



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

**A O-GLCNACILAÇÃO PROMOVE A OSTEOCLASTOGÊNESE E DETERMINA UM  
MODO MAIS AGRESSIVO DE REABSORÇÃO DOS OSTEOCLASTOS.**

**Ribeirão Preto**  
**2022**



**THAISE MAYUMI TAIRA**

**A O-GLCNACILAÇÃO PROMOVE A OSTEOCLASTOGÊNESE E DETERMINA UM  
MODO MAIS AGRESSIVO DE REABSORÇÃO DOS OSTEOCLASTOS.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para  
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria  
Área de Concentração: Odontopediatria

**Orientadora:** Sandra Yasuyo Fukada Alves

**Versão Corrigida**

**Ribeirão Preto**  
**2022**

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**

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP – Ribeirão Preto

Taira, Thaise Mayumi

A O-GlcNAcilação promove a osteoclastogênese e determina um modo mais agressivo de reabsorção dos osteoclastos. Ribeirão Preto, 2022.

122p.: il. ; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências. Programa: Odontopediatria Área de Concentração: Odontopediatria.

Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Orientador: Alves, Sandra Yasuyo Fukada

1. Osteoclastos. 2. Reabsorção Óssea. 3. Remodelação Óssea. 4. Metabolismo Energético. 5. Doenças Ósseas Metabólicas



## FOLHA DE APROVAÇÃO

---

TAIRA, TM. **A O-GlcNAcilação promove a osteoclastogênese e determina um modo mais agressivo de reabsorção dos osteoclastos.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a  
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Odontopediatria

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

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



## DADOS CURRICULARES

---

### THAISE MAYUMI TAIRA

- Nascimento** 31 de julho 1991, Tupã, SP
- Filiação** Lauro Taira  
Alice Akiko Nacashima Taira
- 2010-2014** Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo –FORP/USP
- 2011-2012** Iniciação Científica – Bolsista RUSP  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FCFRP/USP  
“Papel do receptor NOD2 na modulação da osteoclastogênese”  
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves
- 2012-2013** Iniciação Científica – Bolsista RUSP  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FCFRP/USP  
“Papel do receptor NOD2 na atividade dos osteoclastos”  
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves
- 2015-2016** Aperfeiçoamento em Atendimento Odontológico a Pacientes Especiais.  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP
- 2015-2017** Mestrado em Ciências  
Área de Concentração: Odontopediatria  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo- FORP/USP  
Dissertação: “Papel do receptor NLRP12 na modulação da reabsorção óssea durante a progressão da lesão periapical experimental”  
Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves

**Nov/2019** - Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE- FAPESP)

**Mai/2020** Área de Concentração: comportamento de osteoclastos humanos *in vitro*.

*University of Southern Denmark - SDU*

"The role of O-GlcNAcylation on osteoclast fusion and resorption"

Orientador: Prof. Kent Søe

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves

**2017-2022** Doutorado em Ciências

Área de Concentração: Odontopediatria

Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo- FORP/USP

Tese: "A O-GlcNAcilação promove a osteoclastogênese e determina um modo de reabsorção mais agressivo de reabsorção dos osteoclastos"

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Yasuyo Fukada Alves

## DEDICATÓRIA

---

*“Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que com sua infinita sabedoria foi um verdadeiro guia nessa minha jornada”*

*Aos meus pais, Lauro Taira e Alice Akiko Nacashima Taira, que sempre me apoiaram durante toda a minha trajetória, me mantendo firme e forte para seguir com os meus sonhos, sempre com os pés no chão. Sou muito grata por toda a dedicação, amor, pelos esforços. Amo muito vocês!*

*Ao meu irmão, Thiago Satoru Taira, por toda amizade e conversas. Tento me espelhar em você, no seu esforço, dedicação e foco pelos seus objetivos. Te admiro muito.*

*Ao meu namorado, Reinaldo Mitsuo Sato Kumata, obrigada por todo carinho, paciência, companheirismo e por sempre me aconselhar nas minhas decisões. Você é muito especial para mim, te amo!*

*A todos os meus familiares e amigos, pela torcida a cada conquista, pelo apoio e sorrisos.*



## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

---

*Agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Yasuyo Fukada Alves pela sua orientação com este trabalho, sempre com o seu entusiasmo à pesquisa. Muito obrigada por todo o ensinamento, pela confiança depositada a mim, pelas oportunidades e pela amizade. Admiro muito sua honestidade e competência.*





## **AGRADECIMENTOS**

---

*À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da atual Diretora Prof. Dr. Paulo Nelson Filho e do Vice-diretor Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva Mandato e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da coordenadora, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato.*

*Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pelos valiosos ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica e pela oportunidade de conviver com vocês.*

*Aos professores da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Prof. Dr. José Carlos Alves Filho e Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, pela cordialidade e pela cooperação durante a realização desta pesquisa.*

*Ao professor Dr. Kent Søe da University of Southern Denmark pela orientação e todo o aprendizado durante os 7 meses de Pesquisa no Exterior.*

*Ao professor Dr. Shigeaki Kato que gentilmente cederam os animais Ctsk-Cre.*

*Aos professores da banca e suplentes, por terem aceito o convite e pela atenção dispensada na leitura da tese.*

*Aos pós-graduandos em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial à Letícia Fernanda Duffles Rodrigues, Renata Zoraida Rizental Delgado e à Isabela Ribeiro Madalena pela convivência, trocas de experiências, por todo apoio e amizade.*

*Às técnicas Mayara Santos Gomes, Juliana Aparecida Vercesi de Macedo, Nilza Letícia Magalhães, Jacob Bastholm Olesen por todo auxílio e ensinamento durante a realização dos experimentos laboratoriais e amizade.*

*Aos meus amigos de laboratório, Laisa Yasmin de Souza, Lucas Gabriel Venturini, João Luiz Guilherme Neto, Mariana Soares Pena Ribeiro, Taíssa Cássia de Souza Furtado, por toda ajuda durante a execução laboratorial desse projeto, pelos ensinamentos e pela amizade.*

*Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, da Clínica de Pacientes Especiais, da Seção de Pós-graduação, enfim, todos os funcionários da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e aos funcionários da Faculdade de Farmácia e Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela disponibilidade, pela atenção e por toda a ajuda durante este período.*

*À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processos: 2017/23264-4 e BEPE 2019/15582-1) pelo suporte financeiro para que esse projeto fosse executado.*

*Ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM 26436, 277771, 27858) pelo escaneamento das microtomografias computadorizadas.*

*Por fim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho e, também, a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante esse período. Muito obrigada!*

TAIRA, TM. **A O-GlcNAcilação promove a osteoclastogênese e determina um modo mais agressivo de reabsorção dos osteoclastos.** Ribeirão Preto, 2022. 122p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

## RESUMO

Os osteoclastos são células reguladoras do volume ósseo que demandam um alto gasto energético para se diferenciarem e exercerem a sua função de reabsorção óssea. A glicose, principal fonte energética para diversos processos celulares, é crucial para a osteoclastogênese e para a manutenção dos osteoclastos ativos. No entanto, o papel das vias metabólicas da glicose nos osteoclastos ainda não foi bem elucidado. Sendo assim, com o intuito de explorar um ramo da via glicolítica, avaliamos o efeito da O-GlcNAcilação, que é uma modificação pós-traducional decorrente da metabolização de glicose pela via das hexosaminas. Este processo consiste na incorporação de (GlcNAc), em resíduos de serina/ treonina de proteínas nucleares e citoplasmáticas pela ação da enzima OGT. A O-GlcNAcilação regula diversos processos celulares incluindo fatores de transcrição, atividade enzimática, funções de proteínas nucleares e citoplasmáticas, dentre outros. Portanto, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o papel da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese e na atividade dos osteoclastos *in vitro* e no remodelamento ósseo fisiológico e patológico *in vivo*. Para a cultura de osteoclastos, foram utilizadas a medula óssea de camundongos C57BL/6, tratadas com GlcNAc ou com os inibidores da OGT (OSMI-1 e 5SGlcNAc); assim como células da medula óssea de camundongos com deleção seletiva de *Ogt* em monócitos (*LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*) e em osteoclastos (*CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*), com os seus respectivos controles *LysM-Cre* e *CtsK-Cre*. Da mesma forma, foi realizado cultura de osteoclastos humanos, onde foi observado o comportamento dos osteoclastos frente ao tratamento com GlcNAc e OSMI-1. Para a avaliação *in vivo*, utilizamos camundongos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e seu controle para a avaliação dos parâmetros ósseos e para a indução do modelo de lesão periapical. Primeiramente, foi observado que a adição de GlcNAc estimula a diferenciação e atividade dos osteoclastos murinos, enquanto o OSMI-1 e 5SGlcNAc inibiram esses efeitos. Paralelamente a isso, a deficiência de *Ogt* nos monócitos prejudicou a diferenciação dos osteoclastos e a capacidade de desmineralização deles, além de apresentarem uma menor expressão proteica de NFATc1, Integrina  $\alpha$ V e Catepsina K durante todo o período de diferenciação. Ainda, vimos que o GlcNAc estimulou a diferenciação de osteoclastos de origem humano e estimulou os mesmos a reabsorverem de forma mais agressiva. Esse efeito também foi revertido na presença do OSMI-1. Extrapolando os nossos resultados *in vitro*, observamos que animais com deficiência seletiva de *Ogt* nos osteoclastos, não apresentaram uma reabsorção óssea fisiológica no fêmur observada após 16 semanas de idade, demonstrando um maior volume ósseo e espessura trabecular quando comparados com o grupo controle. O osso cortical do fêmur também apresentou um maior volume ósseo e uma menor porosidade nos animais *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. Por fim, como um possível alvo de O-GlcNAcilação temos o NFATc1, uma vez que ele estava mais expresso no núcleo na presença de GlcNAc. Esses dados mostram que a O-GlcNAcilação exerce um papel importante na osteoclastogênese murino e humano, além de alterar o comportamento reabsortivo dos osteoclastos para um modo mais agressivo. Por fim,

nossos dados mostram um possível mecanismo para a perda e fragilidade óssea mediada pela atividade excessiva dos osteoclastos em doenças osteolíticas. Sendo assim, o presente estudo abre novos caminhos direcionados para a O-GlcNAcilação em osteoclastos como uma possível intervenção terapêutica em doenças osteometabólicas.

**Palavras-chave:** Osteoclastos. Reabsorção Óssea. Remodelação Óssea. Metabolismo Energético. Doenças Ósseas Metabólicas.

TAIRA, TM. **O-GlcNAcylation promotes osteoclastogenesis and dictates aggressive bone resorption by osteoclasts.** Ribeirão Preto, 2022. 122p. Ph.D. thesis - School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

## ABSTRACT

Osteoclasts play a key role in the regulation of bone mass, which to differentiate and reabsorb bone require high energy expenditure. Glucose, the main energy source for several cellular processes, is crucial for osteoclastogenesis and for the maintenance of active osteoclasts. However, the role of glucose metabolic pathways on osteoclasts has not been well elucidated. Therefore, in order to explore a branch of the glycolysis pathway, we evaluated the effect of O-GlcNAcylation, which is a post-translational modification resulting from glucose metabolism through the hexosamine pathway. This process consists of the addition of GlcNAc in serine/threonine moieties of nuclear and cytoplasmic by OGT enzyme. O-GlcNAcylation regulates several cellular processes including transcription factors, enzymatic activity, functions of nuclear and cytoplasmic proteins, among others. Therefore, the aim of our study was to evaluate the role of O-GlcNAcylation on osteoclastogenesis and osteoclast's activity *in vitro*, and on physiological and pathological bone remodeling *in vivo*. For osteoclast culture, we used bone marrow from C57BL/6 mice treated with GlcNAc or OGT inhibitors (OSMI-1 and 5SGlcNAc), and we also used bone marrow from *Ogt* genetic deletion in monocytes (*LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*), and in osteoclasts (*CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*) mice, with their respective controls mice. To evaluate the osteoclasts' resorption behavior with GlcNAc and OSMI-1 treatment we used human cells for osteoclast culture. For *in vivo* analysis, we used *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* mice and *CtsK-Cre* as a control group to evaluate bone parameters and to induce the periapical lesion model. First, we observed that GlcNAc addition stimulates murine osteoclast's differentiation and activity, while OSMI-1 and 5SGlcNAc inhibited. Together, *Ogt* deficiency in monocytes impaired osteoclast's differentiation, and their demineralization capacity, showing a decrease in NFATc1,  $\alpha$ V Integrin, and Cathepsin K protein expression during all osteoclast's differentiation process. Besides this, GlcNAc stimulates human osteoclast's differentiation and induces osteoclasts to resorb more aggressively. This effect was also reversed in the presence of OSMI-1. Going beyond our *in vitro* studies, we observed that *Ogt* deficiency mice in osteoclasts did not present physiological bone resorption in the femur after 16-weeks old, since these mice presented higher bone volume and trabecular thickness when compared with its control group. The femur cortical bone also presented a higher bone volume and less porosity in *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* mice. Finally, as a possible target of O-GlcNAcylation, we have NFATc1, since it was more expressed in the nucleus in the presence of GlcNAc. These data show that O-GlcNAcylation plays an important role in murine and human osteoclastogenesis, in addition to altering the resorption behavior of osteoclasts to a more aggressive mode. Finally, our data show a possible mechanism for bone loss and fragility mediated by excessive osteoclast activity in osteolytic diseases. Therefore, the present study opens new avenues for O-GlcNAcylation on osteoclasts as a possible therapeutic intervention on osteometabolic diseases.

**Keywords:** Osteoclasts. Bone resorption. Bone remodeling. Energy Metabolism. Bone diseases, Metabolic.



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b><math>\alpha</math>:</b>	alfa
<b><math>\alpha</math>-MEM:</b>	Minimum Essencial Medium Eagle- Alpha Modification
<b><math>\beta</math>:</b>	beta
<b><math>\Delta</math>:</b>	delta
<b><math>^{\circ}</math> :</b>	graus
<b>%:</b>	por cento
<b><math>\mu</math>m:</b>	micrometro (s)
<b><math>\mu</math>g:</b>	micrograma (s)
<b><math>\mu</math>L:</b>	microlitro (s)
<b>3D:</b>	tridimensional
<b>5SGlcNAc:</b>	uridina 5'-difosfato de 2-acetamido-2-desoxi-5-tio-D-glucopiranosose
<b>ALP:</b>	fosfatase alcalina
<b>ANOVA:</b>	análise de variância
<b>ATP:</b>	adenosina trifosfato
<b>Atp6v0d2:</b>	d2 isoform of vacuolar ATPase V0 domain
<b>BAD:</b>	benzil-2acetamido-2deoxy- $\alpha$ -dgalactopyronoside
<b>BSA:</b>	albumina de soro bovino
<b>BV/TV:</b>	bone volume per tissue volume
<b>C:</b>	celsius
<b>CAMKII:</b>	calcium/calmodulin-dependet protein kinase II
<b>CD14:</b>	cluster of differentiation 14
<b>cDNA:</b>	ácido desoxirribonucleico complementar (complementar deoxyribonucleic acid)
<b>CEUA:</b>	Comitê de Ética no Uso de Animais
<b>c-fms:</b>	macrophage colony stimulating factor receptor
<b>c-fos:</b>	fosfolipase C
<b>Co.Th:</b>	cortical thickness
<b>CSF1:</b>	colony stimulating factor
<b>CSF1R:</b>	colony stimulating factor receptor
<b>CT:</b>	cycle threshold
<b>CTAn:</b>	computed tomography analysis
<b>Ct. Po:</b>	cortical porosity

<b>CTR:</b>	calcitonin receptor
<b>CtsK:</b>	catepsina K (cathepsin K)
<b>DAPI:</b>	4',6-diamidino-2-phenylindole
<b>DC-STAMP:</b>	dendritic cell-specific transmembrane protein
<b>DNA:</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>EDTA:</b>	Ethylenediamine Tetracetic Acid
<b>GFAT:</b>	enzima frutose aminotransferase
<b>GlcNAc:</b>	O-linked- $\beta$ -N-acetylglucosamine
<b>Glc-6-P:</b>	glucosamina-6-fosfato
<b>GlcNAc-1-P:</b>	acetilglucosamina-1-fosfato
<b>GlcNAc-6-P:</b>	N-acetilglucosamina-6-fosfato
<b>g:</b>	grama (s)
<b>g/cm<sup>3</sup>:</b>	grama por centímetro cúbico
<b>H<sup>+</sup>ATPase:</b>	ATP fosfo-hidrolase
<b>HBP:</b>	hexosamine biosynthetic pathway
<b>HE:</b>	hematoxilina e eosina
<b>IkBa:</b>	inibidor do fator nuclear kappa B alfa
<b>IP:</b>	imunoprecipitação
<b>kDA:</b>	kilodalton
<b>kV:</b>	kilowatt
<b>Kg:</b>	kilo
<b>LysM:</b>	Lysozyme M
<b>M-CSF:</b>	Fator estimulador de colônia de macrófagos
<b>M-CSFR:</b>	macrophage colony stimulating factor receptor
<b>micro-CT:</b>	microtomografia computadorizada
<b>MITF:</b>	fator de transcrição associado a microftalmia
<b>MMPs:</b>	metaloproteinases da matriz
<b>mA:</b>	miliampere
<b>mg:</b>	miligrama (s)
<b>mM:</b>	milimolar
<b>min:</b>	minuto (s)
<b>mL:</b>	mililitro (s)
<b>mm<sup>2</sup>:</b>	milímetro(s) quadrado (s)
<b>ng:</b>	nanograma (s)
<b>nM:</b>	nanomolar



<b>nm:</b>	nanômetro
<b>NaOH:</b>	hidróxido de sódio
<b>NFAT:</b>	NF of activated T-cell
<b>NF-<math>\kappa</math>B:</b>	fator de transcrição nuclear kappa B (nuclear factor kappa B)
<b>NH<sub>4</sub>Cl:</b>	Cloreto de amônio
<b>NLRs:</b>	receptores tipo NOD (Nod-like receptors)
<b>NLRP12:</b>	Nod-like Receptor Family Pyrin Domain Containing 12
<b>OGA:</b>	$\beta$ -D-N-acetylglucosaminidase
<b>O-GlcNAc:</b>	O-linked $\beta$ -N-acetylglucosamine
<b>OGT:</b>	O-linked N-acetylglucosaminyltransferase
<b>OSCAR:</b>	osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor
<b>OSMI-1:</b>	O-GlcNAc transferase (OGT) inhibitor
<b>P/S:</b>	penicilina/estreptomicina
<b>PAMPs:</b>	padrões moleculares associados ao patógeno
<b>PBS:</b>	tampão fosfato salina
<b>PBMC:</b>	peripheral blood mononuclear cell
<b>pH:</b>	potencial hidrogeniônico
<b>qPCR:</b>	reação em cadeia da polimerase quantitativa (quantitative polymerase chain reaction)
<b>RANK:</b>	receptor ativador de NF- $\kappa$ B
<b>RANKL:</b>	ligante do receptor ativador de NF- $\kappa$ B
<b>RIPA:</b>	radio immunoprecipitation assay
<b>RNA:</b>	ácido ribonucleico (ribonucleic acid)
<b>RNA<sub>m</sub>:</b>	ácido ribonucleico mensageiro
<b>Runx2:</b>	runt-related transcription factor 2
<b>rpm:</b>	rotações por minuto
<b>s:</b>	segundo (s)
<b>TBS-T:</b>	Tris Buffered Saline with Tween 20
<b>TNF-<math>\alpha</math>:</b>	Fator-alfa de necrose tumoral (tumor necrosis factor)
<b>TRAF6:</b>	fator 6 associado ao receptor de TNF (TNF receptor-associated factor 6) TRAP ou TRAcP: fosfatase ácida resistente ao tartarato (tartrate-resistant acid phosphatase)
<b>WT:</b>	wild-type
<b>UDP-GlcNAc:</b>	UDP-N-acetylglucosamine

**USA:** United States of America  
**V-ATPase:** vacuolar-type H<sup>+</sup> -ATPase  
**V:** volts

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Avaliação da expressão de marcadores “chaves” da O-GlcNAcilação.** (A) Imagem da expressão proteica de GFAT1 e OGT nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (M-CSF e RANKL). (B) *Blot* de RL2 em osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico. Em ambos, a  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. As imagens são representativas de dois experimentos independentes..... **65**
- Figura 2. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de GlcNAc.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por quatro dias, estimulados com GlcNAc (0,3; 1 e 3 mM) e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAcP-positivas por poço. Foi utilizado o One-way ANOVA para comparação dos grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-way ANOVA. \* $p < 0.05$ . (C) O gráfico indica o índice de fusão que foi determinado pela contagem do número total de núcleos em 9 campos diferentes e divididos pelo número total de osteoclastos dos mesmos campos. A análise estatística da comparação entre os grupos Controle e GlcNAc (3 mM) foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os dados são representativos de três experimentos independentes..... **67**
- Figura 3. Avaliação da atividade desmineralizadora dos osteoclastos na presença de GlcNAc.** (A) Áreas mais claras indicam a desmineralização da hidroxiapatita, onde os pré-osteoclastos foram cultivados por cinco dias. Os poços foram fotografados no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a área de desmineralização mensurada e normalizada com o grupo controle e dada em  $\text{mm}^2$ . A análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* combinado ao pós-teste de *Dunn's multiple comparison*, onde \* $p < 0,05$ ..... **68**

- Figura 4. Avaliação do efeito do inibidor de OGT na osteoclastogênese.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados na presença ou ausência do inibidor de OGT - OSMI-1. As imagens foram obtidas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a contagem do número total de osteoclastos por poço. (C) O gráfico do índice de fusão foi determinado pela divisão do número total de núcleos pelo número total de osteoclastos. A análise estatística da comparação entre os grupos Controle e OSMI-1 foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Dados representativos de três experimentos independentes..... **69**
- Figura 5. Avaliação da expressão de marcadores de osteoclastos na presença de OSMI-1 por *Western blot*.** Imagem da expressão proteica de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (controle) e nos osteoclastos cultivados na presença de OSMI-1. A  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes..... **70**
- Figura 6. Determinação da capacidade desmineralizadora dos osteoclastos na presença de OSMI-1.** (A) Imagens representativas dos poços contendo hidroxiapatita após oito dias de cultura. O grupo controle representa os osteoclastos que foram cultivados no meio osteoclastogênico e o grupo OSMI-1, aqueles que foram tratados com o inibidor da OGT. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico indica a medida da área desmineralizada ( $\text{mm}^2$ ) que foi calculada pela normalização em relação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*, onde \*\*\*\* $p < 0,0001$ . (n=4). Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes..... **71**
- Figura 7. Avaliação do efeito do inibidor de OGT na diferenciação e atividade dos osteoclastos.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados na presença ou ausência do inibidor de OGT - 5SGlcNAc. As imagens foram obtidas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ m. O gráfico do índice de fusão foi determinado pela divisão do número total de núcleos pelo número total de osteoclastos. A análise

estatística da comparação entre os grupos Controle e 5SGlcNAc foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*,  $***p < 0.001$ . (n=5). (B) Imagem da expressão proteica de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (controle) e nos osteoclastos cultivados na presença de 5SGlcNAc. A  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. (C) Imagens representativas dos poços contendo hidroxiapatita após cinco dias de cultura. O grupo controle representa os osteoclastos que foram cultivados no meio osteoclastogênico e o grupo 5SGlcNAc, aqueles que foram tratados com o inibidor da OGT. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. O gráfico indica a medida da área desmineralizada ( $\text{mm}^2$ ) que foi calculada pela normalização em relação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*, onde  $**p < 0,01$ . (n=5). (D) Imagem da expressão proteica de RL2 nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (controle) e nos osteoclastos cultivados na presença de 5SGlcNAc. A  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes..... 72

**Figura 8. Avaliação da expressão de OGT por *Western blot*.** Imagens representativas da expressão de OGT nas células provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* estimuladas com M-CSF e em meio osteoclastogênico após três dias de diferenciação. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes..... 73

**Figura 9. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *Ogt* nos monócitos na osteoclastogênese.** (A) Imagens representativas de osteoclastos provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* após quatro dias de diferenciação. Os osteoclastos foram coradas com TRAcP e fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico mostra o número total de osteoclastos por poço. (C) O gráfico representa o índice de fusão dos osteoclastos, calculados pela divisão do número total de núcleos pelo número total de osteoclastos. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*, onde  $***p < 0.001$ . Esses resultados são representativos de três experimentos independentes..... 74

- Figura 10. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *Ogt* nos monócitos na expressão de marcadores de osteoclastos por *Western blot*.** (A) Imagens da expressão proteica de NFATc1 no lisado total de pré-osteoclastos/osteoclastos provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* nos tempos 0, 1, 2 e 3 dias de diferenciação. (B) Expressão proteica de Integrina  $\alpha$ V e Catepsina K no lisado total de pré-osteoclastos/osteoclastos provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes..... **75**
- Figura 11. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *Ogt* na capacidade desmineralizadora dos osteoclastos.** (A) Imagens representativas de lacunas de reabsorção em placa de hidroxiapatita realizadas pelos osteoclastos provenientes de animais *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. Barra= 100  $\mu$ M. (B) A área total de desmineralização foi mensurada utilizando o programa LasX (Leica Microsystems) e normalizada com o grupo controle. A análise estatística foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \* $p < 0.05$ . Os experimentos são representativos de dois experimentos independentes..... **76**
- Figura 12. Avaliação do efeito do GlcNAc na diferenciação de osteoclastos humanos.** (A) Imagens representativas de osteoclastos corados após sete dias de diferenciação tratado com GlcNAc (0,3 mM) e seu respectivo controle. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ M (B) Quantificação do número de osteoclasto por campo (16 campos) na presença de GlcNAc em 5 experimentos independentes. Foi realizado o teste *t* pareado, onde \* $p < 0,05$ . (C) A média do número de núcleo por osteoclasto (índice de fusão) foi avaliado na presença do GlcNAc e comparado com o seu respectivo controle. A análise estatística utilizada foi o teste de *Mann Whitney*, \*\* $p < 0.01$ . (D) Atividade de TRAcP mensurada no meio condicionado dos osteoclastos tratados com GlcNAc e comparado com o seu controle. A barra representa a média  $\pm$  DP. A análise estatística foi feita utilizando o teste *Friedman* seguido do pós-teste de *Dunn's multiple comparison*. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ..... **77**

**Figura 13. Avaliação da inibição farmacológica de *Ogt* na diferenciação de osteoclastos humanos.** (A) Imagens representativas de osteoclastos corados após sete dias de diferenciação tratado com OSMI-1 (30 nM) e seu respectivo controle. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ M (B) Quantificação do número de osteoclasto por campo (16 campos) na presença de OSMI-1 em 5 experimentos independentes. Foi realizado o teste *t* pareado, onde  $*p < 0,05$ . (C) A média do número de núcleo por osteoclasto (índice de fusão) foi avaliado na presença do OSMI-1 e comparado com o seu respectivo controle. A análise estatística utilizada foi o teste de *Mann Whitney*,  $**p < 0.01$ . (D) Atividade de TRAcP mensurada no meio condicionado dos osteoclastos tratados com OSMI-1 e comparado com o seu controle. A barra representa a média  $\pm$  DP. A análise estatística foi feita utilizando o teste *Friedman* seguido do pós-teste de *Dunn's multiple comparison*.  $*p < 0.05$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ .....

