° C por 90 minutos com o objetivo de hidrolisar o RapiGest. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 30 minutos a 6° C e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo (Waters Total Recovery vial- Waters).

Para a purificação dos peptídeos, as amostras foram carregadas na coluna C18 (PepClean C18 Spin Column) com 2% de ácido trifluoroacético (TFA) em 20% de ACN seguidos dos processos de ativação com 50% de ACN, equilíbrio e lavagem (0,5% de TFA em 5% de ACN) e eluição das amostras com 70% de ACN + 0,1% de ácido fórmico.

A seguir, as amostras foram evaporadas em um concentrador a vácuo (Eppendorf, Hamburgo, DE) e adicionados 190 µL de ACN a 3% contendo 0,1% de ácido fórmico acrescido de 1 µL do padrão de digestão MassPREP (álcool desidrogenase-ADH) da concentração 1 pmol/µl (Waters). As amostras foram

transferidas para um frasco de recuperação total (Waters, Manchester, UK) e adquiridas no espectrômetro de massas.

4.13.2 Cromatografia líquida de ultraperformance acoplada a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

Os peptídeos foram analisados utilizando-se o sistema nanoACQUITY (Waters Milliford, USA) acoplado ao espectrômetro de massas Xevo G2 (Waters, Milliford, USA) e obtidos a partir do pool da triplicata experimental (n=1). Para isso, o sistema UPLC nanoACQUITY foi equipado com uma coluna do tipo HSS T3 (Acquity UPLC HSS T3 column 2,1 mm x 50 mm; 1,8 µm, Waters), previamente equilibrada com 7% da fase móvel B (100% ACN + 0,1 % ácido fórmico). Os peptídeos foram separados por um gradiente linear de 7-85 % de fase móvel B durante 70 min com fluxo de 0,35 µL/min e a temperatura da coluna mantida a 55°C. O MS foi operado em modo íon positivo, com o tempo de aquisição de dados de 70 min. Os dados obtidos foram processados pelo software ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0 (Waters, Milliford, USA). A identificação das proteínas foi obtida por meio algoritmo de contagem de íons incorporado ao software. Os dados obtidos foram buscados no banco de dados da espécie *Mus musculus* baixado do catálogo do UniProt (Universal Protein Resource).

4.14 Isolamento de osteoclastos

Precursos de osteoclastos primários oriundos da medula óssea foram isolados a partir de ossos longos dos animais 129/Sv WT e 5-LO KO, entre 7 a 9 dias de idade. Para isso, fêmures e tíbias foram triturados em HBSS para a liberação da medula óssea, e o sobrenadante foi transferido para um tubo falcon e centrifugado a 1380 rpm por 10 minutos a TA. O pellet foi ressuspensionado em 7mL de HBSS fresco para a estratificação das células com Histopaque. Em seguida foi realizada uma nova centrifugação a 560 rcf (*relative centrifugal force*) por 30 minutos à TA. Então, somente o “anel” (parte esbranquiçada da estratificação no qual contém os monócitos) foi transferido para outro falcon e adicionado 7mL de HBSS. Uma nova centrifugação foi realizada a 1380 rpm por 10 minutos e o pellet foi ressuspensionado em 1mL de meio completo (αMEM, 10% SFB, 1% de penicilina/estreptomicina) e colocado em placa de

petri de 3,5 cm em incubação por 12 minutos (para a adesão de células indesejadas). Após esse tempo, o sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo falcon para a realização da contagem celular. As células da linhagem monocítica-macrofágica foram mantidas com suplementação das citocinas Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) e ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL) (MARINO et al., 2014).

4.15 Delineamento experimental e tratamento das células com citocinas

Para os experimentos de osteoclastogênese foram plaqueados 4×10^5 células/poço para a imunomarcação com TRAP, em placas de 96 poços e 2×10^6 células/poço para o RT-PCR, em placas de 6 poços. Após a contagem, as células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica foram plaqueadas com meio de cultura α MEM com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina e suplementadas com M-CSF na dose de 50ng/mL. Após três dias, o meio foi trocado e adicionado o RANKL na concentração de 120ng/mL. O meio de cultura foi trocado a cada três dias de cultivo celular, sendo o experimento avaliado no período de 10 dias.

4.16 TRAP

Para a realização da TRAP, células da linhagem monocítica-macrofágica foram fixadas com formalina a 10% por 10 minutos à TA e em seguida lavadas com PBS. Após isso, foi adicionado 100 μ L da solução do Kit 387A-1KT (Sigma) contendo nitrato de sódio, fast garnet, solução de ácido fosfórico Naptol, acetato, tartarato e água deionizada, de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram revestidas com papel alumínio para proteção da luz e incubadas a 37° C por 60 minutos à TA. Em seguida as células foram lavadas com água deionizada e mantidas secas para a aquisição das imagens em microscópio invertido.

4.17 Ensaio de reabsorção óssea

Células da linhagem monocítica-macrofágica foram cultivadas em placas de 96 poços sobre fatias ósseas e mantidas por 10-11 dias com suplementação de 50 ng/mL de M-CSF e 120 ng/mL de RANKL. Após o período experimental as fatias ósseas

foram lavadas com solução tampão PBS. Em seguida, as células foram removidas cuidadosamente com cotonete embebido em PBS, esfregando-o na superfície da lâmina de osso retirando, portanto, as células aderidas. Após a remoção dos osteoclastos, as lâminas ósseas foram transferidas para um tubo de ensaio, em seguida foram lavadas com água e então, foi realizado a marcação com o corante azul de toluidina a 1% em água (pH 4,5), agitando o tubo por 30 segundos. Em seguida, foram realizadas 3 lavagens com água deionizada e após isso, as lâminas foram secas com papel absorvente. Depois, as fatias ósseas foram transferidas para uma lâmina de vidro para a aquisição das imagens no microscópio óptico.

4.18 Análise Estatística

Os resultados foram analisados utilizando o programa GraphPad Prism 4. Os grupos experimentais foram submetidos à análise de variância ANOVA One-way, seguido pelo teste de Tukey, ou Teste t de Student não pareado, quando apropriado. A significância foi dada quando $P < 0,05$. Todas as amostras passaram pelo teste de normalidade de acordo com o método de Kolmogorov e Smirnov, onde o valor de P foi $> 0,10$.

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Análise densitométrica

O perfil ósseo vertebral e femural de machos e fêmeas WT e 5-LO KO foi avaliado por meio do μ CT. A figura 1a (A, B) mostra diferenças fenotípicas na vértebra Lombar 5 (L5) entre as linhagens murinas. Os resultados da análise quantitativa das vértebras mostraram maior densidade de volume ósseo em machos 5-LO KO (BV/TV) (Figura 1a C). O perfil do osso trabeculado apresentou diferenças significativas. Os animais KO possuem trabéculas mais espessas (Tb. Th) (Figura 1a E) e menos separadas (Tb. Sp) (Figura 1a F) ($P < 0,05$), porém o número de trabéculas não foi diferente dos animais machos WT (Figura 1a D). Em relação as fêmeas, não houve diferenças nos parâmetros ósseos avaliados entre as duas linhagens ($P > 0,05$). A figura 1b mostra os resultados da análise densitométrica na região da placa de crescimento femural dos animais WT e 5-LO KO. Diferenças fenotípicas entre as duas linhagens murinas podem ser observadas em figura 1b A e B. A análise quantitativa mostrou maior densidade óssea em camundongos machos 5-LO KO em relação aos machos WT e as fêmeas 5-LO KO. Além disso, os fêmures das fêmeas WT apresentaram maior densidade óssea quando comparado as fêmeas 5-LO KO (Figura 1b C) ($P < 0,05$). Em adição, as fêmeas WT apresentaram maior número de trabéculas ósseas e trabéculas menos separadas do que as fêmeas 5-LO KO, e os machos 5-LO KO apresentaram maior número de trabéculas e trabéculas menos separadas do que as fêmeas da mesma linhagem (Figura 1b D, F) ($P < 0,05$) e não apresentando, portanto, diferenças significantes quanto a espessura das trabéculas (Figura 1b E) ($P > 0,05$).

Figura 1a: Análise densitométrica de vértebras L5 em animais WT e 5-LO KO por μ CT. A, B) Imagens das vértebras nos planos frontal e transversal adquiridas pelo software Dataviewer. C) Representação gráfica da densidade óssea (BV/TV). D) Número de trabéculas (Tb.N). E) Espessura das trabéculas (Tb.Th). F) Separação das trabéculas (Tb. Sp). E). (N=4). *Representa diferenças estatísticas entre WT vs. 5-LO KO, entre o mesmo gênero. Teste T de Student não pareado (* $P < 0,05$).

Figura 1b: Análise densitométrica femural de animais WT e 5-LO KO por μ CT. A, B) Imagens dos fêmures nos planos coronal, sagital e axial adquiridas pelo software Dataviewer. C) Representação gráfica da densidade óssea (BV/TV). D) Número de trabéculas (Tb.N). E) Espessura das trabéculas (Tb.Th). F) Separação das trabéculas (Tb. Sp). (N=4). *Representa diferenças estatísticas entre linhagens e diferenças entre gêneros. Teste T de Student não pareado (*P<0,05. **P<0,01).

5.2 Atividade de Fosfatase Alcalina (ALP)

A figura 2, mostra a atividade da ALP em osteoblastos primários de animais WT e 5-LO KO, suplementados com meio osteogênico (50µg/mL de ácido ascórbico e 10mM de β-glicerofosfato), nos períodos de 4, 7, 10 e 14 dias. Em todos os períodos houve maior atividade de ALP nos osteoblastos dos camundongos 5-LO KO (OBL 5-LO KO) ($P<0,05$) quando comparado as células dos animais WT (OBL WT).

Figura 2: Atividade de ALP em osteoblastos murinos WT e 5-LO KO nos períodos de 4, 7, 10 e 14 dias. Os resultados representam a média da atividade enzimática em µmol de p-NP/minuto pela quantidade de proteína total em mg $\pm$ SD. Representação de 3 experimentos independentes (n=5). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO. Teste T de Student não pareado (* $P<0,05$. ** $P<0,01$. *** $P<0,001$).

