

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCAS GABRIEL RODRIGUES VENTURINI

**Papel da mitofusina 2 e da dinâmica mitocondrial na diferenciação e função de osteoclastos**

**Ribeirão Preto**

**2023**

LUCAS GABRIEL RODRIGUES VENTURINI

**Papel da mitofusina 2 e da dinâmica mitocondrial na diferenciação e função de osteoclastos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Ciências.

Programa: Imunologia Básica e Aplicada

Área de concentração: Imunologia

Orientador(a): Sandra Yasuyo Fukada Alves.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

### FICHA CATALOGRÁFICA

Venturini, Lucas Gabriel Rodrigues

Papel da mitofusina 2 e da dinâmica mitocondrial na diferenciação e função de osteoclastos. Ribeirão Preto, 2023.

60p.:il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Imunologia.

Venturini, LGR. Papel da mitofusina 2 e da dinâmica mitocondrial na diferenciação e função de osteoclastos.

Tese apresentada à  
Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo,  
para obtenção do título de  
Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Aprovada em: \_\_ / \_\_ / \_\_

**Banca examinadora**

Prof(a). Dr(a).

\_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento:

\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).

\_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento:

\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a).

\_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento:

\_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

“Em nós, até a cor é um defeito. Um imperdoável mal de nascença, o estigma de um crime. Mas nossos críticos se esquecem que essa cor, é a origem da riqueza de milhares de ladrões que nos insultam; que essa cor convencional da escravidão tão semelhante à da terra, abriga sob sua superfície escura, vulcões, onde arde o fogo sagrado da liberdade.”

**Luís Gonzaga Pinto da Gama**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todas as pessoas que ficaram e estão debilitadas devido a doenças osteolíticas como a osteoporose.

Também dedico este trabalho a todas as pessoas negras deste país, marginalizadas, massacradas e que sofrem o racismo na pele no dia a dia. Estes a quem não foi dada a chance nem de sonhar em alcançar um lugar no ensino superior, quem dirá, na pós graduação, lembrem que a única coisa que temos a perder são as correntes que ainda nos prendem a escravidão.

Por fim, gostaria de dedicar este trabalho a minha família, em especial, meus pais, irmão, namorada e filho que muito me apoiaram e deram força para a realização deste trabalho.

,

## AGRADECIMENTOS

A construção desta tese não foi feita por uma única pessoa, então gostaria de agradecer imensamente a quem colaborou direta ou indiretamente com esta história contada em cinco anos.

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pois acredito que nada poderia ser feito sem Ele.

Agradeço imensamente a minha orientadora Sandra Fukada, exemplo de professora, pesquisadora e ser humano, com quem tive o prazer de trabalhar, muito obrigado por todas as broncas e ensinamentos, te admiro muito e espero poder colaborar mais vezes com você durante a vida profissional.

Agradeço as duas pessoas que me transformaram a minha vida pra sempre. Keyth Sued, obrigado por ser uma grande companheira, por me motivar sempre a buscar ser melhor e por ter me dado o melhor presente do mundo. Meu filho, Eduardo Luiz Venturini, o momento do seu nascimento foi, sem dúvida, o momento mais especial da minha vida, o seu sorriso é com certeza a coisa mais linda que eu já vi, obrigado por me dar forças diariamente e me fazer ser um homem melhor a cada dia

Agradeço aos meus pais Luciana e Heloiz, que sempre me apoiaram e fizeram de tudo para que eu conseguisse realizar meus sonhos, meu espelho são vocês, muito obrigado por tudo.

Aos meus avós maternos Luzia e Antonio que sempre me motivaram e incentivaram nos estudos, esta vitória também é de vocês. Aos meus avós paternos João e Maria, muito obrigado pela criação e valores que me passaram desde criança, sei que os dois não poderão ver ou entender este sonho sendo concluído, mas tem muito de vocês nele, obrigado.

Ao meu irmão João, que muito me orgulha e sempre me influenciou em buscar ser melhor e mais responsável, me fazendo pensar melhor nas coisas e deixando de ser tão egoísta, muito obrigado.

A todos os tios, tias, primos e primas que participam desta família grande e unida que eu possuo, e que sempre me motivaram e incentivaram, obrigado a todos vocês.

Aos meus colegas de laboratório João, Thaíse, Letícia, Cecília, Taissa e César que muito me ensinaram e ajudaram no desenvolver deste trabalho, além de fazer com que o momento de trabalho profissional também fosse um momento de estar com amigos, tornando estes 5 anos muito mais leves.

Aos meus amigos, que foram minha segunda família e meu porto seguro nestes 5 anos de doutorado, me ajudaram a viver e sobreviver a Ribeirão Preto, Renato Marques, Thayná Bertelli, Vicente Sin e Victória Thomazelli, anjos na minha vida, muito obrigado.

Aos meus amigos que já fazem parte da minha família, e que levo da graduação para o resto da vida, Eduardo Kloppel, Thamires Gratão e Carolina Abreu Miranda que fazem parte desta longa estrada acadêmica e me aconselham sempre.

Aos companheiros de pós graduação que participaram das disciplinas comigo ou colaboraram com este trabalho, em especial, Elidianne Anibal e Ayda Schneider.

A todos os professores membros do CRID (Centro de pesquisa em doenças inflamatórias) que colaboraram direta ou indiretamente com este trabalho, seja com análise de resultados ou fornecimento de reagentes, em especial, Professor José Carlos Farias Alves Filho e Professor Fernando Cunha.

Agradecer ao professor Luke A. J O'Neill e a todos os membros do LON's Lab no TBSI em Dublin que fizeram dos meus oito meses na Irlanda um momento de crescimento pessoal e profissional ímpar.

Agradecer as técnicas do LaBio, Mayara Santos Gomes e Juliana Aparecida Vercesi pelo excelente auxílio sempre prestado.

Agradecer ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Massas (CNPEM), em especial o LNNano, sem o qual não seria possível as análises de Microtomografia computadorizada com tamanha qualidade e velocidade.

Agradecer ao professor Pedro Vieira da UNICAMP que, por vezes, cedeu camundongos para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho também foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – sob o processo nº 2019/17167-

As professoras Tarcíla Aparecida Alves e Vilma Lima que estavam presentes no LaBio no início deste trabalho e me aconselharam no decorrer do mesmo.

A excelente secretária do curso de pós graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Ana Cristine que faz com que esta loucura funcione perfeitamente, muito obrigado Ana.

A todos os funcionários de segurança e limpeza da USP, FCFRP, FMRP, biotério central e biotério da farmácia pelo excelente trabalho prestado nestes 5 anos que praticamente vivi dentro da USP.

Ao programa de pós graduação em Imunologia Básica e Aplicada, a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e a Universidade de São Paulo por me permitir sonhar e realizar o sonho de ser um pesquisador na melhor universidade da América Latina, vindo de onde eu vim e sendo quem eu sou, muito obrigado.

## RESUMO

Venturini, LGR. **Papel da mitofusina 2 e da dinâmica mitocondrial na diferenciação e função de osteoclastos.** [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; 2023.

Os osteoclastos são macrófagos tecido-específicos com a função de reabsorção óssea. Por serem células gigantes e multinucleadas, os osteoclastos necessitam, desde a sua formação, passando pela adesão e movimentação na superfície óssea e finalmente pela produção de enzimas osteolíticas, de uma elevada quantidade de energia. A mitocôndria é a organela responsável pela produção de energia nas células animais e sabe-se que ela tem a capacidade de alterar seu número, tamanho e localização intracelular através de um processo denominado dinâmica mitocondrial, importante para a diferenciação de muitas células. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o papel da dinâmica mitocondrial na diferenciação de osteoclastos. Para responder a este objetivo, primeiro observamos um aumento na área das mitocôndrias em osteoclastos diferenciados quando comparados a progenitores mononucleares. Avaliamos a expressão de genes da dinâmica mitocondrial durante a diferenciação dos osteoclastos e vimos um aumento dos genes de fusão mitocondrial, em particular, da mitofusina 2. Realizamos a deleção condicional da mitofusina 2 em precursores de osteoclastos e observamos uma diminuição do número de osteoclastos e da área de desmineralização óssea em osteoclastos com deleção de mitofusina 2 em comparação com o controle in vitro. Aprofundando os efeitos da deleção da mitofusina 2 em osteoclastos, observamos uma redução na área da mitocôndria, no potencial de membrana mitocondrial, bem como na produção de energia via fosforilação oxidativa no grupo com deleção seletiva quando comparado ao grupo controle, também observamos aumento na produção de lactato no grupo com deleção de mitofusina 2. Finalmente, para observar o efeito da deleção da mitofusina 2 em um modelo osteolítico in vivo, submetemos os camundongos ao modelo de perda óssea por ovariectomia, e observamos que os camundongos osteoclastos com deleção condicional foram protegidos da perda óssea trabecular quando comparado aos camundongos controle. Assim, este trabalho demonstra que a mitofusina 2 estimula a diferenciação de osteoclastos via produção de energia mitocondrial, e a deleção da mitofusina 2 protege camundongos da perda óssea trabecular.

**Palavras-chave:** metabolismo, mitocôndria, mitofusina 2, osteoclastogênese, osteoporose.

## ABSTRACT

Venturini, LGR. **Role of mitofusin 2 and mitochondrial dynamics in osteoclast differentiation and function.** [thesis]. Ribeirão Preto: University of São Paulo, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto; 2023.

Osteoclasts are tissue-specific macrophages with the function of bone resorption. Because they are giant and multinucleated cells, osteoclasts need, from their formation, through adhesion and movement on the bone surface and finally through the production of osteolytic enzymes, a high amount of energy. Mitochondria is the organelle responsible for energy production in animal cells and it is known that it has the ability to change its number, size and intracellular location through a process called mitochondrial dynamics, important for the differentiation of a lot of cells. Therefore, the aim of this work was to evaluate the role of mitochondrial dynamics in the differentiation of osteoclasts. To answer this objective, we first observed an increase in the area of mitochondria in differentiated osteoclasts when compared to mononuclear progenitors. We look for the expression of mitochondrial dynamics during osteoclast differentiation and saw an increase of mitochondrial fusion genes, in particular, mitofusin 2. We performed the conditional knockout of mitofusin 2 in osteoclast precursors and observed a decrease in the number of osteoclasts and area of bone resorption in knockout osteoclasts compared to the control in vitro. Going deeper into the effects of mitofusin 2 deletion in osteoclasts, we observed a reduction in the area of mitochondria, in the mitochondrial membrane potential, as well as in the production of energy via mitochondria in knockout group when compared to the control group, we also observed an increase in the production of lactate in knockout group. Finally, to observe the effect of mitofusin 2 deletion in an in vivo osteolytic model, we performed a conditional knockout of mitofusin 2 in osteoclasts and submitted the mice to the model of bone loss by ovariectomy, and we observed that conditional knockout osteoclasts mice were protected from trabecular bone loss when compared to control mice. Thus, this work demonstrates that mitofusin 2 stimulates the differentiation of osteoclasts via mitochondrial energy production, and the deletion of mitofusin 2 protects mice from trabecular bone loss.

**Keywords:** metabolism, mitochondria, mitofusin 2, osteoclastogenesis, osteoporosis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Microscopia eletrônica de transmissão em osteoclastos e macrófagos precusores de osteoclastos .....	<b>30</b>
<b>Figura 2:</b> Expressão de genes de fusão mitocondrial durante a diferenciação de osteoclastos .....	<b>31</b>
<b>Figura 3:</b> Expressão gênica de Fis1 durante a diferenciação de osteoclastos .....	<b>32</b>
<b>Figura 4:</b> Expressão proteica de Mfn2 durante a diferenciação de osteoclastos.....	<b>33</b>
<b>Figura 5:</b> Diferenciação de osteoclastos por TRAP <sup>+</sup> in vitro .....	<b>34</b>
<b>Figura 6:</b> Área de desmineralização de osteoclastos sobre o conteúdo mineral ósseo in vitro .....	<b>35</b>
<b>Figura 7:</b> Características morfológicas mitocondriais em osteoclastos .....	<b>36</b>
<b>Figura 8:</b> Potencial de membrana mitocondrial em osteoclastos .....	<b>37</b>
<b>Figura 9:</b> Taxa de consumo de oxigênio (OCR).....	<b>38</b>
<b>Figura 10:</b> Produção de Lactato por osteoclastos .....	<b>39</b>
<b>Figura 11:</b> Atividade do Complexo I mitocondrial .....	<b>40</b>
<b>Figura 12:</b> Parâmetros trabeculares ósseos em camundongos submetidos ao modelo osteolítico de ovariectomia .....	<b>42</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**°C:** graus celsius

**µg:** microgramas

**µL:** microlitro(s)

**ATP:** adenosina trifosfato

**BMDM:** macrófago derivado da medula óssea

**BMUs:** Unidades básicas multicelulares

**Ca<sup>2+</sup>:** cálcio

**CEUA:** comitê de ética no uso de animais

**CreLoxP:** recombinação Cre-Lox

**Dlx5:** Distal less homebox 5

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**Drp1:** Dynamin-related protein 1

**EROS:** espécies reativas de oxigênio

**FCCP:** carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona

**Fis1:** mitochondrial fission 1

**HRP:** horseradich peroxidase

**IMM:** membrana mitocondrial interna

**M-CSF:** fator estimulador de colônias de macrófagos

**Mfn1:** mitofusina 1

**Mfn2:** mitofusina 2

**mg:** miligramas

**MicroCT:** microtomografia computadorizada

**MITF:** fator de transcrição associado a microftalmia

**mL:** mililitro

**mM:** milimolar

**MMP-9:** matriz metaloproteinase

**MSCs:** Células tronco mesenquimais

**NFATc1:** fator nuclear de células T ativadas c1

**NF-κB:** Fator nuclear kappa B

**ng:** nanograma

**OC:** osteoclasto

**OcΔMfn2:** osteoclasto com deleção seletiva de mitofusina 2

**Oc-Mfn2:** osteoclasto controle

**OMM:** membrana mitocondrial externa

**Opa1:** Optic Atrophy 1

**Osx:** Osterix

**OVX:** ovariectomia

**PCR:** reação em cadeia de polimerase

**PGC1α/β:** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha/beta

**PTH:** Paratormônio

**RANK:** receptor ativador de NF-κB

**RANKL:** ligante do receptor ativador de NF-κB

**RNA:** ácido ribonucleico

**Runx2:** Runt related transcription factor 2

**SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis

**TNF-α:** fator de necrose tumoral alfa;

**TRAF6:** molécula adaptadora fator 6 associado ao receptor de TNF

**TRAP:** fosfatase ácida resistente ao tartarato

**α-MEM:** minimum essential medium alpha

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 Osteoclastos e o remodelamento ósseo .....	14
1.2 Doenças osteolíticas .....	17
1.3 Mitocôndria e a dinâmica mitocondrial .....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Animais .....	23
3.2 Genotipagem dos animais por PCR convencional .....	23
3.3 Cultura de osteoclastos murinos .....	23
3.4 Determinação do número de osteoclastos pela reação TRAP .....	24
3.5 Ensaio de desmineralização óssea .....	24
3.6 Expressão gênica por qPCR .....	24
3.7 Expressão proteica por Western-blotting .....	26
3.8 Ovariectomia .....	27
3.9 Microtomografia computadorizada .....	27
3.10 Microscopia eletrônica de transmissão .....	28
3.11 Sondas mitocondriais .....	28
3.12 Seahorse .....	28
3.13 Atividade do complexo I mitocondrial .....	28
3.14 Análise estatística .....	29
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>30</b>
4.1 Fatores de fusão mitocondrial são expressos durante a diferenciação de osteoclastos .	30
4.2 A deleção mitofusina 2 leva a diminuição da osteoclastogênese .....	33
4.3 A deleção de mitofusina 2 impacta a produção energética de osteoclastos .....	38
4.4 A deleção de mitofusina 2 reduz a perda óssea promovida pela ovariectomia .....	41
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>44</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>52</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1. Osteoclastos e o remodelamento ósseo

O tecido ósseo, apesar de rígido, é altamente dinâmico, sendo sucessivamente moldado e reconstruído para que possa exercer suas funções (crescimento, correção de microfraturas e proteção de órgãos vitais) de forma eficiente. Este processo é denominado remodelamento ósseo, o qual é dividido em duas etapas que se interligam: a reabsorção (remoção do tecido ósseo antigo) e a formação (deposição de um tecido novo) (XIAO et al., 2016). O processo de remodelamento é orquestrado por 3 células, que formam unidades básicas multicelulares (BMUs) como proposto por Frost (1963), sendo elas: os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos (SIMS & MARTIN, 2014) e que são coordenados por reguladores metabólicos e mecânicos (BOLAMPERTI, VILLA & RUBINACCI, 2022).