78

**Figura 14. Análise da capacidade de reabsorção dos osteoclastos na presença de GlcNAc.** (A) Imagens representativas das lacunas de reabsorção coradas com Azul de toluidina após três dias de plaqueamento de osteoclastos maduros sobre os discos de osso na presença ou ausência de GlcNAc (0,03 mM). (B) O gráfico representa a porcentagem de reabsorção por superfície óssea, dada pela contagem em 16 áreas do disco de osso usando um graticulo de 100-pontos acoplado na ocular do microscópio. O grupo com GlcNAc foi comparado ao seu controle utilizando o teste de Mann Whitney. (n=5). (C) Gráfico representando a formação de *pit* e *trench* nos grupos com GlcNAc e controle. Foi utilizada a análise estatística de *two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnett's multiple comparison*.  $**p < 0,01$ ,  $****p < 0,0001$ . (D) A formação de *pit* e *trench* realizado pelos osteoclastos tratados com GlcNAc foram comparados com seus respectivos controles em cinco experimentos utilizando células de diferentes doadores. Foi realizado o teste *t* pareado, onde  $*p < 0,05$ .....

80

**Figura 15. Avaliação da capacidade reabsortiva dos osteoclastos na presença do inibidor OSMI-1.** (A) Imagens representativas das lacunas de reabsorção coradas com Azul de toluidina após três dias de plaqueamento de osteoclastos maduros sobre os discos de osso na presença ou ausência de OSMI-1 (1 nM). (B) A porcentagem de reabsorção por superfície óssea foi dada pela contagem de lacunas em 16 áreas do disco de osso usando um graticulo de 100-pontos acoplado na ocular do microscópio. O grupo com OSMI-1 foi comparado ao seu controle utilizando o teste de Mann Whitney. (n=5). (C) As lacunas de reabsorção foram subdivididas em *pit* e *trench* e quantificadas (porcentagem de *pit* e *trench*/ superfície óssea) nos grupos com OSMI-1 e controle. Foi realizada a análise estatística de *two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnett's multiple comparison*. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. (D) A formação de *pit* e *trench* realizado pelos osteoclastos tratados com OSMI-1 foram comparados com seus respectivos controles em 5 experimentos utilizando células de diferentes doadores. Foi realizado o teste *t* pareado, onde \*p<0,05..... 82

**Figura 16. Avaliação do impacto da deleção seletiva de OGT nos osteoclastos sobre o remodelamento ósseo *in vivo*.** (A) Foto representativa de fêmures e tíbias de camundongos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* coletados com 16 semanas de idade. (B) Imagens tridimensionais de microtomografia dos fêmures dos animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. As imagens mostram os cortes sagitais dos fêmures ao lado dos cortes trabeculares e corticais. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado (BV/TV). Espessura trabecular (Tb.Th) em mm. Densidade mineral óssea trabecular (g/cm<sup>3</sup>). Porcentagem do volume ósseo cortical sobre o tecido avaliado (BV/TV). Espessamento cortical (Ct. Th) em mm. Porcentagem de porosidade cortical total (PO tot). A análise estatística utilizada foi o teste "*t*" de *Student*, onde \*p<0,05. (n=7-9)..... 84



**Figura 17. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *OGT* nos osteoclastos sobre a osteoclastogênese.** (A) Imagens representativas dos osteoclastos provenientes da medula óssea de camundongos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* corados em TRAP, após 4 dias de cultura. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a quantificação do número total de osteoclastos por poço. (C) Gráfico representativo do índice de fusão obtido através da contagem do número total de núcleos e dividido pelo número total de osteoclastos. A análise estatística da comparação entre os grupos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \* $p < 0,05$ . Dados representativos de três experimentos independentes..... 85

**Figura 18. Avaliação do impacto da O-GlcNAcilação na perda óssea induzida pela lesão periapical.** (A) Imagens representativas da raiz distal do primeiro molar inferior de animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* submetidas a lesão periapical e seus respectivos controles. Cortes semi-seriados de 5 mm foram corados com HE para avaliação da extensão da lesão periapical formada após 14 dias de doença periapical. O delineado preto descontínuo representa a área periapical nos animais controles e a lesão periapical nos animais submetidos a doença. (B) Avaliação da área do espaço periapical. Foi realizada a mensuração da área periapical na raiz distal do primeiro molar dos animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* submetidas a lesão periapical e seus respectivos controles. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o seu respectivo controle; ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo WT com lesão periapical..... 87

**Figura 19. Determinação da presença de osteoclastos na lesão periapical.** (A) Imagens representativas da raiz distal do primeiro molar inferior de animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* submetidas a reação enzimática de TRAcP. As marcações em vermelho representam as células positivas para TRAcP (osteoclastos). (B) Quantificação do número de células TRAcP-positivas na região periapical dos animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o seu respectivo controle; ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo *CtsK-Cre* com lesão periapical..... 89

- Figura 20. Análise de imunoprecipitação para NFATc1.** Imagens da revelação de *immunoblotting* para marcação de NFATc1 e RL2 (O-GlcNAcilação) em amostras de cultura de osteoclastos estimulados com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL) por 3 dias e imunoprecipitadas com anti-NFATc1 (IP)..... **91**
- Figura 21. Localização de NFATc1 por imunofluorescência e fração nuclear.** (A) Imagens de imunofluorescência com marcações para DAPI (azul), NFATc1 (verde) e o Merge (sobreposição) dessas 2 imagens de osteoclastos retratando osteoclastos estimulados com RANKL (10 ng/mL) seguido de osteoclastos com RANKL (10 ng/mL) e GlcNAc (3 mM) por 4 horas. (B) Fração nuclear de osteoclastos cultivados por 3 dias e marcados com anti-NFATc1 na presença do inibidor OSMI-1 e no seu controle (RANKL). H3 foi usado como gene endógeno. Imagens representativas de dois experimentos independentes..... **93**

## LISTA DE ESQUEMAS

- Esquema 1. Ilustração do ciclo de O-GlcNAcilação proteica regulada pelas enzimas OGT e OGA.** A O-GlcNAcilação é catalisada por OGT, que transfere GlcNAc do UDP-GlcNAc para a proteína-alvo, e a GlcNAc é removida da proteína-alvo pela OGA (adaptados de LEE *et al.*, 2014)..... **43**
- Esquema 2. Ilustração da ativação de NFATc1.** A ativação de RANK pelo seu ligante RANKL leva a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , liberando o NF- $\kappa$ B que transloca para o núcleo. Ainda, o NF- $\kappa$ B ativa c-Fos que consequentemente leva a translocação de NFATc1 para o núcleo. O NF- $\kappa$ B e o NFATc1 no núcleo leva a transcrição de vários genes relacionados com a diferenciação e ativação dos osteoclastos (ALQRANEI *et al.*, 2020)..... **90**



## LISTA DE VÍDEOS

- Vídeo 1. (Arquivo separado).** Osteoclastos maduros corados com *SiR-actin* (verde) na presença de *Verapamil* (como descrito em Søre e Delaisse, 2017) e colocados em discos de osso corados com rodamina (vermelho) na presença de M-CSF e RANKL por três dias. Área representativa dos osteoclastos fazendo escavações no grupo Controle, seguido dos osteoclastos tratados com GlcNAc (0,03 mM) e finalizando com o grupo OSMI-1 (1nM). As imagens foram tiradas a cada 20 minutos e o tempo de gravação foi de aproximadamente 72 horas..... **83**



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>37</b>
1.1 Tecido ósseo, osteoclastogênese e reabsorção óssea.....	39
1.2 Metabolismo dos osteoclastos.....	42
<b>2. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>47</b>
2.1 Objetivos específicos.....	49
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>51</b>
3.1 Animais .....	53
3.2 Genotipagem dos animais por PCR convencional .....	53
3.3 Cultura de osteoclastos .....	54
3.3.1 Cultura de osteoclastos murino .....	54
3.3.2 Avaliação da expressão de marcadores osteoclastogênicos na cultura de osteoclastos por Western blot.....	55
3.3.3 Imunofluorescência para NFATc1. ....	55
3.4 Cultura de osteoclastos humanos.....	56
3.4.1 Ensaio de reabsorção .....	57
3.5 Coloração de TRAcP e ensaio de atividade enzimática de TRAcP .....	58
3.6 Indução da lesão periapical .....	58
3.6.1 Avaliação histomorfométrica da extensão da lesão periapical formada e quantificação dos osteoclastos presentes nesta região.....	59
3.7 Avaliação por microtomografia computadorizada (micro-CT) .....	60
3.8 Forma de análise dos resultados .....	60
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>63</b>
4.1 A O-GlcNAcilação participa do processo de diferenciação dos osteoclastos.....	65
4.2 A O-GlcNAcilação promove a osteoclastogênese e a capacidade de desmineralização dos osteoclastos.....	66
4.3 A inibição de OGT prejudica a diferenciação dos osteoclastos .....	68
4.4 A O-GlcNAcilação estimula a expressão de marcadores importantes para a diferenciação e ativação dos osteoclastos.....	70
4.5 A inibição de OGT compromete a capacidade desmineralizadora dos osteoclastos .....	70
4.6 A deleção seletiva de OGT nos precursores de osteoclastos inibiu a diferenciação dos osteoclastos.....	73

4.7 A deficiência de OGT nos monócitos prejudica a função de desmineralização dos osteoclastos.....	75
4.8 A O-GlcNAcilação estimula a diferenciação dos osteoclastos humanos .....	76
4.9 A inibição farmacológica de OGT com OSMI-1 inibe a diferenciação dos osteoclastos humanos.....	77
4.10 A O-GlcNAcilação estimula o aumento da atividade dos osteoclastos humanos, impulsionando-os a reabsorverem de modo mais agressivo.....	79
4.11 A O-GlcNAcilação é importante para a homeostase óssea .....	83
4.12 A O-GlcNAcilação tem um papel importante no desenvolvimento da lesão periapical experimental.....	86
4.13 O NFATc1 como potencial alvo de O-GlcNAcilação durante a osteoclastogênese e ativação dos osteoclastos. ....	90
4.14 A GlcNAcilação estimula a ativação de NFATc1 durante a osteoclastogênese. ....	91
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>95</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>119</b>



# 1. INTRODUÇÃO

---



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Tecido ósseo, osteoclastogênese e reabsorção óssea

O tecido ósseo é um tecido dinâmico, composto por uma matriz rica em colágeno e reforçado por cristais minerais que exercem funções importantes no nosso corpo, como locomoção, suporte e proteção dos tecidos moles, armazenamento de cálcio e fosfato, além de abrigo da medula óssea (ROBLING; CASTILLO; TURNER, 2006; DATTA *et al.*, 2008). Para exercer tais funções e manter a homeostase, o tecido ósseo requer uma constante renovação da matriz óssea, denominada de remodelamento ósseo, que é necessariamente regulado pela atividade dos osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos são as células responsáveis pelo processo de formação óssea e os osteoclastos, por sua vez, realizam a reabsorção do tecido ósseo, sendo ambos encontrados na superfície tecidual (CLARK, 2008; SETTEMBRE, 2009). Já os osteócitos se encontram imersos na matriz do tecido ósseo e atuam como mecanossensores e orquestradores do remodelamento ósseo (KARSENTY; KRONENBERG; TEITELBAUM, 2007; BONEWALD, 2011). Diversas doenças osteolíticas, ou seja, que têm como consequência a redução da massa óssea e um aumento da fragilidade como a diabetes, a osteoporose, a artrite reumatóide, a osteoartrite e as periodontites, são decorrentes do aumento da atividade dos osteoclastos ou da diminuição da atividade dos osteoblastos ou de ambos os fatores associados (RAGGATTI; PARTRIDGE, 2010; FENG; McDONALD, 2011). Por isso, investigar as condições predisponentes ao desequilíbrio da atividade dessas células é de extrema importância para o entendimento e desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos para essas doenças.

Os osteoclastos são células multinucleadas originadas da fusão dos progenitores hematopoiéticos da linhagem mielóide. A diferenciação de osteoclastos, denominada de osteoclastogênese, envolve vários estágios que vão desde o comprometimento de monócitos e/ou macrófagos em células precursoras de osteoclastos (estágio inicial), até a formação de células gigantes e multinucleadas (estágio final) pela proliferação, migração e fusão dos macrófagos (SEGOVIA-SILVESTRE, 2009). A osteoclastogênese é regulada essencialmente por duas citocinas: o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e 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 *et al.*, 1991). Esta citocina apresenta um papel crucial na osteoclastogênese, não só porque ativa vias de sinalizações que controlam a sobrevivência e proliferação celular, mas também porque regula a expressão do receptor RANK na membrana das células. 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 (LANCEY *et al.*, 1998; NAKAGAWA *et al.*, 1998). A ativação do RANK-RANKL promove a ativação de várias vias de sinalização intracelular, incluindo as vias clássica e alternativa do NF- $\kappa$ B, c-Fos, fosfolipase C, fator de transcrição associado a microftalmia (MITF) e fator nuclear de células T ativadas c1 (NFATc1), as quais são importantes para a diferenciação dos osteoclastos (LUCHIN *et al.*, 2001; ASAGIRI, 2007).

O NFATc1, é considerado o principal fator de transcrição regulador da diferenciação dos osteoclastos, visto que animais deficientes de NFATc1 condicionalmente em osteoclastos, desenvolvem osteopetrose (WINSLOW *et al.*, 2006). Além disso, a expressão ectópica de NFATc1 em células monocíticas precursoras induz a formação de osteoclastos, independentemente de RANKL (TAKAYANAGI *et al.*, 2002). O mecanismo pelo qual o NFATc1 se torna essencial para a osteoclastogênese se dá pelo fato desse fator de transcrição regular inúmeros genes relacionados tanto com a diferenciação e fusão dos osteoclastos: *Calcitonin receptor* (CTR), *Osteoclast-associated receptor* (OSCAR), *Dendritic cell-specific transmembrane protein* (DC-STAMP) e *D2 isoform of vacuolar ATPase V<sub>0</sub> domain* (Atp6v0d2); bem como genes relacionados com a ativação dos mesmos: *Tartrate resistant acid phosphatase* (TRAP) e *Cathepsin K* (CtsK) (YAVROPOULOU; YOVOS, 2008).

Os osteoclastos maduros (com mais de três núcleos) são únicos com a função de reabsorção óssea, e a função adequada desse tipo celular é crítica para a homeostase do tecido ósseo. Para que ocorra o processo de reabsorção óssea, é necessário que os osteoclastos maduros passem por um intenso remodelamento citoesquelético, polarização da membrana plasmática, redistribuição de transportadores e organelas e um intenso tráfego endossomal (NY; RIBET; PAVLOS,

2019). Os osteoclastos iniciam esse processo formando uma zona de selamento com a matriz óssea por meio de integrina tipo alfa v beta 3 (integrina  $\alpha v\beta 3$ ), gerando então lacunas de reabsorção para onde são secretados ácido e enzimas proteolíticas (RUCCI; TETI, 2016). A manutenção do pH ácido, por  $H^+$ 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), resultando assim na degradação de colágeno e na desmineralização da hidroxiapatita (KALERVO-VAANANEN *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, pesquisadores têm investigado o comportamento dos osteoclastos durante o processo de reabsorção óssea. Para que os osteoclastos possam reabsorver o tecido ósseo, é necessário que haja uma sincronia entre degradação de colágeno e da solubilização de minerais (TAKAHASHI *et al.*, 2007). Quando há uma menor taxa de colagenólise em relação a desmineralização, a tendência é que os osteoclastos façam escavações circulares, profundas e perpendiculares à superfície óssea. Esse tipo de reabsorção foi denominado de "pit" (poço), o qual foi interpretada como um evento de curta duração, onde os osteoclastos reabsorvem de forma intermitente (LAKKAKORPI; VÄÄNÄNEN, 1991; SALTEL *et al.*, 2004). Em condições opostas, onde há uma maior taxa de colagenólise quando comparado a desmineralização, os osteoclastos realizam escavações longas e profundas. Esse modo de reabsorção foi identificado como "trench" (trincheira), por serem escavações contínuas onde os osteoclastos reabsorvem enquanto se movem pela superfície óssea (STENBECK; HORTON, 2000). Essas características nos fazem pensar que a reabsorção do tipo "trench" seja um tipo mais agressivo de reabsorção, visto que são escavações realizadas de forma mais rápida e com uma maior área de reabsorção. De fato, Delaissé e colaboradores (2021), mostraram através de uma imagem de microscopia eletrônica de varredura, inúmeras reabsorções do tipo "trench" na trabécula do fêmur de uma paciente osteoporótica de 71 anos de idade, evidenciando a relação de *trenches* com a fragilidade óssea, observada em diversas patologias.

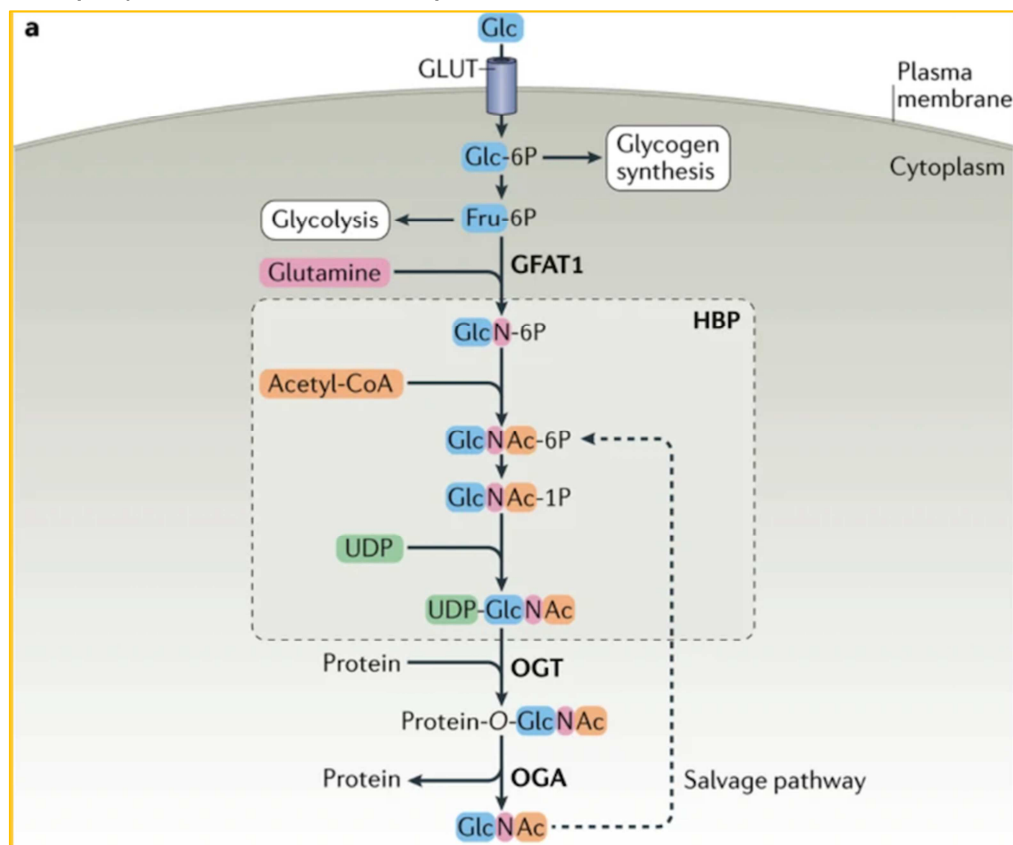
## 1.2 Metabolismo dos osteoclastos

Metabolismo é todo o processo que a célula utiliza para obtenção de energia com o objetivo de realizar as suas funções biológicas (PARK-MIN, 2019). Por realizarem inúmeros processos durante a diferenciação e para exercerem a sua atividade funcional, os osteoclastos requerem uma alta demanda energética (KIM *et al.*, 2007a). Além disso, por apresentarem mitocôndrias em abundância, também são consideradas células com alta capacidade de geração de energia (DUDLEY; SPIRO, 1961). De fato, as mitocôndrias são as organelas responsáveis por converter o oxigênio e os nutrientes em ATP via fosforilação oxidativa (SPINELLI; HAIGIS, 2018), sendo esta uma das vias essenciais para a diferenciação e sobrevivência dos osteoclastos (AOKI; SHIMIZU; ITO, 2020; PARK-MIN, 2019). No entanto, embora a fosforilação oxidativa seja uma via que atenda às demandas energéticas dos osteoclastos, todas as vias metabólicas estão intimamente conectadas. Sendo assim, houve uma necessidade em explorar o papel de outras vias metabólicas durante a osteoclastogênese, assim como durante a reabsorção óssea.

Produtos da via glicolítica, como a glicose e a glutamina, são essenciais para a formação de osteoclastos a partir de macrófagos murinos obtidos da medula óssea estimulados com RANKL, e também para exercerem a sua função de reabsorção óssea (INDO *et al.*, 2013). Após a captação da glicose pela célula através do seu transportador de membrana, a glicose é direcionada para três principais vias metabólicas: a glicólise, a via das pentoses e a via biossintética das hexosaminas (HBP) (LIU *et al.*, 2018). Comparado à glicólise e a via das pentoses, uma pequena porcentagem de glicose é metabolizada pela via das hexosaminas (HARDIVILLÉ; HART; 2014). No entanto, a hiperglicemia, uma característica patognomônica dos diabéticos, em que há um aumento absoluto ou relativo do fluxo de glicose para a HBP, resulta em um aumento de UDP-GlcNAc (*UDP-N-acetylglucosamine*) e, conseqüentemente, aumento na O-GlcNAcilação de proteínas (ROBINSON *et al.*, 1995). A O-GlcNAcilação é uma modificação pós-traducional que consiste na adição de O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) aos resíduos de serina ou treonina de proteínas-alvo pela enzima OGT (O-GlcNAc transferase) (TORRES e HART, 1984). Diferentemente da fosforilação, que envolve diversas quinases e fosfatases, a O-GlcNAcilação envolve a atividade de apenas duas enzimas: a OGT (*uridine*

*diphospho-N-acetyl-glucosamine:polypeptide  $\beta$ -N-acetylglucosaminyltransferase*) que é responsável pela inserção do O-GlcNAc e, a OGA ( *$\beta$ -D-N-acetylglucosaminidase*) a qual faz a remoção do O-GlcNAc (Esquema 1), o que torna esse processo reversível e altamente dependente da disponibilidade de UDP-GlcNAc (*UDP-Nacetylglucosamine*), substrato da enzima OGT (HARDIVILLÉ; HART; 2014). Portanto, a OGT é o “centro de controle” da HBP que capta o fluxo de nutrientes e transmite via O-GlcNAcilação de proteínas.

**Esquema 1. Ilustração do ciclo de O-GlcNAcilação proteica regulada pelas enzimas OGT e OGA.** A O-GlcNAcilação é catalisada por OGT, que transfere GlcNAc do UDP-GlcNAc para a proteína-alvo, e a GlcNAc é removida da proteína-alvo pela OGA (adaptados de LEE *et al.*, 2014).



Diversos estudos têm demonstrado que a O-GlcNAcilação regula diversos processos celulares incluindo fatores de transcrição, atividade enzimática, interações entre proteínas, ciclo celular, metabolismo, epigênese e até funções de proteínas nucleares e citoplasmáticas (DIAS; HART, 2007; HART *et al.*, 2007; BOND; HANOVER, 2013; MA *et al.*, 2014, BAUDOIN, 2015). No entanto, a identificação do

que cada modificação pós-traducional representa nesses processos biológicos, ainda é bastante limitado se considerarmos o grande número de proteínas-alvo.

A formação do UDP-GlcNAc, substrato da OGT, inicia-se pela conversão da frutose-6-fosfato, oriunda da glicólise, em glucosamina-6-fosfato pela ação da enzima frutose aminotransferase (GFAT). A glucosamina-6-fosfato (Glc-6-P) passa por uma reação de acetilação pela ação da enzima Glc-6-P acetiltransferase, formando a molécula de N-acetilglucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-P), a qual é transformada pela enzima fosfo-GlcNAc mutase em acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-P). Por fim, esta molécula perde o grupamento fosfato e ganha um UDP pela ação da enzima UDP-GlcNAc pirofosforilase, formando o UDP-GlcNAc (KIM, 2011). Sendo assim, a disponibilidade de glicose e a ativação da via biossintética das hexosaminas são fatores que regulam diretamente a disponibilidade intracelular de UDP-GlcNAc.

De maneira análoga a fosforilação de proteínas, a O-GlcNAcilação pode ser desencadeada por modificações no ambiente celular como por exemplo, durante a diferenciação, durante um processo inflamatório, em resposta a estímulos como stress, hormônios e pela disponibilidade de nutrientes (HART; HOUSLEY; SLAWSON, 2007; HART *et al.*, 2011). As modificações, dinâmicas e reversíveis de proteínas, produzidas pela O-GlcNAcilação têm sido consideradas importantes reguladores-chave das disfunções celulares observadas em diversas patologias. Tem sido demonstrado um aumento da expressão de OGT em diversos tipos de câncer assim como um aumento de proteínas O-GlcNAcyladas (DE QUEIROZ *et al.*, 2014). Além disso, o silenciamento de OGT em diferentes modelos de câncer de pâncreas, de mama e de próstata levaram a um prognóstico mais favorável, uma vez que foi observado uma inibição do crescimento tumoral (CALDWELL *et al.*, 2010; LYNCH *et al.*, 2012; MA *et al.*, 2013). Outros trabalhos mostram que esta modificação proteica pode levar a complicações vasculares quando ocorre a O-GlcNAcilação da enzima eNOS nas células endoteliais (DU *et al.*, 2001) ou levar a disfunção cardíaca e arritmia quando a O-GlcNAcilação ocorre na proteína quinase dependente de cálcio/calmodulina (CaMKII) em cardiomiócitos (ERICKSON *et al.*, 2013). Estudos prévios mostram ainda que a O-GlcNAcilação participa da ativação de respostas inflamatórias, visto que membros da família do NF- $\kappa$ B podem ser alvos de O-



GlcNAcilação e que este processo favorece outras mudanças pós-traducionais, como a acetilação, bem como regula a atividade transcricional de células do sistema imune (ALLISON *et al.*, 2012; OH; GHOSH, 2013). Além disso, foi demonstrado que essa modificação pós-traducional de NF- $\kappa$ B é dependente de OGT, uma vez que o aumento de O-GlcNAcilação mediado pela maior expressão de OGT resultou no aumento da atividade transcricional de NF- $\kappa$ B em condições hiperglicêmicas (YANG *et al.*, 2008). Como evidenciado, diferentes alvos, em diferentes sistemas, são passíveis de serem O-GlcNAcilados e sofrerem modificações funcionais, entretanto, existem poucos estudos sobre o papel da O-GlcNAcilação de proteínas sobre a função dos diferentes tipos celulares envolvidos com o remodelamento ósseo.