5.3 Potencial de Mineralização

Investigamos aqui se os LTs endógenos e exógenos são capazes de modular a mineralização óssea, por meio do ensaio colorimétrico vermelho de alizarina. As células foram tratadas com o meio osteogênico e avaliadas por até 21 dias. Os resultados demonstraram que houve maior mineralização nos OBL 5-LO KO quando comparados ao WT ($P<0,05$) (Figura 3A). A figura 3 B e C mostram mineralização dos osteoblastos WT tratados com os LTs exógenos B₄ e D₄ na concentração de 10^{-8} M, os inibidores da síntese de LTs MK 886 e MK 591 a 10^{-6} M e os antagonistas dos receptores BLT1/2 CP-105696, na concentração de 10^{-6} M e

U75302 a 10^{-7} M, além do antagonista dos receptores dos CysLTs, MK 571, na dose de 10^{-6} M.

O tratamento com o LTB₄ e LTD₄, diminuiu a deposição de cálcio em relação ao controle ($P < 0,05$). O mecanismo oposto foi mostrado ao tratar as células com os inibidores da síntese de LTs (MK 886 e MK 591), nos quais foram capazes de aumentar os nódulos mineralizados. Os osteoblastos também foram tratados com os antagonistas dos receptores BLT1/2 (CP-105696 e U75302) e CysLTs (MK 571). Somente os antagonistas do BLT1/2 promoveram um aumento da mineralização em relação ao controle ($P < 0,05$). Em contrapartida, no grupo das células tratadas com os antagonistas dos CysLT1/2 não houve modulação quanto ao grupo controle ($P > 0,05$). Porém os antagonistas CP-105696/U75302 e MK 571 aumentaram a mineralização dos OBL WT em relação aos grupos estimulados com os LTs B₄ e D₄ respectivamente ($P < 0,05$). A ausência de modulação na mineralização também ocorreu quando os osteoblastos foram submetidos aos antagonistas + LTs exógenos, evidenciando o mecanismo de ação dos LTs pelos receptores, principalmente do LTB₄, mostrados na figura 3C. O efeito dos LTs exógenos em osteoblastos 5-LO KO também foi avaliado, no qual houve uma diminuição da deposição de cálcio em relação ao controle além de haver diferenças significativas entre os dois tipos de LTs ($P < 0,05$) (Figura 3 D, E).

Figura 3: Mineralização de osteoblastos murinos WT e 5-LO KO nos períodos de 14 e 21 dias, por vermelho de alizarina. A) Quantificação da deposição de cálcio dos osteoblastos WT e 5-LO KO. B) Imagens da coloração com vermelho de alizarina de osteoblastos WT tratados com LTB₄ (10⁻⁸ M), LTD₄ (10⁻⁸ M), MK886 (10⁻⁶ M), MK591 (10⁻⁶ M), CP-105696 (10⁻⁶ M), U75302 (10⁻⁷ M), U75302+ LTB₄ (10⁻⁷ M; 10⁻⁸ M), MK571 (10⁻⁶ M), MK571 + LTD₄ (10⁻⁶ M; 10⁻⁸ M). C) Quantificação da deposição de cálcio dos OBL WT. D) Imagens das placas evidenciando a deposição de cálcio em OBL 5-LO KO tratados ou não com LTs B₄ e D₄, na concentração de 10⁻⁸ M. E) Quantificação de nódulos mineralizados dos OBL KO. Representação de 3 experimentos independentes (n=6). *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle e # referindo-se aos grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

5.4 Expressão gênica

Primeiramente foi realizado uma cinética para avaliar o perfil dos principais genes envolvidos no metabolismo ósseo em osteoblastos murinos WT e 5-LO KO. Foi avaliado o perfil gênico do Alox5, responsável pela síntese da 5-lipoxigenase, em osteoblastos dos animais WT em diferentes períodos. A cinética do Alox5 apresentou um aumento da expressão no 10º e 14º dia, sugerindo maior síntese de LTs no período de diferenciação celular ($P<0,05$) (Figura 4a A). A expressão do Alpl (ALP) nos osteoblastos 5-LO KO foi maior em todos os períodos quando comparados ao WT ($P<0,05$) (Figura 4a B). Quanto ao Bglap (osteocalcina - OCN), a expressão gênica foi aumentada nas células 5-LO KO em quase todos os períodos, com exceção do 7º dia, quando comparado ao WT (Figura 4a C). Os resultados mostraram também que a expressão de MMP-2 (Figura 4a D) foi maior nos OBL 5-LO KO no período basal (dia 0) e depois com 14 dias, porém houve uma diminuição da expressão no período de 7 dias, em relação aos OBL WT ($P<0,05$). A expressão do MMP-9 (Figura 4a E) foi maior com 4 e 7 dias nos osteoblastos KO, quando comparados com o WT ($P<0,05$). Os demais períodos não apresentaram modulação. Também foram avaliados os níveis de expressão relativa do Tnfsf11 (RANKL) e Tnfrsf11b (OPG). A cinética do RANKL mostrou maior expressão gênica nos OBL 5-LO KO com 0, 4 e 7 dias (Figura 4a F), por outro lado para a OPG todos os tempos avaliados apresentaram menor expressão nos OBL 5-LO KO ($P<0,05$) (Figura 4a G). Os resultados da razão RANKL/OPG mostraram maior expressão de RANKL nos animais 5-LO KO em todos os tempos estudados ($P<0,05$) (Figura 4a H).

Após a comparação do perfil da expressão gênica em osteoblastos murinos WT vs. 5-LO KO, as células de ambas linhagens foram tratadas com LTB₄ a 10⁻⁸ M e U75302, na concentração de 10⁻⁷ M, e coletadas em períodos iniciais (4 dias) e tardios (14 dias) da diferenciação osteogênica. Para esta análise foram adotados dois critérios de comparação: 1) Diferenças entre as linhagens (WT vs. KO, mesmo grupo) e 2) Diferenças entre os grupos, na mesma linhagem. Resultados do período de 4 dias do regulador transcricional Runx2 mostraram uma diminuição da expressão em células 5-LO KO tratadas com o antagonista U75302, quando comparados com WT. Em osteoblastos WT, o antagonista do BLT1/2 aumentou a expressão de Runx2 em relação ao controle e ao grupo LTB₄. Com 14 dias, o mesmo antagonista também aumentou a expressão do Runx2 quando comparado ao LTB₄ ($P<0,05$) (Figura 4b I).

O fator de transcrição SP7 (osterix) também foi avaliado, apresentando modulação apenas com 4 dias. Houve uma diminuição da expressão de SP7 nos grupos controle, LTB₄ e U75302 das células 5-LO KO, em relação ao WT. Também houve um aumento da expressão no grupo U75302 em relação ao LTB₄, em OBL WT ($P < 0,05$) (Figura 4b J). Com relação ao perfil gênico do colágeno tipo 1, os osteoblastos 5-LO KO apresentaram menor expressão de Col1a1 no controle e nos grupos tratados com LTB₄ e com U75302 com 4 dias de cultivo ($P < 0,05$), não apresentando regulação no 14º dia (Figura 4b K). Resultados da expressão de OCN, no 14º dia de cultivo, mostraram que nos osteoblastos dos animais 5-LO KO, há maior expressão gênica nos grupos controle, LTB₄ e U75302 quando comparados aos mesmos grupos das células WT. Ainda nos OBL 5-LO KO, o uso do antagonista U75302 aumentou a expressão de OCN em relação ao controle ($P < 0,05$) (Figura 4b L). Sobre a MMP-2, a expressão nos controles foi maior nos OBL 5-LO KO do que nos WT, no período de 14 dias ($P < 0,05$) (Figura 4b M). Com relação ao gene MMP-9, houve maior expressão nos OBL 5-LO KO, quando tratados com LTB₄, com 4 dias de cultivo. No 14º dia, os OBL 5-LO KO apresentaram menor expressão de MMP-9 em todos os grupos (controle, LTB₄ e U75302) quando comparados aos OBL WT (Figura 4b N). Os genes RANKL e OPG também foram avaliados. No período de 4 dias, os OBL KO apresentaram maior expressão em todos os grupos experimentais (controle, LTB₄ e U75302) em relação aos OBL WT ($P < 0,05$) (Figura 4b O). No entanto, com 14 dias, o mesmo perfil de expressão se repetiu, porém para o gene OPG ($P < 0,05$) (Figura 4b P). Os resultados da razão RANKL/OPG mostraram, no período de 4 dias, maior expressão de RANKL no grupo controle dos OBL 5-LO KO em relação ao controle dos OBL WT ($P < 0,05$). Com relação às diferenças entre os grupos na mesma linhagem, o grupo tratado com o antagonista do BLT1/2 apresentou maior expressão com relação ao controle e ao LTB₄, nos OBL WT. Por outro lado, nos OBL 5-LO KO o LTB₄ inibiu a expressão de RANKL com relação ao controle. Porém, a expressão de RANKL foi maior no grupo tratado com U75302 em relação ao LTB₄, no período de 4 dias ($P < 0,05$). No 14º dia de cultivo celular, os OBL 5-LO KO apresentaram menor expressão de RANKL em todos os grupos experimentais, quando comparado aos OBL WT ($P < 0,05$) (Figura 4b Q).

Figura 4a: Níveis de expressão gênica em osteoblastos de animais WT e 5-LO KO. As figuras A-H foram apresentadas como o perfil gênico das duas linhagens (WT vs. KO), de marcadores da diferenciação osteogênica em diferentes tempos (0-14 dias). A) Alox-5; B) Alpl; C) Bglap (OCN); D) MMP-2; E) MMP-9; F) Tnfsf11 (RANKL); G) Tnfrsf11b (OPG); H) Razão RANKL/OPG. *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO. Teste T de Student não pareado (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001). Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 3 experimentos independentes (n=3). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001).