Os osteoblastos e osteócitos são derivados de células tronco mesenquimais pluripotentes (MSCs) (GRIGORIADIS, HEERSCHKE & ALBIN, 1988). Os osteoblastos são caracterizados pela expressão dos fatores de transcrição Runt related transcription factor 2 (Runx2), distal less homebox 5 (Dlx5) e Osterix (Osx). Esta célula possui como função principal a deposição e mineralização da matriz óssea, além disso participa da regulação da osteoclastogênese e apresentam função endocrinológica como a secreção de osteocalcina. Os osteócitos por sua vez, possuem uma função mecano-sensora da integridade óssea e regula a resposta tanto de osteoblastos como de osteoclastos durante o remodelamento ósseo (CAPULLI, PAONE E RUCCI, 2014).

Os osteoclastos são células multinucleadas formadas a partir de precursores da linhagem mieloide, localizados na medula óssea, sendo uma espécie de macrófago especializado tecido-específico que conduzem o processo de reabsorção óssea (BOYLE, SIMONET & LACEY, 2003). A diferenciação de osteoclastos, denominada de osteoclastogênese, envolve uma série de etapas que seguem desde o comprometimento de monócitos e/ou macrófagos para precursores de osteoclastos (estágio inicial), até a formação de células gigantes multinucleadas (estágio final) pela fusão celular (SEGOVIA-SILVESTRE et al., 2009).

A osteoclastogênese é regulada essencialmente por duas citocinas: 1) o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e; 2) o ligante do receptor ativador do NF- $\kappa$ B (RANKL). O M-CSF, também conhecido como CSF-1, atua no receptor c-

fms (CSF1R/MCSFR) expresso em monócitos e macrófagos (HATTERSLEY, KERBY & CHAMBERS, 1991) e apresenta papel crucial na osteoclastogênese, ativando vias de sinalização que controlam a sobrevivência e proliferação celular, como também regulando a expressão do receptor RANK (MUN, PARK & PARK-MIN, 2020).

O RANKL é uma citocina que pertence a superfamília do TNF e se liga no receptor RANK, o qual é expresso em monócitos, macrófagos e em pré-osteoclastos (LACEY et al., 1998; NAKAGAWA et al., 1998). O RANKL é um ativador altamente eficaz e promove o recrutamento da molécula adaptadora fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF-6), a qual leva a ativação de várias vias de sinal intracelular, incluindo vias clássicas e alternativas do NF- $\kappa$ B, c-Fos, fosfolipase C, fator de transcrição associado a microftalmia (MITF) e fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), importantes para os diferentes estágios de diferenciação dos osteoclastos (LUCHIN et al., 2001; ASAGIRI & TAKAYANAGI, 2007). Em particular, o NFATc1 é considerado o regulador central da diferenciação dos osteoclastos visto que animais deficientes de NFATc1 condicionalmente em osteoclastos, desenvolvem osteopetrose (WINSLOW et al., 2006) e que a expressão ectópica de NFATc1 em células precursoras de monócitos induzem a formação de osteoclastos independentemente do estímulo RANKL (TAKAYANAGI et al., 2002).

A reabsorção óssea exige dos osteoclastos uma série de modificações que compreendem intenso remodelamento citoesquelético, polarização da membrana plasmática, redistribuição de transportadores e organelas e intenso tráfego endossômico. A reabsorção óssea inicia-se com a formação da zona de selamento que é marcada pela adesão celular na superfície óssea mineralizada, por meio de integrinas tipo alfa v beta 3 (integrina  $\alpha v \beta 3$ ) e formação de lacunas de reabsorção, onde são secretados ácidos e enzimas proteolíticas. A manutenção do pH ácido, por H<sup>+</sup>ATPase vacuolares nestas lacunas são importantes para amplificação da atividade das enzimas proteolíticas secretadas de vesículas, como o TRAP, catepsina K e matriz metaloproteinase-9 (MMP-9), permitindo assim a desmineralização e degradação de colágeno (VAANANEN & LAITALA-LEINONEN, 2008).

Considerando que o osteoclasto é uma célula grande comparada as demais, e sua intensa adaptação estrutural e bioquímica descritas acima, os osteoclastos maduros demandam altos níveis de ATP para a biossíntese de diferentes fatores utilizados durante a reabsorção óssea, por isso sofrem adaptações metabólicas para

a realização de sua função (PARK-MIN, 2009). De fato, inúmeros estudos mostram a importância de processos metabólicos na função e diferenciação dos osteoclastos. Há um aumento no consumo de glicose e oxigênio, assim como na produção de lactato nas diferentes fases de proliferação, migração e fusão de pré-osteoclastos. Esses achados são corroborados pela observação de que níveis elevados de glicose no meio de cultura aumentam a diferenciação dos osteoclastos, enquanto a privação de glicose inibe a capacidade de reabsorção destas células (INDO et al., 2013). Além da glicose, outros substratos bioenergéticos, tais como o piruvato, induzem a diferenciação de osteoclastos, demonstrando a importância do metabolismo energético para a diferenciação e função desta célula (FONG et al., 2013).

O questionamento acerca do metabolismo energético durante a ativação e diferenciação de osteoclastos remonta a 1931 quando Ch'uan demonstrou a partir de microscopia eletrônica em tecido ósseo que os osteoclastos são células ricas em mitocôndrias quando comparados as demais células presentes no tecido ósseo. Outro estudo por Miyazaki e colaboradores (2012) demonstrou em modelo murino *in vivo* que os osteoclastos não apenas são células ricas em mitocôndrias, como dependem destas organelas funcionais para exercer de forma competente sua função, algumas mitocôndrias funcionam como armazenamento de cálcio.

Além disso, osteoclastos diferenciados a partir da linhagem de macrófagos RAW 264.7 estimulados com RANKL apresentaram um aumento na expressão de proteínas relacionadas com o ciclo do ácido cítrico, como a enzima citrato sintase, isocitrato, aconitase, assim como, proteínas relacionadas à fosforilação oxidativa como NADH desidrogenase e citocromo c-ubiquitinol redutase. Os autores sugerem que o aumento da síntese de fatores relacionados ao metabolismo energético e da função mitocondrial é importante para a osteoclastogênese (CZUPALLA et al., 2005).

Lemma e colaboradores (2016) realizaram um estudo utilizando cultura de osteoclastos diferenciados a partir de monócitos do sangue periférico de voluntários humanos, onde foi possível observar um aumento da massa mitocondrial, da concentração de ATP e maior expressão de genes codificantes dos complexos I-IV da cadeia transportadora de elétrons durante a osteoclastogênese, além de também demonstrar uma tendência a glicólise por parte dos osteoclastos maduros durante a execução de sua função.

Sabendo que o desequilíbrio na formação de osteoclastos pode levar ao desenvolvimento de doenças osteolíticas e da importância do metabolismo de glicose para a osteoclastogênese, compreender e modular o metabolismo dos osteoclastos pode ser a chave para o desenvolvimento de tratamento para doenças como a osteoporose, a osteoartrite e a artrite reumatoide.

## **1.2 Doenças osteolíticas**

As doenças osteolíticas são um conjunto de desordens metabólicas do sistema esquelético que tem como principal característica a perda da densidade e da massa óssea. Outro fator que está relacionado a este conjunto de lesões ósseas é a superativação dos osteoclastos (HEYMANN et al., 2005).

Dentre as diversas doenças que estão relacionadas a perda de massa óssea destaca-se a osteoporose por ser o principal fator relacionado a perda de movimentação em mulheres pós-menopausa e homens de idade avançada. Estima-se que cerca de 8.9 milhões de pessoas no mundo são afetadas por esta doença, acarretando consequências físicas e psicológicas, além de diminuir drasticamente a qualidade de vida, sendo por este motivo, considerada um grande problema de saúde pública (CLYNES et al., 2020).

A perda de massa óssea é uma consequência inevitável do envelhecimento. Normalmente, mulheres entre 65-69 anos e homens entre 74-79 anos tem o primeiro declínio acentuado da massa óssea. Contudo, fatores como: perda de peso (em pessoas idosas), tabagismo e consumo de álcool (de regular a alto) podem acelerar este processo de perda óssea. A osteoporose causada pelo envelhecimento ou pelo pós-menopausa é chamada de osteoporose primária (POURESMAEILI et al., 2018).

Algumas drogas como glicocorticoides, antiepiléticos, inibidores da bomba de prótons, terapia hormonal sistêmica, bem como, desordens da tireoide, doença renal crônica e diabetes também podem levar ao desenvolvimento da osteoporose, sendo considerada como osteoporose secundária (EBELING et al., 2022).

O mecanismo fisiopatológico da osteoporose está relacionado ao processo de remodelamento ósseo. Como já explicado previamente, o osso tem a capacidade de se autorrenovar, onde há a reabsorção óssea por parte dos osteoclastos e a deposição de um novo tecido ósseo por parte dos osteoblastos. Uma vez que os

osteoclastos por algum motivo aumentem sua função e reabsorvam mais tecido ósseo do que os osteoblastos são capazes de repor, ocorre a formação de poros nos ossos, redução da densidade e massa óssea e a desconfiguração da microarquitetura óssea. Este processo leva a ossos mais frágeis que podem ser fraturados mais facilmente, característico da osteoporose (DRAKE, CLARKE & LEWIECKI, 2015).

Existem diversos tratamentos no mercado para a osteoporose, que podemos dividir em 4 grandes grupos: 1. Reposição de cálcio e vitamina D; 2. Terapia anti-reabsortiva: bifosfonados, denozumab; 3. Tratamentos hormonais: moduladores seletivos do receptor de estrogênio, testosterona, análogos de PTH; 4. Terapias experimentais: Romosozumab, Inibidores de Dickkopf-1. Porém, nenhum destes tratamentos se apresentou como relevante na cura da osteoporose, o que leva a gastos como 30 bilhões de dólares gastos pelos EUA, e entre 17 e 20 bilhões de dólares gastos pela União Europeia em um ano no tratamento da osteoporose (KOZLA & HOFFBAUER, 2017).

Sendo assim, novos alvos terapêuticos são constantemente investigados no contexto da osteoporose. Sabendo da alta demanda energética do osteoclasto para cumprir sua função de reabsorção óssea e sua participação na fisiopatologia da osteoporose faz-se necessário investigar o metabolismo dos osteoclastos, em especial sua produção energética, para compreensão e modulação como possível alvo terapêutico para o tratamento de doenças osteolíticas, em especial, da osteoporose.

### **1.3 Mitocôndria e dinâmica mitocondrial**

A mitocôndria é uma organela citoplasmática “independente” que possui dupla membrana e material genético próprio. Sua presença é indispensável para todas as células nucleadas, pois apresenta como principal função a fosforilação oxidativa para a geração de energia em forma de ATP, o qual é fundamental para a manutenção da função e sobrevivência celular (LEHNINGER, 1962). Desde a descoberta da principal função mitocondrial, muito avançou-se sobre a existência de outras funções metabólicas dessa organela como, por exemplo, na geração de espécies reativas de oxigênio (KOWALTOWSKI et al., 2009), morte celular (MARTINOU & YOUNG, 2011) e metabolismo de cálcio (RIZZUTO et al., 2012). A descoberta destas múltiplas

funções da mitocôndria fez cair o conceito de que ela seria uma organela isolada e estática.

Apesar de não serem formadas *de novo*, as mitocôndrias podem mudar sua forma, número e localização intracelular, comportamento que é denominado de dinâmica mitocondrial (NI, WILLIAMS & DING, 2015). A dinâmica mitocondrial compreende os processos de fissão e fusão mitocondrial. Estes processos são altamente organizados e orquestrados por uma rede de moléculas localizadas nas membranas mitocondriais interna (IMM), externa (OMM) e/ou no citosol. A fissão é o processo pelo qual as mitocôndrias se fragmentam tornando-se organelas pequenas e isoladas, estágio importante durante a divisão celular e morte por apoptose. A fissão é coordenada pela GTPase Drp1 (dynamamin-related protein 1) presente no citosol celular, que é recrutada pela proteína Fis1 (mitochondrial fission 1) para a membrana mitocondrial externa, onde estão localizados os sítios de clivagem no momento da fissão (LACKNER & NUNNARI, 2009).

Por outro lado, a fusão mitocondrial é o processo pelo qual as mitocôndrias menores se unem para formar organelas maiores e mais complexas, importantes em processos de alto gasto energético, sobrevivência celular frente a agressões e diferenciação celular (WESTRATE et al., 2014). A fusão mitocondrial é coordenada pela molécula mitocondrial Optic atrophy 1 (Opa1), proteína fusional presente na membrana mitocondrial interna e pelas mitofusinas 1 e 2 (Mfn1 e Mfn2). As mitofusinas são GTPases presentes na membrana mitocondrial externa que possuem uma extremidade no citosol e outra no espaço intermembranar mitocondrial (SANTEL & FULLER, 2001). Apesar de apresentarem 80% de similaridade estrutural, as mitofusinas 1 e 2 não apresentam papéis redundantes quanto a função na fusão mitocondrial. Enquanto a Mfn1 é necessária para responder ao estímulo fusional da Opa1, a Mfn2 possui função central no tethering entre mitocôndria e retículo endoplasmático, associado a formação dos mitocôndrios e a regulação do cálcio intracelular, sendo que ambas têm papel essencial para a fusão mitocondrial (SCHREPFER & SCORRANO, 2016). Porém, apenas a deleção de Mfn2 é incompatível com a vida e a deleção de Mfn1 é corrigida pela atividade aprimorada da Mfn2.