Estudos utilizando células pré-osteoblásticas MC3T3-E1 demonstraram que há um aumento global de proteínas O-GlcNAciladas nas diferentes fases de diferenciação dos osteoblastos, e que modificações proteicas produzidas por O-GlcNAc regulam a expressão de osteocalcina, que é uma proteína secretada por osteoblastos (KIM *et al.*, 2007b). Ainda, a inibição farmacológica de OGA, o qual proporciona um estado de maior O-GlcNAcilação, leva a um aumento da atividade transcricional de *Runx2* em pré-osteoblastos (linhagem MC3T3-E1) e aumento da atividade de fosfatase alcalina (ALP) (NAGEL *et al.*, 2014). Estes dados mostram, portanto, que O-GlcNAcilação de *Runx2* está relacionado com o controle da diferenciação e atividade de osteoblastos. Os estudos publicados até o momento ainda são controversos em relação ao efeito da HBP e da O-GlcNAcilação na diferenciação e função dos osteoclastos. Primeiramente, Koyama e Kamemura (2015) não observaram nenhum efeito tanto na expressão de *Acp5* (TRAP) e na atividade enzimática de TRAP durante a osteoclastogênese em cultura de células RAW264 na presença de inibidores de OGA, sugerindo que essa via não afetava a osteoclastogênese. Posteriormente, utilizando as mesmas células RAW264, Takeuchi e colaboradores (2016) demonstraram que altas doses do monossacarídeo GlcNAc inibiu a diferenciação dos osteoclastos. Ainda, mais recentemente, esses mesmos autores realizaram uma cultura de osteoclastos com as células RAW264 na presença de Thiamet G, um inibidor da OGA. Eles mostraram neste estudo que na presença de Thiamet G, houve um menor número e atividade dos osteoclastos vistos no ensaio de reabsorção em placa contendo hidroxiapatita (TAKEUCHI *et al.*, 2020), sugerindo

um efeito inibitório da O-GlcNAcilação na diferenciação e na atividade dos osteoclastos. Já um estudo mais recente, demonstrou em cultura de células primárias que a O-GlcNAcilação estimula a osteoclastogênese *in vitro* (KIM *et al.*, 2021).

Considerando esses dados controversos, o objetivo deste estudo foi avaliar o papel da O-GlcNAcilação no remodelamento ósseo fisiológico e durante o desenvolvimento de uma doença osteolítica *in vivo*, bem como aprofundar nossos conhecimentos do efeito da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese de origem murino e de humanos, assim como na atividade dos osteoclastos. Levando em consideração que a lesão periapical é uma doença lítica exacerbada em situações de altos níveis glicêmicos, como por exemplo no diabetes (PÉREZ-LOSADA *et al.*, 2021), e os dados da literatura mostram que a O-GlcNAcilação tem um papel na osteoclastogênese, a nossa hipótese era que essa modificação pós-traducional estaria envolvida na perda óssea induzida por necrose radicular em camundongos. Assim, o entendimento do papel da O-GlcNAcilação, especificamente nos osteoclastos, durante o processo patológico de perda óssea em lesão periapical, poderia conferir uma possível aplicação clínica para contenção desta patologia no futuro.

## 2. PROPOSIÇÃO

---



## 2. PROPOSIÇÃO

Investigar o papel da O-GlcNAcilação na diferenciação e função dos osteoclastos murino e humano, bem como no remodelamento ósseo fisiológico e na perda óssea em modelo de lesão periapical induzida em camundongos.

### 2.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar o papel da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese em células murinas e humanas.
- b) Investigar o papel da O-GlcNAcilação na atividade desmineralizadora dos osteoclastos murinos, bem como na formação de lacunas de reabsorção pelos osteoclastos humanos.
- c) Avaliar se a O-GlcNAcilação participa do remodelamento ósseo fisiológico *in vivo*.
- d) Investigar se a O-GlcNAcilação interfere no desenvolvimento da lesão periapical induzida em camundongos.



### 3. *MATERIAL E MÉTODOS*

---





### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Para o uso de animais, este projeto foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Protocolo: 17.1.1134.60.2) (Anexos 1 e 2). Neste estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 (*wild-type*), *LysM-Cre* obtidos do Jackson Lab (*stock no*: 004781, Bar Harbor, Maine, EUA), *Ctsk-Cre* que foram gentilmente cedidos pelo Dr. Shigeaki Kato (University of Tokyo, Japão) e *Ogt-flox*, também adquiridos no Jackson Lab (*stock no*: 004860, Bar Harbor, Maine, EUA). Animais com deleção seletiva de *Ogt* nos monócitos/ precursores de osteoclastos (*LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*) foram gerados através do cruzamento do animal *LysM-Cre* com o animal *Ogt-flox* e os animais com deleção seletiva de *Ogt* nos osteoclastos (*Ctsk-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*) foram gerados a partir do cruzamento de animais *Ctsk-Cre* com *Ogt-flox*. Os animais *LysM-Cre* e *Ctsk-Cre* foram utilizados como animais controles (WT). Para os experimentos *in vitro* foram utilizados camundongos machos, entre 6 a 8 semanas de idade, e para os experimentos *in vivo* utilizamos os camundongos fêmeas, uma vez que o gênero do camundongo não interfere no modelo experimental proposto. Os animais foram mantidos em caixas pequenas (5 animais/caixa) no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Os mini-isoladores dos animais foram forrados com maravalha e ficaram organizados em estantes ventiladas com sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar, com temperatura controlada de 24°C ± 2°C e ciclo de claro/escuro a cada 12 horas. Os animais foram alimentados com ração à vontade e água filtrada.

#### 3.2 Genotipagem dos animais por PCR convencional

Primeiramente, uma amostra de DNA (*punch* da orelha) de cada animal foi coletado para realização da extração de DNA. Para extração de DNA foi adicionado 75 µl de tampão (NaOH 25 mM e EDTA 0,2 mM) em cada amostra, as quais foram levadas ao termociclador a 98°C por 1 hora. Em seguida, o DNA extraído foi quantificado no aparelho nanofotômetro (NanoPhotometer® P360, Implén, Inc., Califórnia, EUA), onde posteriormente 20 ng total de DNA foi utilizado para a reação

de PCR. Para esta reação foram utilizados os primers específicos para análise da enzima do *Cre* genérico, *LysM-Cre* e *Ogt*, juntamente com o Amplitaq Gold 360 Master MIX (#4398881- Applied biosystems™, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, EUA). As amostras de DNA de cada animal foram aplicadas em gel 1,5% de agarose em cuba de eletroforese de 100 Volts por 50 minutos, além do padrão molecular, um controle positivo e negativo. Após a corrida, o gel foi revelado em uma câmara escura com luz ultravioleta e o genótipo de cada animal foi estabelecido previamente ao seu uso.

### **3.3 Cultura de osteoclastos**

#### **3.3.1 Cultura de osteoclastos murino**

Ossos longos dos camundongos foram dissecados e colocados em meio de cultura celular  $\alpha$ -MEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, EUA) suplementado com 1 % de penicilina/estreptomicina (P/S - Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). No fluxo laminar, os ossos foram limpos em álcool 70%, seguido de lavagem em  $\alpha$ -MEM com 1 % de P/S e 10 % de soro fetal bovino (SFB - GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EUA) para posterior extração das células da medula óssea. Para extração da medula óssea, uma das extremidades dos fêmures e das tíbias foram cortadas e posicionadas dentro dos tubos eppendorfs para centrifugação a 4°C, 10.000 g por 1 minuto. Após a extração das células da medula óssea, estas foram submetidas ao tampão de lise para remoção das hemácias e as células foram ressuspensas em  $\alpha$ -MEM suplementado para contagem do número de células. A contagem foi realizada em quatro quadrantes da câmara de Neubauer utilizando o Azul de Trypan a 0,5%. Em seguida,  $13 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placa de petri (Corning, Nova York, EUA) em 13 mL de  $\alpha$ -MEM suplementado e 30 ng/mL do Fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF, R&D Systems®, Minneapolis, EUA) por 3 dias. Após esta etapa, as células não aderentes foram removidas e os pré-osteoclastos foram lavados e coletados com PBS, contados e replaqueados em presença de 30 ng/mL de M-CSF, 10 ng/mL do ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL, R&D Systems®, Minneapolis, EUA) para a diferenciação osteoclástica. Em alguns ensaios foram ainda adicionados GlcNAc ou inibidores da OGT (OSMI-1 e 5SGlcNAc) de acordo com o objetivo de cada experimento.

### 3.3.2 Avaliação da expressão de marcadores osteoclastogênicos na cultura de osteoclastos por Western blot

Para avaliação da expressão das proteínas osteoclásticas, foram plaqueados  $2 \times 10^5$  pré-osteoclastos por poço em placa de 24 poços (Corning, Nova York, EUA) em presença de 30 ng/mL de M-CSF e 10 ng/mL de RANKL. Após 24, 48 e 72 horas de incubação, as células foram lisadas utilizando um êmbolo de uma seringa, tampão de radioimunoprecipitação (RIPA - Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, USA) e um coquetel de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma, Missouri, EUA). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 13.000 g por 10 minutos e o sobrenadante foi coletado. A dosagem de proteínas foi realizada utilizando uma curva de BSA e um kit específico (Pierce™ BCA Protein Assay, Thermo Scientific™, Massachusetts, EUA). Cada amostra (10 µg) foi aplicada em um gel de poliacrilamida com 10-15% de SDS em cuba de eletroforese a 200v/100mA. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de PVDF. A membrana foi bloqueada por 1 hora em leite desnatado a 5% em TBS-T e posteriormente incubada com seus respectivos anticorpos alvos GFAT1 (ab125069), Integrina  $\alpha$ v (ab179475), Catepsina K (ab187647), NFAT2 (NFATc1, ab25916), O-GlcNAc (RL2, ab2739), OGT (ab50270), OSMI-1 (ab235455) e  $\beta$ -actina (ab6276) todos da Abcam (Cambridge, United Kingdom), os quais foram adicionados em diluição conhecida em TBS-T contendo leite ou BSA a 5%, incubando-se durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as membranas foram lavadas vigorosamente em TBS-T e incubadas com seus respectivos anticorpos secundários por 2 horas. Após incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase, a imunorreatividade das bandas foi detectada por adição de uma solução de quimiluminescência (WestPico Super Signal, Pierce) e reveladas no *QuemiDoc XRS instrument* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

### 3.3.3 Imunofluorescência para NFATc1.

Os osteoclastos murinos foram cultivados conforme descrito em 4.3.1. Após 72 horas do replaqueamento, o grupo controle foi reestimulado com RANKL (10 ng/mL) enquanto o grupo experimental foi reestimulado com RANKL (10 ng/mL) e GlcNAc (3 mM) por 4 horas. Após este período, as células foram lavadas e fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 10 minutos. As células foram incubadas com

NH<sub>4</sub>Cl (50 mM) por 10 minutos a temperatura ambiente para reduzir a autofluorescência e subsequentemente permeabilizada com 0.1% Triton X-100 em PBS por 5 minutos. Após a lavagem, as células foram incubadas *overnight* com o anticorpo anti-NFATc1 diluído em PBS contendo 3% de BSA (Santa Cruz Biotechnology, Texas, EUA) a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado com Alexa-Fluor 488 (A-11034 Thermo-Fisher [1:1000]) por 2 horas a temperatura ambiente. Por fim, as células foram lavadas com PBS e montadas com Vectashield contendo DAPI (Vector Laboratories, Cambridge, United Kingdom) em lâminas histológicas. As imagens foram obtidas no microscópio confocal Leica SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### 3.4 Cultura de osteoclastos humanos

Monócitos CD14-positivos foram isolados de bolsas de sangue doadas por voluntárias saudáveis com mais de 50 anos de acordo com a legislação Dinamarquesa (todas as doadoras assinaram o Termo de Consentimento de Uso de Material Excedente do Doador). Primeiramente o sangue foi diluído em PBS e centrifugado a 2.000 rpm a 20° C com Ficoll-paque (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom) para a separação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC). A "nuvem" de PBMC foi coletada e lavada duas vezes com PBS. Monócitos CD14-positivos foram separados com o auxílio de "beads" magnéticos para CD14 (BD Biosciences, New Jersey, EUA) e um separador magnético (R&D Systems, Abingdon, UK) s.

As células CD14-positivas foram plaqueadas na densidade de  $5 \times 10^6$  de células em garrafas de cultura (Greiner, Frickenhausen, Denmark) em  $\alpha$ -MEM (Invitrogen, Taastrup, Denmark) contendo 10% FBS (Cambrex/Invitrogen, Taastrup, Denmark) e 25 ng/mL M-CSF humano (R&D Systems, Minnesota, EUA). Para a diferenciação dos osteoclastos, após dois dias de cultura as células foram replaqueadas em placa de 96 poços (Greiner, Frickenhausen, Germany) o meio foi trocado e suplementado com 25 ng/ml de M-CSF e RANKL solúvel humano (R&D Systems, Minnesota, EUA). Três dias depois, foi adicionado diferentes concentrações de GlcNAc (0,03 a 1 mM) ou OSMI-1 (3,0 a 100 nM) solubilizado em sulfóxido de

dimetilo (DMSO, Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, USA) em  $\alpha$ -MEM com 25 ng/ml de M-CSF e RANKL. Este solvente foi adicionado na mesma concentração no grupo controle de OSMI-1, resultando na concentração de 0,25%. Após 7 dias de diferenciação, os osteoclastos foram corados com coloração de Giemsa. O número de osteoclastos e seus núcleos foram contados em seis campos randomizados pelo *Random number generator* (GraphPad.com), e utilizando uma objetiva de 20x (Olympikus IX71).

### 3.4.1 Ensaio de reabsorção

Os osteoclastos maduros, com 7 dias de diferenciação, foram lavados com PBS e cuidadosamente removidos da garrafa de cultura com Accutase (Biowest, Minneapolis, USA). Depois de contadas, os osteoclastos foram plaqueados em cima de discos de ossos de 0,4 mm de espessura (Boneslices, Jelling, Dinamarca) na densidade de  $5 \times 10^4$  células. Uma hora depois das células serem plaqueadas, foi adicionado o GlcNAc ou OSMI-1 e deixados por três dias. Após esse tempo experimental, os discos de osso foram lavados e corados com Azul de toluidina (Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, EUA) para a visualização das lacunas de reabsorção. As lacunas foram analisadas utilizando um graticulo de 100 pontos de 24,5 mm de diâmetro (Graticules Optics Limited, Cambridge, UK) acoplados em um microscópico. As reabsorções geradas pelos osteoclastos foram caracterizadas em dois tipos, poço ou trincheira. A reabsorção do tipo trincheira foi determinada tendo o seu comprimento como mais que o dobro da sua largura. A porcentagem de cada tipo de reabsorção foi determinada em toda a superfície do disco de osso. O avaliador não teve acesso às identificações dos grupos experimentais durante as análises.

Para a análise de reabsorção óssea ao vivo, os osteoclastos maduros foram corados com 100 nM de *SIR-actin* e 10  $\mu$ M de *verapamil* (ambos diluídos em DMSO e fornecidos pela Spirochrome, Switzerland) e adicionados na densidade de  $1 \times 10^5$  células em discos de osso de 0,2 mm de espessura corados com rodamina (NHS-Rhodamine, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) como descrito em SØE; DELAISSÈ, 2017. As células foram deixadas na estufa a 37°C em 5 % de CO<sub>2</sub> por 4 horas para aderirem no disco de osso, e em seguida os discos de osso foram

transferidos para uma câmara de tampa de vidro (X16 Labtek II Lamelle 8 Puits, Thermo Fisher scientific, Massachusetts, USA). Em seguida, a câmara foi acoplada ao microscópio de fluorescência *Olympus Fluoview FV10i* (Olympus Corporation, Japan), o foco foi ajustado e três áreas foram selecionadas em cada disco de osso utilizando os seguintes comprimentos de onda: *Cy5* (558 nm) e *Rhodamine Phalloidin* (575 nm), com a magnificação de 10 x e uma abertura confocal de 1,9. O intervalo entre cada imagem fotografada foi de aproximadamente 20 minutos e o tempo total de gravação foi por volta de 72 horas.

### **3.5 Coloração de TRAcP e ensaio de atividade enzimática de TRAcP**

Após o período de diferenciação dos osteoclastos, as células foram lavadas com PBS e fixadas com tampão de Citrato (pH= 3,6) e então coradas com kit comercial de TRAcP de acordo com as indicações do fabricante (387A kit, Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, USA). Depois de coradas, as células foram fotografadas com o microscópio Leica DMIRB 6000B (Leica Microsystems, Inc, Richmond Hill, ON) na objetiva de 10 x. As células TRAcP-positivas contendo mais que dois núcleos foram considerados osteoclastos.

A atividade enzimática de TRAcP da cultura de células humanas foi mensurada no sobrenadante do nono dia de cultura. Essas amostras foram pipetadas juntamente com solução de TRAcP, incubadas a 37° C por aproximadamente 15 minutos e lidas no espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.6 Indução da lesão periapical**

Uma vez genotipados, os animais *Ctsk-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>ff</sup>* foram anestesiados por administração intraperitoneal de cloridrato de Cetamina (Ketamina 10 %, Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A. Embu-Guaçu, SP) na dosagem de 0,1 mL/Kg de peso, e cloridrato de Xilazina (Anasedan® 2 %, Ceva Santé Animale S/A. Paulínea, SP), também na dosagem de 0,1 mL/Kg de peso e submetidos ao protocolo clássico de indução de lesão periapical (DE ROSSI *et al.*, 2008; DA SILVA *et al.*, 2012). Os animais foram então posicionados em uma mesa cirúrgica para realizar uma abertura coronária no primeiro molar inferior direito com uma broca esférica de aço inoxidável ¼ acoplada à caneta de baixa rotação e

contra-ângulo. Após a abertura coronária, a entrada do canal distal foi explorada com uma lima endodôntica #08. O tamanho da abertura coronária foi padronizado de acordo com o diâmetro da broca e os canais foram deixados expostos ao meio ambiente bucal. Os primeiros molares do lado esquerdo, sem exposição pulpar, constituíram o grupo controle. Após 14 dias de exposição pulpar, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical.

### **3.6.1 Avaliação histomorfométrica da extensão da lesão periapical formada e quantificação dos osteoclastos presentes nesta região**

Após o período experimental, as hemi-mandíbulas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10 % por 24 horas à temperatura ambiente, e posteriormente descalcificadas com uma solução à base de EDTA a 10 % (pH=7,4) por aproximadamente 30 dias. Para avaliar se o tecido estava descalcificado, foi realizado um teste inserindo uma agulha de calibre 0,45 mm na região de incisivo. Caso a agulha penetrasse no incisivo sem nenhuma resistência, a amostra estaria pronta para o processamento de inclusão em parafina. Sequencialmente, as amostras foram desidratadas em ordem crescente de álcoois (Synth<sup>®</sup>) 70 %, 80 %, 95 % e 100 % e diafanizadas em xilol (Synth<sup>®</sup>). As mandíbulas foram imersas em parafina fundida (56 a 60° C), e incluídos em blocos de parafina com a face vestibular voltada para baixo utilizando uma central de inclusão (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os blocos de parafina contendo as mandíbulas foram cortados no sentido longitudinal em micrótomo (HistoCore AUTOCUT; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) no sentido vestibulo-lingual. Lâminas de cortes semi-seriados de 5 µm foram obtidas em toda a extensão da amostra que incluísse as raízes do primeiro molar com o ápice aberto. Os cortes semi-seriados de cada grupo experimental foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histomorfométrica da reabsorção óssea alveolar apical. As lesões periapicais, ou as regiões de perda de estruturas ao redor do ápice dental envolvido, foram delineadas utilizando o programa de imagens *ImageJ Software* (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) e suas áreas mensuradas em mm<sup>2</sup>. Para marcação e quantificação dos osteoclastos presentes ao redor da lesão periapical, os outros cortes semi-seriados foram submetidos à reação de fosfatase ácida resistente ao

tartarato (TRAcP) e contra-coradas com Hematoxilina. Os osteoclastos, os quais apresentaram uma coloração avermelhada (células TRAP-positivas) foram quantificados na região da lesão periapical da raiz distal do primeiro molar por meio de microscópio óptico (Nikon eclipse E200, Tóquio, Japão). Cortes representativos de HE e TRAcP foram fotografados com câmera AxioCam MRc5 acoplada ao microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha).

### **3.7 Avaliação por microtomografia computadorizada (micro-CT)**

Para avaliação quantitativa tridimensional dos parâmetros ósseos dos fêmures (cortical e trabecular), os fêmures foram dissecados e fixados em formol tamponado a 10 % por 24 horas. Em seguida, as amostras foram escaneadas utilizando o aparelho de micro-tomografia computadorizada Micro-CT Sky Scan 1172 (Bruker Corporation, Billerica, EUA), com o tamanho de *voxel* de 8,7  $\mu\text{m}$ , 49 kV, filtro de alumínio de 0.5 mm e 0.18° de rotação de ângulo. Para visualização, as imagens de projeção tridimensional (3D) foram reconstruídas utilizando o software NRecon (versão 1.7.4.2; Skyscan; Bruker Corporation, Billerica, EUA) e posteriormente cortes transversais de um segmento de 1 mm (209 secções) abaixo da diáfase média foram selecionadas para as análises de parâmetro ósseo trabecular como fração de volume ósseo trabecular (BV/TV, %), espessura trabecular (Tb.Th.) e densidade mineral óssea ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ), assim como análises da região cortical fração de volume ósseo cortical (BV/TV, %), espessura cortical (Co.Th.), bem como a porosidade cortical (Ct. Po) utilizando os programas de imagens *Data Viewer* e *CTAn* (Bruker micro-CT). A calibração foi dada a partir de um *phantom* com densidade de hidroxiapatita já conhecida (Skyscan, Aartselaar, Belgium).

### **3.8 Forma de análise dos resultados**

Primeiramente, os dados foram avaliados quanto a sua distribuição pelos testes de *D'Agostino's K-squared* e *Shapiro-Wilk* utilizando GraphPad Software 7.0 (GraphPad Prism; GraphPad Software, San Diego). Em casos de distribuição normal dos dados, utilizamos o teste "t" de *Student* para comparar dois grupos e o teste de variância a um critério (*One-way ANOVA*) para comparar mais de dois grupos. Em caso de distribuição não normal, testes não-paramétricos de *Mann-Whitney* e *Kruskal*



*Wallis* foram utilizados conforme os grupos a serem comparados. Em seguida, os pós-testes foram realizados conforme a necessidade. As diferenças das médias ou medianas foram consideradas significativas para valores de  $P < 0,05$ .



## 4. *RESULTADOS*

---

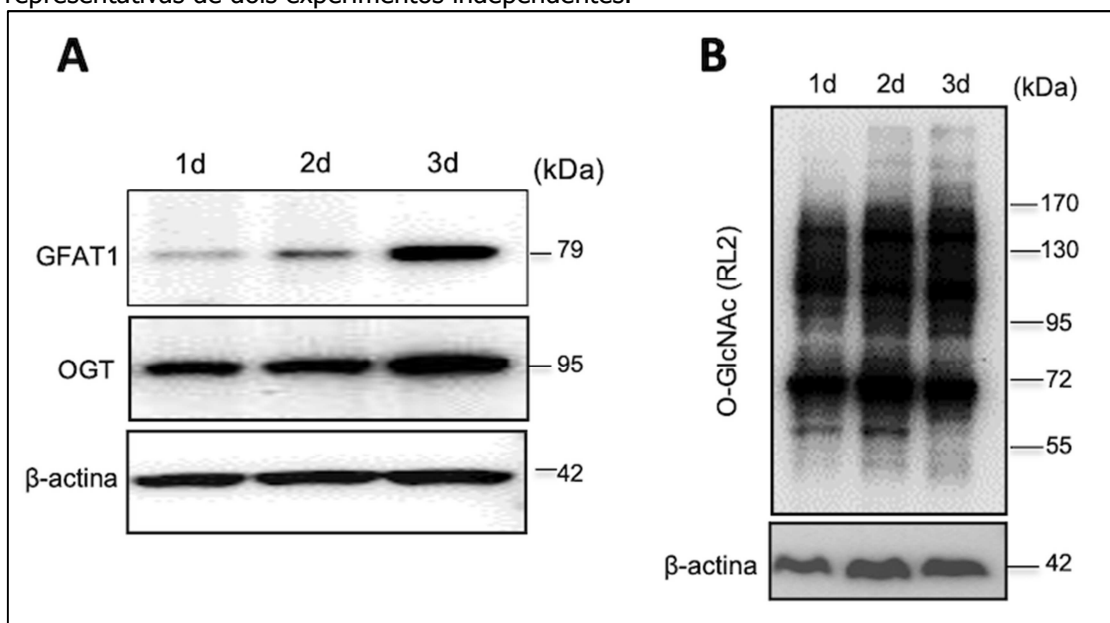


## 4. RESULTADOS

### 4.1 A O-GlcNAcilação participa do processo de diferenciação dos osteoclastos

A atividade da HBP e conseqüentemente a O-GlcNAcilação é decorrente principalmente do fornecimento dos substratos, como a glucose e a glutamina, e pela atividade enzimática da frutose aminotransferase (GFAT) e OGT (SCHLEICHER; WEIGERT, 2000). A enzima GFAT converte frutose-6-fosfato e glutamina em glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P) e a enzima OGT faz a inserção do monossacarídeo GlcNAc nos sítios específicos das proteínas. Sendo assim, o primeiro passo para investigar se a O-GlcNAcilação estaria envolvida com o processo de diferenciação dos osteoclastos, foi avaliar a expressão de GFAT e OGT na cultura de osteoclastos murino. Como podemos observar na figura 1A, houve um aumento da expressão de GFAT em função do tempo de diferenciação dos osteoclasto e uma alta expressão de OGT durante todo o período de diferenciação. Além disso, vimos que o estímulo de RANKL levou a O-GlcNAcilação de várias proteínas (Figura 1B), sugerindo que ocorre a O-GlcNAcilação durante a osteoclastogênese e que pode participar desse processo.