Figura 4b: Níveis de expressão gênica em osteoblastos de animais WT e 5-LO KO. As figuras I-Q foram apresentadas como resultados da expressão gênica frente ao tratamento com LTB₄ a 10⁻⁸ M ou com o antagonista U75302 a 10⁻⁷ M, com 4 e 14 dias de cultivo. I) Runx2; J) Sp7; K) Col1a1; L) Bglap (OCN); M) MMP-2; N) MMP-9; O) Tnfsf11 (RANKL); P) Tnfsf11b (OPG); Q) Razão RANKL/OPG. Os dados apresentados são resultados da média, ±SD de 3 experimentos independentes (n=3). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

5.5 Cálcio Intracelular

Os osteoblastos das linhagens murinas WT e 5-LO KO apresentam diferentes perfis quanto à mobilização do cálcio em condições basais (sem estímulo). Em ambos períodos (7 e 14 dias), os OBL 5-LO KO apresentam menor concentração de cálcio intracelular em relação aos OBL WT ($P<0,05$). Esse perfil foi semelhante quando as células foram tratadas com os LTB_4 ($P<0,05$), mas não houve modulação após tratamento com LTD_4 ($P>0,05$). Com relação ao tratamento, no período de 14 dias, a adição do LTD_4 inibiu significativamente a liberação do cálcio intracelular independente da linhagem, em relação ao controle ($P<0,05$) (Figura 5).

Figura 5: Resposta de cálcio intracelular em osteoblastos WT e 5-LO KO estimulados com LTs, nos períodos de 7 e 14 dias. Os níveis de cálcio intracelular foram determinados pelo ELISA e os dados foram apresentados como a média $\pm$ SD de Unidades de Fluorescência Relativa (RFU), de 1 experimento independente ($n=6$). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (* $P<0,05$. ** $P<0,01$. *** $P<0,001$).

5.6 cAMP

As respostas intracelulares do segundo mensageiro adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) ocorreram no período de maior diferenciação celular, com 14 dias. Os níveis de cAMP foram menores nos osteoblastos KO em relação ao WT, em todos os grupos tratados ou controle. LTD_4 diminuiu a concentração de cAMP, mas não LTB_4 , em OBL 5-LO KO ($P<0,05$) (Figura 6).

Figura 6: Resposta de cAMP intracelular em osteoblastos WT e 5-LO KO estimulados com LTs, nos períodos de 7 e 14 dias. Os níveis de cAMP foram determinados pelo ensaio imunoenzimático competitivo ELISA. Os dados foram apresentados como a média $\pm$ SD dos valores de cAMP em picomol/mL de 1 experimento independente (n=2). *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO e # representa diferenças entre os grupos tratados. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

5.7 Produção de Eicosanoides

Resultados da figura 7 mostram os principais eicosanoides produzidos por osteoblastos de animais 129/Sv (WT) e 5-LO KO sob estímulo com ionóforo de cálcio em diferentes concentrações (5, 10 e 20 μ M). Em geral, houve pouca/ausência ou uma produção intermediária dos metabólitos 11-HETE e PGJ₂ em todos os períodos estudados com exceção do grupo 129/Sv OBL de 2 dias estimulados com 20 μ M de ionóforo de cálcio no qual houve intensa produção de 11-HETE. Os demais metabólitos apresentaram uma produção intermediária nos osteoblastos das duas linhagens murinas, com exceção do LTB₄, que estava ausente em todos os grupos dos animais 5-LO KO. A concentração do ionóforo de cálcio pareceu influenciar na quantidade de eicosanoides produzidos (Figura 7A).

O metabólito AA apresentou maior produção comparado aos demais apresentados neste estudo, principalmente em animais 5-LO KO, seguido por EPA e pelas prostaglandinas 6-keto PGF 1 α , PGA₂ e PGE₂, com valores intermediários, e menor produção para os metabólitos 11-HETE, LTB₄, PGF 1 α e PGJ₂ (Figura 7 B).

Figura 7: *Heat maps* sobre a produção de eicosanoides em osteoblastos de animais 129/Sv (WT) e 5-LO KO estimulados com 5-20 μ M de ionóforo de Cálcio, por meio de espectrometria de massas. A) Comparação de um mesmo metabólito em diferentes grupos. B) Comparação de todos os metabólitos entre os grupos. A escala de cores indica o percentual da produção de cada metabólito entre 0-100%. O gradiente de cor padrão configura o menor valor no mapa de calor como azul escuro, o maior valor como vermelho e valores intermediários como verde claro, com uma transição correspondente (ou gradiente) entre estes extremos. Os dados foram tratados no *software* PeakView e MultiQuant e os *heat maps* realizados no programa Excel utilizando a média dos grupos. Principais eicosanoides quantificados: 11-HETE (11-hydroxy-5Z,8Z,12E,14Z-eicosatetraenoic acid); 6-Keto PGF 1 α (6-keto prostaglandina F1 α); AA (ácido araquidônico); EPA (ácido eicosapentaenoico); LTB₄ (leucotrieno B₄); PGA₂ (prostaglandina A₂); PGE₂ (prostaglandina E₂); PGF 1 α (prostaglandina F1 α); PGJ₂ (prostaglandina J₂).

5.8 Perfil proteômico de osteoblastos e identificação de proteínas diferencialmente expressas

A Tabela 2 mostra proteínas com alterações de expressão em osteoblastos dos animais WT e 5-LO KO. Em geral, a maioria das proteínas apresentou maior expressão nos animais WT. A análise comparativa (WT vs. KO) mostrou um total de 154 proteínas identificadas, sendo 89 reguladas positivamente em OBL WT em relação aos OBL 5-LO KO. Foram encontradas 06 proteínas exclusivamente expressas no grupo WT (Tabela 3) e 59 no grupo KO (Tabela 4).

Tabela 2. Proteínas com mudanças significativas na expressão em WT vs. 5-LO KO.

Accession	Description	PLGS score	WT vs. KO Ratio
P20029	78 kDa glucose-regulated protein	596.7	2.39
P68033	Actin_ alpha cardiac muscle 1	6087.0	3.06
P68134	Actin_ alpha skeletal muscle	6087.0	3.03
P62737	Actin_ aortic smooth muscle	6087.0	3.13
P60710	Actin_ cytoplasmic 1	12475.0	2.89
G3UYG0	Actin_ cytoplasmic 2	5739.2	5.70
P63268	Actin_ gamma-enteric smooth muscle	6087.0	3.13
P17182	Alpha-enolase	2777.8	2.08
B0V2N7	Annexin (Fragment)	148.8	3.97
P07356	Annexin A2	176.3	3.94
P48036	Annexin A5	466.2	2.41
P56480	ATP synthase subunit beta_ mitochondrial	190.2	2.44
Q8BFZ3	Beta-actin-like protein 2	1657.1	2.94
J3QPZ9	Beta-enolase (Fragment)	277.3	1.90
P14211	Calreticulin	143.7	2.72
F8WGL3	Cofilin-1	502.6	2.32
P45591	Cofilin-2	102.1	2.56
Q60847	Collagen alpha-1(XII) chain	267.9	2.23
P31001	Desmin	37.0	4.01
P10126	Elongation factor 1-alpha 1	895.5	2.83
P62631	Elongation factor 1-alpha 2	147.6	3.06
P08113	Endoplasmin	499.4	2.05
P11276	Fibronectin	718.4	2.51
A6ZI44	Fructose-bisphosphate aldolase	1608.7	2.59
P05064	Fructose-bisphosphate aldolase A	1611.3	2.61
P05063	Fructose-bisphosphate aldolase C	137.2	2.23
A0A1D5RLD8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	4321.1	2.08

S4R1W1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3448.7	2.05
Q61696	Heat shock 70 kDa protein 1A	73.9	3.86
P17879	Heat shock 70 kDa protein 1B	73.9	3.67
P16627	Heat shock 70 kDa protein 1-like	78.8	3.94
Q504P4	Heat shock cognate 71 kDa protein	267.7	2.86
P17156	Heat shock-related 70 kDa protein 2	101.5	2.86
Q8CBB6	Histone H2B	588.8	2.32
P70696	Histone H2B type 1-A	250.2	2.61
Q64475	Histone H2B type 1-B	588.8	2.39
Q6ZWY9	Histone H2B type 1-C/E/G	588.8	2.36
P10853	Histone H2B type 1-F/J/L	588.8	2.32
Q64478	Histone H2B type 1-H	588.8	2.34
Q8CGP1	Histone H2B type 1-K	588.8	1.88
P10854	Histone H2B type 1-M	588.8	2.36
Q8CGP2	Histone H2B type 1-P	588.8	2.34
Q64525	Histone H2B type 2-B	588.8	2.27
Q64524	Histone H2B type 2-E	588.8	2.44
Q9D2U9	Histone H2B type 3-A	588.8	2.39
Q8CGP0	Histone H2B type 3-B	588.8	2.34
P62806	Histone H4	691.6	1.93
Q9DCV7	Keratin_ type II cytoskeletal 7	8.7	4.10
P11679	Keratin_ type II cytoskeletal 8	8.7	4.10
A0A1W2P6F6	Myosin light polypeptide 6	345.5	2.61
Q8VDD5	Myosin-9	118.5	2.66
P15532	Nucleoside diphosphate kinase A	308.9	3.22
A0A1L1SST0	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	392.0	2.36
P17742	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	786.7	2.41
G3X981	Peripherin	58.2	2.56
P35700	Peroxiredoxin-1	675.1	5.26
S4R2M7	Phosphoglycerate kinase	205.7	2.44
P09411	Phosphoglycerate kinase 1	215.0	2.34
P09041	Phosphoglycerate kinase 2	86.1	2.44
Q9DBJ1	Phosphoglycerate mutase 1	395.4	2.51
Q5SX49	Profilin	424.7	2.80
P62962	Profilin-1	424.7	2.77
P27773	Protein disulfide-isomerase A3	150.4	2.20
G3X925	Pyruvate kinase	176.4	2.44
P53657	Pyruvate kinase PKLR	180.8	2.34
P52480	Pyruvate kinase PKM	4590.8	2.12
A0A1L1SU37	Pyruvate kinase PKM (Fragment)	3958.3	2.10
Q99PT1	Rho GDP-dissociation inhibitor 1	374.9	2.77
E9Q3M9	RIKEN cDNA 2010300C02 gene	35.6	4.31
P19324	Serpin H1	401.8	2.75

P02769	Serum albumin	1483.3	1.48
P17751	Triosephosphate isomerase	1702.8	1.90
A0A0A0MQA5	Tubulin alpha chain (Fragment)	245.8	1.65
P68369	Tubulin alpha-1A chain	565.3	2.18
P05213	Tubulin alpha-1B chain	589.7	2.18
P68373	Tubulin alpha-1C chain	565.3	2.23
P05214	Tubulin alpha-3 chain	245.8	2.16
P68368	Tubulin alpha-4A chain	245.8	1.67
Q9JJZ2	Tubulin alpha-8 chain	117.2	1.77
Q7TMM9	Tubulin beta-2A chain	1293.6	2.80
Q9CWF2	Tubulin beta-2B chain	1293.6	2.83
Q9ERD7	Tubulin beta-3 chain	1271.8	2.72
Q9D6F9	Tubulin beta-4A chain	70.6	2.20
P68372	Tubulin beta-4B chain	595.4	2.72
P99024	Tubulin beta-5 chain	1288.9	2.80
Q922F4	Tubulin beta-6 chain	538.2	2.66
V9GXA7	Uncharacterized protein	896.9	2.32
V9GXQ2	Uncharacterized protein	195.6	8.67
P20152	Vimentin	3830.3	2.41

Tabela 3. Proteínas identificadas exclusivamente em OBL WT.