Essa aparelhagem mitocondrial atua na maior parte das células nucleadas e o desequilíbrio entre estas moléculas está associado ao desenvolvimento de uma série

de doenças, como diabetes (WILLIAMS & CAINO, 2018), doenças neurodegenerativas (ITOH et al., 2013) e cardiovasculares (DORN II et al., 2013).

A Mfn2, dentre todas as moléculas associadas a fusão mitocondrial, chama a atenção por ser um fator de sobrevivência celular uma vez que a depleção desta molécula está associada a indução de apoptose em neurônios, por exemplo (PENG et al., 2015). A Mfn2 apresenta também papel essencial na regulação metabólica (BACH et al., 2003) e parte dessa função está ligada à sua capacidade de realizar a fusão mitocondrial e de induzir a ligação entre mitocôndria e retículo endoplasmático o qual é essencial para a sinalização do cálcio intracelular (DE BRITO & SCORRANO, 2008). Camundongos knockout condicional de Mfn2 em hepatócitos demonstraram ter intolerância à glicose e falha na sinalização da insulina (SEBASTIÁN et al., 2012). Além disso, estudos demonstraram uma maior expressão da Mfn2 em comparação com as demais moléculas associadas a fusão (Mfn1, Opa1) em tecidos periféricos como o músculo esquelético, que está intimamente ligado ao tecido esquelético (BACH et al., 2003).

Os dados de Forni e colaboradores (2016) demonstraram a importância das moléculas envolvidas na dinâmica mitocondrial para a diferenciação de células de origem mesenquimal, dentre essas moléculas, a Mfn2 encontra-se aumentada em adipócitos e osteócitos. Além disso, dados na literatura mostraram que a Mfn2 está ligada a biogênese mitocondrial sendo estimulada pelos co-ativadores transcricionais PGC1 $\alpha$ /PGC1 $\beta$  (LIESA et al., 2008). É importante notar que o gene *Ppargc1b* que codifica o co-ativador PGC1 $\beta$  está aumentado durante a diferenciação de osteoclastos e que a deleção condicional deste gene a esta célula, inibiu a biogênese mitocondrial e a diferenciação de osteoclastos (ISHII et al., 2009). Por outro lado, um estudo recente de Zhang e colaboradores (2018) demonstrou que a deleção seletiva de PGC1 $\beta$  em células precursoras não alterou os marcadores e a taxa de diferenciação de osteoclastos, contudo foi observado uma redução significativa dos marcadores de ativação e da função na reabsorção óssea. Embora a literatura seja divergente quanto ao papel de PGC1 $\beta$  sobre a osteoclastogênese, existe um consenso quanto a importância mitocondrial para que os osteoclastos promovam sua função, ou seja, os trabalhos publicados até o momento concordam que a deleção de PGC1 $\beta$  *in vivo* favorece um quadro osteopetrótico.

Este conjunto de evidências apresentadas até o momento sugerem uma possível relação entre a PGC1 $\beta$ , a função mitocondrial e o metabolismo de osteoclastos, porém a literatura carece de trabalhos que elucidem o papel da mitofusina 2 e das demais moléculas relacionadas a dinâmica mitocondrial na diferenciação e ativação de osteoclastos e o papel da fusão mitocondrial sobre processos osteolíticos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o papel da dinâmica mitocondrial, em especial, da mitofusina 2 durante a diferenciação e função de osteoclastos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da deleção de mitofusina 2 sobre a diferenciação e função de osteoclastos in vitro;
- Avaliar o efeito da deleção da mitofusina 2 sobre as características morfofuncionais mitocondriais em osteoclastos in vitro;
- Avaliar o efeito da deleção da mitofusina 2 sobre a perda óssea trabecular in vivo em modelo de ovariectomia.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para a realização deste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 sem alterações genéticas, e também alterados geneticamente pela tecnologia CreLoxP que gera camundongos com deleção seletiva de mitofusina 2 em macrófagos e/ou osteoclastos:  $LysM^{cre/0}$ ,  $LysM^{cre/0}Mfn2^{ff}$ ,  $Ctsk^{cre/0}$ ,  $Ctsk^{cre/0}Mfn2^{ff}$ . Foram utilizados camundongos machos com 8-10 semanas de vida:  $LysM^{cre/0}$  e  $LysM^{cre/0}Mfn2^{ff}$ , além de fêmeas de 12 a 16 semanas  $Ctsk^{cre/0}$  e  $Ctsk^{cre/0}Mfn2^{ff}$ . Os animais foram mantidos no biotério de criação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto durante o experimento, em um ciclo de 12 horas claro/escuro, temperatura e umidade controladas. A água e a ração foram administradas *ad libitum*. Este trabalho seguiu as normas do CEUA-USP, foi aprovado sob o número de protocolo 18.1.947.60.0.

#### 3.2 Genotipagem dos animais por PCR convencional

Para a genotipagem dos camundongos foi realizada a extração do DNA, utilizando as amostras animais as quais foram adicionados 75  $\mu$ l de tampão (NaOH 25 mM e EDTA 0,2 mM) e levadas ao termociclador a 98 por 1 hora. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado no aparelho nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Implent, Inc., Califórnia, USA), onde posteriormente foi utilizado 20 ng total de DNA para a reação de PCR. Para esta reação foram utilizados os primers específicos para análise de Lisozima Cre, Catapsina K Cre e Mitofusina 2 flox, juntamente com o Amplitaq Gold 360 Master MIX. As amostras foram aplicadas em gel 1,5% de agarose em cuba de eletroforese de 100V por 50 minutos, além do padrão molecular e o controle positivo e negativo.

#### 3.3 Cultura de osteoclastos murinos

A diferenciação de osteoclastos murinos foi realizada a partir de cultura primária utilizando células da medula óssea. Para isso, fêmur e tíbia de camundongos  $LysM^{cre/0}$  e  $LysM^{cre/0}Mfn2^{ff}$  foram assepticamente removidos e as medulas ósseas extraídas e mantidas por 3 dias em meio de cultura  $\alpha$ -MEM (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) suplementada com 10% soro fetal bovino, 100 unidades/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (ThermoScientific, Carlsbad, CA, USA) na presença de 30 ng/mL

de M-CSF (R&D Systems). As células não aderidas foram removidas e eliminadas, e as células aderidas (pré-osteoclastos) foram cultivadas em meio osteoclastogênico com 30 ng/mL de M-CSF e 10 ng/mL de RANKL (R&D Systems) por diferentes tempos, de acordo com o protocolo de estudo.

### **3.4 Determinação do número de osteoclastos pela reação de TRAP**

Para o ensaio de TRAP foram plaqueados 20.000 pré-osteoclastos em placa de 96 poços e cultivadas na presença de M-CSF e de RANKL por 3 dias. A marcação de osteoclastos foi realizada pela reação da fosfatase ácida resistente ao tartarato - TRAP (KIT SIGMA 387-A). As células foram primeiramente fixadas com tampão de citrato por 20 minutos, lavadas com PBS e incubadas a 37° C na solução corante contendo tartarato por 40 minutos, ao abrigo da luz, de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, os osteoclastos (células coradas e contendo 3 ou mais núcleos) foram fotografados e quantificados quanto ao número e tamanho das células utilizando o programa de imagens (ImageJ software).

### **3.5 Ensaio de desmineralização óssea**

Para o ensaio de desmineralização óssea em placa de osteassay, 15.000 pré-osteoclastos foram plaqueados em placa de 96 poços contendo hidroxapatita (CORNING®) e cultivadas na presença de M-CSF e de RANKL por 10 dias. Após esse período foram tiradas fotos em microscópio e área de desmineralização foi medida em software de imagem (ImageJ software).

### **3.6 Expressão gênica por qPCR**

Foram coletados os pré-osteoclastos dos tempos 0, 24h, 48h e 72h. O isolamento de RNA total da cultura de células foi realizado utilizando o Kit da Promega SV Total Isolation System (Z3105- Promega), de acordo com o cartão de protocolo 9FB025 indicado pelo fabricante. O RNA extraído foi eluído em 30 µl de água Nuclease free e quantificado no aparelho nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Impln, Inc., California, USA). Foi utilizado 500 µg de RNA total para a síntese do cDNA por meio da reação de transcriptase reversa (High capacity cDNA Reverse Transcription kit da Applied Biosystems- 4368813). As amostras foram levadas ao termociclador (Eppendorf vapo.protect) e submetidas às seguintes temperaturas: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos e 4°C até a remoção

das amostras do aparelho. Após a realização da reação, as amostras foram diluídas 10 vezes e armazenadas em -20°C até o momento do uso.

A reação de PCR para amplificação dos genes de interesse foi realizada utilizando os respectivos primers específicos (TaqMan® Gene Expression Assay) para marcadores de osteoclastos como *Nfatc1* (*Nfatc1*). Foi utilizado o reagente TaqMan® o mix de 5 µL de 2x qPCR BIO TaqMan® Mix Separate-ROX (PCR Biosystems) e o equipamento de PCR em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™).

Primer para *Nfatc1* (Mm00479445\_m1), foram obtidos comercialmente e a sequência é propriedade privada do fornecedor (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). O gene *Gapdh* (Mm99999915\_g1) foi utilizado como gene endógeno.

A amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 50°C por 2 minutos para incubação, 95°C por 20 segundos para ativação da polimerase AmpliTaq Gold Enzyme, 40 ciclos de 95°C por 1 minuto para desnaturação do DNA e 60°C por 20 segundos para o anelamento do primer e a extensão.

Além disso foram utilizados primers específicos (Syber Green®) para o metabolismo como Mitofusina 1 (*Mfn1*), Mitofusina 2 (*Mfn2*), Proteína relacionada a dinâmica 1 (*Drp1*). O gene *Gapdh* foi utilizado como gene endógeno.

Foi utilizado o mix de 5 µL de 2x qPCR BIO SyGreen Mix Separate-ROX (PCR Biosystems) e o equipamento de PCR em tempo real StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems™). A sequência dos primers estão na tabela abaixo:

Tabela 1 – Sequências dos primers Syber Green utilizados

Gene	Primer (5'-3')	
	Forward	Reverse
<i>Mfn1</i>	CCTACTGCTCCTTCT AACCCA	AGGGACGCCAATCC TGTGA
<i>Mfn2</i>	AGAACTGGACCCGG TTACCA	CACTTCGCTGATACC CCTGA
<i>Drp1</i>	CAGGAATTGTTACGG TTCCCTAA	CCTGAATTAAGTTGT CCCGTGA
<i>Gadph</i>	AGGTCGGTGTGAAC GGATTTG	TGTAGACCATGTAGT TGAGGTCA

A amplificação foi realizada em termociclador sob as seguintes condições: 1 ciclo de 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 5 segundos, 40 ciclos de 65°C por 30 segundos.

Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, cycle threshold), sendo este o ponto correspondente ao número do ciclo obtido na fase de amplificação exponencial das amostras que permite a análise quantitativa da expressão do gene avaliado. O cálculo de expressão relativa dos genes foi normalizado pela expressão na condição controle, ou seja, pela diferença entre  $\Delta Ct$  das amostras (Ct do gene alvo – Ct do gene endógeno constitutivo) e a média obtida do  $\Delta Ct$  dos animais controles, resultando os valores de  $\Delta\Delta Ct$  de cada animal. Em seguida, foi realizado o cálculo da expressão de cada gene avaliado com base na equação descrita pelo trabalho de Livak e Schmittgen (2001):

$$\text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

### 3.7 Expressão proteica por *Western-blotting*

Amostras de proteínas (5 mg a 40 mg) foram separadas por SDS-PAGE de 8% a 12% e transferido para membrana de difluoreto de polivinilideno Immobilon (Millipore, Billerica, MA, EUA) por eletroblotting (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), e então

sondado com os respectivos anticorpos. Resumidamente, o bloqueio foi realizado em TBSTM (TBST 0,1% Tween + 5% de leite em pó desnatado) seguido de incubação com anticorpos primários em TBSTA (TBST + 0,1% Tween + 5% albumina) durante a noite a 4°C. Anti-MFN2 (ab56889, Abcam) foi utilizado. Em seguida, as membranas foram lavadas em TBST e incubadas com anticorpos secundários contra camundongos (ab6789, Abcam) em TBSTM por 2 horas em temperatura ambiente. Os borrões foram lavados e depois desenvolvidos com substrato HRP quimioluminescente (Luminata Forte-Millipore). A intensidade das bandas indicando os níveis de proteína foi determinada por quantificação densitométrica usando o software Image J, relativo para  $\beta$ -actina como um controle de carregamento.

### **3.8 Ovariectomia**

Os animais  $Ctsk^{cre/0}$  e  $Ctsk^{cre/0}Mfn2^{ff}$ , primeiramente, foram anestesiados e posteriormente, foi realizada a incisão em cada flanco (direito e esquerdo). Após a identificação dos ovários foi feita a ligadura de seus pedúnculos e em seguida a ressecção dos tecidos ovarianos. A parede abdominal foi fechada em dois planos utilizando sutura contínua de fio de seda 4.0. Como controle, fêmeas igualmente manipuladas foram utilizadas, sem, entretanto, haver a ressecção do tecido ovariano (grupo Sham/OVX). Após um período de 30 dias, os animais foram eutanasiados e as amostras coletadas. Após eutanásia, foram coletados: sangue e fêmur.

### **3.9 Microtomografia computadorizada**

As amostras foram processadas de acordo com modificações no protocolo descrito por Baloul e colaboradores em 2011. As amostras dos fêmures esquerdos de animais  $Ctsk^{cre/0}$  e  $Ctsk^{cre/0}Mfn2^{ff}$  foram dissecadas, limpas, fixadas em formaldeído a 10% para padronização do posicionamento da mesma durante a realização da MicroCT. Os fêmures foram posicionados na posição transversal com a cabeça e o trocanter maior do fêmur voltada para cima. As mensurações dos padrões ósseos foram realizadas utilizando os programas de imagens Data Viewer e CTAn (Bruker microCT). A análise das trabéculas foi realizada 1 cm abaixo da zona de crescimento.

### **3.10 Microscopia eletrônica de transmissão**

Foram plaqueadas  $1 \times 10^6$  células por poço em placa de 6 poços em meio osteoclastogênico por 3 dias, A cultura foi fixada por 2 horas em glutaraldeído (2% em

tampão fosfato) e incluído em Embed. Foi feita a preparação dos ultrafinos e a visualização via microscópio eletrônico de transmissão (Jeol JEM- 100 CXII equipado com câmera digital Hamamatsu ORCA-HR).

### **3.11 Sondas mitocondriais**

Para a avaliação do potencial de membrana mitocondrial, foram utilizadas sondas fluorescentes mitocondriais: Mitotracker Green FM, Mitotracker Red. Foram plaqueados 20.000 células em placa preta de fundo transparente (CORNING) com meio osteolcastogênico, após diferenciadas as células foram ou não fixadas dependendo do protocolo de cada sonda, a sonda fluorescente foi adicionada e as imagens foram captadas em microscópio confocal. As imagens foram analisadas pelo software ImageJ e a intensidade fluorescência foi avaliada.

