

LORRAINE PERCILIANO DE FARIA

Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese: um estudo in vitro

São Paulo

2021

LORRAINE PERCILIANO DE FARIA

Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese: um estudo in vitro

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia para obter o título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientador: Prof^o Dr. Victor Elias Arana-Chavez

São Paulo

2021

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Faria, Lorraine Perciliano de.

Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese: um estudo in vitro / Lorraine Perciliano de Faria ; orientador Victor Elias Arana-Chavez -- São Paulo, 2021.

109 p. : fig., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Biologia Oral. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Osteoclasto. 2. Bifosfonato. 3. Hormônios glicocorticoides. 4. Cultivo celular. I. Arana-Chavez, Victor Elias. II. Título.

Faria LP. Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese: um estudo in vitro. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 25/05/2021

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria Cristina Manzanares Céspedes

Instituição: Universidade de Barcelona Julgamento: Aprovada

Prof. Dr Edilson Ervolino

Instituição: Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP Julgamento: Aprovada

Profa. Dra. Emanuela Prado Ferraz

Instituição: Faculdade de Odontologia de São Paulo – FOUSP Julgamento: Aprovada

À Deus, a razão da vida
Ao meu esposo Rodrigo

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos especiais

Ao professor Victor Elias Arana Chavez, meus mais sinceros agradecimentos. Que sorte a minha de ter encontrado um orientador que além de ser um excelente pesquisador e professor, ainda é uma pessoa que tenho imenso respeito e admiração. Meus anos no LBO, graças à sua orientação e amizade foram leves, cheios de oportunidades e de muito aprendizado. Levarei sempre seu jeito tranquilo de ouvir meus questionamentos, a liberdade que me foi dada para poder errar e aprender a solucionar esses erros e a confiança que me concedeu no desenvolvimento deste trabalho. Sob a sua orientação eu pude crescer!

À minha duplinha amada, Cláudia Cotomácio e Gabriela Magliano. Amizade construída na pós-graduação e que persiste ao deadline das defesas. Vocês foram essenciais na minha jornada na USP e no LBO. Obrigada pela força, por me ouvirem e pelo companheirismo.

Às amigas do LBO, Taís Carvalho, Juliana Cristina, Simone Peixe, Andressa Hotsumi, muito obrigada pela companhia, pelas conversas diárias com café e pelo suporte em todos os momentos. À querida IC Giuliana, que esteve comigo em diversas etapas deste trabalho. À Dra. Vivian Bradaschia, por ser tão solícita aos meus questionamentos e sempre disposta a colaborar.

À técnica de laboratório, Elis Chinen, obrigada por toda a ajuda desde o meu primeiro dia no LBO, pela paciência e parceria. Sua competência, organização e profissionalismo me inspiraram muito. Ao técnico Douglas Nesadal, obrigada pela colaboração, ensinamentos e por me ajudar prontamente toda vez que eu precisei.

Ao professor Shannon Holliday, meu supervisor no Doutorado sanduíche, por ter me recebido tão bem no seu laboratório na Universidade da Flórida. Com você eu aprendi a arriscar mais e confiar no meu trabalho. Muito obrigada por todas as oportunidades. *To Professor Shannon Holliday, my "sandwich" PhD supervisor, for having received me so well in his laboratory at University of Florida. I've learned from him to take more risks and trust my work. Thank you so much for all the opportunities.*

Às amigas Flávia Rangel, Bruna Garcia e Renata Delgado pela companhia brasileira, tão aconchegante e necessária nesse período que passamos longe de casa. Meus meses em Gainesville foram melhores com vocês!

À Eleanor, Sharon e Sandra e todos os amigos do grupo Monday Night Conversation, muito obrigada pelo carinho e cuidado que tiveram comigo. *To Eleanor, Sharon and Sandra and all the friends of the Monday Night conversation group, thank you so much for all the love you have given me.*

À minha família amada, por todo suporte e amor.

Aos meus amigos, pelo incentivo e cuidado.

Ao meu esposo Rodrigo, você é parte fundamental nessa conquista. Obrigada por comprar minhas ideias e embarcar nos meus sonhos. Seu apoio foi imprescindível em todas as fases da minha jornada acadêmica, desde o TCC, passando pelo mestrado e agora no doutorado. Mas especialmente agora, no desafio dos 6 meses do sanduíche nos EUA, seu companheirismo e segurança deram a força que eu precisava para encarar esse desafio. Te amo!