Accession	Description	PLGS score
P46660	Alpha-internexin	176.2
A0A0R4J036	Neurofilament 3_ medium	176.2
P19246	Neurofilament heavy polypeptide	176.2
P08551	Neurofilament light polypeptide	176.2
D3YZ35	Neurofilament medium polypeptide	176.2
F7C9H0	Periostin (Fragment)	134.7

Tabela 4. Proteínas identificadas exclusivamente em OBL 5-LO KO.

Accession	Description	PLGS score
P63101	14-3-3 protein zeta/delta	101.3
Q9D8M4	60S ribosomal protein L7-like 1	35.9
P40124	Adenylyl cyclase-associated protein 1	141.8
P00330	Alcohol dehydrogenase 1	578.4
B1ARR6	Alpha-enolase (Fragment)	759.5
P10107	Annexin A1	120.0
Q5SX59	Beta-enolase (Fragment)	668.6
P18242	Cathepsin D	155.6

F6WIM8	Collagen alpha-1(XII) chain (Fragment)	125.8
Q8BTM8	Filamin-A	100.1
Q8C253	Galectin	259.7
P16045	Galectin-1	212.6
P16110	Galectin-3	259.7
A0A0N4SUX5	Gamma-enolase	783.9
A0A0R4J0X7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	39.9
A0A0N4SV66	Histone H2A	812.8
C0HKE1	Histone H2A type 1-B	812.8
C0HKE2	Histone H2A type 1-C	812.8
C0HKE3	Histone H2A type 1-D	812.8
C0HKE4	Histone H2A type 1-E	812.8
Q8CGP5	Histone H2A type 1-F	812.8
C0HKE5	Histone H2A type 1-G	812.8
Q8CGP6	Histone H2A type 1-H	812.8
C0HKE6	Histone H2A type 1-I	812.8
Q8CGP7	Histone H2A type 1-K	812.8
C0HKE7	Histone H2A type 1-N	812.8
C0HKE8	Histone H2A type 1-O	812.8
C0HKE9	Histone H2A type 1-P	812.8
Q6GSS7	Histone H2A type 2-A	812.8
Q64522	Histone H2A type 2-B	720.0
Q64523	Histone H2A type 2-C	812.8
Q8BFU2	Histone H2A type 3	812.8
Q8R1M2	Histone H2A.J	812.8
Q3THW5	Histone H2A.V	720.0
P0C0S6	Histone H2A.Z	720.0
P27661	Histone H2AX	720.0
E9QNP0	KxDL motif-containing protein 1	504.5
Q564E2	L-lactate dehydrogenase	487.8
P06151	L-lactate dehydrogenase A chain	490.4
P16125	L-lactate dehydrogenase B chain	117.5
P00342	L-lactate dehydrogenase C chain	117.5
P08249	Malate dehydrogenase_ mitochondrial	153.5
A0A0A6YW67	MCG23377_ isoform CRA_b	504.5
V9GXC1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	22.2
A0A1L1SRX5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A	372.4
O08807	Peroxiredoxin-4	155.1
P0CG49	Polyubiquitin-B	504.5
P0CG50	Polyubiquitin-C	504.5
J3QMC2	Profilin-1	375.0
E9PZ00	Prosaposin	72.6
Q8BVA0	Putative uncharacterized protein	220.0

A0A140LHK0	Serpin H1	119.6
Q62465	Synaptic vesicle membrane protein VAT-1 homolog	73.1
Q01853	Transitional endoplasmic reticulum ATPase	62.4
Q99P91	Transmembrane glycoprotein NMB	220.0
A0A087WRB4	Tubulin alpha-4A chain (Fragment)	42.3
P62983	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	504.5
P62984	Ubiquitin-60S ribosomal protein L40	504.5
A0A1B0GT66	Uncharacterized protein	155.6

5.8.1 Ontologia genética e Rede de interação proteína-proteína (Networks)

A Figura 8A mostra a classificação funcional das proteínas identificadas baseada nos processos biológicos da ontologia genética (GO). Quinze categorias foram observadas por meio do Programa CYTOSCAPE®-ClueGO, dentre as quais o grupo que apresentou maior porcentagem de genes relacionados foi: 1. Metabolismo dos nucleotídeos derivados da purina, com 19%, seguido de 2. Processo metabólico do piruvato, com 16%; 3. Organização do nucleossomo (12%); 4. Silenciamento da cromatina (11%); 5. Organização de citoesqueleto de filamentos intermediários (6%); 6. Adesão celular homotípica (5%); 7. Regulação positiva do processo viral (5%); 8. Montagem do fuso (4%); 9. Desenvolvimento da substância negra (4%); 10. Migração do mesênquima (4%); 11. Desenvolvimento neuronal de hormônio liberador de gonadotrofina do hipotálamo (4%); 12. Regulação do processo metabólico da ATP (3%); 13. Regulação da despolimerização de filamentos de actina (3%); 14. Processo de biossíntese de lactato do piruvato (3%); 15. Resposta imune inata em mucosa (3%).

Para a comparação exibida acima, foi criada uma rede de proteínas, empregando todas as interações encontradas. Após a criação da rede global, as ligações entre cada elemento (nodos) e bordas (interações) foram filtradas usando a especificação para a taxonomia *mus musculus* (10090). O *plug-in cluster marker*, CYTOSCAPE® foi usado para criar módulos ativos conectados, sub-redes (*subnetworks*), dentro da rede de interação molecular, cujos genes apresentaram mudanças significativas quanto à expressão e valor de P, como mostrado na análise proteômica original. As proteínas foram consideradas mais expressas (*upregulated*) ou menos expressas (*downregulated*) quando $P > 0,95$ e $P < 0,05$ respectivamente. A Figura 8B mostra a *subnetwork* da comparação entre osteoblastos WT vs. 5-LO KO.

O perfil proteico dos OBL 5-LO KO apresentou diferenças significativas em relação aos OBL WT. Proteínas relacionadas ao citoesqueleto celular como várias isoformas de tubulina (P68369) e anexina (P07356), além de proteínas *heat shock*/chaperonas moleculares (P17879), apresentaram aumento da expressão em OBL WT, e consequente diminuição da expressão em OBL 5-LO KO. Além disso, várias proteínas identificadas foram exclusivas dos OBL 5-LO KO, dentre elas algumas relacionadas a modulação de processos inflamatórios (atividade anti-inflamatória) (P10107) e a regulação da via do fator nuclear Kappa B (NF-KB) (Q01853).

Figura 8: Caracterização funcional e network de proteínas identificadas na análise proteômica de osteoblastos de animais WT e 5-LO KO, no período de 14 dias. A) Distribuição funcional de proteínas identificadas com expressão diferencial nos grupos WT vs. KO. Categorias de proteínas com base em processos biológicos da GO. Termos significativos ($Kappa = 0,03$) e distribuição de acordo com a porcentagem do número de associação de genes por meio do *plug-in* ClueGO, CYTOSCAPE®. GO: Ontologia genética. B) Subnetworks criadas para estabelecer a interação entre proteínas identificadas com expressão diferencial em grupos WT vs. 5-LO KO. A cor dos nodos indica a expressão diferencial da respectiva proteína com o seu código de acesso. Os nodos vermelho escuro e verde escuro indicam proteínas únicas para osteoblastos WT e KO, respectivamente. Os nodos em cinza indicam as proteínas de interação que são oferecidas pelo *plug-in* cluster marker, do programa CYTOSCAPE®, que não foram identificados no presente estudo, e os nodos verdes claros indicam superexpressão em OBL WT.

5.9 Análise fenotípica dos osteoclastos

As células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais WT, exibem células gigantes multinucleadas com inúmeros núcleos, fenotipicamente similares a osteoclastos, aderidos à superfície da placa de cultura (Figura 9 A e B). Por outro lado, o grupo 5-LO KO apresenta uma população de células com formas e tamanhos variáveis, de difícil identificação de núcleos, e menor grau de maturação, quando comparadas ao grupo WT (Figura 9 C e D).

Figura 9: Análise morfológica comparativa da cultura de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais 129/Sv WT e 5-LO KO, com 11 dias de cultivo, estimuladas com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). A-B) Perfil osteoclastogênico dos animais WT. Osteoclastos gigantes multinucleados observados no aumento de 10x e 20x respectivamente. C-D) Perfil osteoclastogênico dos animais 5-LO KO no aumento de 10x e 20X respectivamente. Imagens representativas fotografadas em microscópio invertido Leica/DM IRBE, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany.