### **3.12 Seahorse**

Para a avaliação da taxa de consumo de oxigênio utilizamos o equipamento Seahorse Flux Analyzer. Primeiramente, foram plaqueadas 10.000 células por poço em microplaca específica do aparelho com sensor de oxigênio, após os 3 dias de diferenciação foi adicionado meio D-mem sem cor com 10mM de glicose e levada ao aparelho Seahorse previamente calibrado. A análise completa durou 80 minutos, onde foram avaliados 3 pontos de tempo a cada estímulo adicionado. Para a avaliação da respiração basal utilizou-se apenas a célula com meio glicosado, depois adicionou-se oligomicina, seguido de carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) e por fim, rotenona.

### **3.13 Atividade do complexo I mitocondrial**

Para a avaliação da atividade do complexo I mitocondrial foi utilizado o kit da Sigma-Aldrich Mitochondrial Complex I Activity Assay Kit, seguido o protocolo do fornecedor. Primeiramente foram plaqueadas 10 milhões de células em meio osteoclastogênico, após 3 dias de estímulo, as células foram coletadas e as mitocôndrias extraídas pelo kit Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells (Thermo-Fisher), as amostras foram normalizadas para uma quantidade de 500µg de proteína mitocondrial e posteriormente foi então avaliada a atividade do complexo I mitocondrial pela capacidade das mitocôndrias isoladas em converter NADH em NAD<sup>+</sup>.

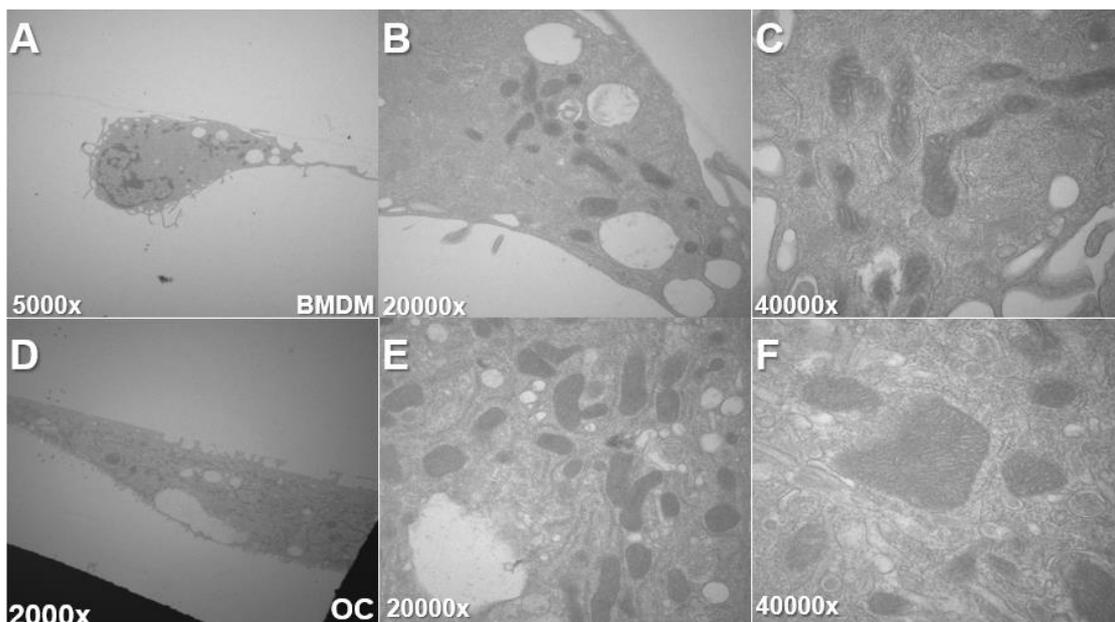
### **3.14 Análise estatística**

Os dados foram analisados com o auxílio do GraphPad Software 7.0 (GraphPad Prism; GraphPad Software, San Diego), usando o teste “t” de Student para comparar dois grupos e o teste de variância unidirecional (One-way ANOVA) para comparar mais de dois grupos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM, e os experimentos foram repetidos pelo menos 2 vezes. Para cada teste, um  $P < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Fatores de fusão mitocondrial são expressos durante a diferenciação de osteoclastos

Os osteoclastos são células ricas em mitocôndrias. Ch'uan (1931) já demonstrava que os osteoclastos quando comparados as demais células presentes no tecido esquelético era a que possuía a maior quantidade de mitocôndrias. Porém, pouco se sabe sobre a estrutura morfológica das mitocôndrias em osteoclastos, portanto o primeiro passo foi observar estas organelas em uma cultura de osteoclastos in vitro. Utilizando a microscopia eletrônica de transmissão (MET) avaliamos a morfologia mitocondrial de osteoclastos diferenciados e comparamos com seus progenitores mielóides.



**Figura 1 – Microscopia eletrônica de transmissão em osteoclastos e macrófagos precursores de osteoclastos:** Macrófagos (A) mitocôndrias em macrófagos (B, C), osteoclastos (D) mitocôndrias em osteoclastos diferenciados (E, F).

A figura 1A é uma foto ilustrativa de um macrófago derivado da medula óssea (BMDM) cultivado por 72 horas e nas imagens em sequência (figura 1B e 1C) aumentos de 20.000x e 40.000x feitos para a observação das mitocôndrias presentes no macrófago.

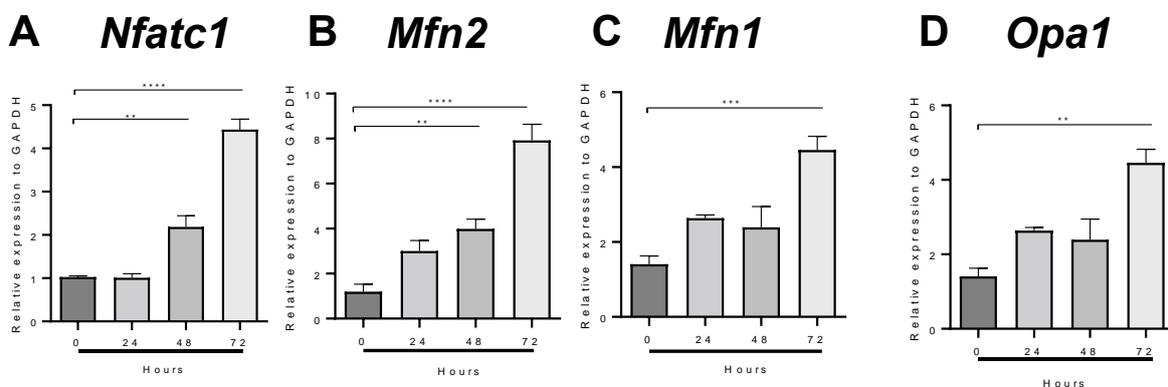
Quando comparadas as mitocôndrias presentes no macrófago (figura 1B, 1C) com aquelas presentes no osteoclasto (figura 1D, 1E), as mitocôndrias do osteoclasto

parecem estar passando por um processo de fusão, uma vez que aparentam ser maiores e cobrem uma área maior das células.

Hoje também se sabe que a mitocôndria tem a capacidade de modular seu tamanho, morfologia e localização intracelular de forma a atender estímulos internos e externos. Esta capacidade da mitocôndria de auto modulação com eventos de fusão e fissão é conhecido como dinâmica mitocondrial (LIESA et al., 2009).

Pouco se sabe sobre a dinâmica mitocondrial em osteoclastos, portanto, avaliamos a expressão gênica de alguns fatores relacionados a fusão mitocondrial, entre eles, mitofusina 1 (*Mfn1*), mitofusina 2 (*Mfn2*) e *Optic Atrophy 1* (*Opa1*) via PCR quantitativo.

Além disso, também avaliamos a expressão do principal fator de transcrição durante a diferenciação de osteoclastos (*Nfatc1*) todos durante a diferenciação de osteoclastos após estímulo com RANKL in vitro por 72 horas como apresentado na figura 2.



**Figura 2 – Expressão de genes de fusão mitocondrial durante a diferenciação de osteoclastos:** expressão gênica relativa via RT-PCR 0, 24, 48 e 72 horas após o estímulo de pré-osteoclastos com RANKL a) *Nfatc1*, b) mitofusina 2, c) mitofusina 1, d) *Opa1*, ANOVA\*  $p < 0,05$ , ANOVA\*\*  $p < 0,01$ , ANOVA\*\*\*  $p < 0,005$ , ANOVA\*\*\*\*  $p < 0,001$ .

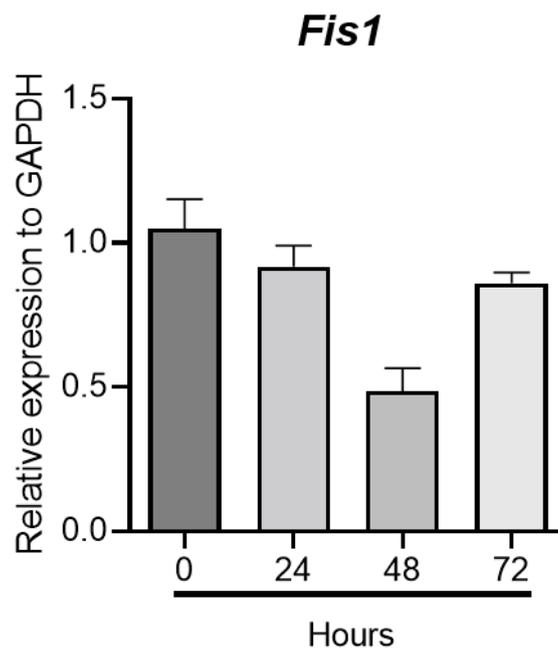
Na figura 2A pode-se observar o aumento da expressão do gene *Nfatc1* em 72 horas após o estímulo com RANKL. Este dado representa o efeito do RANKL sobre seu receptor RANK, uma vez que a cascata de ativação do receptor RANK culmina na expressão de *Nfatc1* em monócitos e/ou macrófagos levando a formação de osteoclastos diferenciados após 72 horas.

As figuras 2B e 2C mostram um aumento da expressão gênica das mitofusinas 1 e 2 após 72 horas do estímulo com RANKL. Além disso também pode-se observar

um aumento na expressão de *Opa1* após 72 horas do estímulo (figura 2D), estes dados somados demonstram que os genes envolvidos na fusão mitocondrial estão aumentados em osteoclastos diferenciados

Os dados das figuras 1 que mostram um aumento na área das mitocôndrias, bem como, os dados da figura 2 que demonstram um aumento na expressão de genes associados a fusão mitocondrial durante a diferenciação de osteoclastos, indicam que possa estar havendo um processo de fusão mitocondrial durante a diferenciação de osteoclastos.

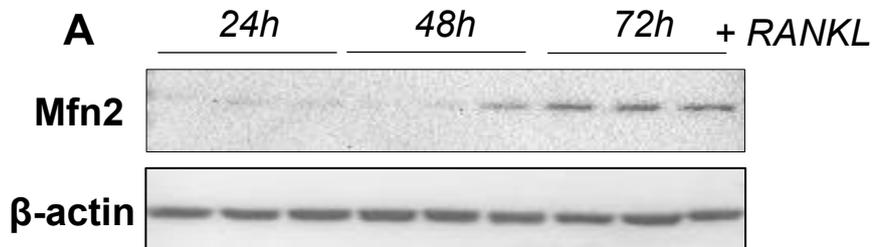
Em contrapartida, não há dados sobre o processo de fissão mitocondrial em osteoclastos, por isso, avaliamos a expressão gênica de um dos fatores associados a fissão mitocondrial, a *mitochondrial fission* (*Fis1*), durante a diferenciação de osteoclastos (figura 3).



**Figura 3 – Expressão gênica de *Fis1* durante a diferenciação de osteoclastos:** expressão gênica relativa via RT-PCR 0, 24, 48 e 72 horas após o estímulo de pré-osteoclastos com RANKL.

Pode-se observar pela figura 3 que não houve diferença na expressão gênica de *Fis1* nos diferentes tempos após o estímulo com RANKL, ou seja, durante a diferenciação de osteoclastos.

Considerando a participação da mitofusina 2 no processo de fusão mitocondrial, avaliou-se a expressão proteica desta molécula nos diferentes estágios de diferenciação após estímulo com RANKL (figura 4).



**Figura 4 – Expressão proteica de Mfn2 durante a diferenciação de osteoclastos:** *Western Blotting* do período de diferenciação de osteoclastos após o estímulo de BMDM's com RANKL por 72 horas.

É possível observar pela figura 4 uma baixa expressão proteica de mitofusina 2 nos tempos de 24 e 48 horas após o estímulo com RANKL e um visual aumento na expressão no tempo de 72 horas. Esses dados confirmam o aumento da proteína de mitofusina 2 durante a diferenciação de osteoclastos.

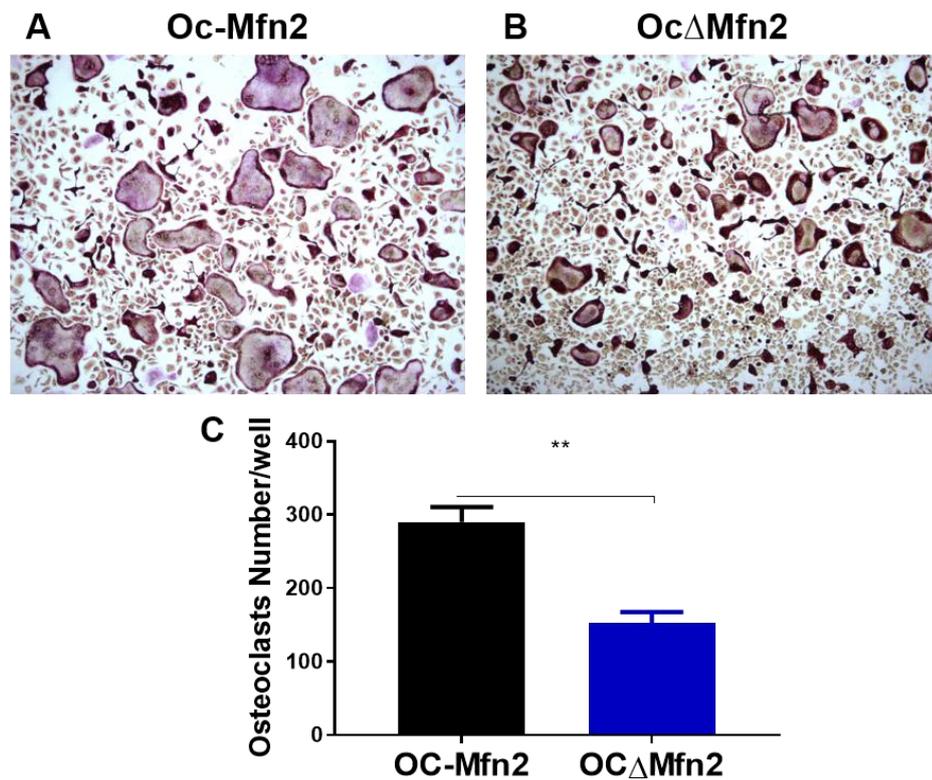
Os dados apresentados pelas figuras 2 e 4 evidenciaram um aumento na expressão gênica e proteica de mitofusina 2 durante o período de diferenciação de osteoclastos, após o estímulo com RANKL. Então prosseguiu-se para avaliar se a mitofusina 2 poderia interferir no processo de diferenciação dos osteoclastos.