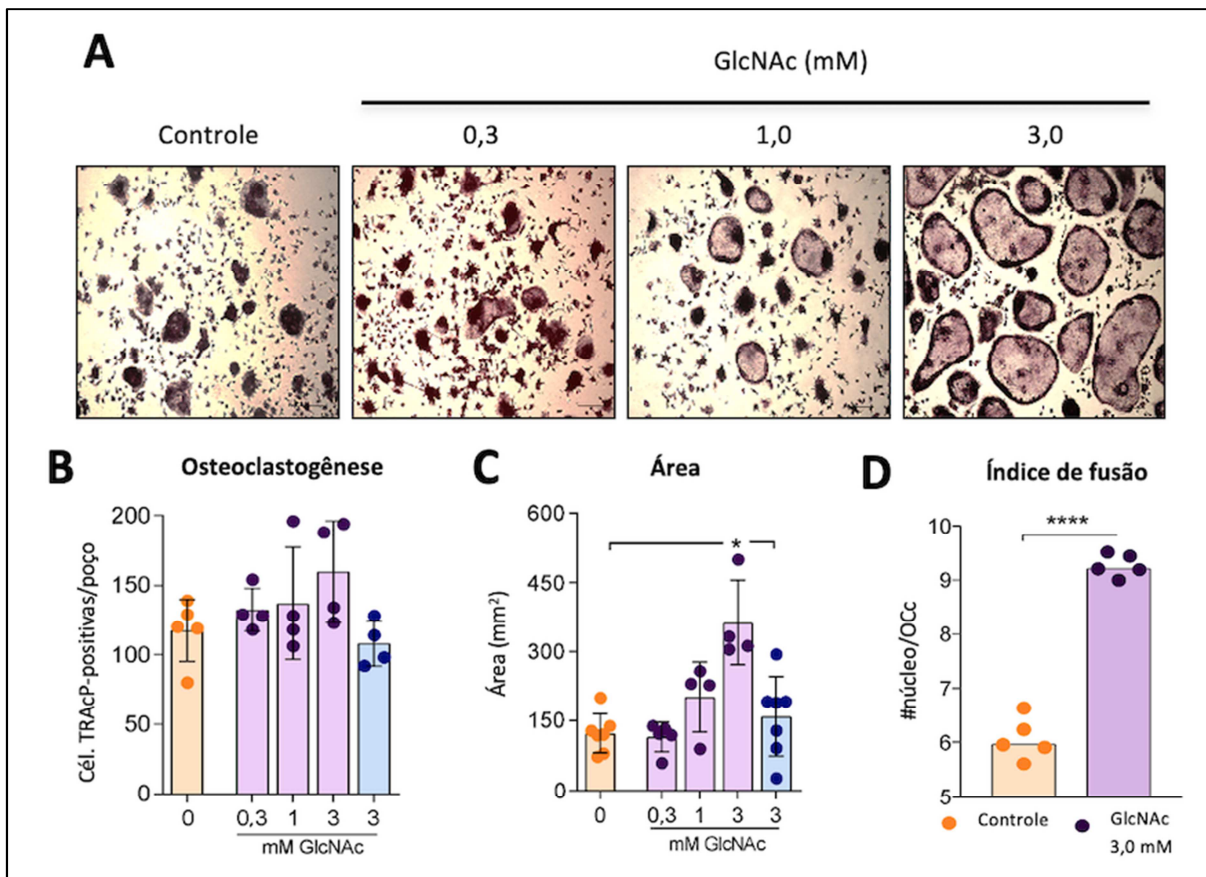
**Figura 1. Avaliação da expressão de marcadores "chaves" da O-GlcNAcilação.** (A) Imagem da expressão proteica de GFAT1 e OGT nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (M-CSF e RANKL). (B) *Blot* de RL2 em osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico. Em ambos, a  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. As imagens são representativas de dois experimentos independentes.



## **4.2 A O-GlcNAcilação promove a osteoclastogênese e a capacidade de desmineralização dos osteoclastos**

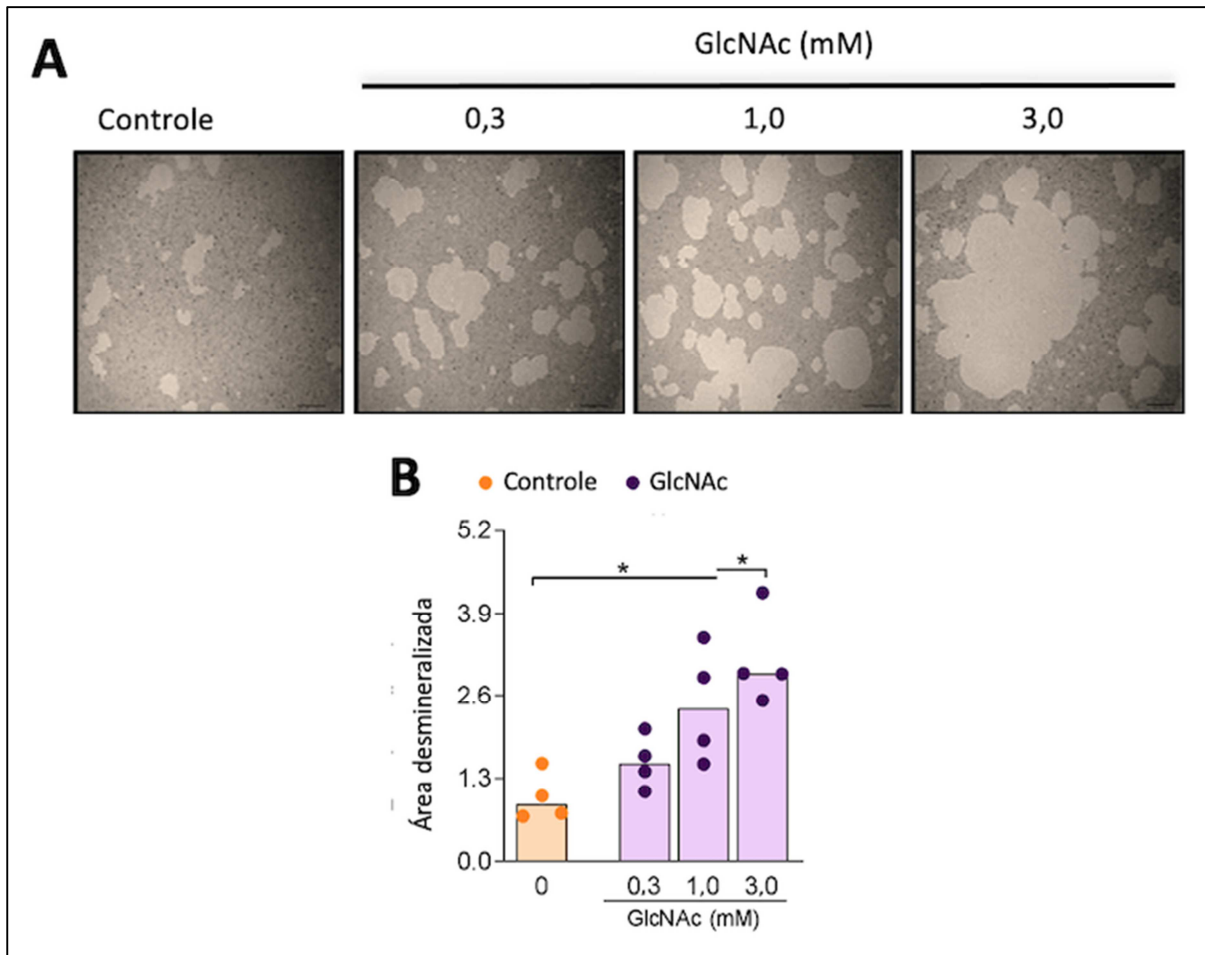
Em seguida, fomos avaliar se a O-GlcNAcilação modulava a diferenciação de osteoclastos. Para isso, realizamos uma cultura primária de osteoclastos na presença do monossacarídeo GlcNAc que é utilizado pela OGT durante a O-GlcNAcilação. O GlcNAc foi adicionado no dia 0 da cultura, em três concentrações diferentes (0,3; 1,0 e 3,0 mM) . Após quatro dias de cultura, as células foram fixadas e coradas com TRAcP, onde conseguimos notar osteoclastos bem maiores no grupo com GlcNAc na concentração de 3 mM (Figura 2A). As células TRAcP-positivas (osteoclastos) foram quantificadas (Figura 2B), e para a nossa surpresa, não houve diferença no número absoluto de osteoclastos diferenciados entre os grupos tratados com GlcNAc e o grupo controle. No entanto, pelas imagens da figura 2A observamos que os osteoclastos estavam maiores e com mais núcleos no grupo tratado com GlcNAc (3 mM). Portanto, realizamos a quantificação da área dos osteoclastos formados (Figura 2C) e a média de núcleos por osteoclasto. Os dados mostram que realmente o GlcNAc estimulou a fusão entre os pré-osteoclastos/osteoclastos uma vez que a área e o número de núcleos por osteoclasto foi significativamente maior que o grupo controle (Figura 2C e 2D). E esse efeito foi revertido na presença do inibidor de OGT (5SGlcNAc).

**Figura 2. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de GlcNAc.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por quatro dias, estimulados com GlcNAc (0,3; 1 e 3 mM) – barra em lilás ou GlcNAc e 5sGlcNAc – barra em azul, e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAcP-positivas por poço. Foi utilizado o One-way ANOVA para comparação dos grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-way ANOVA. \* $p < 0.05$ . (D) O gráfico indica o índice de fusão que foi determinado pela contagem do número total de núcleos em 9 campos diferentes e divididos pelo número total de osteoclastos dos mesmos campos. A análise estatística da comparação entre os grupos Controle e GlcNAc (3 mM) foi realizada pelo teste de Mann-Whitney, \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Os dados são representativos de três experimentos independentes.



Concomitantemente, avaliamos se o GlcNAc exercia efeito sobre a capacidade de desmineralização dos osteoclastos. Para este fim, os pré-osteoclastos foram cultivados em placa contendo hidroxiapatita e na presença do GlcNAc a 0,3; 1 e 3 mM. Importante destacar que as áreas mais claras nas figuras indicam as lacunas de desmineralização formadas pelos osteoclastos (Figura 3A). Ao medir a desmineralização, observamos que a área é maior nos grupos tratados com GlcNAc, sugerindo que o GlcNAc também estimula um aumento de atividade dos osteoclastos. Além disso, esse aumento foi dependente da dose, ou seja, conforme aumentamos a dose de GlcNAc, mais os osteoclastos ficaram ativos e maior foi a área de desmineralização (Figura 3B).

**Figura 3. Avaliação da atividade desmineralizadora dos osteoclastos na presença de GlcNAc.** (A) Áreas mais claras indicam a desmineralização da hidroxiapatita, onde os pré-osteoclastos foram cultivados por cinco dias. Os poços foram fotografados no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu\text{m}$ . (B) O gráfico representa a área de desmineralização mensurada e normalizada com o grupo controle e dada em  $\text{mm}^2$ . A análise estatística foi realizada pelo teste de *Kruskal-Wallis* combinado ao pós-teste de *Dunn's multiple comparison*, onde  $*p < 0,05$ .



### 4.3 A inibição de OGT prejudica a diferenciação dos osteoclastos

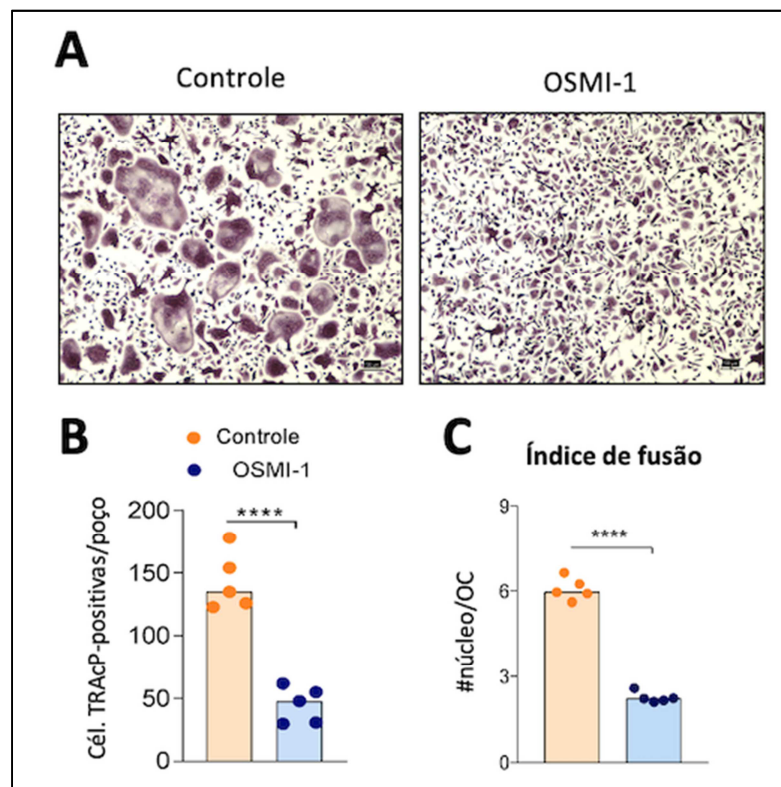
O próximo passo foi confirmar o efeito da inibição da O-GlcNAcilação na diferenciação dos osteoclastos *in vitro*. Para isso, foi utilizado um inibidor da enzima OGT, que é a responsável pelo processo de O-GlcNAcilação de proteínas. Quando adicionamos o inibidor da OGT (OSMI-1) na cultura de osteoclastos, observamos que houve uma inibição no processo de diferenciação de osteoclastos (Fig. 4A). Ao quantificar o número de osteoclastos, o grupo tratado com OSMI-1 apresentou um número significativamente menor que o grupo controle (Figura 4B).

O processo natural da osteoclastogênese consiste em diversos processos de fusão entre células mononucleadas e/ou multinucleadas, ou seja, para os osteoclastos se tornarem células maduras é necessário que as células se aproximem



uma das outras e tenham um rearranjo do citoesqueleto (PEREIRA *et al.*, 2018). Essa reorganização do citoesqueleto consiste na formação do anel de actina e emissão de podossomos e filopódios, que são prolongamentos finos de actina que auxiliam no aumento da superfície de contato entre as células facilitando a aproximação entre elas e posteriormente a fusão (SONG *et al.*, 2014; OIKAWA *et al.*, 2018). Assim, o comprometimento de qualquer uma dessas etapas prejudicaria a fusão entre os pré-osteoclastos e conseqüentemente a diferenciação dos osteoclastos. Sendo assim, avaliamos também a média de núcleos por osteoclasto nos grupos Controle e tratados com OSMI-1. A figura 4C mostra que, na presença de OSMI-1 os osteoclastos apresentaram menos núcleos quando comparados com o grupo Controle. Esses dados reforçam que a O-GlcNAcilação é importante para a diferenciação dos osteoclastos, tendo um efeito crucial na fusão dos pré-osteoclastos/osteoclastos.

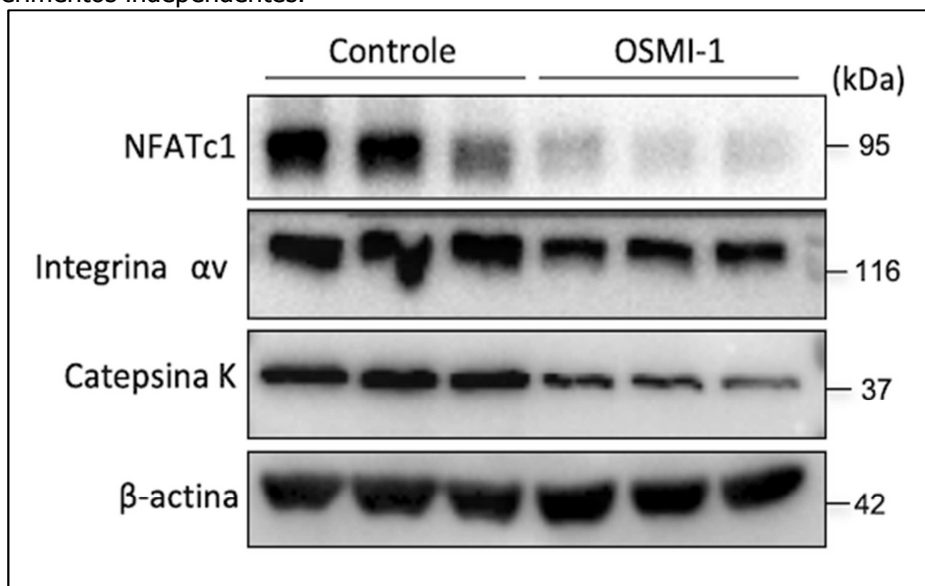
**Figura 4. Avaliação do efeito do inibidor de OGT na osteoclastogênese.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados na presença ou ausência do inibidor de OGT - OSMI-1. As imagens foram obtidas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a contagem do número total de osteoclastos por poço. (C) O gráfico do índice de fusão foi determinado pela divisão do número total de núcleos pelo número total de osteoclastos. A análise estatística da comparação entre os grupos Controle e OSMI-1 foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Dados representativos de três experimentos independentes.



#### 4.4 A O-GlcNAcilação estimula a expressão de marcadores importantes para a diferenciação e ativação dos osteoclastos

Considerando o efeito da O-GlcNAcilação estimulando a osteoclastogênese, avaliamos se essa inibição da osteoclastogênese por OSMI-1 estaria relacionada com a diminuição da expressão proteica de alguns marcadores “chave” dos osteoclastos como o NFATc1, que é o principal fator de transcrição da osteoclastogênese; Integrina  $\alpha$ v, que é responsável tanto pela adesão dos pré-osteoclastos entre si durante o processo de fusão quanto pela adesão dos osteoclastos na própria matriz óssea; e a Catepsina K, que é o principal marcador de atividade dos osteoclastos. Como podemos observar na figura 5, a menor diferenciação dos osteoclastos *in vitro* estava relacionada com uma redução da expressão de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K em 72 horas de diferenciação.

**Figura 5. Avaliação da expressão de marcadores de osteoclastos na presença de OSMI-1 por Western blot.** Imagem da expressão proteica de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (controle) e nos osteoclastos cultivados na presença de OSMI-1. A  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.

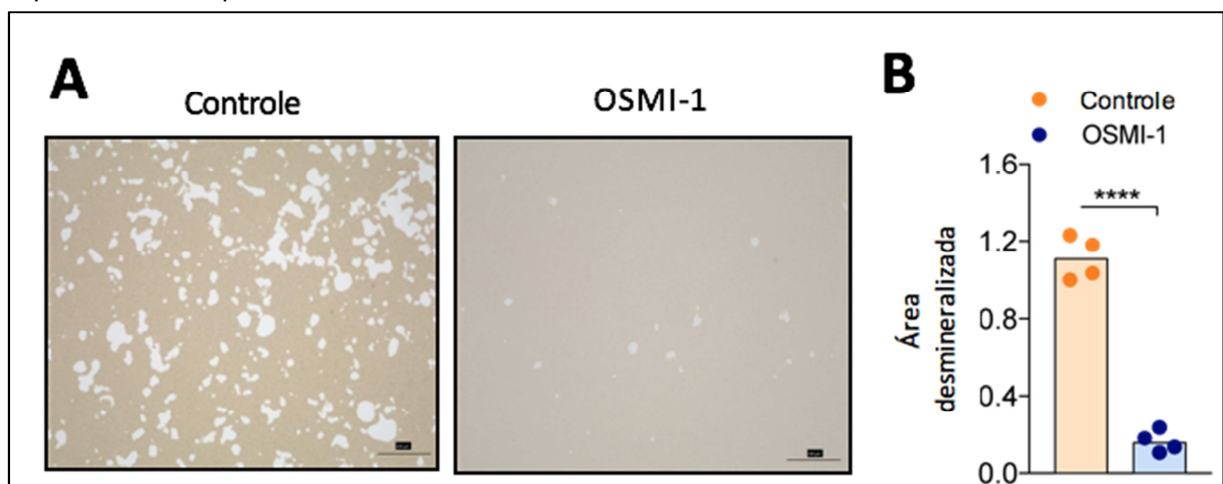


#### 4.5 A inibição de OGT compromete a capacidade desmineralizadora dos osteoclastos

A etapa seguinte foi avaliar se a inibição de OGT teria algum efeito no processo de desmineralização dos osteoclastos. Para isso, os pré-osteoclastos foram cultivados em meio osteoclastogênico em uma placa de cultura contendo

hidroxiapatita no fundo do poço, que é um constituinte mineral natural encontrado no tecido ósseo. Na figura abaixo (Figura 6A) podemos observar as lacunas de desmineralização formadas pelos osteoclastos após oito dias de cultivo. Ainda, observando esta mesma figura, é notório que o tratamento com OSMI-1 inibiu os osteoclastos a formarem essas lacunas. Ao quantificar as áreas de desmineralização, foi possível confirmar que o OSMI-1 inibe a capacidade desmineralizadora dos osteoclastos (Figura 6B). Em conjunto, os dados acima mostram que a O-GlcNAcilação também é importante para a atividade dos osteoclastos.

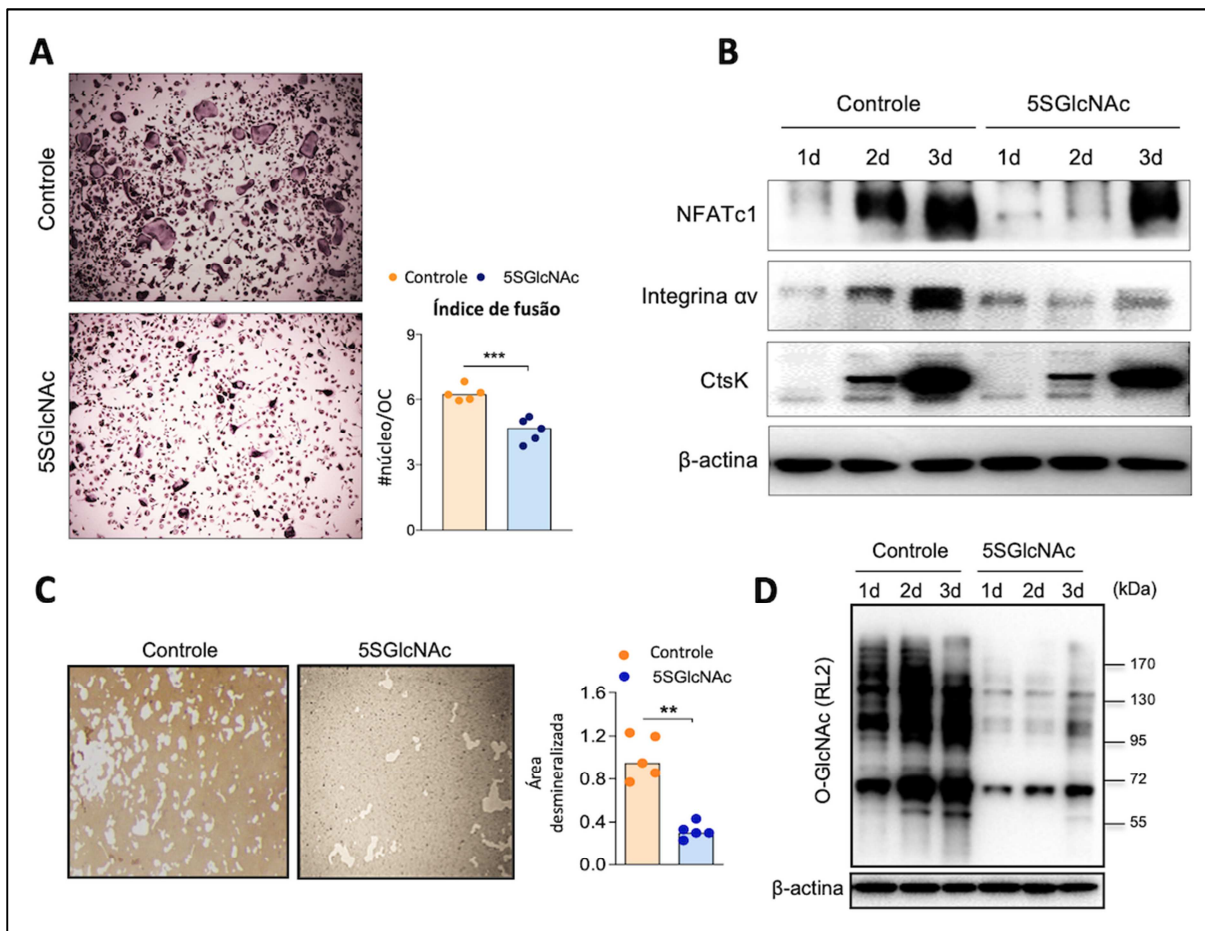
**Figura 6. Determinação da capacidade desmineralizadora dos osteoclastos na presença de OSMI-1.** (A) Imagens representativas dos poços contendo hidroxiapatita após oito dias de cultura. O grupo controle representa os osteoclastos que foram cultivados no meio osteoclastogênico e o grupo OSMI-1, aqueles que foram tratados com o inibidor da OGT. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico indica a medida da área desmineralizada ( $\text{mm}^2$ ) que foi calculada pela normalização em relação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*, onde \*\*\*\* $p < 0,0001$ . (n=4). Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.



Para confirmar os efeitos da inibição de OGT sobre a formação e função de osteoclastos, avaliamos também o efeito de outro inibidor da OGT, o 5SGlcNAc. Da mesma forma, ao adicionar o 5SGlcNAc no dia 0 da cultura de osteoclastos murino, houve uma redução na diferenciação dos osteoclastos (Figura 7A). Ainda, podemos observar uma redução significativa no número de núcleos por osteoclastos, mostrando que 5SGlcNAc também prejudicou a fusão dos osteoclastos. Esses resultados ainda estavam relacionados com uma menor expressão de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K, com destaque a partir do segundo dia pós estímulo com RANKL (Figura 7B). Ademais, a atividade desmineralizadora dos osteoclastos também

foi prejudicada com o tratamento com 5SGlcNAc (Figura 7C). Por último, vimos que o 5SGlcNAc inibiu a O-GlcNAcilação de proteínas durante a osteoclastogênese (Figura 7D). Isso nos mostra que o efeito do 5SGlcNAc inibe a O-GlcNAcilação de proteínas durante a osteoclastogênese, impactando assim a fusão e a atividade dos osteoclastos.