5.10 Atividade da TRAP

Células da linhagem monocítica-macrofágica, derivadas da medula óssea, foram estimuladas com M-CSF (50ng/mL) e RANK-L (120ng/mL), expostas ou não a diferentes tratamentos e avaliadas pelo ensaio colorimétrico TRAP. Em geral, as populações celulares observadas nas duas linhagens de animais WT e 5-LO KO apresentaram fenótipos distintos. As células dos animais WT foram classificadas como: 1. Células gigantes multinucleadas TRAP positivas (TRAP⁺) maduras compatíveis com osteoclastos (OCS); 2. Células multinucleadas TRAP⁺, osteoclasto-*like* (OCS-*like*); 3. Células mononucleares TRAP negativas (TRAP⁻) derivadas da linhagem monocítica-macrofágica (CM). A população de células gigantes OCS apresenta características de osteoclastos multinucleados, com formato e tamanho variáveis, evidenciando um número de núcleos superior a 30. O grupo OCS-*like* revela células de formatos e tamanhos variáveis, no entanto, com dimensões menores em relação ao grupo OCS e um número de núcleos inferior a 10. As CMs mostram morfologia fusiforme ou poliédrica com o núcleo bem definido sem nucléolos evidentes e escasso citoplasma. Os critérios adotados para a análise quantitativa foram: células com imunomarcagem TRAP⁺ e multinucleadas (OCS e OCS-*like*), foram consideradas uma única população na avaliação quantitativa. O tratamento com os LTs B₄ e D₄, retardou o processo de formação dos osteoclastos gigantes (população OCS), sendo observado em sua maioria, células pequenas com número de núcleos inferior a 10 (OCS-*like*) em relação ao grupo controle, no qual foram verificadas maior população OCS, embora não evidenciado na quantificação ($P > 0,05$) (Figura 10a A). Ainda no grupo dos animais WT, o tratamento com o meio condicionado tanto dos osteoblastos WT quanto dos OBL 5-LO KO, retardou o processo de formação de OCS em comparação com o grupo controle ($P < 0,05$) (Figura 10a B). Ainda com relação ao tratamento com o meio condicionado, resultados mostraram que as células do grupo experimental MC-OBL WT (meio condicionado dos osteoblastos WT) ao receberem estímulo com LTs exógenos, não apresentaram modulação (Figura 10b C), porém, no grupo MC-OBL KO (meio condicionado dos osteoblastos 5-LO KO) o LTD₄, mas não o LTB₄, aumentou o número de osteoclastos formados (Figura 10b D) ($P < 0,05$).

As células dos animais 5-LO KO expostas ou não a diferentes tratamentos, revelaram um perfil diferente na imunoreação com TRAP quando comparado aos animais WT. Foram observadas células de formatos e tamanhos variáveis com

marcação TRAP intensa e homogênea, inviabilizando a identificação/quantificação precisa do número de núcleos, nomeando-as como Precursoras de Osteoclastos (PO). Os grupos tratados com LTB₄ e LTD₄ mostraram células com características fenotípicas indistinguíveis com aquelas PO do grupo controle, não estimulando, portanto, a formação de OCS (Figura 10c E).

Figura 10a: Morfologia e quantificação da atividade da TRAP de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais WT, após 10 dias de cultivo sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). A) Células WT foram tratadas ou não (controle) com LTs (B₄ e D₄) a 10⁻⁸ M. B) Células WT tratadas ou não (controle) com meio condicionado de osteoblastos dos animais WT (MC-OBL WT) e KO (MC-OBL-KO). *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

Figura 10b: Morfologia e quantificação da atividade da TRAP de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais WT, após 10 dias de cultivo sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). C) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais WT (controle: MC-OBL WT) e sob estímulo dos LTs exógenos B₄ e D₄ (MC-OBL WT_{exLTB₄} e MC-OBL WT_{exLTD₄} respectivamente), na dose de 10⁻⁸ M. D) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais KO (controle: MC-OBL KO) e sob estímulo dos LTs exógenos B₄ e D₄ (MC-OBL KO_{exLTB₄} e MC-OBL KO_{exLTD₄} respectivamente), na dose de 10⁻⁸ M. *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

Figura 10c: Morfologia e quantificação da atividade da TRAP de células derivadas da linhagem monocítica-macrofágica dos animais 5-LO KO, após 10 dias de cultivo sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). E) Células KO foram tratadas ou não (controle) com LTs (B₄ e D₄) a 10⁻⁸ M. *Representa diferenças estatísticas, em relação ao controle. ANOVA-1 critério (*P<0,05. **P<0,01. ***P<0,001).

5.11 Reabsorção óssea

Resultados do ensaio de reabsorção óssea mostraram intensa atividade osteoclástica em animais WT no grupo controle (Figura 11 A), apresentando, portanto, áreas de reabsorção da matriz óssea, evidenciado pela coloração com azul de toluidina. O tratamento com os LTB₄ e LTD₄ parece ter modulado a atividade dos osteoclastos, apresentando áreas reabsortivas menores quando comparado ao grupo controle (Figura 11 B, C). Os grupos das células que foram tratadas com os meios condicionados MC-OBL-WT e MC-OBL-KO não apresentaram áreas de reabsorção óssea (Figura 11 D, G) e mesmo o estímulo dessas células com os LTs B₄ e D₄ não foi suficiente para promover a reabsorção da matriz óssea (Figura 11 E, F, H, I). Em adição, as células dos animais 5-LO KO apresentaram poucas áreas de reabsorção e menores com relação ao tamanho, quando comparadas com o controle das células WT (Figura 11 J), mas ao tratar as células 5-LO KO com os LTs B₄ e D₄, não foi observado nenhuma reabsorção dos discos ósseos (Figura 11 K, L).

Figura 11: Imagens do ensaio de reabsorção de osteoclastos derivados da linhagem monocítica-macrofágica de animais WT e 5-LO KO sob estímulo com M-CSF (50ng/mL) e RANKL (120ng/mL). Células WT e 5-LO KO foram cultivadas sobre discos ósseos e após 10 dias, as mesmas foram removidas e as áreas de reabsorção coradas com azul de toluidina a 1% (pH 4,5). A-C) Células tratadas ou não (controle) com LTs (B₄ e D₄) a 10⁻⁸ M. D-F) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais WT (controle: MC-OBL WT) e sob estímulo dos LTs exógenos B₄ e D₄ (MC-OBL WT-B₄ e MC-OBL WT-D₄ respectivamente), na concentração de 10⁻⁸ M. G-I) Células WT tratadas com o meio condicionado dos osteoblastos dos animais KO (controle: MC-OBL KO) e sob estímulo dos LTs exógenos B₄ e D₄ (MC-OBL KO-B₄ e MC-OBL KO-D₄ respectivamente), na concentração de 10⁻⁸ M. J-L) Células KO foram plaqueadas sobre discos ósseos e tratadas ou não (controle) com LTs (B₄ e D₄) a 10⁻⁸ M.

5.12 Expressão gênica em osteoclastos

A análise comparativa da expressão gênica entre osteoclastos WT (OCS WT) e 5-LO KO (OCS 5-LO KO), com 11 dias de diferenciação celular revelou maior expressão do Alox5 (Figura 12a A), Il-1b (Interleucina 1b) (Figura 12a H), Il-6 (Interleucina-6) (Figura 12a I) e TNF-a (Figura 12a J), nos animais WT ($P < 0,05$). Os marcadores da diferenciação osteoclástica TRAP (Acp5) (Figura 12a E), Catepsina K (Ctsk) (Figura 12a F) e o Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (Nfatc1) (Figura 12a G), além dos receptores de LTs BLT1/2 (Figura 12a B e C) e CysLT1 (Figura 12a D) não apresentaram diferenças na expressão ($P > 0,05$).

Após a comparação dos OCS WT vs. KO, somente as células WT foram tratadas com LTB₄ a 10^{-8} M e U75302, na concentração de 10^{-7} M, e coletadas após 11 dias da diferenciação osteoclastogênica. Resultados mostraram diminuição da expressão de Alox5 em células tratadas com o LTB₄, quando comparados ao controle e superexpressão desse mesmo alvo quando os OCS WT foram estimulados com U75302 ($P < 0,05$) (Figura 12b K). Os mesmos tratamentos não foram capazes de modular os receptores BLT1 e BLT2 (Figura 12b L e M, respectivamente), os marcadores da diferenciação osteoclastogênica Acp5 (Figura 12b N), Ctsk (Figura 12b O) e Nfatc1 (Figura 12b P) ou a Il-6 (Figura 12b R) ($P > 0,05$). Porém, em OCS WT, o LTB₄ aumentou a expressão de Il-1b em relação ao controle e ao grupo do antagonista U75302 (Figura 12b Q). O estímulo com LTB₄ também aumentou a expressão de TNFa quando comparado ao U75302 ($P < 0,05$) (Figura 12b S).

Figura 12a: Níveis de expressão gênica em osteoclastos no período de 11 dias. As figuras A-J foram apresentadas como o perfil gênico das duas linhagens (WT vs. KO), de marcadores da diferenciação osteoclastogênica. A) Alox-5; B) BLT1; C) BLT2; D) CysLt1; E) Acp5; F) Ctsk; G) Nfatc1; H) Il-1b; I) Il-6; J) TNFa. *Representa diferenças estatísticas, comparando-se WT vs. KO. Teste T de Student não pareado (* $P < 0,05$. ** $P < 0,01$. *** $P < 0,001$). #Representa diferenças entre os grupos. ANOVA-1 critério (# $P < 0,05$. ## $P < 0,01$. ### $P < 0,001$). Os dados apresentados são resultados da média, $\pm$ SD de 1 experimento independente (n=3).

Figura 12b: Níveis de expressão gênica em osteoclastos no período de 11 dias. As figuras K-S foram apresentadas como resultados da expressão gênica frente ao tratamento com LTB₄ a 10⁻⁸ M ou com o antagonista U75302 a 10⁻⁷ M. K) Alox-5; L) BLT1; M) BLT2; N) Acp5; O) Ctsk; P) Nfatc1; Q) Il-1b; R) Il-6; S) TNFα; #Representa diferenças entre os grupos. ANOVA-1 critério (#P<0,05. ##P<0,01. ###P<0,001). Os dados apresentados são resultados da média, ±SD de 1 experimento independente (n=3).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

No contexto ósseo, é sabido que a produção de LTs é estimulada em doenças inflamatórias como artrite reumatóide (KLICKSTEIN et al., 1980, DAVIDSON et al. 1983, AHMADZADEH et al., 1991), osteoartrite (PELLETIER et al., 2001, LAUFER 2003) e periodontite (TSAI et al., 1998, BAROUKH et al., 1990) e participam do remodelamento atuando no processo de reabsorção óssea. A importância do estudo se baseia no fato de que grande parte da população mundial é acometida por doenças osteoinflamatórias (SEONG et al., 2010), e entender o papel dos LTs no metabolismo ósseo poderá auxiliar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas quanto ao uso de inibidores da síntese e/ou antagonistas dos receptores de LTs, podendo assim diminuir o grau de severidade dessas doenças e amenizar seus sintomas e efeitos.