Agradecimentos institucionais

À Faculdade de Odontologia – FOUSP e à Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela enorme dedicação ao curso buscando sempre sua melhoria.

Ao Departamento de Biomateriais e Biologia Oral e aos professores Fernando Neves Nogueira, Alyne Simões Gonçalves, Rafael Yague Ballester, Roberto Ruggiero Braga, Carlos Eduardo Francci, Igor Studart Medeiros, Josete Barbosa Cruz Meira, Leonardo Eloy Rodrigues Filho, Paulo Francisco Cesar, Marina Guimarães Roscoe, Paulo Eduardo Capel Cardoso e José Nicolau, obrigada pelos ensinamentos e por seguirem contribuindo com excelência na disseminação do conhecimento.

Às secretárias do departamento de Biomateriais e Biologia Oral, Eli e Rosinha, por toda ajuda e paciência. A tranquilidade e o apoio de vocês me acalmaram em

diversos momentos. Ao secretário do programa de pós-graduação em Odontologia, David Lascalla.

Aos demais funcionários da pós-graduação e da biblioteca, em especial à Glauci, sempre muito prestativos e atenciosos.

À CAPES pela bolsa PRINT do PDSE e ao CNPq pelo apoio financeiro.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

Carl Sagan.

RESUMO

Faria LP. Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese: um estudo in vitro [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

Os osteoclastos são células multinucleadas com a função de degradar e reabsorver o tecido ósseo. Medicamentos como o alendronato (um tipo de bisfosfonato nitrogenado) e a dexametasona (glicocorticoide), podem interferir na fisiologia das células clásticas. Enquanto o alendronato (ALN) inativa o osteoclasto, agindo primordialmente sobre o citoesqueleto desta célula, a dexametasona (DEX) pode promover aumento na atividade dessa célula. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do ALN, da DEX e da combinação de ambos sobre a osteoclastogênese e ativação desta célula. Primeiramente foi estabelecido protocolo de remoção de *smear layer* para os discos de osso bovino e na sequência, foi realizada análise em espectrofotômetro para avaliar a concentração de ALN absorvida pelo osso. O substrato ósseo foi capaz de absorver completamente o ALN da solução nas concentrações de 10 e 100 μM . O cultivo de osteoclastos foi feito a partir das células da medula óssea de camundongos e estimulados com 1,25 dihidroxivitamina D3 e através de osteoclastos obtidos a partir de células Raw 264.7 estimulados com RANKL. As células foram cultivadas sobre substrato ósseo previamente tratado com ALN e tratadas com DEX a 1 μM . Conclui-se que o tratamento com ALN a 10 μM não foi capaz de inibir completamente a reabsorção óssea, seja administrado sozinho ou com a DEX. A DEX promoveu aumento na expressão gênica RANKL e redução de OPG, mesmo quando administrada conjuntamente com ALN. Quando utilizado na concentração de 100 μM , o ALN reduziu a quantidade de anéis de actina dos osteoclastos e promoveu significativa diminuição na liberação de EVs nestas células.

Palavras-chave: Osteoclasto. Bisfosfonato. Glicocorticoide. Cultivo celular.

ABSTRACT

Faria LP. Effect of alendronate, dexamethasone and the association of both on osteoclastogenesis: an in vitro study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2021. Versão Corrigida.

Osteoclasts are multinucleated cells which degrade and reabsorb bone tissue. Drugs such as alendronate (nitrogen-containing type of bisphosphonate) and dexamethasone (glucocorticoid), have several effects on osteoclasts. While alendronate (ALN) inactivates the osteoclast, acting primarily on the cytoskeleton of this cell, dexamethasone (DEX) may promote an increase in this cell activity. The aim of this study was to evaluate the effects of ALN, DEX and a combination of both on osteoclastogenesis and activation of this cell. First, a smear layer removal protocol for bovine bone disks was established, and then a spectrophotometric analysis to assess the concentration of ALN absorbed by the bone. The bone substrate was able to completely absorb the ALN with solutions of 10 and 100 μM . Osteoclast culture was obtained from mouse bone marrow cells and stimulated with 1.25 dihydroxyvitamin D3 and through osteoclasts from Raw 264.7 cells stimulated with RANKL. The cells were cultivated on bone slices treated with ALN and DEX at 1 μM . It was concluded that treatment with ALN at 10 μM did not completely inhibit bone resorption, whether administered alone or with DEX. DEX promoted increased expression of the RANKL and reduced OPG, even when administered with ALN. When osteoclasts were treated with 100 μM ALN, a significant decrease in the formation of actin rings was found and reduced release of EVs.