**Figura 7. Avaliação do efeito do inibidor de OGT na diferenciação e atividade dos osteoclastos.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados na presença ou ausência do inibidor de OGT - 5SGlcNAc. As imagens foram obtidas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ m. O gráfico do índice de fusão foi determinado pela divisão do número total de núcleos pelo número total de osteoclastos. A análise estatística da comparação entre os grupos Controle e 5SGlcNAc foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \*\*\* $p < 0.001$ . (n=5). (B) Imagem da expressão proteica de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (controle) e nos osteoclastos cultivados na presença de 5SGlcNAc. A  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. (C) Imagens representativas dos poços contendo hidróxiapatita após cinco dias de cultura. O grupo controle representa os osteoclastos que foram cultivados no meio osteoclastogênico e o grupo 5SGlcNAc, aqueles que foram tratados com o inibidor da OGT. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. O gráfico indica a medida da área desmineralizada ( $\text{mm}^2$ ) que foi calculada pela normalização em relação ao grupo controle. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*, onde \*\* $p < 0,01$ . (n=5). (D) Imagem da expressão proteica de RL2 nos osteoclastos cultivados em meio osteoclastogênico (controle) e nos osteoclastos cultivados na presença de 5SGlcNAc. A  $\beta$ -actina foi usada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.

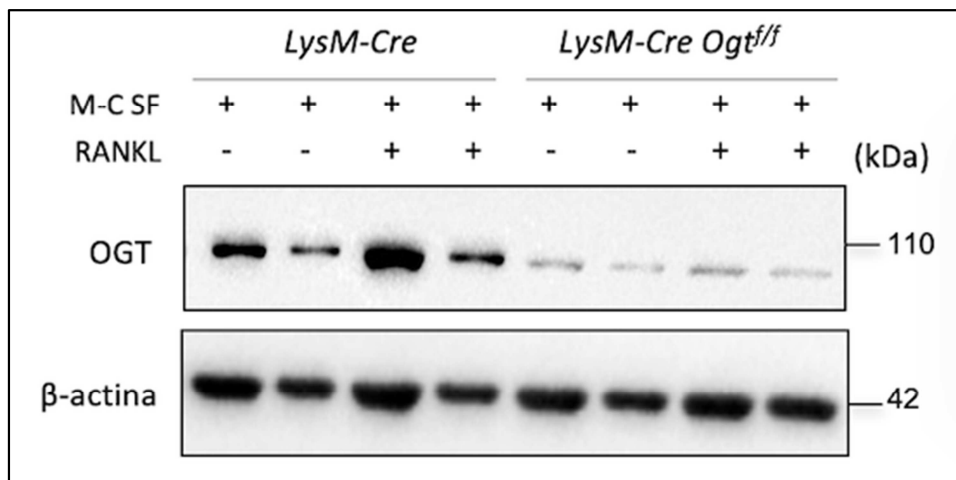


#### 4.6 A deleção seletiva de OGT nos precursores de osteoclastos inibiu a diferenciação dos osteoclastos

Visto que a inibição farmacológica da OGT reduziu a osteoclastogênese, fomos avaliar se a deleção seletiva de OGT nos precursores de osteoclastos também afetaria a diferenciação e a atividade dos osteoclastos. Para isso, utilizamos a medula óssea de camundongos deficientes para OGT especificamente nos monócitos (*LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*) e seus controles *LysM-Cre* para realizar a cultura de osteoclastos.

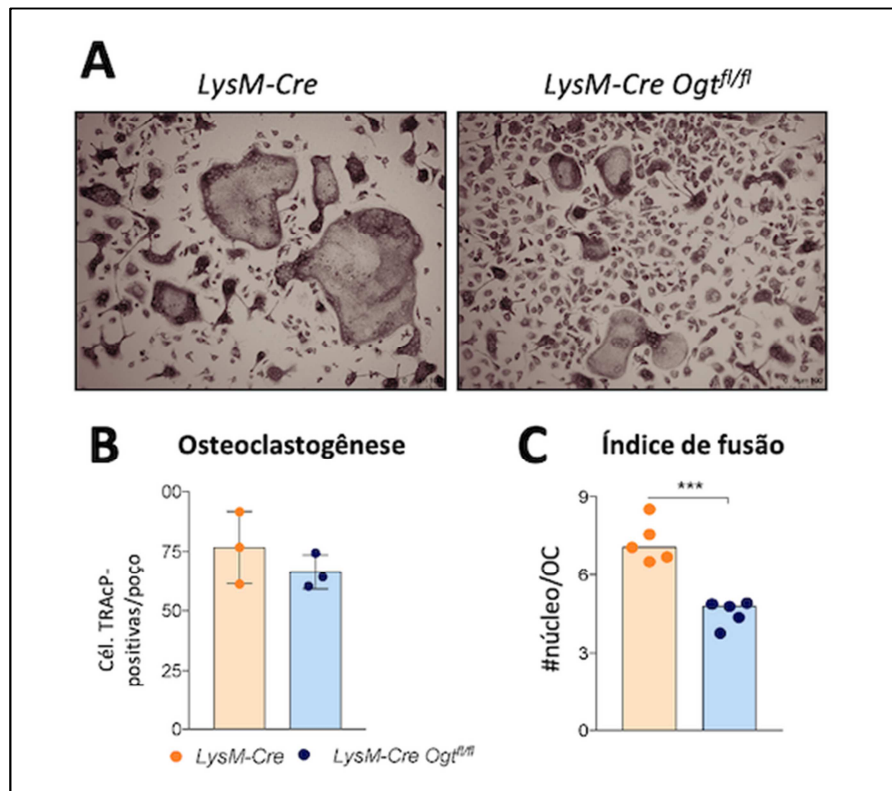
O primeiro passo foi confirmar a deleção de *Ogt* nos animais *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* durante a osteoclastogênese. Conforme esperado, após três dias de diferenciação, foi observado uma menor expressão de OGT no grupo *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* em ambos os grupos, estimulados apenas com M-CSF e com meio osteoclastogênico quando comparados ao grupo *LysM-Cre*, confirmando a deficiência seletiva de *Ogt* nesses camundongos (Figura 8).

**Figura 8. Avaliação da expressão de OGT por Western blot.** Imagens representativas da expressão de OGT nas células provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* estimuladas com M-CSF e em meio osteoclastogênico após três dias de diferenciação. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.



Após confirmar a deleção de *Ogt* nos animais *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*, fomos avaliar o efeito dessa deleção de *Ogt* na diferenciação dos osteoclastos. Após quatro dias de cultura, observou-se uma disparidade entre os osteoclastos derivados de animais *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* (Figura 9A). Embora o número de osteoclastos também não tenha sido diferente, o índice de fusão dos osteoclastos foi menor no grupo *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* (Figura 9B e 9C). Esses dados reforçam os dados que a O-GlcNAcilação exerce um papel crucial na diferenciação dos osteoclastos, apresentando um efeito importante na fusão dos osteoclastos.

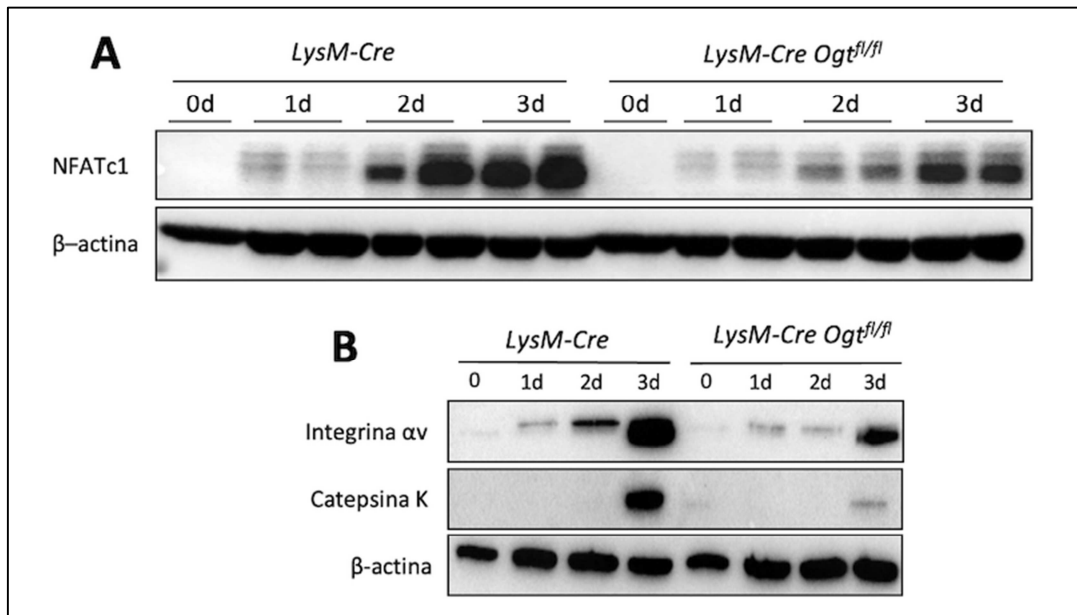
**Figura 9. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *Ogt* nos monócitos na osteoclastogênese.** (A) Imagens representativas de osteoclastos provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* após quatro dias de diferenciação. Os osteoclastos foram corados com TRAcP e fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico mostra o número total de osteoclastos por poço. (C) O gráfico representa o índice de fusão dos osteoclastos, calculados pela divisão do número total de núcleos pelo número total de osteoclastos. A análise estatística foi realizada pelo teste de *Mann-Whitney*, onde \*\*\* $p < 0.001$ . Esses resultados são representativos de três experimentos independentes.



O próximo passo foi avaliar se a deleção seletiva de *Ogt* estaria modulando a expressão dos marcadores osteoclastogênicos, como o NFATc1, Integrina  $\alpha$ V e Catepsina K. Ao avaliar a expressão do principal fator de transcrição da osteoclastogênese, o NFATc1, vimos que durante todo o processo de diferenciação a expressão de NFATc1 estava menor no grupo *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* em relação ao grupo controle (Figura 10A). Da mesma forma, quando avaliamos os principais marcadores de atividade do osteoclastos, Integrina  $\alpha$ V e Catepsina K, observamos que no dia 0 e 1 após a estimulação com RANKL, ambos os grupos apresentaram baixa expressão de Integrina  $\alpha$ V. No entanto, nos dias 2 e 3, o grupo *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* apresentou uma menor expressão proteica de Integrina  $\alpha$ V quando comparado ao grupo controle (Figura 10). Em relação a expressão de Catepsina K, foi observado a expressão deste marcador apenas no terceiro dia de diferenciação, apresentando também uma menor expressão no animal *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*.



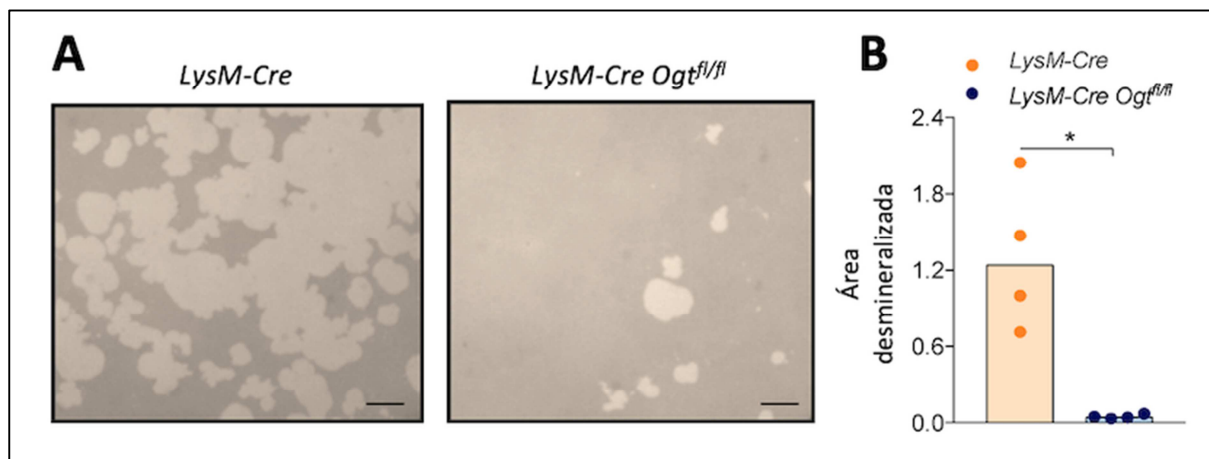
**Figura 10. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *Ogt* nos monócitos na expressão de marcadores de osteoclastos por *Western blot*.** (A) Imagens da expressão proteica de NFATc1 no lisado total de pré-osteoclastos/osteoclastos provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* nos tempos 0, 1, 2 e 3 dias de diferenciação. (B) Expressão proteica de Integrina  $\alpha$ V e Catepsina K no lisado total de pré-osteoclastos/osteoclastos provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. A  $\beta$ -actina foi utilizada como gene endógeno. Esses resultados são representativos de dois experimentos independentes.



#### 4.7 A deficiência de OGT nos monócitos prejudica a função de desmineralização dos osteoclastos

Em seguida, fomos investigar se a deficiência seletiva de *Ogt* nos monócitos impactaria na função dos osteoclastos. Assim, cultivamos as células provenientes de camundongos *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* em placa contendo hidroxiapatita para avaliar se a função desses osteoclastos também estariam sendo moduladas pela O-GlcNAcilação. Como podemos observar nas imagens, a deficiência de OGT em monócitos prejudicou a atividade dos osteoclastos, visto que houve poucas lacunas de desmineralização formadas na placa quando comparadas ao grupo controle (Figura 11A). De fato, ao quantificar a área total de desmineralização representadas por estas lacunas, observou-se uma redução significativa entre os grupos *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e *LysM-Cre* (Figura 11B). Esses dados também sugerem uma correlação positiva entre o número de núcleos e a atividade de reabsorção dos osteoclastos como visto previamente por PIPER *et al.*, 1992 e BOISSY *et al.*, 2002.

**Figura 11. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *Ogt* na capacidade desmineralizadora dos osteoclastos.** (A) Imagens representativas de lacunas de reabsorção em placa de hidroxiapatita realizadas pelos osteoclastos provenientes de animais *LysM-Cre* e *LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. Barra= 100  $\mu$ M. (B) A área total de desmineralização foi mensurada utilizando o programa LasX (Leica Microsystems) e normalizada com o grupo controle. A análise estatística foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \* $p < 0.05$ . Os experimentos são representativos de dois experimentos independentes.

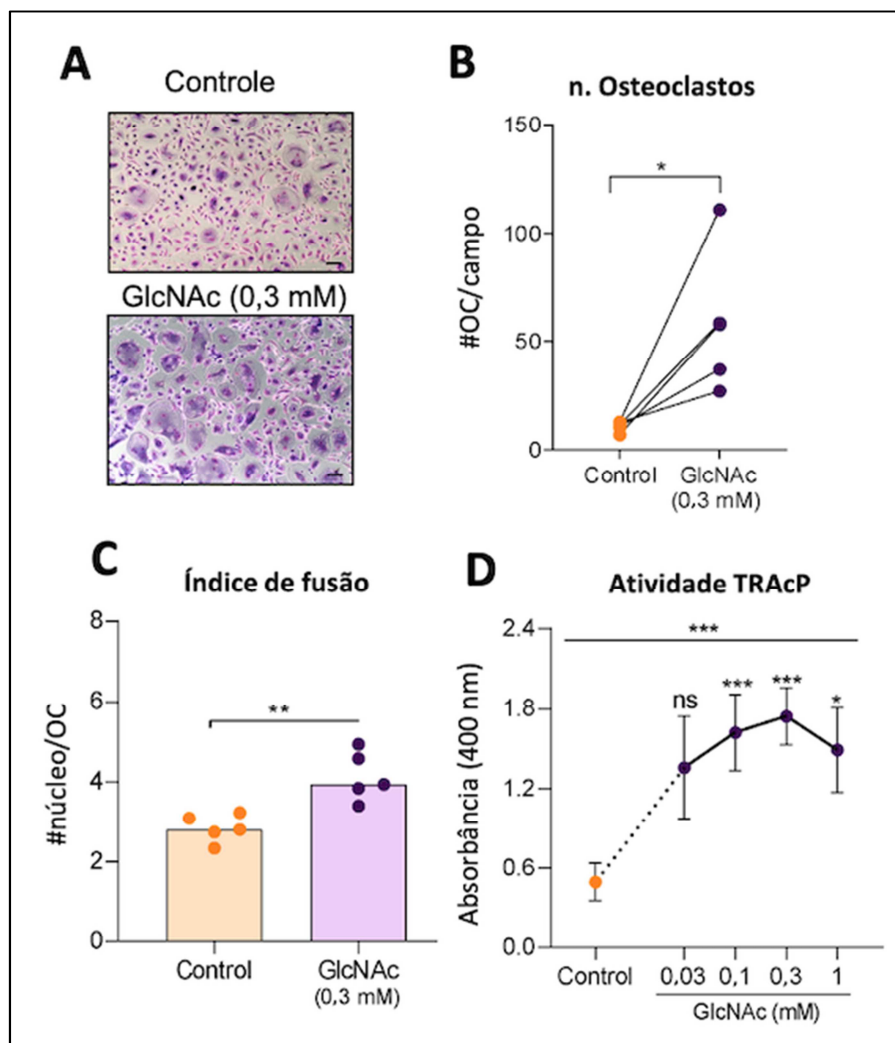


#### 4.8 A O-GlcNAcilação estimula a diferenciação dos osteoclastos humanos

Confirmado o efeito da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese e na atividade dos osteoclastos murinos, fomos avaliar se essa modificação também teria o mesmo efeito nos osteoclastos de origem humano. Para tal, fizemos uma cultura de osteoclastos humanos a partir de células CD14-positivas isoladas, as quais foram obtidas do sangue periférico de doadores voluntários. Ao adicionar o GlcNAc, no início da cultura, vimos que ele estimulou a diferenciação dos osteoclastos, uma vez que houve um aumento do número de células multinucleadas em relação ao grupo controle (Figura 12A e B). Esse efeito foi observado em cinco doadores diferentes (Figura 12B). Ainda, o GlcNAc estimulou um maior número de fusões entre os pré-osteoclastos quando comparados ao grupo controle, uma vez que os osteoclastos em presença de GlcNAc se apresentaram maiores e com maior quantidade de núcleos por osteoclasto (Figura 12C). Paralelamente a isso, os níveis de atividade de TRAcP mensurados no sobrenadante estavam aumentados nos grupos com GlcNAc de forma dose-dependente (Figura 12D).



**Figura 12. Avaliação do efeito do GlcNAc na diferenciação de osteoclastos humanos.** (A) Imagens representativas de osteoclastos corados após sete dias de diferenciação tratado com GlcNAc (0,3 mM) e seu respectivo controle. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ m (B) Quantificação do número de osteoclasto por campo (16 campos) na presença de GlcNAc em 5 experimentos independentes. Foi realizado o teste *t* pareado, onde  $*p < 0,05$ . (C) A média do número de núcleo por osteoclasto (índice de fusão) foi avaliado na presença do GlcNAc e comparado com o seu respectivo controle. A análise estatística utilizada foi o teste de *Mann Whitney*,  $**p < 0,01$ . (D) Atividade de TRAcP mensurada no meio condicionado dos osteoclastos tratados com GlcNAc e comparado com o seu controle. A barra representa a média  $\pm$  DP. A análise estatística foi feita utilizando o teste *Friedman* seguido do pós-teste de *Dunn's multiple comparison*.  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ .

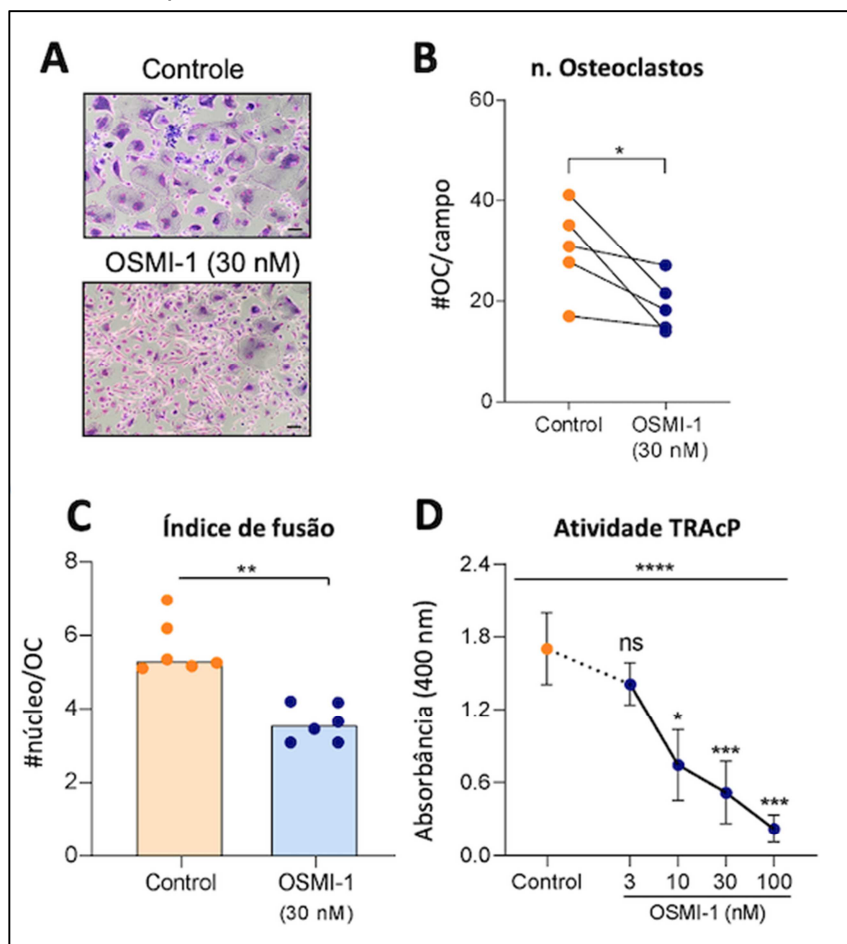


#### 4.9 A inibição farmacológica de OGT com OSMI-1 inibe a diferenciação dos osteoclastos humanos

Dado o mesmo efeito estimulatório do GlcNAc na osteoclastogênese proveniente de células humanas, fomos avaliar se a inibição da enzima OGT com OSMI-1 também causaria efeito inibitório nas células humanas. Como podemos ver na Figura 13A, a presença de OSMI-1 prejudicou a diferenciação dos osteoclastos humanos, que pode ser detectado pela menor média de osteoclastos por campo

(Figura 13B), assim como pela presença de osteoclastos com poucos núcleos (Figura 13C). Esses dados nos mostram que a O-GlcNAcilação também atua na diferenciação dos osteoclastos humanos ao induzir o processo de fusão entre os pré-osteoclastos/osteoclastos. Os níveis de TRAcP também foram reduzidos de forma dose-dependente na presença de OSMI-1 (Figura 13D).

**Figura 13. Avaliação da inibição farmacológica de *Ogt* na diferenciação de osteoclastos humanos.** (A) Imagens representativas de osteoclastos corados após sete dias de diferenciação tratado com OSMI-1 (30 nM) e seu respectivo controle. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra= 100  $\mu$ M (B) Quantificação do número de osteoclasto por campo (16 campos) na presença de OSMI-1 em 5 experimentos independentes. Foi realizado o teste *t* pareado, onde  $*p < 0,05$ . (C) A média do número de núcleo por osteoclasto (índice de fusão) foi avaliado na presença do OSMI-1 e comparado com o seu respectivo controle. A análise estatística utilizada foi o teste de *Mann Whitney*,  $**p < 0.01$ . (D) Atividade de TRAcP mensurada no meio condicionado dos osteoclastos tratados com OSMI-1 e comparado com o seu controle. A barra representa a média  $\pm$  DP. A análise estatística foi feita utilizando o teste *Friedman* seguido do pós-teste de *Dunn's multiple comparison*.  $*p < 0,05$ ,  $***p < 0.001$ ,  $****p < 0.0001$ .

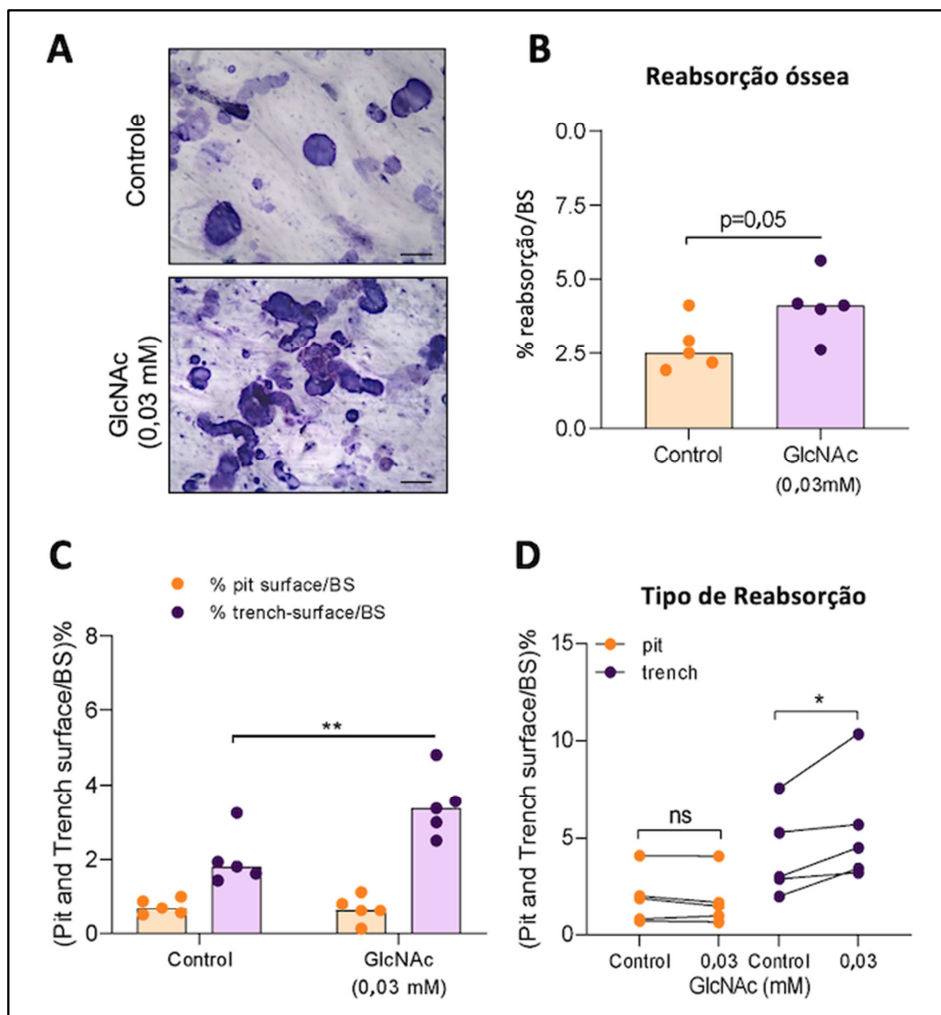


#### **4.10 A O-GlcNAcilação estimula o aumento da atividade dos osteoclastos humanos, impulsionando-os a reabsorverem de modo mais agressivo**

Estudos prévios já demonstraram que os osteoclastos podem reabsorver de duas formas, formando *pits* ou *trenches*. Enquanto os *pits* correspondem a escavações redondas, de pequeno diâmetro, os *trenches* são escavações longas e profundas realizadas pelos osteoclastos mais ativos e mais agressivos (SØE; DELAISSÈ, 2017). Com o intuito de avaliar o efeito da O-GlcNAcilação na atividade dos osteoclastos humanos, cultivamos os osteoclastos em meio osteoclastogênico em garrafas de cultura por sete dias e após a sua diferenciação, esses osteoclastos “maduros” foram replaqueados sobre discos de osso bovino de 0,4mm de espessura na presença de GlcNAc ou OSMI-1. As imagens dos discos de osso com as lacunas de reabsorção coradas com Azul de toluidina a 0,5% nos mostram que, após 3 dias de estímulo, o grupo GlcNAc apresentou lacunas maiores de reabsorção quando comparadas ao grupo controle (Figura 14A). Ao quantificar a porcentagem de reabsorções na superfície total do disco de osso, podemos confirmar que o GlcNAc elevou a atividade dos osteoclastos (Figura 14B). Curiosamente, a suplementação de GlcNAc levou a um aumento específico de apenas um tipo de reabsorção, *dos trenches* (Figura 14C). Esse efeito também foi confirmado em cinco doadores de sangue diferentes (Figura 14D).