Pesquisas do nosso grupo mostraram que a diferenciação osteogênica de osteoblastos murinos com ácido ascórbico e beta-glicerofosfato induz o aumento significativo da expressão da enzima 5-LO, responsável pela síntese de LTs (manuscrito em preparação). Embora os osteoblastos em diferenciação aumentem a expressão da 5-LO, pouco se sabe sobre seu impacto na diferenciação osteogênica e os mecanismos intracelulares envolvidos. Assim, esse estudo objetivou compreender o papel dos LTs endógenos e exógenos na diferenciação osteogênica e se essas moléculas oriundas dos osteoblastos exercem um papel fundamental para a formação dos osteoclastos em animais 129/Sv WT e 5-LO KO.

Segundo Manigrasso et al., 2010, os animais 5-LO KO apresentam um reparo ósseo acelerado, quando comparado aos animais WT. Em nosso trabalho, o perfil ósseo das duas linhagens murinas revelou diferenças na densidade e microestrutura do osso trabecular. Os animais machos 5-LO KO apresentaram tecido ósseo vertebral menos trabeculado, porém mais denso em relação aos camundongos WT. A análise femoral mostrou maior densidade óssea em machos 5-LO KO, porém as fêmeas 5-LO KO apresentaram menor densidade óssea e menos osso trabeculado do que os animais WT. Essa variação estrutural óssea permitiu uma análise molecular e funcional *in vitro*, revelando um metabolismo ósseo diferencial, principalmente em animais machos, devido à ausência de LTs evidenciando, portanto, a contribuição dessas moléculas na osteoblastogênese e osteoclastogênese.

A ausência de LTs em animais 5-LO KO mostrou maior potencial de diferenciação e mineralização dos osteoblastos evidenciado pelo aumento da atividade da ALP, um marcador da formação óssea, e pela deposição de cálcio na matriz óssea. A regulação foi comprovada ao administrar os LTs exógenos B₄ e D₄, inibidores da síntese e antagonistas mostrando que ao estimular OBL WT com LTs, os nódulos de cálcio mineralizados diminuíram, e que a adição de inibidores e antagonistas de LTs recuperou e/ou estimulou o potencial de mineralização dessas células.

O perfil gênico em osteoblastos das duas linhagens murinas foi avaliado, apresentando diferenças expressivas nos mediadores do remodelamento ósseo. Os marcadores de formação óssea ALP (Alpl) e osteocalcina (Bglap) tiveram maior expressão em OBL 5-LO KO reforçando o fato de que essas células apresentam maior potencial de mineralização. Em adição, os resultados da razão RANKL/OPG mostraram maior expressão de RANKL em OBL 5-LO KO, durante o processo de diferenciação celular. A hipótese inicial era de que o RANKL apresentaria baixos níveis de expressão uma vez que ele está envolvido em processos de reabsorção (JIANG et al., 2005) e que genes clássicos relacionados a formação óssea estão superexpressos em OBL 5-LO KO. Em contrapartida, ao avaliar o efeito exógeno do LTB₄ em ambas células, os resultados mostraram o efeito desse mediador na diminuição da expressão de RANKL somente em OBL 5-LO KO, no período inicial da diferenciação osteogênica. Portanto, a ausência de LTs endógenos aumenta a expressão de RANKL, mas o estímulo com LT exógeno diminuiu a expressão de RANKL em OBL 5-LO KO, podendo esse efeito ser explicado devido aos mecanismos celulares compensatórios.

Com relação à sinalização celular, a literatura demonstra que o cálcio intracelular e o cAMP estão diferencialmente envolvidos na osteogênese. Enquanto a elevação de cálcio em osteoblastos induz a proliferação e a diferenciação de osteoblastos e a mineralização (DVORAK et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2000), o cAMP inibe a mineralização, mas promove um fenótipo osteoclastogênico em osteoblastos (NISHIHARA et al., 2017). Nesse trabalho, os OBL 5-LO KO induziram menores níveis de ambos segundos mensageiros em relação aos OBL WT durante a diferenciação celular. Uma vez que os maiores níveis de cálcio observados nos animais WT não mostraram estar relacionados com aumento da mineralização. Assim, é possível que o cAMP seja o sinalizador mais importante em mediar a diferenciação

osteogênica. Sabendo que o LTB₄ e D₄ sinalizam diferencialmente após ligação aos receptores BLT1/BLT2 acoplados à proteína G, por meio das subunidades G α_i ou G α_q , as quais induzem à diminuição de cAMP e elevação de cálcio intracelular, respectivamente, a seguir essas vias foram estudadas com o objetivo de entender o efeito diferencial do LTB₄ e D₄ sobre a diferenciação osteogênica. Nesse sentido, enquanto ambos LTs B₄ e D₄ reduziram os níveis de cálcio em células WT e 5-LO KO, a estimulação das células KO com o LTB₄ e o LTD₄ exógenos aumentou e reduziu, respectivamente os níveis de cAMP. Esses resultados podem explicar, mesmo que parcialmente, que o LTD₄ possui maior impacto sobre a diferenciação osteogênica e mineralização que ocorre por meio da via G α_i , dependente da inibição da cAMP. Além disso, o cAMP modulado significativamente pelo LTD₄ pode explicar o maior potencial osteoclastogênico dos osteoblastos estimulados por esse mediador.

A via do ácido araquidônico (AA) origina diversos metabólitos, como prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), tromboxanas (TX), lipoxinas (LX), ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETE) os quais estão envolvidos em diferentes processos inflamatórios e são responsáveis pela destruição progressiva de cartilagem e de tecido ósseo (HOXHA, 2017). Em nosso estudo foi mostrado a relação dos mediadores inflamatórios na osteogênese, onde os osteoblastos são capazes de sintetizar os eicosanoides, evidenciado pela intensa produção de AA pela célula óssea. Os metabólitos do AA podem estimular a atividade de diferentes citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas 1b, 6 e 8 (IL-1b, IL-6, IL-8), quimiocinas ou integrinas [5] regulando portanto, o metabolismo ósseo (HOXHA, 2017).

A análise proteômica foi empregada nesse estudo para fornecer informações sobre os possíveis mecanismos que poderiam explicar as diferenças observadas no perfil ósseo e nos mecanismos intracelulares dos animais WT e 5-LO KO. Os osteoblastos de ambas linhagens não receberam tratamento com LTs ou outros compostos pois, quisemos verificar as diferenças intrínsecas de cada animal. Além disso, a presença de algumas proteínas específicas ou a regulação delas poderiam explicar os diferentes perfis ósseos dessas linhagens.

Das proteínas totais identificadas nas amostras de OBL WT e 5-LO KO, a maioria apresentou maior expressão em OBL WT. Além disso, a maioria das proteínas presentes foram classificadas funcionalmente com relação ao metabolismo energético das purinas e do piruvato. Nesse sentido, algumas proteínas com maior expressão diferencial, como a actina, em suas várias isoformas, seguido pela anexina, e pela

peroxiredoxina-1, foram aumentadas em aproximadamente 5 vezes em OBL WT. A actina (G3UYG0- UniProt), presente na composição do citoesqueleto, além de interagir seletivamente com adenosina trifosfato (ATP) e participar do metabolismo energético.

Anexina (B0V2N5- UniProt) possui um papel importante como reguladora do processo inflamatório; apresenta propriedade de ligação a proteínas que compõem o citoesqueleto e a fosfolípidos dependentes de cálcio, além de ser um potente inibidor da atividade da fosfolipase (LIMA et al., 2017). No contexto ósseo, algumas isoformas da anexina podem se ligar a sialoproteína óssea e também estão relacionadas ao desenvolvimento de osteoclastos. A peroxirredoxina-1 (P35700- UniProt) importante na proteção celular contra o estresse oxidativo pela desintoxicação de peróxidos e como sensor de eventos de sinalização mediada por peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (SANTOS et al., 2018). Pode participar também das cascatas de sinalização dos fatores de crescimento e do TNF-alfa, regulando as concentrações intracelulares de H_2O_2 . O aumento de proteínas relacionadas ao metabolismo do ATP em OBL WT, como a Heat shock 70 kDa protein 1-like (P16627- UniProt), a subunidade alfa da ATP sintase- mitocondrial e as enolases, em suas subunidades, indicam um aumento do fluxo de energia nesses animais (WT), o que pode gerar estresse oxidativo. Sabe-se que em baixas concentrações, a molécula de ATP aumenta a mineralização óssea (CUTARELLI et al., 2016). Em OBL 5-LO KO, foi observado uma diminuição de grande parte das proteínas relacionadas ao metabolismo energético, podendo ser uma das explicações para o potencial aumento da mineralização evidenciado nos animais 5-LO KO.

Uma outra proteína aumentada nos OBL WT, mas diminuída em OBL 5-LO KO, é a cofilina (F8WGL3- UniProt). Ela está envolvida na despolimerização dos filamentos de actina. Outra possível correlação pode ser feita por meio de um estudo recente sobre o perfil de mineralização aumentado em OBL 5-LO KO no qual foi demonstrado que a inibição da despolimerização da actina aumenta a diferenciação dos osteoblastos e a formação óssea (CHEN et al., 2015). Além disso, a maioria das proteínas identificadas foram únicas dos OBL 5-LO KO, ao passo que poucas foram exclusivas dos OBL WT. Vale ressaltar que uma grande classe de histonas, com vários subtipos foi identificado nas amostras dos animais 5-LO KO. Estudos epigenéticos revelam uma relação entre os processos de metilação das histonas e a diferenciação osteogênica, no qual elevados níveis de de H3K27me3 na região

promotora da BMP-2 está relacionado com a inibição de fenótipos osteogênicos (YOON et al., 2017).

Em relação a osteoclastogênese, trabalhos da literatura avaliaram os efeitos dos LTs na modulação da reabsorção óssea pelo aumento do número e atividade de osteoclastos (MOURA et al. 2014, GARCIA et al. 1996, GALLWITZ et al. 1993). Um recente estudo publicado mostrou que camundongos 5-LO KO não apresentaram perda óssea alveolar e possuem um menor número de células TRAP⁺ nos tecidos periodontais, após a infecção com *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) (MADEIRA et al. 2017). Nossos resultados corroboram com os da literatura, uma vez que o perfil osteoclastogênico dos animais 5-LO KO apresenta diferenças morfológicas e moleculares com relação aos animais WT.