#### **4.2 A deleção de mitofusina 2 leva a diminuição da osteoclastogênese**

Dispondo dos dados apresentados até aqui, realizou-se um modelo de deleção seletiva de mitofusina 2 especificamente em precursores de osteoclastos, neste caso macrófagos derivados de medula óssea (BMDM) para avaliar sua função no processo de diferenciação de osteoclastos.

Utilizou-se camundongos controle  $LysM^{cre/0}$  (Oc-Mfn2) e camundongos com deleção seletiva da proteína de mitofusina 2 em monócitos/macrófagos  $LysM^{cre/0}Mfn2^{f/f}$  (Oc $\Delta$ Mfn2).

Foi realizada a cultura primária de BMDM e diferenciados com o estímulo de RANKL por 72 horas em osteoclastos. Osteoclastos maduros (com mais de 3 núcleos) foram quantificados e os dados estão apresentados na figura 5.



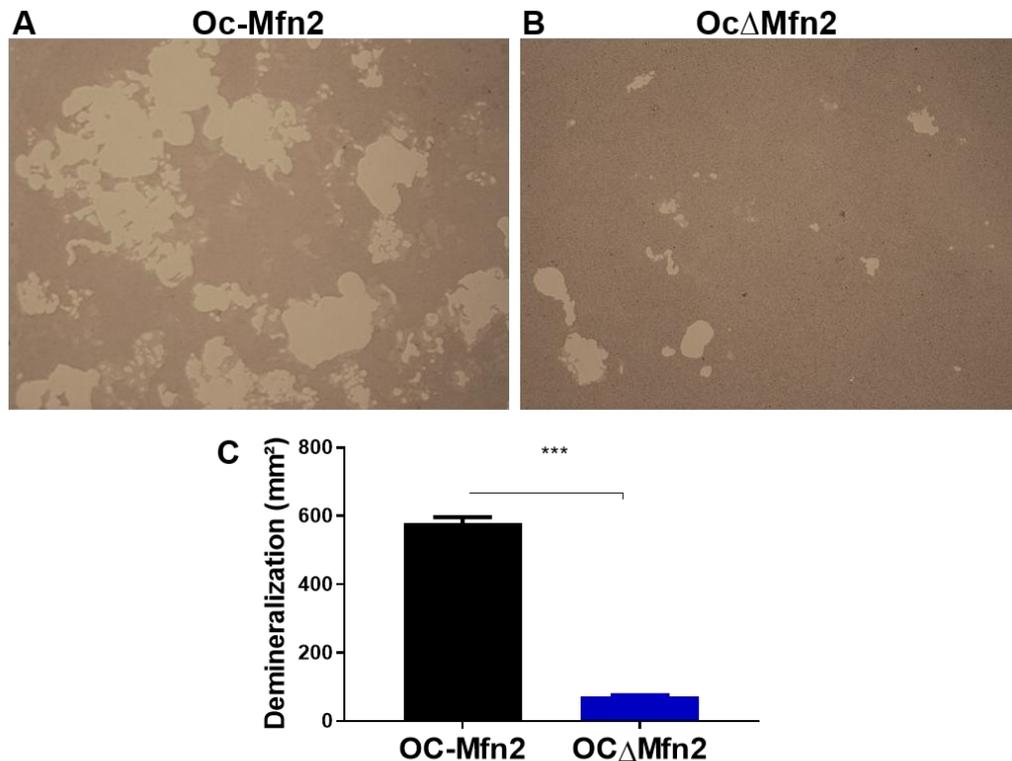
**Figura 5 – Diferenciação de osteoclastos por TRAP<sup>+</sup> in vitro:** A: Imagem representativa de osteoclastos LysM<sup>cre</sup>0 e B: Imagem representativa de osteoclastos LysM<sup>cre</sup>Mfn2<sup>fl/fl</sup> diferenciados in vitro por 72 horas; C: contagem de osteoclastos. Test  $t^{**}$   $p < 0,01$ .

A figura 5A apresenta uma imagem ilustrativa da cultura de osteoclastos que possuem mitofusina 2, após 72 horas do estímulo com RANKL e corados com TRAP. A figura 5B apresenta uma imagem ilustrativa da cultura de osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2. Os osteoclastos são apresentados como estruturas grandes em formato de balão e coradas em vermelho. As imagens da figura 5A e 5B mostram nitidamente que houve uma diminuição do número de osteoclastos diferenciados no grupo que houve a deleção seletiva de mitofusina 2.

A figura 5C apresenta a quantificação do número de osteoclastos diferenciados comparados entre o grupo de osteoclastos com ou sem mitofusina 2. Foi possível observar uma diminuição no número de osteoclastos totais no grupo sem mitofusina 2 quando comparado ao controle.

Este dado indica a participação da mitofusina 2 em algum aspecto da diferenciação de osteoclastos. Assim, o próximo passo foi avaliar o impacto da deleção da mitofusina 2 na função dos osteoclastos. Para isso, foi realizada uma cultura primária de osteoclastos em placas de *osteoclast assay* (conteúdo mineral ósseo) e

a capacidade dos osteoclastos de desmineralizar o conteúdo mineral dos ossos foi avaliada.

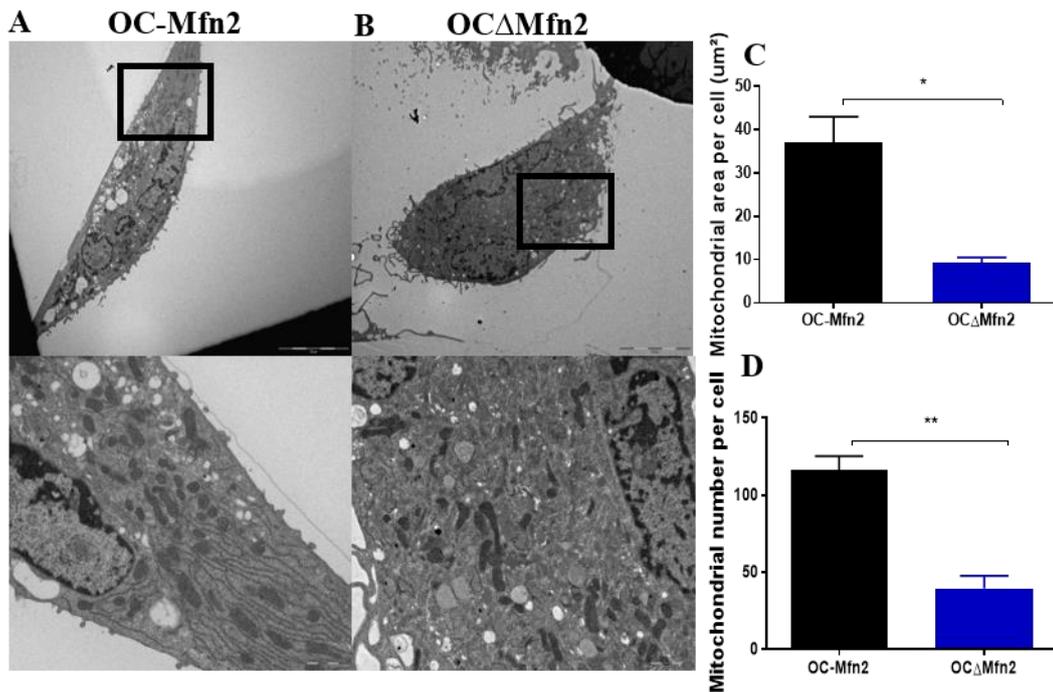


**Figura 6 – Área de desmineralização de osteoclastos sobre o conteúdo mineral ósseo in vitro:** A: Imagem representativa de osteoclastos  $LysM^{cre}0$ ; B: Imagem representativa de  $LysM^{cre}Mfn2^{ff}$  diferenciados in vitro por 72 horas; C: Área de desmineralização. Teste  $t^{***} p < 0,001$ .

A figura 6A apresenta uma imagem representativa da área de desmineralização realizada por osteoclastos controle sobre uma placa de osteoassay, a área mais escura representa a parte mineral óssea e a parte mais clara representa a área desmineralizada pelos osteoclastos. A figura 6B apresenta uma imagem representativa de área de desmineralização dos osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2 e a figura 6C apresenta a quantificação da área de desmineralização dos dois grupos (com ou sem mitofusina 2).

Foi possível observar pela figura 6 uma diminuição na área de desmineralização da placa de osteoassay no grupo com deleção seletiva de mitofusina 2 quando comparado ao grupo controle. Este dado indica uma redução na função dos osteoclastos quando realizada a deleção de mitofusina 2.

Diante da diminuição do número e função de osteoclastos in vitro, o próximo passo foi avaliar o porquê desta redução, como a mitofusina 2 é diretamente relacionada a fusão mitocondrial, analisou-se o número e área de mitocôndrias em osteoclastos in vitro utilizando a microscopia eletrônica de transmissão, dados apresentados na figura 7.

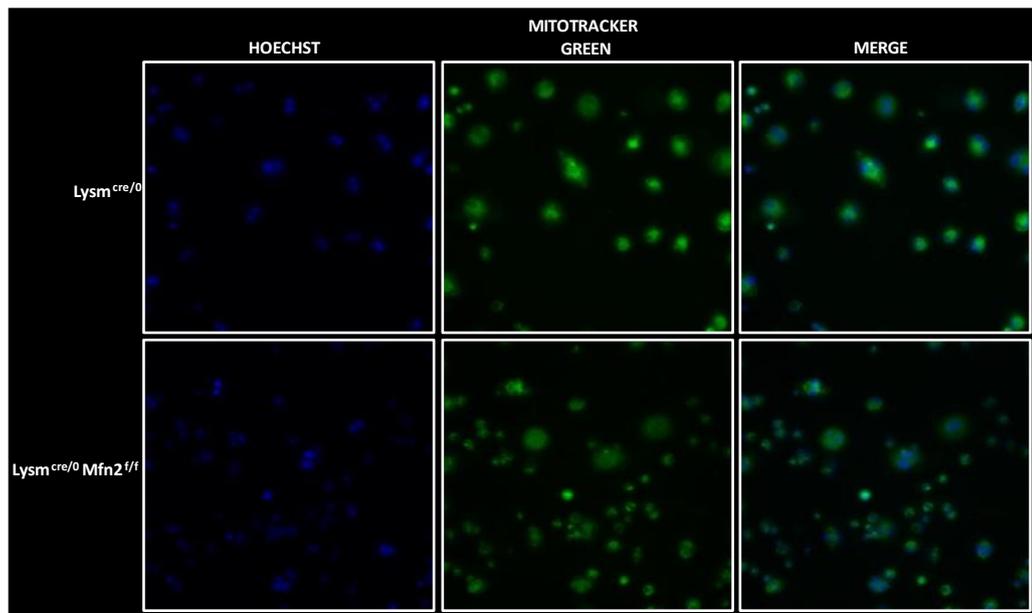


**Figura 7 – Características morfológicas mitocondriais em osteoclastos:** A: Imagem representativa de mitocôndrias de osteoclastos  $LysM^{cre}0$  B: imagem representativa de mitocôndrias de osteoclastos  $LysM^{cre}Mfn2^{if}$  diferenciados in vitro por 72 horas; C: Área mitocondrial; D: Número de mitocôndrias. Teste  $t^*p < 0,05$ , Teste  $t^{**}p < 0,01$ .

As figuras 7A e 7B trazem imagens representativas de osteoclastos diferenciados in vitro com o estímulo de RANKL por 72 horas com ou sem mitofusina 2, respectivamente, e no painel inferior um maior aumento da região demarcada no painel superior dando destaque as mitocôndrias destas células, onde é possível observar uma aparente diminuição no tamanho das mitocôndrias em osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2.

A figura 7C demonstra a área mitocondrial mensurada em cada célula e a figura 7D o número de mitocôndrias por célula. Observa-se que houve uma diminuição no número e na área das mitocôndrias de osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2 quando comparados ao controle.

A diminuição no número e área de mitocôndrias não está necessariamente relacionada a qualidade e capacidade destas organelas de produzirem energia, então para avaliar a qualidade funcional das mitocôndrias avaliamos o potencial de membrana mitocondrial dos osteoclastos com ou sem mitofusina 2, dados apresentados na figura 8.



**Figura 8 – Potencial de membrana mitocondrial em osteoclastos:** Imagem representativa de potencial de membrana de mitocôndrias de osteoclastos  $LysM^{cre/0}$  e  $LysM^{cre/0}Mfn2^{1/f}$  diferenciados in vitro por 72 horas e corados com Mitotracker Green FM (MITO).

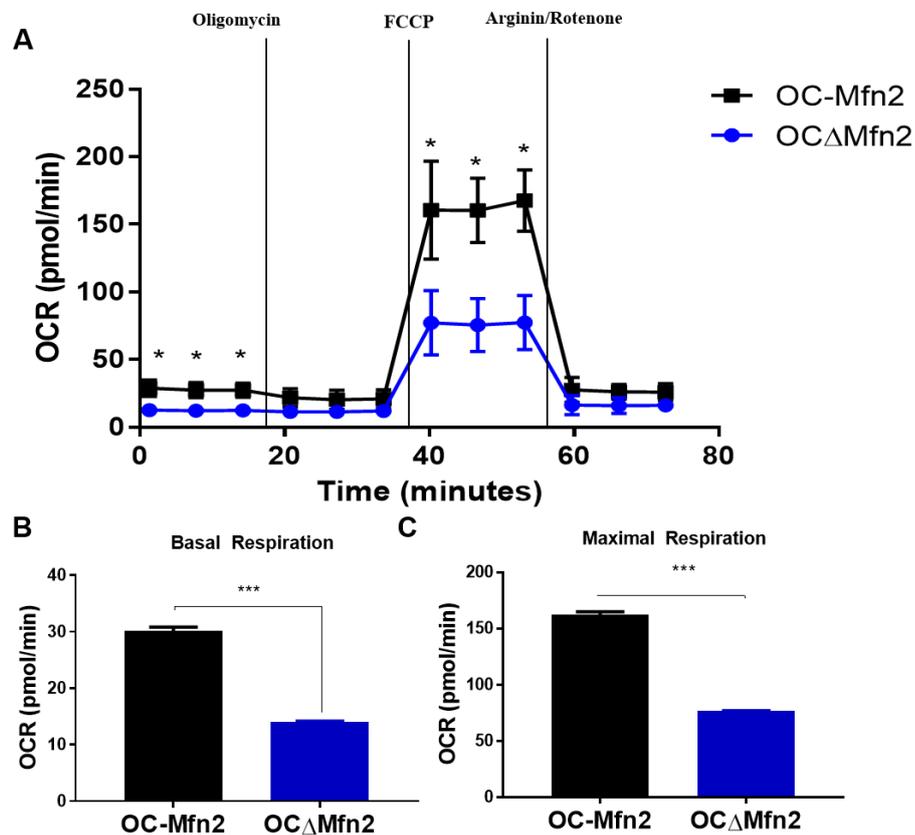
No painel superior da figura 8 estão representados os osteoclastos controle com Hoechst para identificar os núcleos e Mitotracker Green para observar o potencial de membrana mitocondrial. No painel inferior estão as imagens representativas dos mesmos marcadores para osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2. É possível observar visualmente uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial em osteoclastos sem mitofusina 2 quando comparados aos osteoclastos controle.