**Figura 14. Análise da capacidade de reabsorção dos osteoclastos na presença de GlcNAc.**

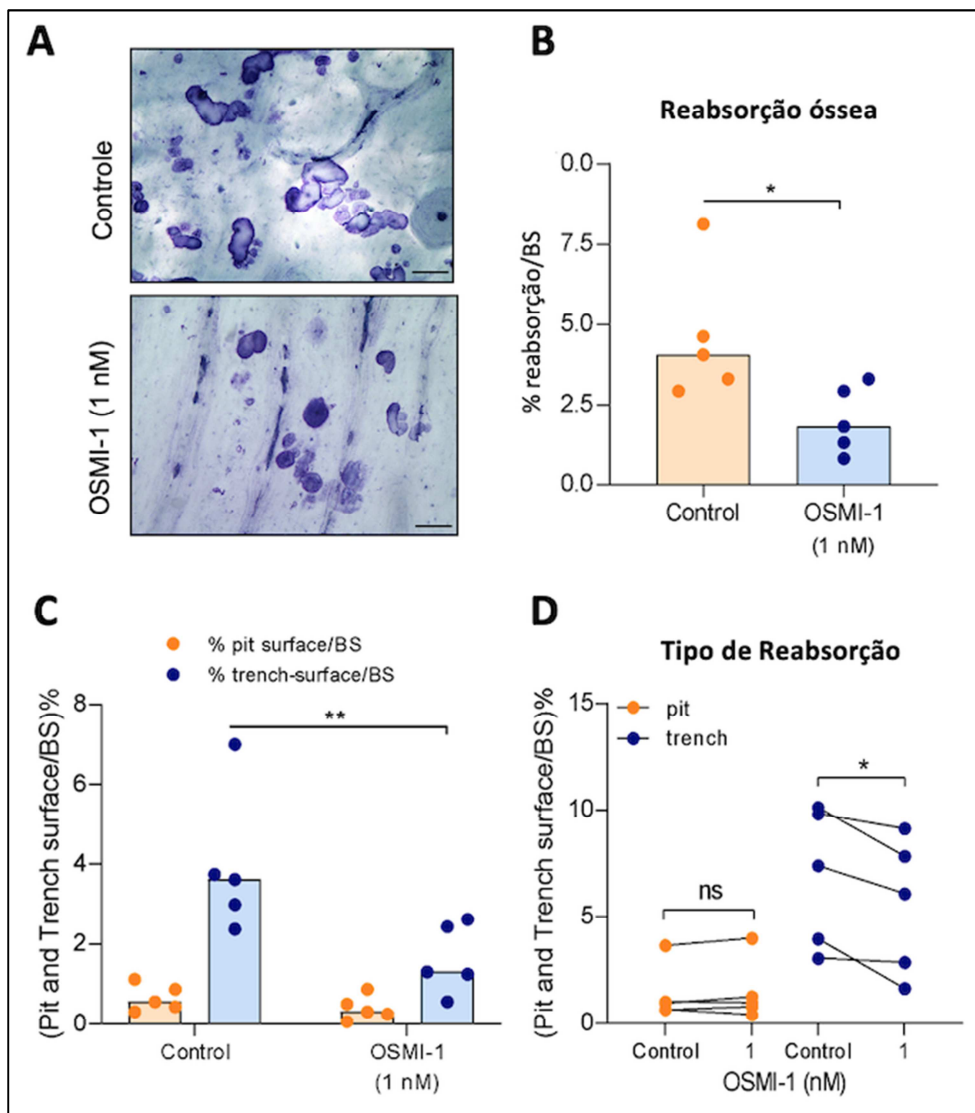
(A) Imagens representativas das lacunas de reabsorção coradas com Azul de toluidina após três dias de plaqueamento de osteoclastos maduros sobre os discos de osso na presença ou ausência de GlcNAc (0,03 mM). (B) O gráfico representa a porcentagem de reabsorção por superfície óssea, dada pela contagem em 16 áreas do disco de osso usando um graticulo de 100-pontos acoplado na ocular do microscópio. O grupo com GlcNAc foi comparado ao seu controle utilizando o teste de Mann Whitney. (n=5). (C) Gráfico representando a formação de *pit* e *trench* nos grupos com GlcNAc e controle. Foi utilizada a análise estatística de *two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnett's multiple comparison*. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ . (D) A formação de *pit* e *trench* realizado pelos osteoclastos tratados com GlcNAc foram comparados com seus respectivos controles em cinco experimentos utilizando células de diferentes doadores. Foi realizado o teste *t* pareado, onde \* $p < 0,05$ .



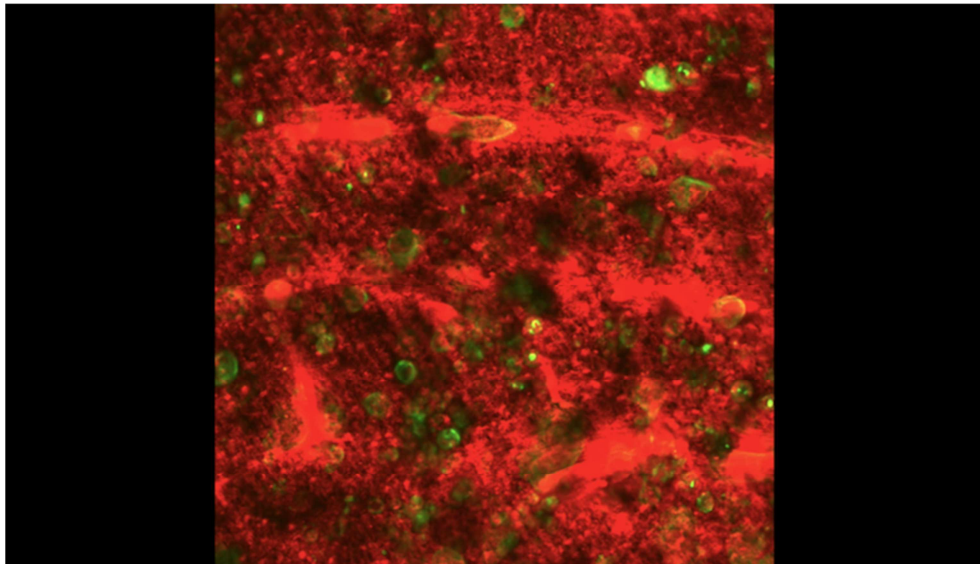
Dando seguimento, também avaliamos a atividade dos osteoclastos na presença de OSMI-1. A presença de OSMI-1 em baixa concentração (1nM) foi o suficiente para inibir os eventos de reabsorção dado pelos osteoclastos maduros, apresentando assim uma menor porcentagem de reabsorção por superfície óssea (Figura 15A e B). Além do mais, a adição de OSMI-1 inibiu a formação de *trenches*, enquanto não afetou a reabsorção do tipo *pit* (Figura 15C). Esses resultados também foram confirmados em cinco experimentos independentes (Figura 15D).

Com o intuito de visualizar melhor o comportamento reabsortivo dos osteoclastos na presença do GlcNAc e OSMI-1, foram gravados vídeos no modo *time-lapse*. Com essas gravações, observamos que a O-GlcNAcilação estimula os osteoclastos a ficarem mais ativos e reabsorverem de forma mais rápida enquanto ele se move pelo disco de osso. O Vídeo 1 mostra os osteoclastos maduros realizando escavações em *pit* e em *trench* no grupo Controle. Subsequentemente, na presença do GlcNAc, podemos observar os osteoclastos fazendo escavações longas e contínuas enquanto se movem sobre a superfície óssea. Por fim, o vídeo finaliza mostrando o efeito inibitório do OSMI-1 nas escavações do tipo *trench*, uma vez que a maioria dos osteoclastos se encontram imóveis e reabsorvendo em forma de *pit*. De modo geral, esses experimentos comprovam que a O-GlcNAcilação controlam não só a diferenciação e a fusão dos osteoclastos, como também determina um modo de reabsorção mais agressivo pelos osteoclastos.

**Figura 15. Avaliação da capacidade reabsortiva dos osteoclastos na presença do inibidor OSMI-1.** (A) Imagens representativas das lacunas de reabsorção coradas com Azul de toluidina após três dias de plaqueamento de osteoclastos maduros sobre os discos de osso na presença ou ausência de OSMI-1 (1 nM). (B) A porcentagem de reabsorção por superfície óssea foi dada pela contagem de lacunas em 16 áreas do disco de osso usando um graticulo de 100-pontos acoplado na ocular do microscópio. O grupo com OSMI-1 foi comparado ao seu controle utilizando o teste de Mann Whitney. (n=5). (C) As lacunas de reabsorção foram subdivididas em *pit* e *trench* e quantificadas (porcentagem de *pit* e *trench*/ superfície óssea) nos grupos com OSMI-1 e controle. Foi realizada a análise estatística de *two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Dunnnett's multiple comparison*. \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001. (D) A formação de *pit* e *trench* realizado pelos osteoclastos tratados com OSMI-1 foram comparados com seus respectivos controles em 5 experimentos utilizando células de diferentes doadores. Foi realizado o teste *t* pareado, onde \*p<0,05.



**Vídeo 1. (Arquivo separado).** Osteoclastos maduros corados com *SiR-actin* (verde) na presença de *Verapamil* (como descrito em Søre e Delaisse, 2017) e colocados em discos de osso corados com rodamina (vermelho) na presença de M-CSF e RANKL por três dias. Área representativa dos osteoclastos fazendo escavações no grupo Controle, seguido dos osteoclastos tratados com GlcNAc (0,03 mM) e finalizando com o grupo OSMI-1 (1nM). As imagens foram tiradas a cada 20 minutos e o tempo de gravação foi de aproximadamente 72 horas.



#### 4.11 A O-GlcNAcilação é importante para a homeostase óssea

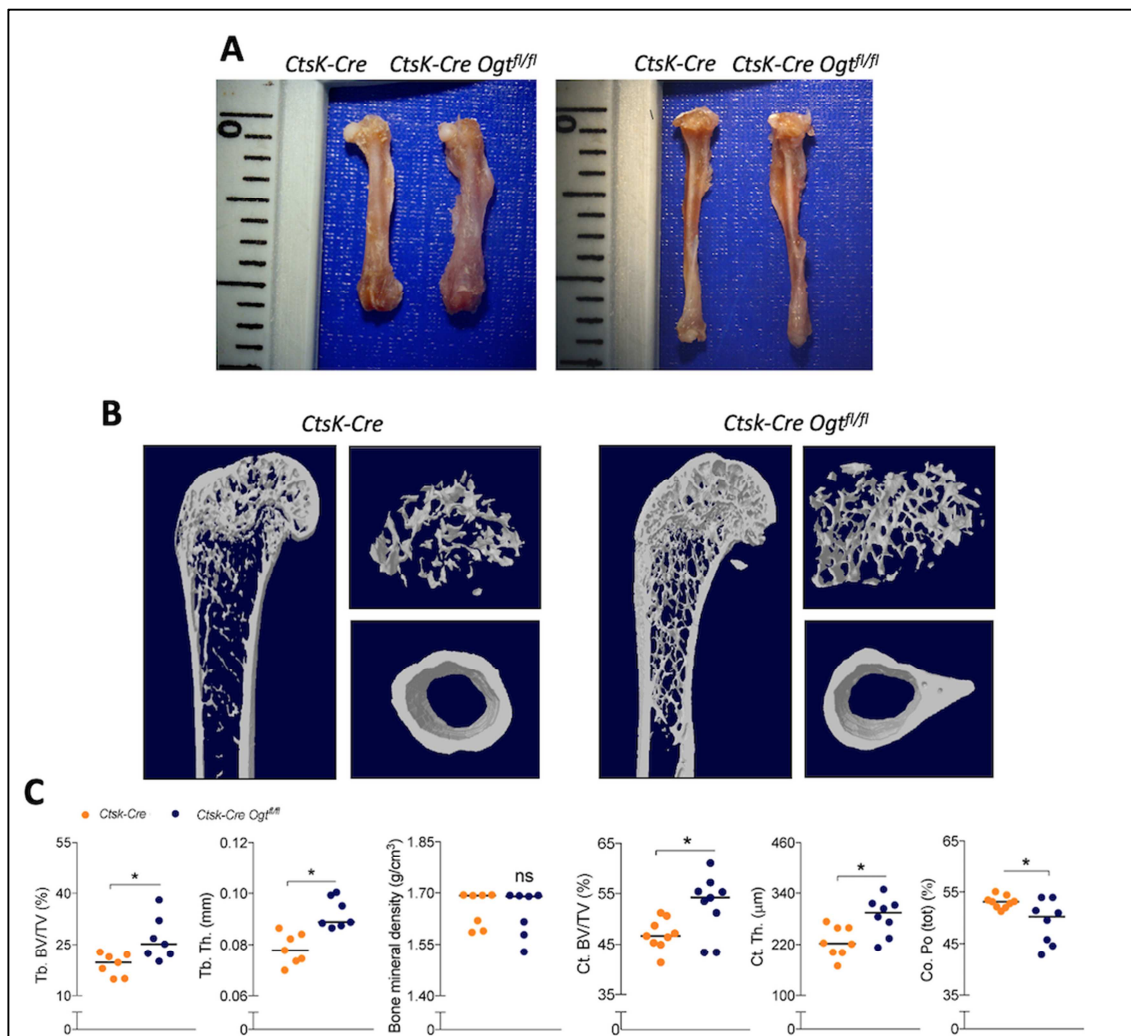
Os dados até o momento mostram que a O-GlcNAcilação tem um papel importante na diferenciação e na função dos osteoclastos *in vitro* tanto de origem murino quanto de humano. Por conseguinte, o próximo passo foi avaliar se a deleção seletiva de *Ogt* nos osteoclastos implicaria em alguma condição fisiológica nos camundongos. Para isso, os camundongos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e seus controles *CtsK-Cre* foram eutanasiados e tiveram seus fêmures dissecados e limpos com 16 semanas de idade, que equivale à fase onde já se inicia um declínio da massa óssea femoral (HALLORAN *et al.*, 2002). A análise morfológica dos fêmures mostrou que o animais *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* apresentaram uma formação de um calo ósseo na região de diáfase, demonstrando uma leve osteopetrose (Figura 16A).

Para avaliar as estruturas ósseas com mais detalhes, os fêmures foram submetidos a um escaneamento de microtomografia computadorizada. As imagens mostram secções reconstruídas da região de epífise proximal e cortes tridimensionais da região trabecular e cortical dos camundongos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e controle (Figura 16B). Assim, foi possível realizar uma análise tridimensional dos parâmetros ósseos corticais e trabeculares dos mesmos. Como podemos observar na figura 14C, a deleção seletiva de *OGT* nos osteoclastos a longo prazo induziu a um aumento do



volume ósseo trabecular (BV/TV mm<sup>3</sup>) e da espessura trabecular (Tb. Th) quando comparados com os animais controles, embora os valores de densidade mineral óssea tenham sido semelhantes. Da mesma forma, o volume ósseo cortical (BV/TV mm<sup>3</sup>) e a espessura cortical (Co. Th) também estavam maiores nos animais *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*, seguidos de uma menor porosidade óssea (PO. tot %) quando comparados com os animais *CtsK-Cre* (Figura 16C). Juntos, esses resultados mostram que a O-GlcNAcilação é crucial no processo de remodelamento ósseo fisiológico tanto a nível trabecular quanto cortical.

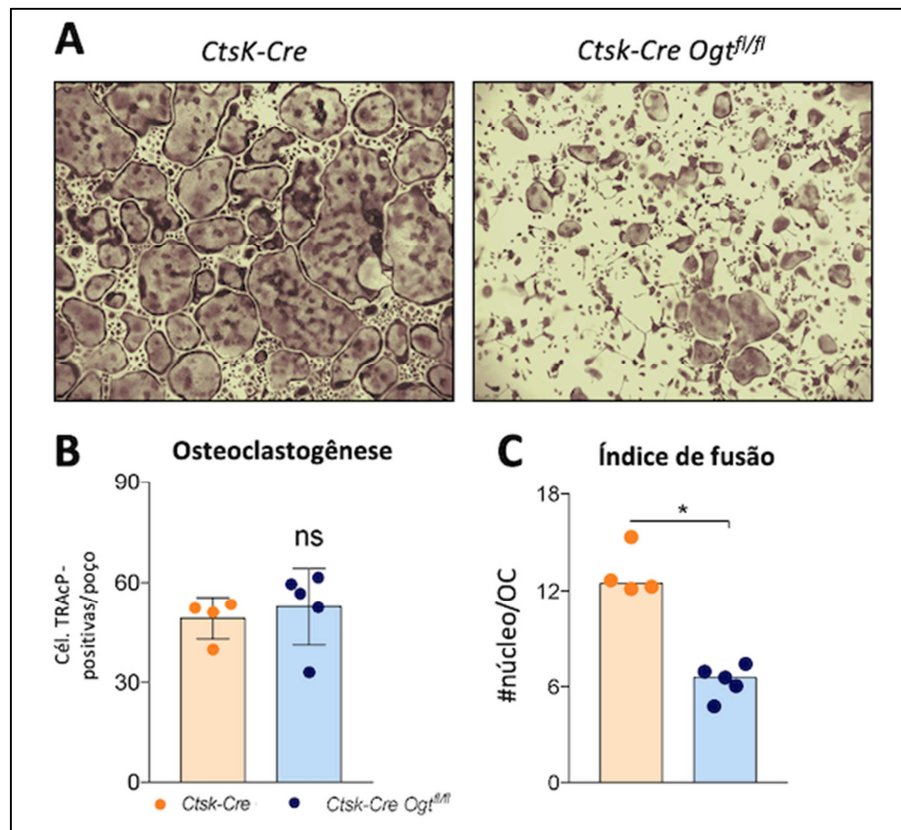
**Figura 16. Avaliação do impacto da deleção seletiva de OGT nos osteoclastos sobre o remodelamento ósseo *in vivo*.** (A) Foto representativa de fêmures e tíbias de camundongos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* coletados com 16 semanas de idade. (B) Imagens tridimensionais de microtomografia dos fêmures dos animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. As imagens mostram os cortes sagitais dos fêmures ao lado dos cortes trabeculares e corticais. (C) Porcentagem do volume ósseo trabecular sobre o tecido avaliado (BV/TV). Espessura trabecular (Tb.Th) em mm. Densidade mineral óssea trabecular (g/cm<sup>3</sup>). Porcentagem do volume ósseo cortical sobre o tecido avaliado (BV/TV). Espessamento cortical (Ct. Th) em mm. Porcentagem de porosidade cortical total (PO tot). A análise estatística utilizada foi o teste "t" de Student, onde \*p<0,05. (n=7-9).





Previamente já demonstramos que a deleção de *OGT* nos precursores de osteoclastos afeta a osteoclastogênese. No entanto, considerando esse efeito da deleção seletiva de *OGT* nos osteoclastos sobre o remodelamento ósseo *in vivo*, fomos verificar se essa deleção de *OGT* nos osteoclastos, também afetariam a diferenciação dos osteoclastos *in vitro*. Como podemos ver na Figura 17A, houve uma redução significativa no tamanho dos osteoclastos derivados de células deficientes da enzima *Ogt* em osteoclastos quando comparados ao grupo controle. Embora o número de osteoclastos não tenha sido alterado pela deleção seletiva de *OGT* nos osteoclastos, a média de núcleos por osteoclastos apresentou uma significativa redução nos animais *Ctsk-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* (Figura 17B e 17C), mostrando que a deleção seletiva de *OGT* nos osteoclastos também inibe a fusão entre os pré-osteoclastos/osteoclastos.

**Figura 17. Avaliação do efeito da deleção seletiva de *OGT* nos osteoclastos sobre a osteoclastogênese.** (A) Imagens representativas dos osteoclastos provenientes da medula óssea de camundongos *Ctsk-Cre* e *Ctsk-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* corados em TRAP, após 4 dias de cultura. As imagens foram fotografadas no aumento de 100x. Barra = 100  $\mu$ m. (B) O gráfico representa a quantificação do número total de osteoclastos por poço. (C) Gráfico representativo do índice de fusão obtido através da contagem do número total de núcleos e dividido pelo número total de osteoclastos. A análise estatística da comparação entre os grupos *Ctsk-Cre* e *Ctsk-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* foi dada pelo teste de *Mann-Whitney*, \* $p < 0,05$ . Dados representativos de três experimentos independentes.



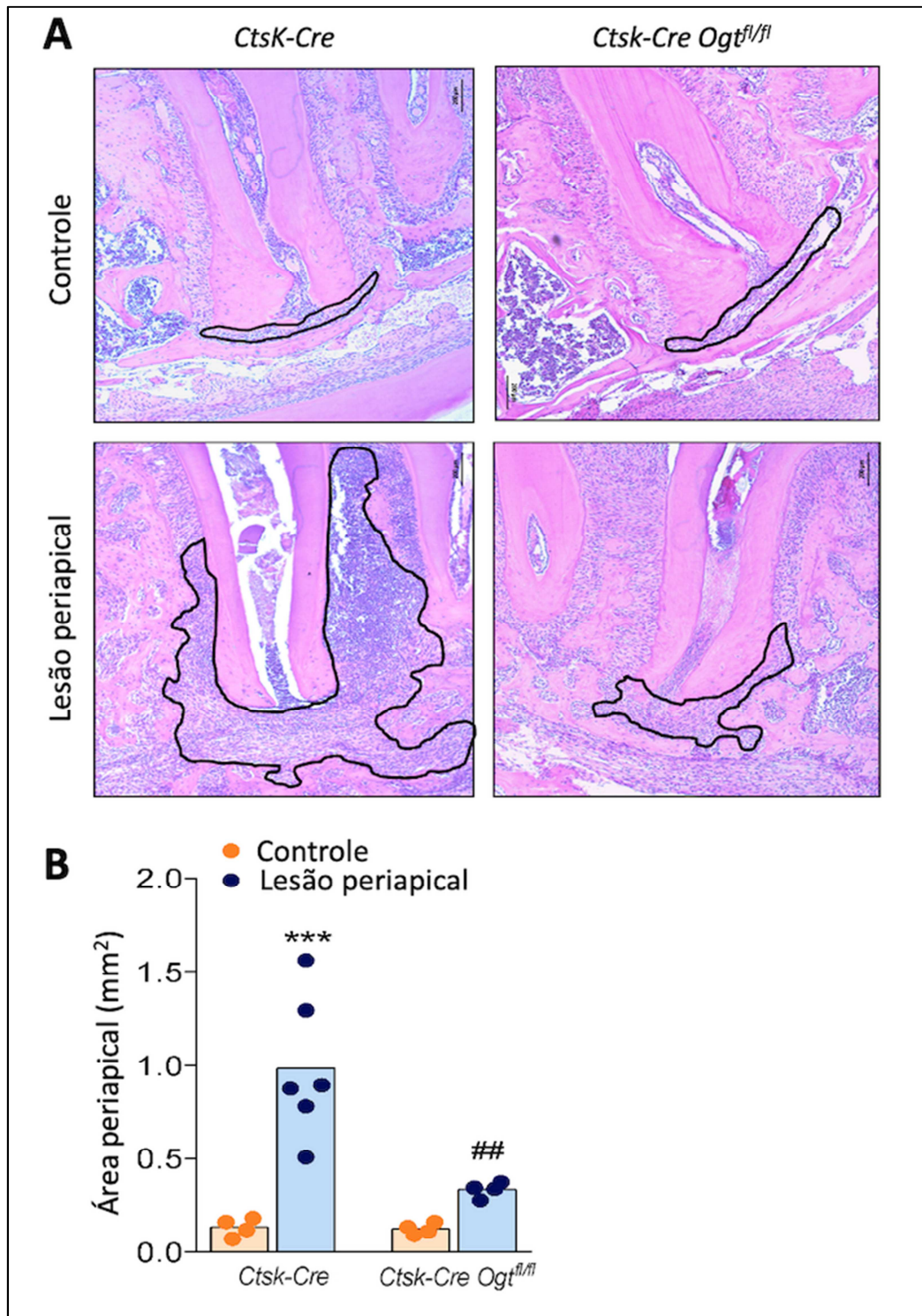
#### 4.12 A O-GlcNAcilação tem um papel importante no desenvolvimento da lesão periapical experimental

Até o momento, foi demonstrado que a O-GlcNAcilação tem um papel na diferenciação e na atividade dos osteoclastos *in vitro*, bem como participa do remodelamento ósseo *in vivo*. Por fim, fomos investigar se a O-GlcNAcilação também interfere no desenvolvimento de patologias que tem por consequência a perda óssea, como por exemplo, o desenvolvimento da lesão periapical. Para isso, os camundongos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e seus controles *CtsK-Cre* foram submetidos ao modelo de indução da lesão periapical. Após 14 dias da indução, as mandíbulas foram coletadas e avaliadas quanto ao tamanho da lesão formada (mm<sup>2</sup>) por histomorfometria. Os cortes histológicos obtidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) para a visualização das estruturas ao redor do ápice dental.

Como podemos observar na Figura 18A, os grupos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* sem lesão apresentaram características semelhantes como ligamento periodontal, cemento e osso alveolar íntegros, assim como ausência de infiltrado inflamatório. Por outro lado, ao induzir a lesão periapical, os grupos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* com lesão periapical apresentaram perda do ligamento periodontal, presença de infiltrado inflamatório e uma reabsorção óssea alveolar (Figura 18A).