Jiang et al., (2005) mostraram que o LTB₄, nas concentrações de 10⁻⁷ M, 10⁻⁸ M e 10⁻⁹ M, promove a formação de osteoclastos em células mononucleares do sangue periférico humano, de forma independente de RANKL. Porém, em estudo piloto do nosso grupo foi observado que o estímulo com LTB₄ e LTD₄, na concentração de 10⁻⁸ M e M-CSF a 50ng/mL não promoveu a formação de osteoclastos ou células multinucleadas, na ausência de RANKL (dados não apresentados).

Resultados da atividade da TRAP após estímulo com M-CSF e RANKL mostraram um perfil osteoclastogênico intrínseco para cada linhagem murina, observando uma população de células gigantes multinucleadas (osteoclastos) nos animais WT, e células classificadas como precursoras de osteoclastos, tendo em vista a difícil visualização de múltiplos núcleos, porém são células TRAP⁺. A atividade osteoclástica também foi observada por meio do ensaio de reabsorção óssea. Com relação ao estímulo com LTs exógenos, tanto o LTB₄, quanto o LTD₄ não modularam a formação de osteoclastos quando comparados ao controle, em ambas linhagens murinas. Porém, ao tratar as células WT com o meio condicionado (MC) dos osteoblastos WT e 5-LO KO, foi observado em ambos grupos uma redução do número e atividade de osteoclastos, sugerindo que o MC retardou o processo de formação de OCS. Esse efeito não foi evidenciado ao adicionar LTs exógenos nos grupos dos MC provenientes dos OBL WT, mas o tratamento com LTD₄, e não LTB₄, aumentou o número de osteoclastos no grupo do MC proveniente dos OBL KO, porém esses osteoclastos não estavam funcionais, evidenciado pela ausência de reabsorção óssea. Esse efeito pode ter ocorrido devido ao fato de os OBL KO apresentarem maior

expressão de RANKL. Diante disso, os níveis de RANKL no sobrenadante são maiores do que nos OBL WT, e ao adicionar o LTD₄ isso potencializou essa resposta.

Com relação ao perfil osteoclastogênico dos animais 5-LO KO evidenciado pela TRAP, verifica-se a ausência de células gigantes multinucleadas. Nossa hipótese é de que o RANKL é inibido/regulado por alguma (s) molécula (s) que está/estão presente (s) somente nesse grupo e que a ativação dessas células ocorre via independente de RANKL, porém essas células apresentaram atividade osteoclástica discreta e/ou alterada, observado pelo ensaio de reabsorção, quando estimuladas com MCSF e RANKL.

Com base nos resultados obtidos, descrevemos aqui uma hipótese que poderá nos auxiliar na compreensão frente às respostas induzidas pelo tratamento com o meio condicionado dos osteoblastos. A presença de RANKL é fundamental para a formação de osteoclastos (JIANG et al., 2005). Sendo assim, ao tratar as células WT com essa citocina o resultado mostrou a formação de osteoclastos gigantes multinucleados. Porém, ao adicionar o meio condicionado dos OBL WT, este sobrenadante que apresenta elevados níveis de OPG (informação baseada em resultados desse trabalho), o qual compete com o RANKL pela ligação ao RANK, inibindo a diferenciação osteoclástica. Além de OPG, esse sobrenadante pode conter moléculas (desconhecidas por nós até o presente momento) potencialmente inibidoras de RANKL, além de baixos níveis de RANKL. Isso não foi suficiente para estimular a formação de osteoclastos, mesmo com a presença de LTs endógenos secretados pelos osteoblastos, também presentes naquele sobrenadante, ou com a adição dos LTs exógenos. Contudo, o número de osteoclastos foi aumentado ao estimular as células com LTD₄, mas não LTB₄ no grupo das células tratadas com o meio condicionado dos OBL 5-LO KO. O efeito se deu provavelmente pelos altos níveis de RANKL e baixos níveis de OPG (informação baseada em resultados desse trabalho).

Em adição, a expressão gênica dos osteoclastos mostrou que os receptores BLT1/2 e CysLT1 apresentam níveis de expressão semelhantes entre as duas linhagens. Sugerindo, que embora os animais 5-LO KO não produzam LTs, seus receptores são expressos na mesma concentração dos animais WT. O mesmo perfil de expressão ocorreu para o Acp5, Ctsk e Nfatc1, marcadores da diferenciação osteoclástica, não havendo diferenças entre as linhagens murinas. Esse resultado reforça o fato de que a não diferenciação/retardo na formação dos osteoclastos em

células KO não está diretamente relacionado com esses genes, mas com o envolvimento de outras moléculas. Interessantemente, os níveis de expressão de Il-6, Il-1B e TNF α foi maior em células WT. Sabe-se que essas citocinas estimulam a produção de RANKL, e consequentemente o aumento a diferenciação de osteoclastos (XIAO et al., 2016). Em células 5-LO KO, esses genes estão pouco expressos, quando comparados ao WT, sugerindo que baixos níveis dessas citocinas pró-inflamatórias estão relacionados no retardo/diminuição da diferenciação osteoclastogênica no grupo 5-LO KO e mesmo o estímulo com LTs exógenos não foi capaz de reverter essa resposta.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

Este trabalho mostrou que os leucotrienos são capazes de modular o metabolismo do osso, evidenciado pelas diferenças significativas no perfil ósseo das linhagens murinas 129/Sv WT e 5-LO KO, e também pelos ensaios *in vitro*, mostrando, que a ausência do gene Alox5, responsável pela síntese de LTs, promove a regulação do metabolismo ósseo.

Referências

REFERÊNCIAS

ABRAMOVITZ M, et al., 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. **Eur J Biochem.** 1993 Jul 1;215(1):105-11.

AHMADZADEH N, et al., Relationship between leukotriene B4 and immunological parameters in rheumatoid synovial fluids. **Inflammation**, 15, p.497–503, 1991.

BACH MK, et al., Leukotriene C synthetase, a special glutathione S-transferase: properties of the enzyme and inhibitor studies with special reference to the mode of action of U-60,257, a selective inhibitor of leukotriene synthesis. **J Allergy Clin Immunol.** 1984 Sep;74(3 Pt 2):353-7.

BARBUTO R, MITCHELL J. Regulation of the osterix (Osx, Sp7) promoter by osterix and its inhibition by parathyroid hormone. **J Mol Endocrinol**, v. 51, n. 1, p. 99-108, 2013.

BAROUKH B, SAFFAR JS. The effect of leukotriene synthesis inhibitors on hamster periodontitis. **Arch Oral Biol**, 35(Suppl.), p.189S–92S, 1990.

BENNETT M, GILROY DW. Lipid mediators in inflammation. **Microbiol Spectrum** 4(6): MCHD-0035-2016.

BOUCHAREYCHAS L, et al., Critical Role of LTB₄/BLT1 in IL-23–Induced Synovial Inflammation and Osteoclastogenesis via NF-κB. *The Journal of Immunology.* **2017, 198 (1) 452-460.**

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** V.72, p.248-254, 1976.

BRIOT K, et al. Inflammatory diseases and bone fragility. **Osteoporos Int.** 15 Sep 2017 .

CAPDEVILA JH, et al., Cytochrome P-450 arachidonate oxygenase. **Methods Enzymol** 187:385–394, 1990.

CAPULLI M, PAONE R, RUCCI N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. **Arch Biochem Biophys**, v. 561, p. 3-12, Nov 2014.

CHARLES J. F, ALIPRANTIS, A. O. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. **Trends Mol Med**, v. 20, n. 8, p. 449-59, Aug 2014.

CHEN L. et al. Inhibiting actin depolymerization enhances osteoblast differentiation and bone formation in human stromal stem cells. **Stem Cell Res**, v. 15, n. 2, p. 281-9, Sep 2015.

CLARK, JD. MILONA, N. KNOPF, JL. Purification of a 110-kilodalton cytosolic phospholipase A2 from the human monocytic cell line U937. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1990 Oct;87(19):7708-12.

CUTARELLI A, et al., Adenosine Triphosphate stimulates differentiation and mineralization in human osteoblast-like Saos-2 cells. **Dev Growth Differ**. May;58(4):400-8, 2016.

DATTA H. K. et al. The cell biology of bone metabolism. **J Clin Pathol**, v. 61, n. 5, p. 577-87, May 2008.

DUCY P, et al. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. **Cell**.89(5):747-54, 1997.

DVORAK MM, et al., Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Apr 6;101(14):5140-5, 2004.

DYER L. A, PI X, PATTERSON C. The role of BMPs in endothelial cell function and dysfunction. **Trends Endocrinol Metab**, v. 25, n. 9, p. 472-80, Sep 2014.

FLORENCIO-SILVA R. et al. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 421746, 2015.

GALLWITZ WE, et al., 5 -Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid stimulate isolated osteoclasts to resorb calcified matrices. **The Journal of Biological Chemistry** 268, p.10087 -10094, 1993.

GARCIA C, et al., Leukotriene B4 stimulates osteoclastic bone resorption both in vitro and in vivo. **Journal of Bone and Mineral Research** 11:1619 -1627, 1996.

GLOVER S, et al., Translocation of the 85-kDa phospholipase A2 from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. **J Biol Chem**. 1995 Jun 23;270(25):15359-67.

GUO D. et al. Identification of osteocyte-selective proteins. **Proteomics**, v. 10, n. 20, p. 3688-98, Oct 2010.

HAMMARSTROM S. Leukotrienes. **Ann. Rev. Biochem**.52:355-77, 1983.

HERSCHMAN HR. Prostaglandin synthase 2. **Biochim Biophys Acta**.1299(1):125-40. 1996.

HIKIJ I H, et al., The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog Lipid Res**. 47(2), p.107-26, 2008.

_____. A distinctive role of the leukotriene B4 receptor BLT1 in osteoclastic activity during bone loss. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2009 Dec 15;106(50):21294-9.

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

HOXHA M. A systematic review on the role of eicosanoid pathways in rheumatoid arthritis. **Adv Med Sci**. 2017 Aug 14;63(1):22-29.

INDO Y. et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. **J Bone Miner Res**, v. 28, n. 11, p. 2392-9, Nov 2013.

IVASHKIV L. B. Metabolic-epigenetic coupling in osteoclast differentiation. **Nat Med**, v. 21, n. 3, p. 212-3, Mar 2015.

JUNQUEIRA LC, CARNEIRO J. **Histologia Básica**. Ed.11. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2006.