Dessa forma, os dados apresentados nas figuras 4 e 5 mostram que a deleção seletiva de mitofusina 2 diminui, respectivamente, a diferenciação e a função de osteoclastos. Quando aprofundada a relação da mitocôndria com esta diminuição da função dos osteoclastos, é possível observar pela figura 7 uma redução na área mitocondrial. A figura 8 mostra uma redução na função mitocondrial (potencial de membrana), estes dados somados indicam que a mitofusina 2 modula a diferenciação

de osteoclastos e que este efeito estaria relacionado a mitocôndria, assim, decidiu-se por investigar o impacto da deleção da mitofusina 2 na produção energética dos osteoclastos.

### 4.3 A deleção de mitofusina 2 impacta a produção energética de osteoclastos

Dispondo dos dados apresentados até aqui elaborou-se a hipótese de que a deleção seletiva de mitofusina 2 poderia de alguma forma impactar na produção energética de osteoclastos. Assim, para testar esta hipótese foi realizado um *seahorse* para avaliar se haveria alteração no consumo de oxigênio, que diz respeito a produção energética via fosforilação oxidativa, em osteoclastos após a deleção seletiva de mitofusina 2, os dados estão apresentados na figura 9.



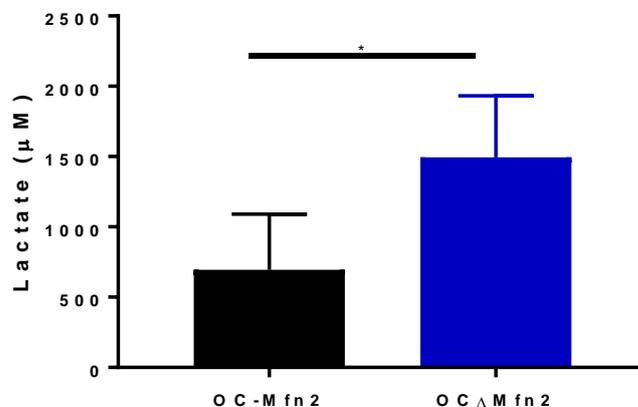
**Figura 9 – Taxa de consumo de oxigênio (OCR):** A: Gráfico do consumo de oxigênio de osteoclastos  $LysM^{cre0}$  e  $LysM^{cre}Mfn2^{ff}$  diferenciados in vitro por 72 horas; B: Respiração basal; C: Respiração máxima. Teste  $t^{***}$   $p < 0,001$ .

A figura 9 apresenta os dados de um teste de *seahorse*. A figura 9A apresenta um gráfico de taxa de consumo de oxigênio que pode ser associada com a produção energética via fosforilação oxidativa. As primeiras 3 medidas antes da injeção de qualquer droga representam a respiração basal das células, que pode ser visto

também no gráfico da figura 9B, onde houve uma redução da respiração basal dos osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2 quando comparados aos osteoclastos controle.

Após o tratamento das células com FCCP, ocorre o desacoplamento da mitocôndria liberando todo o potencial de produção energética desta célula, o que podemos chamar de respiração máxima. A figura 9C traz a respiração máxima das células com ou sem mitofusina 2, e pode-se observar uma diminuição na capacidade das células com deleção seletiva de mitofusina 2 de alcançar seu potencial máximo respiratório. Sendo assim, podemos afirmar que a deleção seletiva de mitofusina 2 reduziu a capacidade respiratória dos osteoclastos.

Sabendo que existem outras formas de produção energética como a glicólise, buscou-se analisar se haveria alteração na concentração do produto desta reação que é o lactato, que indicaria um aumento na produção energética por via glicolítica, dados apresentados na figura 10.

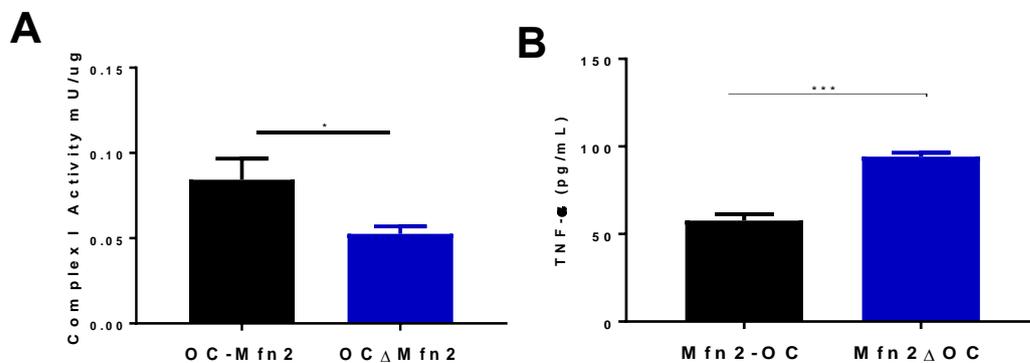


**Figura 10 – Produção de Lactato por osteoclastos:** Gráfico da produção de lactato por osteoclastos  $LysM^{cre0}$  e  $LysM^{cre}Mfn2^{if}$  diferenciados in vitro por 72 horas; Teste  $t^* p < 0,05$ .

A figura 10 mostra a concentração de lactato em culturas de osteoclastos in vitro, onde observa-se um aumento na produção do produto da glicólise nos osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2.

Osteoclastos com deleção de mitofusina 2 aparentam ter uma capacidade reduzida de produção energética via fosforilação oxidativa, o que pode levar a um aumento na produção energética por via glicolítica.

Uma questão ainda não respondida seria especificamente, qual passo da produção energética via OxPhos estaria sendo prejudicada pela deleção de mitofusina 2 durante a diferenciação de osteoclastos. Estudos conduzidos sobre produção energética em macrófagos/osteoclastos demonstrou que a redução da atividade do complexo I mitocondrial em macrófagos os tornaria mais inflamatórios e com a capacidade de diferenciação em osteoclastos diminuída, portanto, testamos a atividade do complexo I mitocondrial e a produção de citocinas inflamatórias, dados apresentados na figura 11.



**Figura 11 – Atividade do Complexo I mitocondrial** A: Gráfico da atividade do complexo I mitocondrial de osteoclastos  $LysM^{cre}0$  e  $LysM^{cre}Mfn2^{ff}$  diferenciados in vitro por 72 horas; B: concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante. Teste  $\chi^2$   $p < 0,05$ , Teste  $t$   $p < 0,01$ .

Na figura 11A estão os dados relacionados a atividade do complexo I mitocondrial, onde é possível observar uma redução na atividade do complexo I mitocondrial em osteoclastos com deleção seletiva de mitofusina 2, quando comparados ao grupo controle.

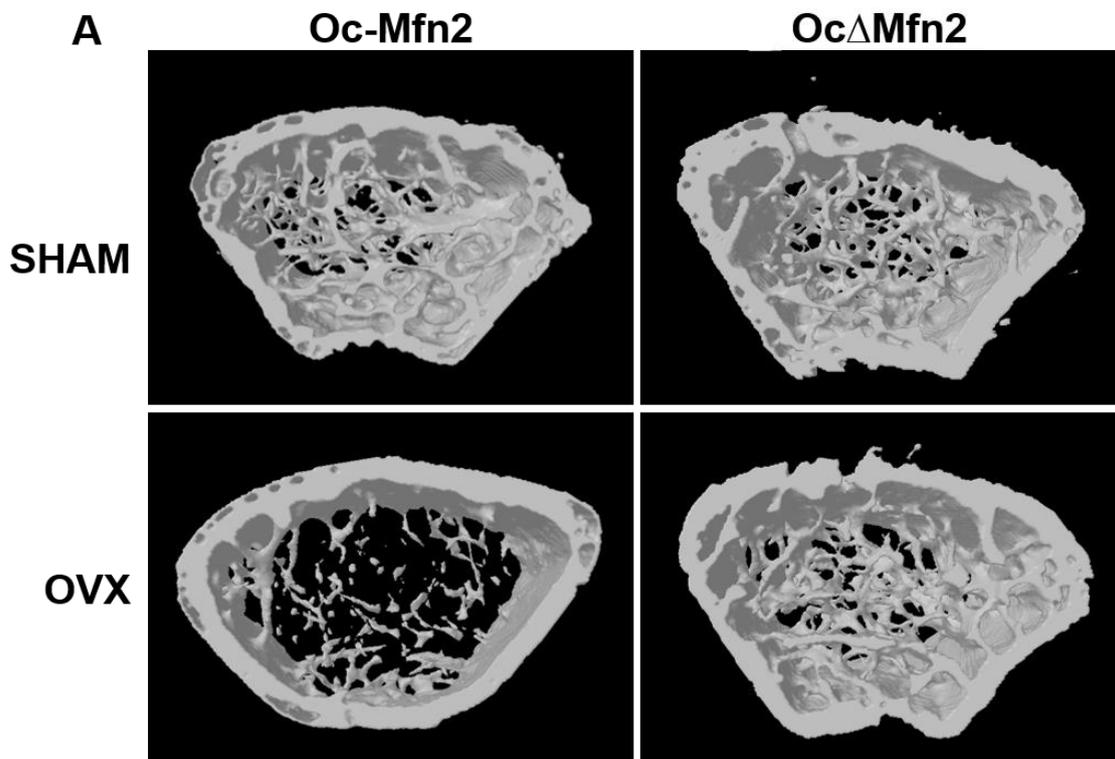
Os dados apresentados na figura 11B mostram a produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina pró-inflamatória, em cultura de osteoclastos, onde foi possível observar o aumento na produção de TNF- $\alpha$  em osteoclastos sem mitofusina 2 quando comparados ao controle.

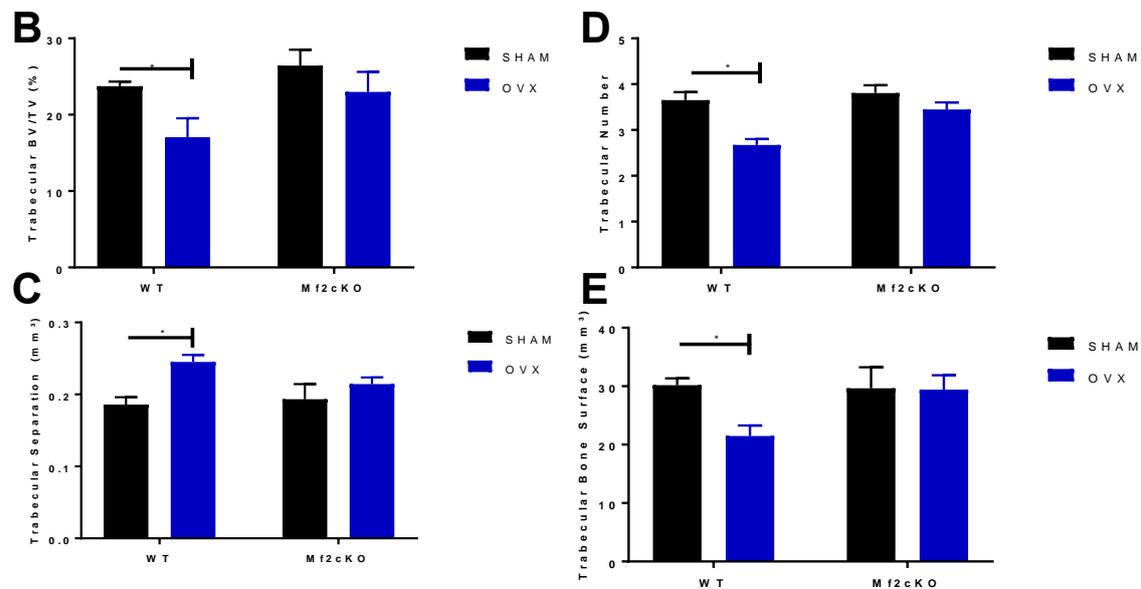
Estes dados somados a literatura vigente demonstram que a deleção seletiva de mitofusina 2 levou a uma diminuição na capacidade de produção energética via fosforilação oxidativa por parte dos osteoclastos, bem como, o aumento da produção de lactato, indicando uma troca compensatória na forma de produção energética. Além disso, verificou-se uma diminuição na atividade do complexo I mitocondrial com

o aumento de produção de citocinas pró-inflamatórias após a deleção de mitofusina 2.

#### 4.4 A deleção de mitofusina 2 reduz a perda óssea promovida pela ovariectomia

Os dados apresentados até aqui indicam que a deleção de mitofusina 2 em osteoclastos leva a uma diminuição do número e atividade dessas células, e que o mecanismo está ligado a produção energética com uma diminuição no número e função mitocondrial em osteoclastos sem mitofusina 2. Porém, todos os dados apresentados foram in vitro. Para avançar na compreensão da função da mitofusina 2 em osteoclastos avaliamos os parâmetros ósseos trabeculares no fêmur de camundongos deficientes de Mfn2. Além disso, foi avaliado o impacto da deleção da mitofusina 2 in vivo, nos animais submetidos a um modelo de perda óssea por ovariectomia (figura 12).





**Figura 12 – Parâmetros trabeculares ósseos em camundongos submetidos ao modelo osteolítico de ovariectomia** A: Imagem ilustrativa abaixo da placa de crescimento no fêmur de camundongos *Ctsk<sup>cre0</sup>* e *Ctsk<sup>cre0</sup>Mfn2<sup>if</sup>* submetidos ao modelo de ovariectomia; Parâmetros ósseos trabeculares - B: Trabecular BV/TV; C: Trabecular number; D: Trabecular separation; E: Trabecular bone surface. Teste  $t^*p < 0,05$ .

A imagem 12A traz a imagem ilustrativa da microtomografia computadorizada do fêmur de camundongos com ou sem deleção seletiva de mitofusina 2, submetidos ou não ao modelo de ovariectomia. É possível observar, no quadrante inferior esquerdo, que camundongos sem deleção seletiva de mitofusina 2 e submetidos ao modelo de ovariectomia tem uma perda óssea trabecular acentuada, quando comparados ao camundongos submetidos ao modelo de ovariectomia com deleção seletiva de mitofusina 2 nos osteoclastos.

Estes dados também são apresentados pelos gráficos. Na figura 12B temos um parâmetro ósseo trabecular chamado BV/TV que mede a razão entre o volume ósseo e o volume tecidual trabecular, onde pode-se observar, uma diminuição nesta razão nos camundongos ovariectomizados (OVX) quando comparados ao SHAM, dentro do grupo sem deleção seletiva de mitofusina 2. No grupo com deleção seletiva de mitofusina 2 não houve diferença entre o grupo SHAM e o OVX.