Keywords: Osteoclast. Bisphosphonate. Glucocorticoid. Cell culture.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1. Processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos. A célula se torna polarizada, o citoesqueleto se reorganiza formando uma zona clara, onde ocorre a adesão do osteoclasto ao tecido ósseo.....34
- Figura 1.2. Comparação entre as composições químicas do pirofosfato e do bisfosfonato. Um átomo de carbono substitui um de oxigênio e são adicionadas duas cadeias laterais, R1 e R2.35
- Figura 1.3. Mecanismo de ação do GC dexametasona nas células. O GC é convertido à sua forma ativa pela ação da enzima 11β -HSD1, e o complexo ativo migra para o núcleo da célula, promovendo as ações genômicas.....38
- Figura 1.4. Liberação e comunicação das EVs. Observar os dois tipos de vesículas liberadas pelas células: microvesículas, brotando diretamente da membrana plasmática da célula e os exossomos, que foram liberados a partir de corpos multivesiculares (CMV).47
- Figura 2.1. Processo de obtenção dos discos de osso cortical bovino. Em (A) é exibido o processo de corte dos discos em cortadora Isomet e em (B) os discos obtidos.61
- Figura 2.2. Obtenção da medula óssea de tíbias e fêmures de camundongo Balb-c. Em (A) os ossos obtidos após procedimento cirúrgico e em (B), a medula óssea obtida após centrifugação.63
- Figura 2.3. Grades sobrepostas à fotomicrografia (MEV) para avaliação de áreas de reabsorção.66
- Figura 2.4. Fotomicrografia do substrato ósseo. Em (A) substrato ósseo que não foi submetido ao processo de remoção de *smear layer*. Observar a presença de *smear layer* (seta preta). Em (B), substrato ósseo após o protocolo de remoção, sem a camada de esfregaço.....67
- Figura 2.5. Fotomicrografia de células provenientes de medula óssea de camundongo Balb-c, tratadas com dihidroxivitamina D3 a 10^{-8} M após 5 dias de cultivo. Observar a presença de numerosas células mononucleadas e a formação de células gigantes (seta preta).....69

Figura 2.6.	Características das células após 7 dias de tratamento e submetidas ao método histoquímico da TRAP. Em (A) grupo C, em (B) grupo A, em (C) grupo AD6 e em (D) grupo D6. Observar a presença de maiores células gigantes nos grupos AD6 e D6.....	73
Figura 2.7.	Diâmetro de célula TRAP+ do grupo AD6, mensurada utilizando o programa ImageJ. A linha azul representando o diâmetro da célula tem a medida de 565 µm (aumento de 100x).....	74
Figura 2.8.	Imunofluorescência para RANKL. Em verde, imunomarcção para RANKL e em azul para DAPI. Observa-se distribuição homogênea do RANKL entre os grupos, sendo o anticorpo visível pelo citoplasma e membrana da célula	75
Figura 2.9.	Imunofluorescência para RANKL. Observar marcações em partículas menores (setas).....	75
Figura 2.10.	Curva de amplificação do gene de referência HMBS.....	76
Figura 2.11.	Curva de amplificação do gene RANKL.....	77
Figura 2.12.	Curva de amplificação do gene OPG.....	77
Figura 2.13.	Micrografia eletrônica de varredura do osso cortical bovino. Observar áreas de reabsorção rasas dispersas pela superfície óssea, inclusive dentro do canal de Havers.	79
Figura 2.14.	Micrografias representativas exibindo o padrão de reabsorção em cada tratamento. Em (A) grupo C, em (B) grupo A, em (C) grupo AD6 e em (D) grupo D6.....	81
Figura 3.1.	Sequência do método utilizado para o isolamento das vesículas extracelulares liberadas por células Raw 264.7.....	90
Figura 3.2.	Células Raw 264.7 cultivadas por 5 dias na presença de substrato ósseo coradas pelo método histoquímico da TRAP (aumento de 100x). Observar a presença de células gigantes e multinucleadas nos três grupos, com distribuição muito semelhante (A = controle; B = ALN 10 µM; C = ALN 100 µM).....	91

- Figura 3.3. Células Raw 264.7 cultivadas por 5 dias sobre substrato ósseo coradas com Faloidina-FITC (aumento de 100x). Pode-se observar a presença de anéis de actina em todos os grupos, em maior quantidade em A (Controle) e em B (Alendronato 10 μ M), quando comparado com o grupo Alendronato 100 μ M (C). Em (D) é possível observar a distribuição da quantidade de anéis de actina por grupo.....92
- Figura 3.4. Tamanho e concentração das EVs previamente isoladas avaliadas pelo método NTA. Em (A) grupo C, (B) A10 (ALN 10 μ M) e (C) A100 (ALN 100 μ M).....94