KARSENTY G. Transcriptional regulation of osteoblast differentiation during development. **Front Biosci**, v. 3, p. d834-7, Aug 1998.

KLEIN RF, et al. Regulation of bone mass in mice by the lipoxygenase gene Alox 15. **Science**. 2004;303(5655):229-32.

KLICKSTEIN LB, SHAPLEIGH C, GOETZL EJ. Lipoxygenation of arachidonic acid as a source of polymorphonuclear leukocyte chemotactic factors in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis and spondyloarthritis. **J Clin Invest**, 66, p.1166–70, 1980.

KONG YY, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**. 1999;397(6717):315-23.

LANDRY Y, et al., Heptahelical and other G-protein-coupled receptors (GPCRs) signaling. **Curr. Med. Chem**, 2006, 13: 51–63.

LAU EM, et al. Osteoporosis and transforming growth factor-beta-1 gene polymorphism in Chinese men and women. **J Bone Miner Metab**. 2004;22(2):148-52.

LAUFER S. Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. **Curr Opin Rheumatol**. 2003, 15, p.623–7.

LEE W. C. et al. Energy Metabolism of the Osteoblast: Implications for Osteoporosis. **Endocr Rev**, v. 38, n. 3, p. 255-266, Jun 2017.

LEWIS R. A., AUSTEN K. F., SOBERMAN, R. J.. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway: biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. **N. Engl. J. Med**. 1990, 323: 645–655.

LIAGREA B, et al. Expression of arachidonate platelet-type 12-lipoxygenase in human rheumatoid arthritis typeB synoviocytes. **FEBS Lett** 1997;414(1):159–64.

LIMA KM, et al., The resolution of acute inflammation induced by cyclic AMP is dependent on annexin A1. **J Biol Chem**. 2017, 292(33):13758-13773.

LOPES DEM, et al., Inhibition of 5-Lipoxygenase (5-Lo) Attenuates Inflammation and Bone Resorption in Lipopolysaccharide (Lps)-Induced Periodontal Disease. **Journal of Periodontology**. 2017.

_____, et al., Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. **Nature** 399:1999, 789–793.

LYNCH K. R, et al. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. **Nature** 399: 1999, p. 789–793.

MADEIRA MFM, et al., The role of 5-lipoxygenase in Aggregatibacter actinomycetemcomitans-induced alveolar bone loss. **J Clin Periodontol**. 2017 Jun 1.

MANCINI, JA, et al., 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. **FEBS Lett**. Mar 8;318(3):277-81., 1993.

MANIGRASSO MB, O'CONNOR JP. Accelerated fracture healing in mice lacking the 5-lipoxygenase gene. **Acta Orthop**. 2010. 81(6):748-55.

MARINO S, et al. Generation and culture of osteoclasts. **Bonekey Rep**. 3, 570, 2014.

MARZIA M, et al. Decreased c-Src expression enhances osteoblast differentiation and bone formation. **J Cell Biol**. 16;151(2):311-320, 2000.

MILLER S.C., MARKS JR. Alveolar bone augmentation following the local administration of prostaglandin E1 by controlled-release pellets. **Bone**, 1993. 14(3): p. 587-93.

MORI S., et al. Production of new trabecular bone in osteopenic ovariectomized rats by prostaglandin E2. **Calcif Tissue Int**, 1992. 50(1): p. 80-7.

MOTYL K. J. et al. Energy Metabolism of Bone. **Toxicol Pathol**, v. 45, n. 7, p. 887-893, Oct 2017.

MOURA AP, et al., The relevance of leukotrienes for bone resorption induced by mechanical loading. **Bone** 69:133 -138, 2014.

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

NAKASHIMA K., et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. **Cell**. 2002;108(1):17-29.

NISHIHARA S, et al., Role of cAMP in phenotypic changes of osteoblasts. **Biochem Biophys Res Commun**. Nov 21. pii: S0006-291X(17)32304-5, 2017.

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

PAREDES Y, et al, Study of the role of leukotriene B4 in abnormal function of human subchondral osteoarthritis osteoblasts: effects of cyclooxygenase and/or 5-lipoxygenase inhibition. **Arthritis Rheum**, 46, p.1804–12, 2002.

PASCO JA, et al. Seasonal periodicity of serum vitamin D and parathyroid hormone, bone resorption, and fractures: the Geelong Osteoporosis Study. **J Bone Miner Res**. 2004;19(5):752-8.

PAULA-SILVA FWG, et al., Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterial-induced Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**. 42 (3), p.447-454, 2016.

PERES CM, et al. Specific leukotriene receptors couple to distinct G proteins to effect stimulation of alveolar macrophage host defense functions. **J Immunol**. 2007;179(8):5454-61.

PELLETIER JP, MARTEL-PELLETIE J, ABRAMSON SB. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. **Arthritis Rheum**, 44, p.1237–47, 2001.

PIPER P, VANE J. The release of prostaglandins from lung and other tissues. **Ann N Y Acad Sci** 180, 1971, 363–385.

RÅDMARK O, et al., Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. **J Biol Chem**. 1984 Oct 25;259(20):12339-45.

REN W, DZIAK R. Effects of leukotrienes on osteoblastic cell proliferation. **Calcif Tissue Int**, 49, p.197–201, 1991.

SAMUELSSON B. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. **Science**. 1983 May 6;220(4597):568-75.

_____. et al., Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science** 237: 1987, p. 1171–1176.

SANTOS CS et al., Monitoring H₂O₂ inside *Aspergillus fumigatus* with an Integrated Microelectrode: The Role of Peroxiredoxin Protein Prx1. **Anal Chem.** 90(4): 2018, p. 2587-2593.

SARAU HM. et al. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. **Mol. Pharmacol.** 56: 1999, p. 657–663.

SECATTO A, et al., The leukotriene B₄/BLT₁ axis is a key determinant in susceptibility and resistance to histoplasmosis. **PLoS One.** 9(1): 2014, p. e85083.

SEONG JM. et al., Stem cells in bone tissue engineering. **Biomed Mater.** 5(6):2010, p. 062001.

SERHAN CN., HAMBERG M., SAMUELSSON B. Trihydroxytetraenes: a novel series of compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. **Biochem Biophys Res Commun** 118: 1984, p. 943–949.

SILVA AP DA, et al. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. **Lasers Med Sci.** 27(4), p.777-83, 2012.

SMITH W. L., MURPHY R. C. The eicosanoids: cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxigenase pathways. In: VANCE, D. E.; VANCE, J. E. (Ed.). *Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes*. 4th ed. **Amsterdam: Elsevier Science**, 2002. p. 341-371.

SMYTH E. M., FITZGERALD G. A. Os eicosanóides, prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e compostos relacionados. In: KATZUNG, B .G. (Ed.) *Farmacologia básica e clínica*. 10^a ed. Porto Alegre: **Mcgraw-hill Interamericana**, 2010, p. 261-274.

STAINS J. P, et al. Molecular mechanisms of osteoblast/osteocyte regulation by connexin43. **Calcif Tissue Int**, v. 94, n. 1, p. 55-67, Jan 2014.

THOUVEREY C, et al. Proteomic characterization of biogenesis and functions of matrix vesicles released from mineralizing human osteoblast-like cells. **J Proteomics**, v. 74, n. 7, p. 1123-34, Jun 2011.

TRAIANEDES K, et al., 5-Lipoxygenase metabolites inhibit bone formation in vitro. **Endocrinology.** 1998;139(7):3178-84.

TSAI CC, et al., Measurement of prostaglandin E2 and leukotriene B4 in the gingival crevicular fluid. **J Dent**, 26, p.97–103, 1998.

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

WAN, M. et al., Biosynthesis of leukotriene B4. **Semin Immunol**. 2017 Oct;33:3-15.
WANG Y, et al. Pyruvate dehydrogenase kinase 4 induces bone loss at unloading by promoting osteoclastogenesis. **Bone**, v. 50, n. 1, p. 409-19, Jan 2012.

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

WU Y, et al., 5-Lipoxygenase Knockout Aggravated Apical Periodontitis in a Murine Model. **J Dent Res**. 2017, p. 1-9.

YAMAGUCHI T, et al., Activation of p42/44 and p38 mitogen-activated protein kinases by extracellular calcium-sensing receptor agonists induces mitogenic responses in the mouse osteoblastic MC3T3-E1 cell line. **Biochem Biophys Res Commun**. Dec 20;279(2):363-8, 2000.

YANG J, et al. Bone morphogenetic proteins: relationship between molecular structure and their osteogenic activity. **Food Science and Human Wellness**. V. 3, p. 127-35, Dec 2014.

YOON DK, et al., The involvement of histone methylation in osteoblastic differentiation of human periosteum-derived cells cultured in vitro under hypoxic conditions. **Cell Biochem Funct**. Oct;35(7):441-452, 2017.

ZANATTA M, et al. Runx-2 gene expression is associated with age-related changes of bone mineral density in the healthy young-adult population. **J Bone Miner Metab**, v. 30, n. 6, p. 706-14, Nov 2012.

ZHANG X, et al. Runx2 overexpression enhances osteoblastic differentiation and mineralization in adipose--derived stem cells in vitro and in vivo. **Calcif Tissue Int**, v. 79, n. 3, p. 169-78, Sep 2006.

Anexo

ANEXO

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru****Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em
Animais****CEEPA-Proc. Nº 005/2017.**

Bauru, 18 de agosto de 2017.

Senhor Professor,

Informamos que Projeto de Pesquisa denominado ***"Mecanismos intracelulares induzidos por leucotrienos durante a diferenciação osteogênica"*** tendo Vossa Senhoria como Pesquisador Responsável, que envolve a utilização de animais (roedores), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi analisado e considerado APROVADO em reunião ordinária da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA), realizada nesta data.

Vigência do projeto:	<i>Maio/2017 a Maio/2018</i>
Espécie/Linhagem:	<i>Camundongo isogênico 129/Sv e Knockout/5-LO KO</i>
Nº de animais:	<i>96</i>
Peso/Idade	<i>6 e 30g/ 7 dias e 8 semanas</i>
Sexo:	<i>Machos e Fêmeas</i>
Origem:	<i>Biotério da Universidade do Sagrado Coração</i>

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

Atenciosamente,

Cássia Maria Fischer Rubira
Profª Drª Cássia Maria Fischer Rubira

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

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