A área periapical mensurada foi identificada na raiz distal do primeiro molar inferior do lado experimental e seus respectivos controles, e essa área foi mensurada em mm<sup>2</sup> utilizando o *software* de imagens *Image J*. Os grupos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* controles apresentaram uma área periapical semelhante entre eles. Ao induzir a lesão, o grupo *CtsK-Cre* apresentou um espaço periapical maior em relação ao seu respectivo grupo controle, devido a presença de um processo inflamatório local e perda de estruturas ao redor da raiz infectada. Ao avaliar o grupo *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* após o mesmo período experimental de 14 dias, vimos que esses animais desenvolveram uma área de lesão periapical menor quando comparado ao grupo *CtsK-Cre* com lesão (Figura 18B), mostrando que a perda óssea induzida por um processo inflamatório/infeccioso também pode ser modulada pela O-GlcNAcilação.

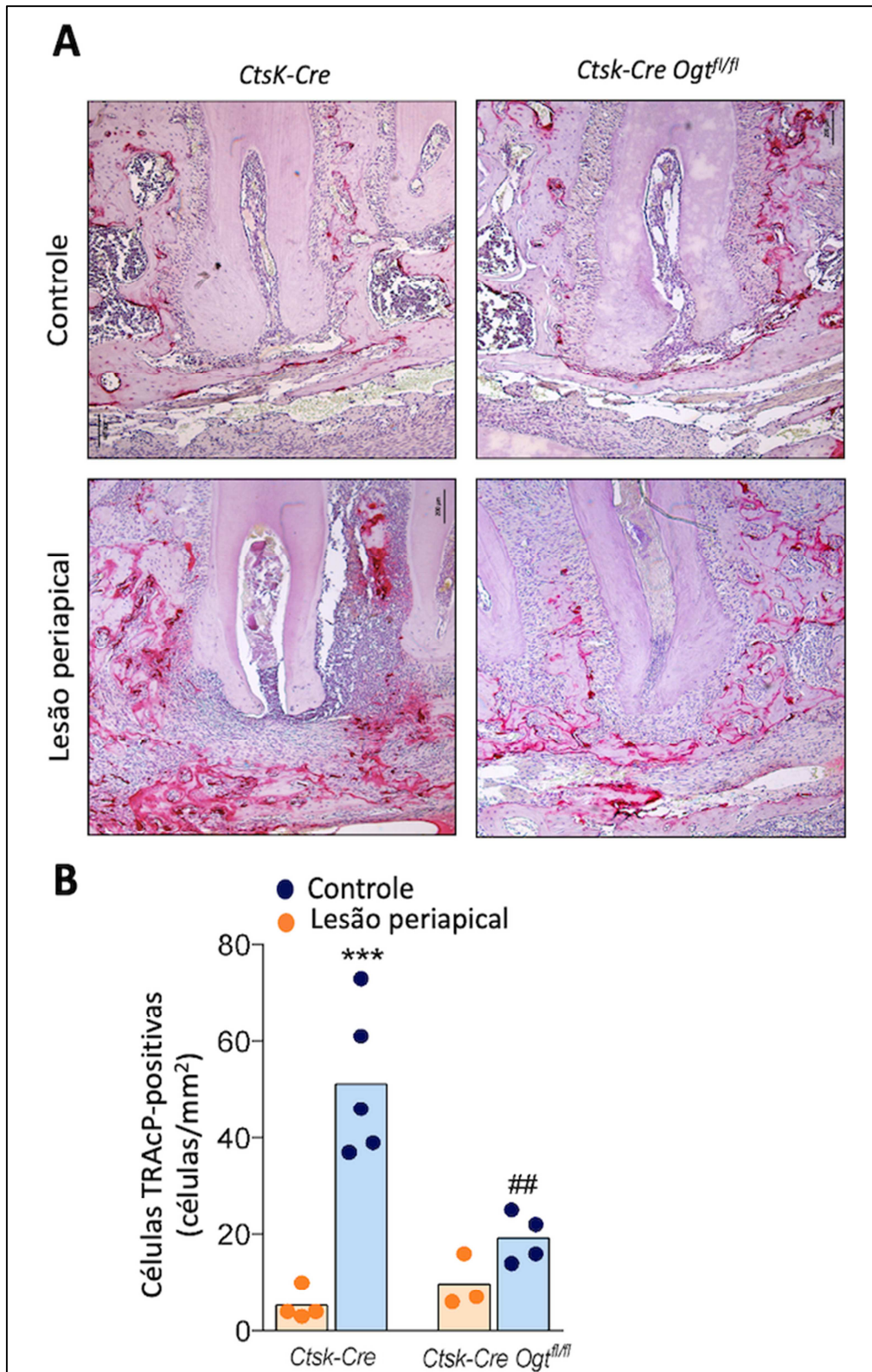
**Figura 18. Avaliação do impacto da O-GlcNAcilação na perda óssea induzida pela lesão periapical.** (A) Imagens representativas da raiz distal do primeiro molar inferior de animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* submetidas a lesão periapical e seus respectivos controles. Cortes semi-seriados de 5 mm foram corados com HE para avaliação da extensão da lesão periapical formada após 14 dias de doença periapical. O delineado preto descontínuo representa a área periapical nos animais controles e a lesão periapical nos animais submetidos a doença. (B) Avaliação da área do espaço periapical. Foi realizada a mensuração da área periapical na raiz distal do primeiro molar dos animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* submetidas a lesão periapical e seus respectivos controles. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o seu respectivo controle; ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo WT com lesão periapical.



Para saber se esse controle de perda óssea nos animais deficientes para OGT estaria relacionado com uma inibição dos osteoclastos na lesão, fomos avaliar o número de osteoclastos pela marcação de TRAcP. Inicialmente, observamos que os grupos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e *CtsK-Cre* sem lesão, se apresentaram de forma semelhante entre eles (Figura 19A). Entretanto, quando induzida a lesão, os animais *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* apresentaram uma marcação de TRAcP menos intensa do que os animais *CtsK-Cre* (Figura 19A). Além disso, ao quantificar o número de osteoclastos ao redor da lesão periapical, foi observado que a deficiência de *Ogt* nos osteoclastos levou a uma redução do número de osteoclastos ao redor do osso alveolar quando comparado com o grupo *CtsK-Cre* com lesão (Figuras 19B).



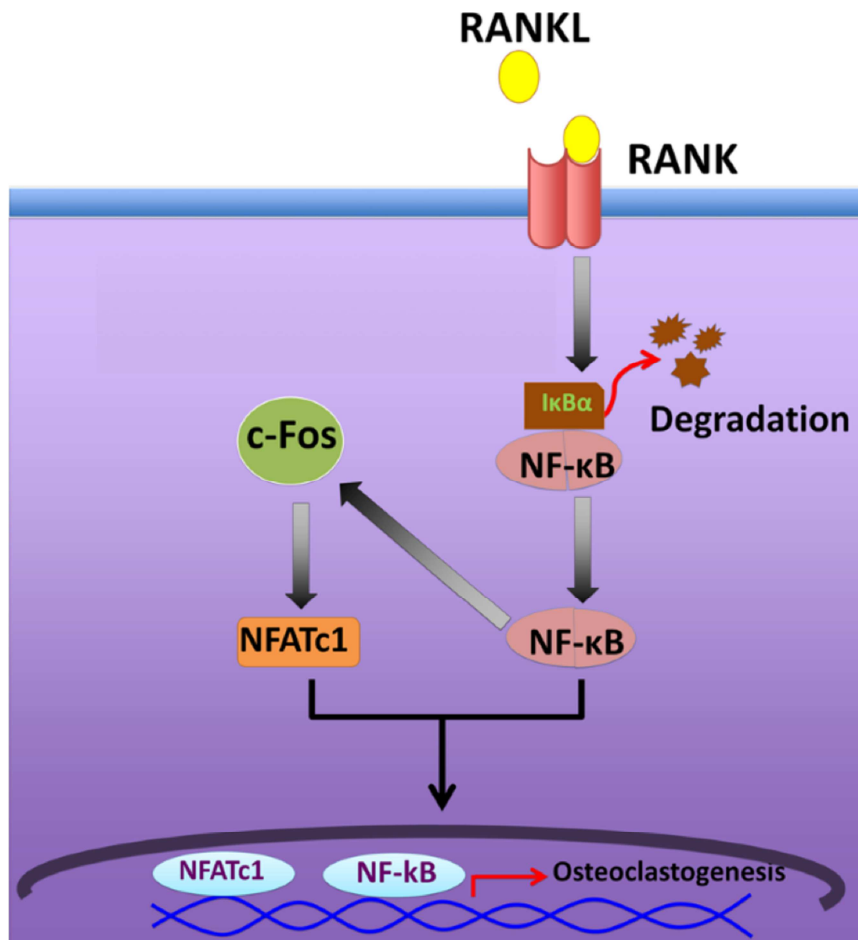
**Figura 19. Determinação da presença de osteoclastos na lesão periapical.** (A) Imagens representativas da raiz distal do primeiro molar inferior de animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* submetidas a reação enzimática de TRAcP. As marcações em vermelho representam as células positivas para TRAcP (osteoclastos). (B) Quantificação do número de células TRAcP-positivas na região periapical dos animais *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. \*\*\* $p < 0,001$  comparado com o seu respectivo controle; ## $p < 0,01$  quando comparado ao grupo *CtsK-Cre* com lesão periapical.



#### 4.13 O NFATc1 como potencial alvo de O-GlcNAcilação durante a osteoclastogênese e ativação dos osteoclastos.

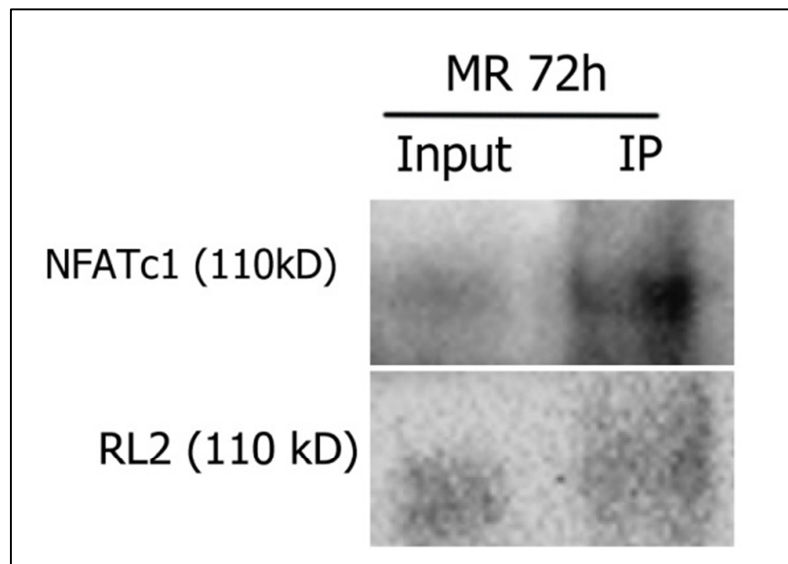
O NFATc1 é o principal fator de transcrição da osteoclastogênese, responsável pela regulação de diversos genes essenciais, não só para a diferenciação como também para atividade dos osteoclastos (TAKAYANAGI *et al.*, 2002; WINSLOW *et al.*, 2006). Sabemos que, para o NFATc1 ser ativado ele precisa ser desfosforilado, processo o qual permitirá a sua translocação para o núcleo da célula, e conseqüentemente, levará a ativação dos outros genes responsáveis pela diferenciação e ativação dos osteoclastos (ALQRANEI *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020).

**Esquema 2. Ilustração da ativação de NFATc1.** A ativação de RANK pelo seu ligante RANKL leva a degradação de I $\kappa$ B- $\alpha$ , liberando o NF- $\kappa$ B que transloca para o núcleo. Ainda, o NF- $\kappa$ B ativa c-Fos que conseqüentemente leva a translocação de NFATc1 para o núcleo. O NF- $\kappa$ B e o NFATc1 no núcleo leva a transcrição de vários genes relacionados com a diferenciação e ativação dos osteoclastos (ALQRANEI *et al.*, 2020).



Considerando que a O-GlcNAcilação afeta ambos os processos de diferenciação e função dos osteoclastos, a nossa hipótese era que o NFATc1 poderia ser um alvo de O- GlcNAcilação, e portanto, o mecanismo de controle da osteoclastogênese e reabsorção óssea. Para isso, foi realizado uma cultura de osteoclastos utilizando a medula óssea de animais C57BL/6, e submetidas ao protocolo de imunoprecipitação (IP).

**Figura 20. Análise de imunoprecipitação para NFATc1.** Imagens da revelação de *immunoblotting* para marcação de NFATc1 e RL2 (O-GlcNAcilação) em amostras de cultura de osteoclastos estimulados com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL) por 3 dias e imunoprecipitadas com anti-NFATc1 (IP).



Podemos observar nessa imagem de *immunoblotting* que o protocolo de imunoprecipitação de NFATc1 foi estabelecido visto que a marcação para NFATc1 no grupo IP está maior em relação ao grupo *Input*, o qual representa o total de proteínas coletadas antes da imunoprecipitação. Ainda, ao avaliar a expressão de proteínas O-GlcNAcilas (RL2) verificou-se que o grupo IP (NFATc1) apresentou uma maior expressão de RL2 quando comparado ao *Input* (Figura 20). Esse ensaio demonstra uma possível interação entre NFATc1 e GlcNAc.

#### 4.14 A GlcNAcilação estimula a ativação de NFATc1 durante a osteoclastogênese.

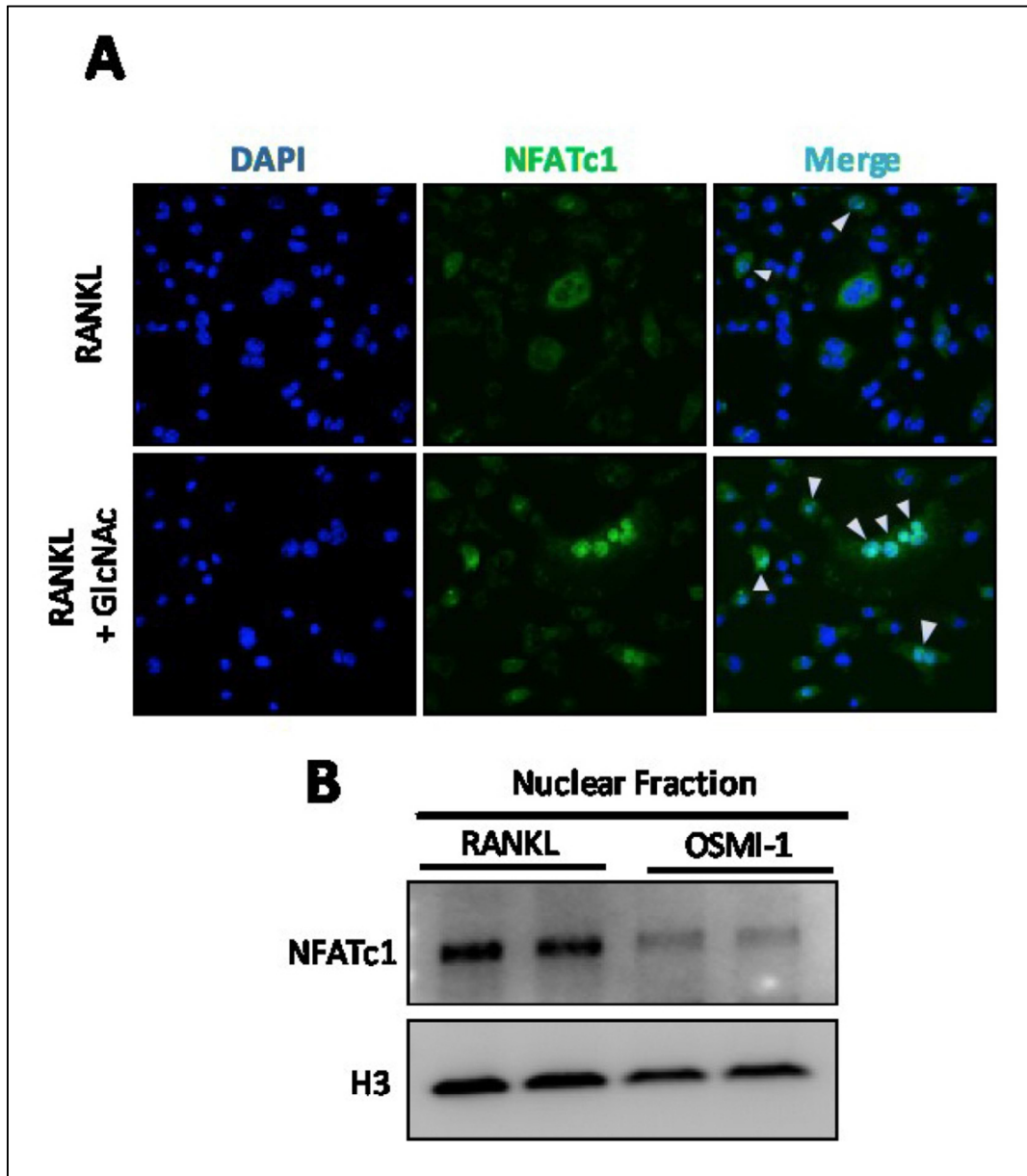
Uma outra maneira de avaliar se a O-GlcNAcilação estaria levando a uma maior ativação de NFATc1 foi realizando um ensaio de imunofluorescência, o qual

nos mostra se o NFATc1 estaria presente mais no núcleo (ativo) ou no citoplasma (inativo) dos pré-osteoclastos/osteoclastos. No terceiro dia de diferenciação com M-CSF e RANKL, o qual representa o pico de fusão entre os pré-osteoclastos, o meio de cultivo foi substituído por um meio com RANKL e GlcNAc no grupo tratado e apenas com o RANKL no grupo controle. Após quatro horas de estímulo, as células foram lavadas com PBS e fixadas para posterior marcação com NFATc1 por imunofluorescência. Como podemos observar nas imagens abaixo, o tratamento com RANKL e GlcNAc por 4 horas resultou em uma maior translocação de NFATc1 para o núcleo, onde podemos ver nas células indicadas pelas setas uma maior colocalização de NFATc1 e DAPI (núcleo) em relação ao grupo controle (Figura 21A).

Para avaliar o efeito inverso, utilizamos o inibidor OSMI-1 na cultura de osteoclastos e coletamos o lisado celular após três dias de cultura, com o objetivo de realizar a fração nuclear dessas células e marcar com o anticorpo para NFATc1. Corroborando com os dados de imunofluorescência, observamos que na presença do meio osteoclastogênico (M-CSF e RANKL) houve um aumento da expressão de NFATc1 no núcleo, mostrando a importância desse marcador na osteoclastogênese. Ao mesmo tempo, ao avaliar o grupo tratado com OSMI-1, observamos uma menor expressão de NFATc1 no núcleo, sugerindo que a inibição da O-GlcNAcilação poderia inibir a ativação de NFATc1 mantendo-o na forma inativa no citoplasma e portanto, inibindo-o de translocar para o núcleo (Figura 21B). Sendo assim, a análise de imunofluorescência e a de fração nuclear juntamente com os dados anteriores, apontam o NFATc1 como um possível alvo de O-GlcNAcilação, pela qual estimula a osteoclastogênese e direciona os osteoclastos a reabsorverem de forma mais ativa.



**Figura 21. Localização de NFATc1 por imunofluorescência e fração nuclear.** (A) Imagens de imunofluorescência com marcações para DAPI (azul), NFATc1 (verde) e o Merge (sobreposição) dessas 2 imagens de osteoclastos retratando osteoclastos estimulados com RANKL (10 ng/mL) seguido de osteoclastos com RANKL (10 ng/mL) e GlcNAc (3 mM) por 4 horas. (B) Fração nuclear de osteoclastos cultivados por 3 dias e marcados com anti-NFATc1 na presença do inibidor OSMI-1 e no seu controle (RANKL). H3 foi usado como gene endógeno. Imagens representativas de dois experimentos independentes.





## 5. *DISCUSSÃO*

---



## 5. DISCUSSÃO

A relação entre metabolismo celular e as vias de sinalização intracelular é um tema emergente na pesquisa biológica, no entanto, ainda não foi totalmente elucidado como essa reprogramação metabólica celular pode controlar o comportamento dos osteoclastos. Diversos estudos têm demonstrado a importância do consumo de glicose durante a diferenciação e a atividade reabsortiva dos osteoclastos (WILLIAMS *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 2007; INDO *et al.*, 2013). Embora a fosforilação oxidativa tenha sido abordada como a maior via de suprimento bioenergético dos osteoclastos, Li e colaboradores (2020) observaram que a via glicolítica também é crucial para a osteoclastogênese. O estudo mostrou que a deleção seletiva de Glut1, que é o transportador de glicose mais expresso nos osteoclastos, diminui a produção de lactato sem comprometer o consumo basal de oxigênio ou a produção de ATP da fosforilação oxidativa, ressaltando um papel independente da glicólise aeróbica na osteoclastogênese (LI *et al.*, 2020).

A O-GlcNAcilação é uma modificação pós-traducional que tem sido bastante estudada nos últimos anos, pois ela integra o metabolismo celular com as mudanças que ocorrem nos processos celulares de diversos tecidos, incluindo a funcionalidade das proteínas (TORRES *et al.*, 1984; HART *et al.*, 2019). Na biologia óssea, os primeiros estudos sobre o papel da O-GlcNAcilação foram em osteoblastos. Os estudos *in vitro* demonstraram que a O-GlcNAcilação potencializa a diferenciação dos osteoblastos, e esses achados foram sustentados por uma redução da expressão gênica de *Runx2* e *Fosfatase alcalina*, importantes marcadores osteogênicos, na presença do inibidor de OGT (KIM *et al.*, 2007b; NAGEL *et al.*, 2014). Entretanto, o papel da O-GlcNAcilação na diferenciação e função dos osteoclastos, bem como a importância dessa modificação pós-traducional no remodelamento ósseo fisiológico e patológico ainda não está bem estabelecido na literatura. Primeiramente, observamos que durante a osteoclastogênese há um aumento da expressão de OGT e GFAT1, duas enzimas cruciais da via das hexosaminas. GFAT1 converte a glutamina em frutose-6-fosfato, que ao final da cascata metabólica, é convertida em UDP-GlcNAc, um substrato da enzima OGT que conduz a O-GlcNAcilação de proteínas (BROSCHAT *et al.*, 2002; MARSHALL; BACOTE; TRAXINGER, 1991). Esses

dados juntamente com o estudo de KIM e colaboradores (2021), onde foi observado o aumento da expressão gênica de *Gfat1* e *Ogt* durante a osteoclastogênese, nos indicam um papel importante da via das hexosaminas na diferenciação dos osteoclastos.

O processo de diferenciação celular requer uma série de modificações controladas pela transcrição de diversos genes e é dependente da metabolização de metabólitos e nutrientes (YANES *et al.*, 2010). O GlcNAc é um monossacarídeo que é rapidamente adicionado e removido de proteínas-alvo em decorrência da atividade enzimática de OGT e OGA, e da ativação de diversas vias de sinalização (KEARSE; HART, 1991). Diversos estudos demonstraram que níveis inadequados de GlcNAc nas células podem causar sérios danos aos processos celulares, podendo ser um fator predisponente para o desenvolvimento de doenças, como câncer, doenças neurodegenerativas e diabetes (HANOVER *et al.*, 2005; FERRER *et al.*, 2014; PARK *et al.*, 2021). No presente estudo, observamos que a adição do monossacarídeo GlcNAc estimulou tanto a formação de osteoclastos gigantes, como também aumentou a capacidade de desmineralização deles. Entretanto, Takeuchi e colaboradores (2016), utilizando altas doses do monossacarídeo GlcNAc (20 mM), viram uma supressão da diferenciação dos osteoclastos da linhagem celular RAW264.7. Ainda, mais recentemente, esses mesmos autores avaliaram a osteoclastogênese na presença de Thiamet G, um inibidor da enzima OGA responsável pela reversão da O-GlcNAcilação. Foi observado que a inibição de OGA levou a redução do número e capacidade de desmineralização dos osteoclastos vistos em placa contendo hidroxiapatita (TAKEUCHI *et al.*, 2020). Esses resultados contraditórios ao nosso, podem ser explicados pelas diferenças do tipo de linhagem celular utilizado e quantidade de GlcNAc adicionado na cultura. Análises proteômicas já revelaram que várias proteínas envolvidas com o ciclo celular, metabolismo e organização do citoesqueleto são regulados de forma diferente nas células RAW264.7 e nas células da medula óssea (NG *et al.*, 2018). Além disso, mesmo após a ativação com RANKL, as células RAW264.7 continuam a manter em grande proporção um fenótipo de macrófago, não sendo, portanto, considerado um osteoclasto completamente diferenciado (NG *et al.*, 2018). Em relação a concentração de GlcNAc, os próprios autores discutem que 20 mM de açúcar é uma concentração muito maior que as concentrações fisiológicas

ou patológicas, não sendo assim parâmetro para uma simulação de uma condição hiperglicêmica (TAKEUCHI *et al.*, 2020).

Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese e na atividade dos osteoclastos, selecionamos dois inibidores da enzima OGT, OSMI-1 e 5SGlcNAc. Existem diversos substratos que inibem a OGT *in vitro*, porém algumas delas são impermeáveis à membrana celular, sendo ineficazes nas células (GLOSTER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2014; BORODKIN *et al.*, 2014). No entanto, os inibidores utilizados neste estudo OSMI-1 e 5SGlcNAc demonstraram ser efetivos ao reduzir drasticamente a O-GlcNAcilação global de proteínas (ORTIZ-MEOZ *et al.*, 2015). Quando adicionados na cultura primária de osteoclastos murino, observamos uma redução tanto da capacidade de diferenciação quanto da desmineralização dos osteoclastos, confirmando a importância da O-GlcNAcilação para a diferenciação e atividade dos osteoclastos *in vitro*. Ainda, vimos que OSMI-1 e 5SGlcNAc reduziram a expressão de importantes marcadores “chave” da diferenciação e atividade dos osteoclastos, como o NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K, corroborando com os achados de expressão gênica de KIM e colaboradores (2021), onde eles também reportam uma redução de *Nfatc1* e *CtsK* na cultura de osteoclastos murino em presença de OSMI-1.

De forma complementar, utilizamos a ferramenta da deleção gênica seletiva *Crelox-P* para avaliarmos o efeito da deleção de *Ogt* especificamente nos precursores de osteoclastos na diferenciação e atividade dos osteoclastos *in vitro*. Demonstramos pela primeira vez que as células provenientes de animais deficientes de *Ogt* (*LysM-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*) tiveram osteoclastos menores e com poucos núcleos, associados a uma menor expressão proteica de NFATc1, Integrina  $\alpha$ v e Catepsina K e a uma menor capacidade de desmineralização. Originalmente, demonstramos que o efeito da O-GlcNAcilação em cultura de osteoclastos humanos foi o mesmo. Paralelamente aos nossos resultados, KIM e colaboradores (2021) utilizaram um RNA de interferência para silenciar a enzima OGT. Da mesma maneira, eles observaram que ao silenciar a OGT houve uma redução da osteoclastogênese, da expressão gênica e proteica de *Nfatc1*, dentre outros.