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 2.1. Análise da saturação dos discos de osso bovino com ALN. Em concentrações inferiores a 1 mM, todo o ALN é incorporado à matriz óssea. Acima de 1 mM, pode-se observar a presença de ALN na solução, indicando que o osso atingiu sua saturação e o BP excedente não foi incorporado.68
- Gráfico 2.2. Viabilidade celular pelo método MTT. Em (A) grupos tratados e controle após 5 dias de cultivo celular. Em (B), 7 dias de cultivo e (C) 9 dias. Nenhum efeito citotóxico foi detectado entre os diferentes tratamentos nos três períodos, já que não houve diferenças significantes entre os grupos tratados e controle ($p>0,05$).....70
- Gráfico 2.3. Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT entre os dias 5, 7 e 9 de cultivo celular. A maior viabilidade celular foi detectada ao 7º dia de cultivo em todos os grupos ($p<0,05$).....71
- Gráfico 2.4. Quantificação de células TRAP+ após 7 dias de cultivo. Em (A) foram consideradas células multinucleadas e gigantes na contagem. Foi observado maior quantidade de células TRAP+ no grupo AD6, significativamente maior do que no grupo A ($p<0,05$). Não foram detectadas diferenças significantes entre os demais grupos. Em (B) contagem de células gigantes TRAP+; não houve diferença estatística entre os grupos ($p>0,05$).....72
- Gráfico 2.5. Expressão gênica dos marcadores RANKL (A) e OPG (B) em células de medula óssea de camundongo cultivadas por 7 dias. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$).....78
- Gráfico 2.6. Quantificação da reabsorção óssea nos discos de osso cortical bovino, após 7 dias de cultivo. Em (A) a quantidade de poços (pits) de reabsorção na amostra avaliada e em (B) a porcentagem da área reabsorvida na amostra. Foi observada diferença significativa ($p<0,05$) entre os grupos A e D6, em ambas análises.80
- Gráfico 3.1. Quantificação de células TRAP+ após 5 dias de cultivo. Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos ($p>0,05$).....91
- Gráfico 3.2. Quantificação dos anéis de actina por área óssea. A menor quantidade foi exibida no grupo A100 ($p<0,05$).....92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Levantamento bibliográfico dos estudos com destaque para os modelos experimentais utilizados, dose dos medicamentos e os achados principais (conclusões).....	42
Quadro 2.1. Sondas utilizadas	65
Quadro 2.2. Diâmetro (em μm) das maiores células TRAP+ por grupo.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β -HSD1	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1
11 β -HSD2	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2
A	grupo alendronato
A-MuLV	Abelson murine leukemia virus
AD6	grupo alendronato e dexametasona a 10 ⁻⁶ M.
ALN	alendronato de sódio
ATP	adenosina trifosfato
BP	bisfosfonato
C	grupo controle
D6	grupo dexametasona a 10 ⁻⁶ M
DEX	dexametasona
EVs	vesículas extracelulares
FPP	farnesil difosfato
GC	glicocorticoide
GIOP	osteoporose induzida por glicocorticoide
GPP	geranyl difosfato
GR	glucocorticoid receptor
kV	quilovolt
M	mol
M-CFS	fator estimulador de colônia macrofágica
MEV	microscopia eletrônica de varredura
mg	miligrama
mM	milimolar
nm	nanômetro
nM	nanomolar
OPG	osteoprotegerina
PPi	pirofosfato inorgânico
RANK	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B</i>
RANKL	<i>receptor activator of nuclear factor kappa B ligand</i>
TRAP	fosfatase ácida resistente ao tartarato
μ g	micrograma

μl	microlitro
μm	micrômetros
μM	micromolar

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	Revisão de literatura e escopo da tese	31
1.1	Tecido ósseo	31
1.2	Osteoclastos	32
1.3	Bisfosfonatos	34
1.4	Glicocorticoides	37
1.5	Tratamento combinado com alendronato e dexametasona	39
1.6	Cultura celular	44
1.7	Cultivo de osteoclastos	45
1.8	Vesículas extracelulares e seu impacto na sinalização celular	46
1.9	Escopo da tese	48
	REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 2	Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese	57
2.1	Introdução	57
2.2	Proposição	59
2.3	Material e métodos	60
2.3.1	Delineamento experimental	60
2.3.2	Obtenção e tratamento dos substratos ósseos	61
2.3.3	Análise da saturação dos substratos ósseos com alendronato	61
2.3.4	Obtenção da cultura primária e diferenciação de células clásticas	62
2.3.5	Viabilidade celular pela técnica do MTT	63
2.3.6	Método histoquímico da TRAP	63
2.3.7	Imunofluorescência para RANKL	64
2.3.8	Análise da expressão gênica por qPCR	64
2.3.9	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	65
2.3.10	Análise estatística	66