O mesmo vale para os outros parâmetros trabeculares, no grupo sem deleção seletiva de mitofusina 2, camundongos OVX tinha uma diminuição do número de trabéculas (figura 12D) e da superfície óssea trabecular (figura 12E) e um aumento na separação entre as trabéculas (figura 12C). Já no grupo onde havia a deleção seletiva de mitofusina 2 não houve perda óssea em nenhum dos parâmetros analisados.

Estes dados sugerem que a deleção seletiva de mitofusina 2 em osteoclastos protege contra a perda óssea induzida pela ovariectomia, sendo um possível alvo de investigação terapêutica para o tratamento de doenças osteolíticas.

## 5. DISCUSSÃO

Os osteoclastos passam por várias mudanças morfológicas para a realização da função de reabsorção óssea, isso inclui desde o comprometimento de precursores da linhagem mieloide através do estímulo com RANKL e M-CSF, a formação e adesão de pré-osteoclastos a superfície óssea, a fusão celular e maturação osteoclástica, finalizando a formação de osteoclastos maduros com a zona de selamento e a produção de enzimas para a degradação da matriz óssea (Catepsina K, MMP-9, TRAP) (TEITELBAUM & ROSS, 2003). Durante a realização da reabsorção óssea alguns processos celulares são importantes, como: acidificação extracelular (liberação H<sup>+</sup>) (BARON et al., 1985), tráfego lisossomal (LACOMBE, KARSENTY & FERRON, 2013) e a exocitose das proteases (BRAGE et al., 2005). Todas estas adaptações e funções demandam dos osteoclastos um alto gasto energético sendo que a principal forma de passagem de íons e de tráfego lisossomal para a lacuna reabsortiva são canais V-ATPase que já provaram até regular a diferenciação e função de osteoclastos (YANG et al., 2012).

Por este motivo, é possível observar um aumento da massa e função mitocondrial durante a osteoclastogênese. Neste contexto nossos resultados corroboram com os dados da literatura sobre o aumento na área mitocondrial em osteoclastos quando comparados aos progenitores mononucleares (MIYAZAKI et al., 2012, INDO et al., 2013; LEMMA et al., 2016; CH'UAN, 1931).

A mitocôndria é a “usina energética” das células eucariontes, sua principal função consiste na produção de adenosina-trifosfato (ATP) que é a fonte energética da célula. De forma breve, a produção de ATP ocorre por um processo chamado fosforilação oxidativa, que envolve a transferência de elétrons através da cadeia de transporte de elétrons localizada na membrana interna das mitocôndrias. Essa transferência de elétrons gera um gradiente eletroquímico que é usado para impulsionar a síntese de ATP a partir de ADP (adenosina difosfato) e fosfato inorgânico, sendo então uma organela de extrema importância para o funcionamento de todas as células eucariontes (BERTRAM et al., 2006).

Sabe-se que as mitocôndrias podem alterar seu tamanho, morfologia e localização intracelular em resposta a certos estímulos celulares (EROS, Ca<sup>+2</sup>, etc.) (LIESA et al., 2009). Este processo, chamado de dinâmica mitocondrial cumpre um

papel importante para a diferenciação de diversas células (FORNI et al., 2016). Neste trabalho, utilizando a cultura de células primárias da medula óssea observou-se o aumento da expressão dos genes associados a fusão mitocondrial *Opa1*, *Mfn1* e *Mfn2*. As mitofusinas estão presentes na membrana externa mitocondrial e permitem a fusão das membranas externas entre diferentes mitocôndrias, em sequência ocorre a fusão das membranas internas pela ação da *Opa1*. Este processo é importante para a célula pois, permite a manutenção da integridade mitocondrial através da troca de conteúdo proteico e lipídico entre mitocôndrias além do próprio DNA mitocondrial, e aumenta a capacidade de produção energética via fosforilação oxidativa das mitocôndrias (HALES, 2010). As 3 proteínas, cumprem funções importantes para a fusão mitocondrial, mas apenas a deleção da mitofusina 2 é capaz de cessar a fusão (CHEN et al., 2003; CHEN, MCCAFFERY & CHAN, 2007), sendo assim, focamos nesta proteína em específico e foi observado em nossos dados o aumento na expressão proteica de mitofusina 2 durante a osteoclastogênese.

Os trabalhos de Ballard et al. (2020) e Jung et al. (2019) demonstraram um papel importante da mitofusina 2 no controle de cálcio em osteoclastos in vitro, diante desta informação focamos em entender o efeito da deleção da mitofusina 2 para a diferenciação e função de osteoclastos. Nossos dados mostram que a deleção de mitofusina reduziu a diferenciação de osteoclastos in vitro.

A homeostase do tecido esquelético depende de uma fina regulação e equilíbrio entre o número de células e a função de osteoclastos e osteoblastos (KIM et al., 2020). Os osteoblastos são células responsáveis pela deposição óssea, funcionando como um balanço aos osteoclastos, além disso, os osteoblastos participam da regulação da diferenciação e função de osteoclastos (CHEN et al., 2018), sendo assim, quando o equilíbrio entre osteoblastos e osteoclastos é quebrado em favor dos osteoclastos, temos uma maior perda óssea que é por sua vez observado em doenças osteolíticas como a osteoporose (GUIDO et al., 2009) e a osteoartrite (ZHU et al., 2019), por exemplo. Em pessoas com doenças osteolíticas a redução do número e da função de osteoclastos é algo positivo e neste trabalho foi possível observar também a redução da área de reabsorção óssea, portanto, uma redução da função de osteoclastos.

A mitofusina 2 é uma GTPase localizada na membrana externa mitocondrial com um domínio transmembranar N-terminal e uma região citosólica C-terminal, que interage com outras proteínas localizadas na membrana da mitocôndria (FILADI,

PENDIN & PIZZO, 2018). Sua função depende do contato proteína-proteína, bem como, de modificações pós traducionais, como a fosforilação que a estimula e a ubiquitinação que inibe a sua função. Além do papel da mitofusina 2 na fusão mitocondrial (SANTEL & FULLER, 2001), ela também possui a função de manutenção da qualidade e morfologia mitocondrial (NG, WAI AND SIMONSEN, 2021), de *tethering* entre mitocôndria e retículo endoplasmático para a troca de íons, lipídios e proteínas, e também como regulação para a produção energética mitocondrial (DORN, 2020). Para testar a razão pela qual a deleção de mitofusina 2 leva a redução do número e função dos osteoclastos, avaliamos a qualidade das mitocôndrias após a deleção de mitofusina 2. Primeiramente avaliamos a morfologia utilizando microscopia eletrônica de transmissão e observamos uma redução no número e área das mitocôndrias no grupo com deleção seletiva de mitofusina 2 nos osteoclastos comparados ao grupo controle. Reafirmando a importância das mitocôndrias e da produção energética para a diferenciação e função de osteoclastos, uma redução na área mitocondrial poderia estar relacionada a uma redução no número de osteoclastos.

A morfologia considerada “comum” das mitocôndrias é no formato alongado ou fusiforme, porém, devido a dinâmica mitocondrial podemos encontrar desde mitocôndrias esféricas até ramificadas (MCCARRON et al., 2013). O estado fissionado das mitocôndrias (geralmente esférica, pequena e isolada) indica um estado de estresse celular e mitocondrial (FRANK et al., 2012). A mitocôndria possui dois tipos de membrana, a externa (OMM) que possui pequenos poros para a passagem de substância do citosol para mitocôndria e vice-versa e a interna que forma invaginações conhecidas como cristas mitocondriais, onde ocorrerá de fato a produção energética por meio da cadeia transportadora de elétrons (ETC), para que ocorra esta produção energética é necessário um potencial de membrana mitocondrial (GIANCOMELLO et al., 2020).

Por este motivo, uma forma de avaliar a qualidade das mitocôndrias é pelo potencial de membrana mitocondrial. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) é a diferença de potencial elétrico transmembranar que existe através da membrana interna mitocondrial. Em condições normais, a carga elétrica dentro da matriz mitocondrial é negativa em relação ao espaço intermembranar. Esse potencial é gerado pela atividade da cadeia transportadora de elétrons (ETC) na membrana

interna mitocondrial. O  $\Delta\psi_m$  desempenha um papel crítico na produção de ATP pela mitocôndria. O transporte de elétrons ao longo da ETC gera um gradiente de prótons ( $H^+$ ) na membrana interna mitocondrial, criando uma diferença de pH e um potencial elétrico através da membrana. Esse gradiente é utilizado pela ATP sintase para produzir ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (ZOROVA et al., 2018). O Mitotracker Green FM se liga a membrana mitocondrial interna pelo potencial de membrana mitocondrial, demonstrando a funcionalidade desta mitocôndria e da ETC pela fluorescência em coloração verde (490nm a 516nm). Neste trabalho observou-se uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial em osteoclastos *knockout* para mitofusina 2 quando comparados aos osteoclastos controle. Esta redução no potencial de membrana demonstra uma diminuição na qualidade das mitocôndrias de osteoclastos *knockout* quando comparados ao grupo controle. Sabendo da redução na qualidade das mitocôndrias passamos a aprofundar o estudo da função destas mitocôndrias pela produção energética via fosforilação oxidativa.

A fosforilação oxidativa é o processo pelo qual a célula produz energia na forma de ATP, utilizando a energia liberada pela oxidação de moléculas de nutrientes, como a glicose e os ácidos graxos, através da ETC na membrana mitocondrial interna. A ETC é composta por quatro complexos proteicos e duas proteínas móveis que funcionam em conjunto para transferir elétrons de moléculas de NADH e  $FADH_2$  através da membrana mitocondrial interna. À medida que os elétrons são transferidos ao longo da ETC, prótons são bombeados da matriz mitocondrial para o espaço intermembranar, criando um gradiente eletroquímico de prótons. Esse gradiente é usado pela ATP sintase para produzir ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico, por meio do processo de fosforilação oxidativa. O oxigênio é necessário no final da cadeia transportadora de elétrons, onde ele recebe elétrons e prótons para formar água. Essa reação é conhecida como redução do oxigênio, e é a última etapa da cadeia transportadora de elétrons. A redução do oxigênio é essencial para manter a função da ETC, uma vez que permite que o transporte de elétrons continue mantendo o gradiente eletroquímico de prótons necessário para a produção de ATP. Por este motivo, a taxa de consumo de oxigênio (OCR) é um bom parâmetro para a avaliação da função mitocondrial de produção energética (COOPER, 2000) . Em nosso modelo, observamos que quando retiramos a mitofusina 2 dos osteoclastos, temos uma redução na função mitocondrial, tanto na respiração basal, ou seja, sem nenhum

estímulo para produção energética, quanto na respiração máxima, que é a capacidade máxima das mitocôndrias de produzir energia. Sabendo da função da ETC para a produção energética, aprofundamos na função do complexo mitocondrial sobre a produção energética via fosforilação oxidativa.

O complexo I mitocondrial, ou NADH desidrogenase, é o primeiro complexo da ETC na mitocôndria. Ele desempenha um papel crucial na produção de energia na célula, ao oxidar o NADH gerado pela glicólise e pelo ciclo de Krebs, transferindo elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. É a porta de entrada da ETC, sendo assim, uma diminuição na função do complexo I compromete toda a produção energética (SHARMA, LU & BAI, 2009). Em nosso modelo, foi observado uma redução na capacidade do complexo I mitocondrial de oxidar o NADH, sendo assim um motivo para a redução da produção energética via fosforilação oxidativa.

Já é descrito na literatura que a diminuição na função do complexo I mitocondrial em macrófagos tendem a polariza-los em perfil mais inflamatórios e ter uma capacidade diminuída para a diferenciação em osteoclastos (JIN et al., 2014). Por isso, observamos a produção de uma citocina inflamatória, a TNF- $\alpha$ , no modelo de deleção condicional para mitofusina 2 em pré-osteoclastos e observamos um aumento na produção desta citocina no grupo deleção condicional comparado ao controle.

Em condições aeróbicas, o processo de glicólise transforma a glicose em piruvato por meio de uma série de reações químicas, este piruvato entra na mitocôndria onde será convertido em Acetil-CoA iniciando o que chamamos didaticamente de ciclo de Krebs ou ciclo do ácido cítrico. Contudo, se a mitocôndria não tiver a capacidade de processar a quantidade de piruvato que está sendo produzida pela glicólise, seja por falta de oxigênio ou alguma outra disfuncionalidade, este piruvato é convertido pela lactato desidrogenase (LDH) em lactato. Assim sendo o lactato pode ser considerado outro marcador de redução de atividade mitocondrial (RABINOWITS & ENERBACK, 2020). Em nosso modelo, a deleção condicional de mitofusina 2 em osteoclastos levou a um aumento na produção de lactato pelas células quando comparados ao grupo controle.

A osteoporose primária é uma condição patológica que atinge os ossos tornando-os fracos e porosos, geralmente atinge a população idosa, mas também o

principal grupo atingido são mulheres pós-menopausa. O estrógeno é um fator regulador da atividade de osteoclastos, ou seja, níveis reduzidos de estrógeno leva a maior diferenciação e função de osteoclastos induzindo a formação de poros nos ossos e conseqüentemente fragilidade óssea. Outros fatores como o tabagismo, consumo excessivo de álcool, falta de atividade física, dieta pobre em cálcio e vitamina, hipertireoidismo e doenças inflamatórias do intestino estão ligados a um pior prognóstico para essa doença. O diagnóstico geralmente é feito por exames de qualidade óssea, como a densitometria óssea e o tratamento é feito com base em bifosfonados e reposição hormonal (no caso de mulheres pós-menopausa), sendo esta doença o principal fator relacionado a perda de movimentação por idosos e não tem cura (FOGER-SAMWALD et al., 2020). Sendo assim, muitos estudos vêm tentando compreender e modular o metabolismo de osteoclastos como uma forma de reduzir a reabsorção óssea e permitir uma recuperação do quadro de osteoporose por parte do paciente (Da, TAO & ZHU, 2021). Em nosso trabalho, utilizamos o modelo de ovariectomia que mimetiza a osteoporose pós menopausa em humanos, pois reduz os níveis estrogênicos em camundongos e após 4 semanas já é possível observar a perda óssea por microtomografia computadorizada (MicroCT) do fêmur e análise dos parâmetros ósseos trabeculares, como foi observado em nosso modelo de perda óssea em que houve a redução do número de trabéculas (Tb.N), da relação entre volume ósseo e volume tecidual (BV/TV) e da superfície óssea trabecular (BS) além de um aumento na separação trabecular (Tb.Sp).