O NFATc1 é o principal fator de transcrição que rege a diferenciação e a atividade dos osteoclastos. Proteínas NFAT são encontradas no citoplasma celular na

forma fosforilada pelo complexo proteico Ik-B $\alpha$ , e quando são ativadas, essas proteínas são desfosforiladas por calcineurina, fosfatase calmodulina dependente/Ca<sup>2+</sup>, e translocadas para o núcleo celular (ZHAO *et al.*, 2017). Essa ativação nos pré-osteoclastos, induz a transcrição de vários genes responsáveis pela osteoclastogênese e pela funcionalidade dos osteoclastos, dentre eles *Trap*, *Catepsina K*, *Integrina  $\alpha V$*  e *MMP-9* (CRABTREE *et al.*, 2002, SOLTANOFF *et al.*, 2009). Sendo o NFATc1 um forte regulador da osteoclastogênese e da atividade dos osteoclastos, o vimos como um potencial alvo de O-GlcNAcilação. Primeiramente, ao inibir a OGT com o OSMI-1 ou pela deleção gênica, vimos que ambos reduziam a expressão de NFATc1 durante a osteoclastogênese. Adicionalmente, demonstramos que OSMI-1 inibe, enquanto a suplementação com GlcNAc estimula a translocação de NFATc1 para o núcleo em osteoclastos maduros. E recentemente, foi demonstrado que OSMI-1 inibe a O-GlcNAcilação de NF- $\kappa$ B p65 e NFATc1, afetando a sua translocação para o núcleo e desse modo, interferindo na transcrição dos genes osteoclásticos (KIM *et al.*, 2021). Inclusive, sabendo que a O-GlcNAcilação e a fosforilação podem competir pelo mesmo sítio de serina/treonina (WANG *et al.*, 2008), nossa hipótese é que a O-GlcNAcilação pode evitar ou retardar a refosforilação de NFATc1, mantendo-o no núcleo e aumentando a sua atividade transcricional durante a diferenciação dos osteoclastos. Nesse mesmo segmento, foi previamente demonstrado que a O-GlcNAcilação de NFATc1 ocorre em linfócitos ativados e o silenciamento de *Ogt* prejudica a atividade transcricional de NFATc1 (GOLKS *et al.*, 2007). Ademais, observaram que a O-GlcNAcilação é também necessária para a ativação de NFATc3, promovendo a sua translocação nuclear em cardiomiócitos (FACUNDO *et al.*, 2012).

Os osteoclastos são as únicas células capazes de realizar a reabsorção do tecido ósseo. Isso se dá pela habilidade deles solubilizarem dois principais constituintes da matriz óssea: o colágeno e os minerais. Estudos mais recentes têm demonstrado que os osteoclastos podem ter orientações e duração de reabsorção diferentes de acordo com a sua capacidade de solubilização desses constituintes, podendo gerar dois tipos de reabsorções diferentes baseado nas suas características geométricas (SØE; DELAISSÉ, 2013). Quando os osteoclastos têm um potencial colagenolítico menor do que a desmineralização, eles se aderem na matriz óssea e



reabsorvem perpendicularmente à superfície de forma intermitente, formando os *pits*. Em casos opostos, os osteoclastos vão se movimentando e reabsorvendo ao mesmo tempo em direção paralela à superfície, formando escavações longas e profundas denominadas de *trenches*. Notavelmente, ao adicionarmos o GlcNAc nos osteoclastos já diferenciados, eles passaram a reabsorver muito mais na forma de *trenches* do que em *pits*. Ainda, ao inibir a O-GlcNAcilação com OSMI-1, esse efeito foi revertido. A maioria das reabsorções do tipo *trench* se inicia como um *pit*, no entanto, é necessário que haja uma alta atividade de Catepsina K para que a reabsorção do tipo *pit* mude para o modo *trench* (SØE; DELAISSÉ, 2017). Essa evidência foi validada ao ter uma redução na formação de *trenches* e um aumento na formação de *pits* conforme foram aumentando as doses de odanacatib, um inibidor de Catepsina K, nos ensaios de reabsorção óssea (BORGGAARD *et al.*, 2020). Corroborando com esses dados, o presente estudo mostrou uma modulação da expressão de Catepsina K ao inibir a O-GlcNAcilação nos osteoclastos, que por sua vez, suprimiu a reabsorção óssea. Sendo assim, pela primeira vez, nossos dados revelam um mecanismo de ação da O-GlcNAcilação na capacidade de reabsorção dos osteoclastos, uma vez que níveis elevados de Catepsina K facilita a formação de *trenches*, um modo de reabsorção óssea mais agressiva.

Apesar dos estudos sobre a direcionalidade das vias metabólicas e compartimentos celulares serem ainda abstratos, há uma hipótese de que as enzimas metabólicas são sequestradas em diferentes áreas das células durante as suas atividades celulares (ZECCHIN *et al.*, 2015). Células endoteliais angiogênicas, por exemplo, aloca enzimas glicolíticas em lamelipódios e filopódios para permitir uma rápida geração de ATP durante a sua movimentação e alto gasto energético (DE BOCK *et al.*, 2013). Nesse contexto, LEMMA e colaboradores (2016) viram que há duas enzimas-chave da via glicolítica PKM2 e GAPDH, localizadas muito próximas às estruturas do anel de actina dos osteoclastos, sugerindo a participação dessa via na movimentação dos osteoclastos durante a formação dos *trenches*.

O remodelamento ósseo é importante para o crescimento, homeostase de cálcio no sangue, reparo de microfissuras e fraturas, assim como para reorganizar as estruturas ósseas para suportar as demandas de carga (MOTYL *et al.*, 2017). Os osteoblastos, osteócitos e osteoclastos são as principais células responsáveis por

esse processo e a homeostase óssea é decorrente do equilíbrio da atividade dessas células. Visto que a deficiência a O-GlcNAcilação tem um papel crucial para a diferenciação e atividade dos osteoclastos, fomos avaliar o efeito da deficiência seletiva de OGT nos osteoclastos sobre o remodelamento ósseo *in vivo*. Ao analisar as microarquiteturas ósseas de fêmur dos camundongos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* e seus controles *CtsK-Cre* por microtomografia computadorizada, observamos que a deficiência seletiva de OGT nos osteoclastos resultou em um aumento da espessura trabecular e cortical, além de um aumento do volume ósseo trabecular e cortical nos camundongos. Esses dados mostram que a O-GlcNAcilação tem um papel importante no remodelamento ósseo fisiológico. Por fim, avaliamos o efeito da deleção seletiva de OGT nos osteoclastos em um modelo de perda óssea resultante de uma inflamação/infecção nos camundongos *CtsK-Cre* e *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>*. Após 14 dias de lesão periapical, vimos que os camundongos *CtsK-Cre Ogt<sup>fl/fl</sup>* tiveram uma menor lesão periapical acompanhado de um menor marcação de TRAcP (presença de osteoclastos) ao redor da lesão periapical quando comparado com o grupo controle *CtsK-Cre*, demonstrando o papel da O-GlcNAcilação na perda óssea induzida durante a lesão periapical. De fato, a hiperglicemia, uma característica dos diabéticos, dificulta a cicatrização de feridas e leva a manifestações sistêmicas e orais, apresentando um efeito direto na integridade da polpa dentária (LIMA *et al.*, 2013). Ainda, os pacientes diabéticos exibem um número reduzido de osteoblastos, além de apresentarem hipercalcúria e osteopenia, sendo esses fatores contribuintes para o agravamento da perda óssea (ZAYZAFON *et al.*, 2000; BALINT *et al.*, 2002).

Embora os dados obtidos no presente projeto nos darem fortes indícios de que o NFATc1 seja a proteína-alvo regulatória, mais experimentos são necessários para verificar se a O-GlcNAcilação de NFATc1 seria o fator que determina o tipo de reabsorção exercido pelos osteoclastos. Além disso, sabe-se que durante a osteoclastogênese, há o envolvimento de várias proteínas O-GlcNAciladas, portanto, outras proteínas-alvo também devem ser exploradas. Deste modo, foi demonstrado neste estudo a participação da O-GlcNAcilação na osteoclastogênese e na modulação dos osteoclastos para uma reabsorção óssea mais ativa e agressiva. Paralelamente, vimos a importância dessa modificação pós-traducional no remodelamento ósseo fisiológico e durante a perda óssea induzida por uma infecção/inflamação. Utilizando

ferramentas farmacológicas e genéticas, foi possível estabelecer uma relação entre a O-GlcNAcilação com a fusão dos pré-osteoclastos/osteoclastos durante a osteoclastogênese. Além disso, vimos um efeito estimulante da O-GlcNAcilação na atividade funcional dos osteoclastos. Ainda, utilizando animais geneticamente deficientes para *Ogt* nos osteoclastos, foi observado que a O-GlcNAcilação é importante não só para a manutenção da homeostase óssea como também para estimular a reabsorção óssea pelos osteoclastos desencadeada por um processo inflamatório/infeccioso, no caso, na lesão periapical experimental.



## 6. CONCLUSÕES

---



## **6. CONCLUSÕES**

A O-GlcNAcilação é essencial para a osteoclastogênese e modula o comportamento reabsortivo dos osteoclastos. Além disso, nossos dados mostram um possível mecanismo para a perda óssea e fragilidade mediada pela atividade excessiva dos osteoclastos em processos patofisiológicos. Portanto, o presente estudo abre novos caminhos direcionados para a O-GlcNAcilação em osteoclastos como uma possível intervenção terapêutica em doenças osteolíticas.





## *REFERÊNCIAS*

---



## REFERÊNCIAS

- Allison DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, et al. Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- $\kappa$ B acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 16;109(42):16888-93, 2012.
- Aoki S, Shimizu K, Ito K. Autophagy-dependent mitochondrial function regulates osteoclast differentiation and maturation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2020. 527(4):874-880.
- Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 40(2):251-64, 2007.
- Balint E, Szabo P, Marshall CF, Sprague SM. Glucose-induced inhibition of in vitro bone mineralization. *Bone*. 28, 21– 8, 2001.
- Baudoin L, Issad T. O-GlcNAcylation and Inflammation: A Vast Territory to Explore. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 9;5:235, 2015.
- Bond MR, Hanover JA. O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease. *Annu Rev Nutr*. 33:205–229, 2013.
- Borggaard XG, Pirapaharan DC, Delaissé JM, Søre K. Osteoclasts' Ability to Generate Trenches Rather Than Pits Depends on High Levels of Active Cathepsin K and Efficient Clearance of Resorption Products. *Int J Mol Sci*. 18;21(16):5924, 2020.
- Borodkin VS, Schimpl M, Gundogdu M, et al. Bisubstrate UDP-peptide conjugates as human O-GlcNAc transferase inhibitors. *Biochem J*. 457(3):497-502, 2014.
- Broschat, K. O. *et al.* Kinetic characterization of human glutamine-fructose-6-phosphate amidotransferase I: potent feedback inhibition by glucosamine 6-phosphate. *J Biol Chem* 277. 14764-14770, 2002.
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, Vosseller K, Reginato MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene*. 29:2831–2842, 2010.
- Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*. 100(1):29-36, 2021.
- Chiu WS, McManus JF, Notini AJ, Cassady AI, Zajac JD, Davey RA. Transgenic mice that express Cre recombinase in osteoclasts. *Genesis*. 39(3):178-85, 2004.
- Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS, "The cell biology of bone metabolism," *Journal of Clinical Pathology*. (61): 577–587, 2008.
- De Bock K, Georgiadou M, Carmeliet P. Role of endothelial cell metabolism in vessel sprouting. *Cell Metab*. 18(5):634-47, 2013.

Delaisse JM, S e K, Andersen TL, Rojek AM, Marcussen N. The Mechanism Switching the Osteoclast From Short to Long Duration Bone Resorption. *Front Cell Dev Biol.* 9:644503, 2021.

De Queiroz RM, Carvalho E, Dias WB. O-GlcNAcylation: the sweet side of the cancer. *Front Oncol.* 4:132, 2014.

Dias WB, Hart GW. O-GlcNAc modification in diabetes and Alzheimer's disease. *Mol BioSyst.* 3:766–772, 2007.

Dudley HR, Spiro D. The fine structure of bone cells. *J Biophys Biochem Cytol.* 11(3):627–649, 1961.

Du XL, Edelstein D, Dimmeler S, Ju Q, et al. Hyperglycemia inhibits endothelial nitric oxide synthase activity by post-translational modification at the AKT site. *J Clin Invest.* 108:1341-8, 2001.

Erickson JR, Pereira L, Wang L, Han G, et al. Diabetic Hyperglycaemia Activates Camkii And Arrhythmias By O-Linked Glycosylation. *Nature.* 17;502(7471):372-6, 2013.

Feng Xu, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol.* 6:121-45, 2011.

Ferrer CM, Lynch TP, Sodi VL, Falcone JN, Schwab LP, Peacock DL, Vocadlo DJ, Seagroves TN, Reginato MJ. O-GlcNAcylation regulates cancer metabolism and survival stress signaling via regulation of the HIF-1 pathway. *Mol Cell.* 54(5):820-31, 2014.

Fong JE, Le Nihouannen D, Tiedemann K, Sadvakassova G, Barralet JE, Komarova SV. Moderate excess of pyruvate augments osteoclastogenesis. *Biol Open.* 22;2(4):387-95, 2013.

Gloster TM, Zandberg WF, Heinonen JE, Shen DL, Deng L, Vocadlo DJ. Hijacking a biosynthetic pathway yields a glycosyltransferase inhibitor within cells. *Nature chemical biology.* 7:174–181, 2011.

Guerrini MM, Takayanagi H. The immune system, bone and RANKL. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 561; 118–123, 2014.

Halloran BP, Ferguson VL, Simske SJ, Burghardt A, Venton LL, Majumdar S. Changes in bone structure and mass with advancing age in the male C57BL/6J mouse. *J Bone Miner Res.* 17(6):1044-50, 2002.

Hanover JA, Forsythe ME, Hennessey PT, Brodigan TM, Love DC, Ashwell G, Krause M. A *Caenorhabditis elegans* model of insulin resistance: altered macronutrient storage and dauer formation in an OGT-1 knockout. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(32):11266-71, 2005.

- Hao L, Chen W, McConnell M, Zhu Z, Li S, Reddy M, Eleazer PD, Wang M, Li YP. A small molecule, odanacatib, inhibits inflammation and bone loss caused by endodontic disease. *Infect Immun*. 83(4):1235-45, 2015.
- Hardivillé S, Hart GW. Nutrient regulation of signaling, transcription, and cell physiology by O-GlcNAcylation. *Cell Metab*. 20(2):208-13, 2014.
- Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked  $\beta$ -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature*. 446, 1017–1022, 2007.
- Hart GW, Slawson C, Ramirez-Correa G, Lagerlof O. Cross talk between O-GlcNAcylation and phosphorylation: roles in signaling, transcription, and chronic disease. *Annu. Rev. Biochem*. 80, 825–858, 2011.
- Hattersley G, Owens J, Flanagan AM, Chambers TJ. Macrophage colony stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 177:526–531, 1991.
- Indo Y, Takeshita S, Ishii KA, Hoshii T, et al. Metabolic regulation of osteoclast differentiation and function. *J Bone Miner Res*. 28(11):2392-9, 2013.
- Kalervo Väänänen H, Laitala-Leinonen T. Osteoclast lineage and function. *Arch of Biochemistry and Biophysics*. 473(2): 132–138, 2008.
- Kang JG, Park SY, Ji S, Jang I, et al. O-GlcNAc protein modification in cancer cells increases in response to glucose deprivation through glycogen degradation. *J Biol Chem*. 284:34777-84, 2009.
- Kearse KP, Hart GW. Lymphocyte activation induces rapid changes in nuclear and cytoplasmic glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88(5):1701-5, 1991.
- Kim EJ. Chemical Arsenal for the Study of O-GlcNAc. *Molecules*. 16, 1987-2022, 2011.
- Kim JM, Jeong D, Kang HK, Jung SY, et al. Osteoclast precursors display dynamic metabolic shifts toward accelerated glucose metabolism at an early stage of RANKL-stimulated osteoclast differentiation. *Cell Physiol Biochem*. 20(6):935-46, 2007a.
- Kim MJ, Kim HS, Lee S, Min KY, Choi WS, You JS. Hexosamine Biosynthetic Pathway-Derived O-GlcNAcylation Is Critical for RANKL-Mediated Osteoclast Differentiation. *Int J Mol Sci*. 22(16):8888, 2021.
- Koyama T, Kamemura K. Global increase in O-linked N-acetylglucosamine modification promotes osteoblast differentiation. *Exp Cell Res*. 338(2):194-202, 2015.
- Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*. 93:165–176, 1998.
- Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Kinetics of the osteoclast cytoskeleton during the resorption cycle *in vitro*. *J Bone Miner Res*. 6: 817–826, 1991.

Lemma S, Sboarina M, Porporato PE, Zini N, Sonveaux P, Di Pompo G, Baldini N, Avnet S. Energy metabolism in osteoclast formation and activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 79:168-180, 2016.

Li B, Lee WC, Song C, Ye L, Abel ED, Long F. Both aerobic glycolysis and mitochondrial respiration are required for osteoclast differentiation. *FASEB J.* 34(8):11058-11067, 2020.

Liu X, Cooper DE, Cluntun AA, Warmoes MO, Zhao S, Reid MA, Liu J, Lund PJ, Lopes M, Garcia BA, Wellen KE, Kirsch DG, Locasale, JW. Acetate production from glucose and coupling to mitochondrial metabolism in mammals. *Cell.* 175, 502–513, 2018.

Luchin A, Suchting S, Merson T, Rosol TJ, et al. Genetic and physical interactions between Microphthalmia transcription factor and PU.1 are necessary for osteoclast gene expression and differentiation. *J Biol Chem.* 276(39):36703-10, 2001.

Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-linked beta-N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem.* 287:11070–11081, 2012.

Ma J, Hart GW. O-GlcNAc profiling: from proteins to proteomes. *Clin Proteomics.* 5;11(1):8, 2014.

Ma Z, Vosseller K. Cancer metabolism and elevated O-GlcNAc in oncogenic signaling. *J Biol Chem.* 289:34457–34465, 2014.

Marshall, S., Bacote, V. & Traxinger, R. R. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266. 4706-4712, 1991.

Motyl KJ, Guntur AR, Carvalho AL, Rosen CJ. Energy Metabolism of Bone. *Toxicol Pathol.* 45(7):887-893, 2017.

Nagel AK, Ball LE. O-GlcNAc Modification Of The Runt-Related Transcription Factor 2 (Runx2) Links Osteogenesis And Nutrient Metabolism In Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Mol Cell Proteomics.* 13(12):3381-95, 2014.

Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, Shima N, et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;253(2):395-400, 1998.

Ng P. Y., Ribet A. B. P, Pavlos N. J. Membrane trafficking in osteoclasts and implications for osteoporosis. *Biochem Soc Trans* 30. 47 (2): 639–650, 2019.

Oh H, Ghosh S. Nf-kappaB: Roles and Regulation in Different CD4(+) T-Cell Subsets. *Immunol Rev.* 252:41–51, 2013.

- Oikawa T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Uehara S, Udagawa N, Saya H, Matsuo K. Tks5-dependent formation of circumferential podosomes/invadopodia mediates cell-cell fusion. *J. Cell Biol.* 197, 553–568, 2012.
- Orban PC, Chui D, Marth JD. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:6861–6865, 1992.
- Ortiz-Meoz RF, Jiang J, Lazarus MB, et al. A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chem Biol.* 10(6):1392-1397, 2015.
- Park J, Ha HJ, Chung ES, Baek SH, Cho Y, Kim HK, Han J, Sul JH, Lee J, Kim E, Kim J, Yang YR, Park M, Kim SH, Arumugam TV, Jang H, Seo SW, Suh PG, Jo DG. *O*-GlcNAcylation ameliorates the pathological manifestations of Alzheimer's disease by inhibiting necroptosis. *Sci Adv.* 7(3):eabd3207, 2021.
- Park-Min KH. Metabolic reprogramming in osteoclasts. *Semin Immunopathol.* 41(5):565-572, 2019.
- Peng LY, Cheng T, Yuan WP. Commonly used cre transgenic mice and their applications in hematopoietic system. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 22(5):1442-7, 2014.
- Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras J. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J. Cell Sci.* 131, 216267, 2018.
- Pérez-Losada FL, Estrugo-Devesa A, Castellanos-Cosano L, Segura-Egea JJ, López-López J, Velasco-Ortega E. Apical Periodontitis and Diabetes Mellitus Type 2: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med.* 9(2):540, 2020.
- Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem.* 285(33):25103-8; 2010.
- Robinson KA, Weinstein ML, Lindenmayer GE, Buse MG. Effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes.* 44(12):1438-46, 1995.
- Robling AG, Castillo AB, Turner CH, "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling," *Annual Review of Biomedical Engineering.* (8): 455–498, 2006.
- Rucci N, Teti A. The, "love-hate" relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biol.* 52–54:176–90, 2016.
- Schleicher ED, Weigert C. Role of the hexosamine biosynthetic pathway in diabetic nephropathy. *Kidney Int Suppl.* 77:S13-8, 2000.
- Segovia-Silvestre T, Neutzsky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, Karsdal MA, Henriksen K. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Hum Genet.* 124(6):561-77, 2009.

Sodi VL, Bacigalupa ZA, Ferrer CM, Lee JV, Gocal WA, Mukhopadhyay D, Wellen KE, Ivan M, Reginato MJ. Nutrient sensor O-GlcNAc transferase controls cancer lipid metabolism via SREBP-1 regulation. *Oncogene*. 37(7):924-934, 2017.

Song RL, Liu XZ, Zhu JQ, Zhang JM, Gao Q, Zhao HY, Sheng AZ, Yuan Y, Gu JH, Zou H, Wang QC, Liu ZP. New roles of filopodia and podosomes in the differentiation and fusion process of osteoclasts. *Genet Mol Res*. 13, 4776–4787, 2014.

Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 20(7):745–754, 2018.

Stashenko P1, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*. 9(4):498-521, 1998.

Stenbeck G, Horton MA. A new specialized cell-matrix interaction in actively resorbing osteoclasts. *J Cell Sci*. 113:1577–1587, 2000.

Takahashi N, Ejiri S, Yanagisawa S, Ozawa H. Regulation of osteoclast polarization. *Odontology*. 95: 1–9, 2007.

Takayanagi H, Kim S, Koga T, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*. 3:889-901, 2002.

Takeuchi T, Horimoto Y, Oyama M, Nakatani S, Kobata K, Tamura M, Arata Y, Hatanaka T. Osteoclast Differentiation Is Suppressed by Increased O-GlcNAcylation Due to Thiamet G Treatment. *Biol Pharm Bull*. 43(10):1501-1505, 2020.

Takeuchi T, Nagasaka M, Shimizu M, Tamura M, Arata Y. *N*-acetylglucosamine suppresses osteoclastogenesis in part through the promotion of O-GlcNAcylation. *Bone Rep*. 3;5:15-21, 2016.

Torres CR, Hart GW. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes. Evidence for O-linked GlcNAc. *J Biol Chem*. 10;259(5):3308-17, 1984.

Yang WH, Park SY, Nam HW, Kim DH, Kang JG, Kang ES, Kim YS, Lee HC, Kim KS, Cho JW. NFκB activation is associated with its O-GlcNAcylation state under hyperglycemic conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(45):17345-50, 2008.

Wang QQ1, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci*. 4(1):19-23, 2012.

Wang S, Shen DL, Lafont D, Vercoutter-Edouart A-S, Mortuaire M, Shi Y, Maniti O, Girard-Egrot A, Lefebvre T, Pinto BM, Vocadlo D, Vidal S. Design of glycosyltransferase inhibitors targeting human O-GlcNAc transferase (OGT) *MedChemComm*. 5:1172–1178, 2014.



Winslow MM, Pan M, Starbuck M, et al. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Dev Cell*. 10:771-82, 2006.

Yanes O, Clark J, Wong D. et al. Metabolic oxidation regulates embryonic stem cell differentiation. *Nat Chem Biol*. 6, 411–417, 2010.

Yavropoulou MP, Yovos JG. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 8(3):204-16, 2008.

Zachara NE, Hart G W. Cell Signaling, The Essential Role Of O-GlcnaC! *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)*. 1761, 6, 599–617, 2006.

Zayzafoon M, Stell C, Irwin R, McCabe LR. Extracellular glucose influences osteoblast differentiation and c-Jun expression. *Journal of Cellular Biochemistry*. 79, 301– 10, 2000.

Zecchin A, Stapor PC, Goveia J, Carmeliet P. Metabolic pathway compartmentalization: an underappreciated opportunity? *Curr Opin Biotechnol*. 34:73-81, 2015.



*ANEXOS*

---



## ANEXOS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Papel do O-Glcnaçiação na perda óssea em lesão periapical experimental", registrada sob nº 17.1.1134.60.2, sob a responsabilidade de Thaise Mayumi Taira e Sandra Yasuyo Fukada Alves, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 13/06/2018 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica	
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 31/10/2021	
Espécie/Linhagem/Raça	CK Ctsk <sup>Cre</sup> 00	CK Ctsk <sup>Cre</sup> OGT <sup>f/f</sup>
Nº de animais	88	88
Sexo	Fêmea	Fêmea
Peso/Idade	18-20g/ 6-8 semanas	18-20g/ 6-8 semanas
Origem	Biotério da FCFRP	

Ribeirão Preto, 20 de junho de 2018.

  
 Ana Patrícia Yatsuda Natsui  
 Coordenadora da CEUA-FCFRP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Papel do O-Glcnação na perda óssea em lesão periapical experimental", registrada sob nº 17.1.1134.60.2, sob a responsabilidade de Thaise Mayumi Taira e Sandra Yasuyo Fukada Alves, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada na reunião de 28/02/2019 da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica			
Vigência da Autorização	21/06/2018 a 31/10/2021			
Espécie/Linhagem/Raça	CK Ctsk <sup>Cre00</sup>	CK Ctsk <sup>Cre</sup> OGT <sup>fl/fl</sup>	CK LysM <sup>Cre/-</sup>	CK LysM <sup>Cre/-</sup> OGT <sup>fl/fl</sup>
Nº de animais	32	32	120	120
Sexo	Fêmea	Fêmea	Fêmea	Fêmea
Peso/Idade	18-20g/ 6-8 semanas	18-20g/ 6-8 semanas	18-20g/ 6-8 semanas	18-20g/ 6-8 semanas
Origem	Biotério da FCFRP			

Ribeirão Preto, 11 de fevereiro de 2021.

  
**Ana Patrícia Yatsuda Natsui**  
 Coordenadora da CEUA-FCFRP