2.4	Resultados	67
2.4.1	Obtenção e tratamento dos substratos ósseos	67
2.4.2	Saturação dos substratos ósseos com alendronato	67
2.4.3	Obtenção da cultura primária e diferenciação de células clásticas	68
2.4.4	Viabilidade celular pela técnica do MTT	69
2.4.5	Método histoquímico da TRAP	71
2.4.6	Imunofluorescência para RANKL.....	74
2.4.7	Análise da expressão gênica por qPCR	76
2.4.8	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	79
	REFERÊNCIAS	82
	CAPÍTULO 3 Efeito do alendronato sobre a liberação de vesículas extracelulares	85
3.1	Introdução	85
3.2	Proposição	87
3.3	Material e métodos	88
3.3.1	Delineamento experimental	88
3.3.2	Obtenção e tratamento dos substratos ósseos	88
3.3.3	Obtenção das células clásticas.....	88
3.3.4	Método histoquímico da TRAP	89
3.3.5	Identificação da presença de anéis de actina com Faloidina-FITC	89
3.3.6	Isolamento das vesículas extracelulares (EVs)	89
3.3.7	Análise das (EVs) utilizando o método NTA	90
3.4	Resultados	91
3.4.1	Método histoquímico da TRAP	91
3.4.2	Identificação da presença de anéis de actina com Faloidina-FITC	92
3.4.3	Análise das EVs utilizando o método NTA	93
	REFERÊNCIAS	95

CAPÍTULO 4	Discussão geral e conclusão	97
4.1	Discussão	97
4.2	Conclusão.....	104
REFERÊNCIAS.....		105
ANEXO A		109

CAPÍTULO 1 Revisão de literatura e escopo da tese

1.1 Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado composto por matriz extracelular com componente orgânico e mineral, além de quatro tipos de células. A matriz orgânica é constituída predominantemente por colágeno tipo I e a fase mineral na forma de cristais de hidroxiapatita $[3Ca_3(PO_4)_2(OH)_2]$. Apesar da sua aparente inércia, o osso é extremamente dinâmico, capaz de promover processos de remodelamento e reparo continuamente (Kenkre; Bassett, 2018).

Este dinamismo do tecido ósseo é regulado por uma complexa rede de sinalização entre as diferentes células que compõem o osso. Há primordialmente células originadas por duas linhagens: as de origem mesenquimal (osteoblastos, células de revestimento ósseo e osteócitos) e as de origem monocítica/macrofágica (osteoclastos). Enquanto as primeiras são as responsáveis por regular e secretar matriz, os osteoclastos têm a função de reabsorção (Datta et al., 2008; Kenkre; Bassett, 2018).

Os osteoblastos são células com formato cuboide quando ativas. Têm características comuns às células secretoras de proteínas, exibindo no seu citoplasma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e vesículas de secreção. Estas células são derivadas de células-tronco pluripotentes mesenquimais e o controle da sua diferenciação é regulado principalmente pelo Runx2 e a via Wnt/ β -catenina. Quando os osteoblastos não estão ativos, ou seja, não estão produzindo matriz, eles são chamados de células de revestimento ósseo. Elas têm formato achatado, com poucas organelas de síntese e formam uma camada contínua de células que recobrem a matriz mineralizada, abaixo do perióstio e endóstio (Dirckx et al., 2019).

Já os osteócitos são osteoblastos que ficaram retidos na matriz óssea mineralizada. Eles são o grupo de células mais abundantes do osso (aproximadamente 90-95% das células) e formam uma profusa rede de comunicação através dos seus canaliculos. Essa comunicação ocorre através da liberação de

citocinas como RANKL/OPG e também Sost/Dkk1/Wnt; ou seja, os osteócitos podem regular tanto os osteoblastos quanto os osteoclastos. Além disso, essas células são bastante sensíveis aos estímulos mecânicos, sendo capazes de coordenar e regular a homeostase óssea (Robling; Bonewald, 2020).