Contudo, quando retiramos a mitofusina 2 dos osteoclastos e submetemos os camundongos ao modelo de ovariectomia observamos que a perda óssea trabecular cessa, não tendo alteração entre os grupos SHAM e OVX como no grupo controle. Quando colocamos estes dados juntos podemos inferir que a mitofusina 2 é uma molécula que estimula ou regula positivamente a diferenciação de osteoclastos, já que sua deleção leva a diminuição destas células. a diminuição da diferenciação é acompanhada por uma perda da qualidade mitocondrial e diminuição na produção energética por fosforilação oxidativa. Além disso, a deleção de mitofusina 2 protegeu os camundongos da perda óssea trabecular pós ovariectomia.

Os osteoclastos tem papel primordial tanto para a manutenção da homeostase óssea quanto para o desenvolvimento de doenças osteolíticas, este trabalho avança no entendimento do funcionamento dos osteoclastos focando principalmente na

dinâmica mitocondrial e na produção energética. A mitofusina 2 tem papel importante na diferenciação de osteoclastos ao estimular a produção energética por fosforilação oxidativa, a deleção desta molécula levou a redução da diferenciação de osteoclastos e protegeu contra a perda óssea induzida por ovariectomia, sendo assim, um potencial alvo terapêutico para estudos de doenças como a osteoporose e osteoartrite.

## 6. CONCLUSÃO

Conclui-se que a fusão mitocondrial e a mitofusina 2 desempenham um papel importante para a diferenciação de osteoclastos, estimulando a produção energética via fosforilação oxidativa. Sua deleção, por sua vez, protegeu contra a perda óssea induzida por ovariectomia, sendo então um possível alvo terapêutico a ser estudado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Asagiri, M.; Takayanagi, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**, v. 40, n. 2, p. 251-264, 2007.

Bach, D. et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: a novel regulatory mechanism altered in obesity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 19, p. 17190-17197, 2003.

Ballard, A. et al. The tethering function of mitofusin2 controls osteoclast differentiation by modulating the Ca<sup>2+</sup>-NFATc1 axis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 19, p. 6629-6640, 2020.

Baloul, S. S., Gerstenfeld, L. C., Morgan, E. F., Carvalho, R. S., Van Dyke, T. E., & Kantarci, A. Mechanism of action and morphologic changes in the alveolar bone in response to selective alveolar decortication-facilitated tooth movement. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 139, n. 4, p. S83-S101, 2011.

Baron, R. et al. Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD lysosomal membrane protein at the osteoclast ruffled border. **The Journal of cell biology**, v. 101, n. 6, p. 2210-2222, 1985.

Betram, R. et al. A simplified model for mitochondrial ATP production. **Journal of theoretical biology**, v. 243, n. 4, p. 575-586, 2006.

Bolamperti, S.; Villa, I.; Rubinacci, A. Bone remodeling: An operational process ensuring survival and bone mechanical competence. **Bone Research**, v. 10, n. 1, p. 48, 2022.

Boyle, W. J.; Simonet, W. S.; Lacey, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.

Brage, M. et al. Different cysteine proteinases involved in bone resorption and osteoclast formation. **Calcified tissue international**, v. 76, p. 439-447, 2005.

Capulli, M.; Paone, R.; Rucci, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 561, p. 3-12, 2014.

- Chen, H.; Detmer, S. A.; Ewald, A. J.; Griffin, E. E.; Fraser, S. E.; Chan, D. C. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. **The Journal of cell biology**, v. 160, n. 2, p. 189-200, 2003.
- Chen, H.; Mccaffery, J. M.; Chan, D. C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. **Cell**, v. 130, n. 3, p. 548-562, 2007.
- Chen, X.; Wang, Z.; Duan, N.; Zhu, G.; Schwarz, E. M.; Xie, C. Osteoblast–osteoclast interactions. **Connective tissue research**, v. 59, n. 2, p. 99-107, 2018.
- Ch'uan, C. H. Mitochondria in osteoclasts. **The Anatomical Record**, v. 49, n. 4, p. 397-401, 1931.
- Clynes, M. A.; Harvey, N. C.; Curtis, E. M.; Fuggle, N. R.; Dennison, E. M.; Cooper, C. The epidemiology of osteoporosis. **British medical bulletin**, v. 133, n. 1, p. 105-117, 2020.
- Cooper, C. E.; Davies, N. A. Effects of nitric oxide and peroxynitrite on the cytochrome oxidase Km for oxygen: implications for mitochondrial pathology. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1459, n. 2-3, p. 390-396, 2000.
- Czapalla, C.; Mansukoski, H.; Pursche, T.; Krause, E.; Hoflack, B. Comparative study of protein and mRNA expression during osteoclastogenesis. **Proteomics**, v. 5, n. 15, p. 3868-3875, 2005.
- Da, W.; Tao, L.; Zhu, Y. The role of osteoclast energy metabolism in the occurrence and development of osteoporosis. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 675385, 2021.
- De Brito, O. M.; Scorrano, L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. **Nature**, v. 456, n. 7222, p. 605-610, 2008.
- Dorn II, G. W. Mitochondrial dynamics in heart disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1833, n. 1, p. 233-241, 2013.
- Dorn, G. W. Mitofusin 2 dysfunction and disease in mice and men. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 782, 2020.

- Drake, M. T.; Clarke, B. L.; Lewiecki, E. M. The pathophysiology and treatment of osteoporosis. **Clinical therapeutics**, v. 37, n. 8, p. 1837-1850, 2015.
- Ebeling, P. R.; Nguyen, H. H.; Aleksova, J.; Vincent, A. J.; Wong, P.; Milat, F. Secondary osteoporosis. **Endocrine Reviews**, v. 43, n. 2, p. 240-313, 2022.
- Filadi, R.; Pendin, D.; Pizzo, P. Mitofusin 2: from functions to disease. **Cell death & disease**, v. 9, n. 3, p. 330, 2018.
- Föger-Samwald, U.; Dovjak, P.; Azizi-Semrad, U.; Kersch-Schindl, K.; Pietschmann, P. Osteoporosis: Pathophysiology and therapeutic options. **EXCLI journal**, v. 19, p. 1017, 2020.
- Fong, J. E.; Le Nihouannen, D.; Tiedemann, K.; Sadvakassova, G.; Barralet J. E.; Komarova, S. V. Moderate excess of pyruvate augments osteoclastogenesis. **Biology open**, v. 2, n. 4, p. 387-395, 2013.
- Forni, M. F.; Pelligia, J.; Trudeau, K.; Shirihai, O.; Kowaltowski, A. J. Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics. **Stem cells**, v. 34, n. 3, p. 743-755, 2016.
- Frank, M. et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 12, p. 2297-2310, 2012.
- Frost, H. M. Bone remodeling dynamics. **Charles C Thomas Company**, 1963.
- Giacomello, M.; Pyakurel, A.; Glytsou, C.; Scorrano, L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 4, p. 204-224, 2020.
- Grigoriadis, A. E.; Heersche, J. N.; Aubin, J. E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 6, p. 2139-2151, 1988.
- Guido, G.; Scaglione, M.; Fabbri, L.; Ceglia, M. J. The "osteoporosis disease". **Clinical cases in mineral and bone metabolism**, v. 6, n. 2, p. 114, 2009.
- Hales, K. G. Iron testes: sperm mitochondria as a context for dissecting iron metabolism. **BMC biology**, v. 8, p. 1-3, 2010.

Hattersley, G.; Kerby, J. A.; Chambers, T. J. Identification of osteoclast precursors in multilineage hemopoietic colonies. **Endocrinology**, v. 128, n. 1, p. 259-262, 1991.

Heymann, D.; Fortun, Y.; Rédini, F.; Padrines, M. Osteolytic bone diseases: physiological analogues of bone resorption effectors as alternative therapeutic tools. **Drug discovery today**, v. 10, n. 4, p. 242-247, 2005.

Indo, Y.; Takeshita, S.; Ishii, K. A.; Hoshii, T.; Aburatani, H.; Hirao, A.; Ikeda, K. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 28, n. 11, p. 2392-2399, 2013.

Ishii, K. et al. Coordination of PGC-1 $\beta$  and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. **Nature medicine**, v. 15, n. 3, p. 259-266, 2009.

Itoh, K.; Nakamura, K.; Iijima, M.; & Sesaki, H. Mitochondrial dynamics in neurodegeneration. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 2, p. 64-71, 2013.

Jin, Z.; Wei, W.; Yang, M.; Du, Y.; Wan, Y. Mitochondrial complex I activity suppresses inflammation and enhances bone resorption by shifting macrophage-osteoclast polarization. **Cell metabolism**, v. 20, n. 3, p. 483-498, 2014.

Jung, S.; Kwon, J. O.; Kim, M. K.; Song, M. K.; Kim, B.; Lee, Z. H.; Kim, H. H. Mitofusin 2, a mitochondria-ER tethering protein, facilitates osteoclastogenesis by regulating the calcium-calcineurin-NFATc1 axis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 516, n. 1, p. 202-208, 2019.

Khosla, S.; Hofbauer, L. C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 5, n. 11, p. 898-907, 2017.

Kim, J. M.; Lin, C.; Stavre, Z.; Greenblatt, M. B.; Shim, J. H. Osteoblast-osteoclast communication and bone homeostasis. **Cells**, v. 9, n. 9, p. 2073, 2020.

Kowaltowski, A. J.; de Souza-Pinto, N. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. Mitochondria and reactive oxygen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 333-343, 2009.

Lacey, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.

Lackner, L. L.; Nunnari, J. M. The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1792, n. 12, p. 1138-1144, 2009.

Lacombe, J.; Karsenty, G.; Ferron, M. Regulation of lysosome biogenesis and functions in osteoclasts. **Cell cycle**, v. 12, n. 17, p. 2744-2752, 2013.

LEHNINGER, Albert L. Water uptake and extrusion by mitochondria in relation to oxidative phosphorylation. **Physiological reviews**, v. 42, n. 3, p. 467-517, 1962.

Lemma, S. et al. Energy metabolism in osteoclast formation and activity. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 79, p. 168-180, 2016.

Liesa, M. et al. Mitochondrial fusion is increased by the nuclear coactivator PGC-1 $\beta$ . **PLoS one**, v. 3, n. 10, p. e3613, 2008.

Livak, K. J.; Schmittgen, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

Luchin, A.; Suchting, S.; Merson, T.; Rosol, T. J.; Hume, D. A.; Cassady, A. I.; Ostrowski, M. C. Genetic and Physical Interactions between Microphthalmia Transcription Factor and PU. 1 Are Necessary for Osteoclast Gene Expression and Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 39, p. 36703-36710, 2001.

Martinou, J.; Youle, R. J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics. **Developmental cell**, v. 21, n. 1, p. 92-101, 2011.

McCarron, J. G.; Wilson, C.; Sandison, M. E.; Olson, M. L.; Girkin, J. M.; Saunter, C.; Chalmers, S. From structure to function: mitochondrial morphology, motion and shaping in vascular smooth muscle. **Journal of vascular research**, v. 50, n. 5, p. 357-371, 2013.

Miyazaki, T. et al. Intracellular and extracellular ATP coordinately regulate the inverse correlation between osteoclast survival and bone resorption. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 45, p. 37808-37823, 2012.

Mun, S. H.; Park, P. S. U.; Park-Min, K. The M-CSF receptor in osteoclasts and beyond. **Experimental & molecular medicine**, v. 52, n. 8, p. 1239-1254, 2020.

Nakagawa, N. et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 253, n. 2, p. 395-400, 1998.

Ng, M. Y. W.; Wai, T.; Simonsen, A. Quality control of the mitochondrion. **Developmental cell**, v. 56, n. 7, p. 881-905, 2021.

Ni, H.; Williams, J. A.; Ding, W. Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. **Redox biology**, v. 4, p. 6-13, 2015.

Park-Min, K. Metabolic reprogramming in osteoclasts. In: **Seminars in immunopathology**. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2019. p. 565-572.

Peng, C. et al. Mitofusin 2 ameliorates hypoxia-induced apoptosis via mitochondrial function and signaling pathways. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 69, p. 29-40, 2015.

Pouresmaeili, F.; Kamalidehghan, B.; Kamarehei, M.; Goh, Y. M. A comprehensive overview on osteoporosis and its risk factors. **Therapeutics and clinical risk management**, p. 2029-2049, 2018.

Rabinowitz, J. D.; Enerbäck, S. Lactate: the ugly duckling of energy metabolism. **Nature metabolism**, v. 2, n. 7, p. 566-571, 2020.

Rizzuto, R.; De Stefani, D.; Raffaello, A.; Mammucari, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 13, n. 9, p. 566-578, 2012.

Santel, A.; Fuller, M. T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. **Journal of cell science**, v. 114, n. 5, p. 867-874, 2001.

Santel, A.; Fuller, M. T. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. **Journal of cell science**, v. 114, n. 5, p. 867-874, 2001.

Schrepfer, E.; Scorrano, L. Mitofusins, from mitochondria to metabolism. **Molecular cell**, v. 61, n. 5, p. 683-694, 2016.

Sebastián, D. et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose

homeostasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 14, p. 5523-5528, 2012.

Segovia-Silvestre, T. et al. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. **Human genetics**, v. 124, p. 561-577, 2009.

Sharma, L. K.; Lu, J.; Bai, Y. Mitochondrial respiratory complex I: structure, function and implication in human diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 16, n. 10, p. 1266-1277, 2009.

Sims, N. A.; Martin, T. J. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. **BoneKEy reports**, v. 3, 2014.

Takayanagi, H. et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. **Developmental cell**, v. 3, n. 6, p. 889-901, 2002.

Teitelbaum, S. L.; Ross, F. Patrick. Genetic regulation of osteoclast development and function. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, n. 8, p. 638-649, 2003.

Väänänen, H. K.; Laitala-Leinonen, T. Osteoclast lineage and function. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 473, n. 2, p. 132-138, 2008.

Westrate, L. M.; Drocco, J. A.; Martin, K. R.; Hlavacek, W. S.; MacKeigan, J. P. Mitochondrial morphological features are associated with fission and fusion events. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95265, 2014.

Williams, M.; Caino, M. C. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes and cancer. **Frontiers in endocrinology**, v. 9, p. 211, 2018.

Winslow, M. M.; Pan, M.; Starbuck, M.; Gallo, E. M.; Deng, L.; Karsenty, G.; Crabtree, G. R. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. **Developmental cell**, v. 10, n. 6, p. 771-782, 2006.

Xiao, W.; Wang, Y.; Pacios, S.; Li, S.; Graves, D. T. Cellular and molecular aspects of bone remodeling. **Tooth movement**, v. 18, p. 9-16, 2016.

Yang, D. Q. et al. V-ATPase subunit ATP6AP1 (Ac45) regulates osteoclast differentiation, extracellular acidification, lysosomal trafficking, and protease

exocytosis in osteoclast-mediated bone resorption. **Journal of bone and mineral research**, v. 27, n. 8, p. 1695-1707, 2012.

Zhang, Y. et al. PGC1 $\beta$  organizes the osteoclast cytoskeleton by mitochondrial biogenesis and activation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 33, n. 6, p. 1114-1125, 2018.

ZHU, Shouan et al. Subchondral bone osteoclasts induce sensory innervation and osteoarthritis pain. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 3, p. 1076-1093, 2019.

Zorova, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical biochemistry**, v. 552, p. 50-59, 2018.