1.2 Osteoclastos

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas derivadas da fusão e diferenciação de células mononucleares da linhagem monocítica-macrofágica provenientes da medula óssea (origem hematopoiética). São células com formato peculiar, alta eficácia na reorganização do citoesqueleto e com uma impressionante capacidade digestiva extracelular (Cappariello et al., 2014).

A principal função dos osteoclastos é reabsorver e degradar o osso em situações fisiológicas e também patológicas, possibilitando o crescimento, reparos, remodelação óssea e movimentação dentária (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009). Contudo, esta célula também participa da regulação dos níveis de cálcio, fosfato, além de diversos outros processos no organismo.

O osteoclasto é uma célula polarizada, de citoplasma acidófilo e com 3 regiões distintas: região basal, onde estão os núcleos e grande parte das suas organelas; logo abaixo, uma região intermediária, onde há uma grande quantidade de vesículas e próximo à superfície óssea, a região ativa. Na região ativa localiza-se a borda em escova e a zona clara, ou de selamento (Madel et al., 2019).

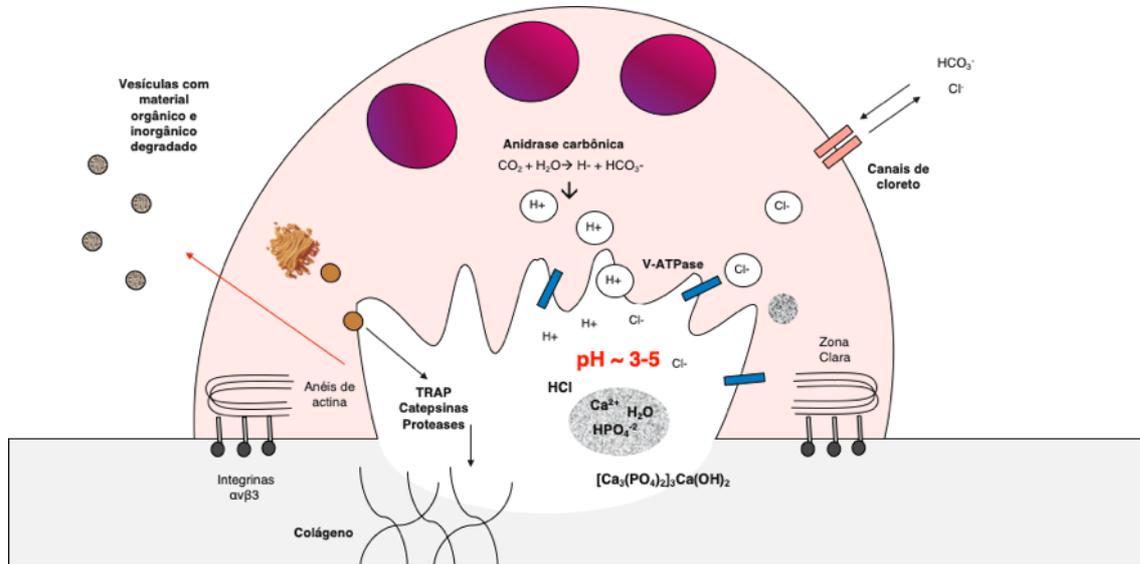
Os estímulos para a ativação e a fusão das células clásticas são regulados principalmente pelo sistema RANK/RANKL/OPG e pelo fator estimulador de colônia macrofágica (M-CFS) (Cappariello et al., 2014). Na membrana plasmática tanto dos precursores das células clásticas quanto dos osteoclastos ativos, há um receptor NF- κ B RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa B*), que quando ativado pelo seu ligante o RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa B ligand*), uma proteína solúvel secretada pelos osteoblastos e seus precursores no osso, estimulam as respostas celulares que promoverão a fusão e diferenciação das células clásticas, aumentando a clastogênese. Outra molécula que pode ser liberada para controlar

esse processo é a osteoprotegerina (OPG). A OPG se liga ao RANKL impedindo-o de se ligar ao RANK, inibindo os processos de diferenciação e ativação das células clásticas (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

Quando a célula clástica é ativada, ela reorganiza seu citoesqueleto e se adere à matriz mineralizada do osso através dos podossomos, essa projeção apresenta, na sua região central, a borda em escova e, na sua periferia, a zona clara. Dentre os componentes principais dos podossomos podemos citar os microfilamentos de actina, proteínas de adesão e receptores de integrina (Cappariello et al., 2014). Os microfilamentos, em uma ação bastante dinâmica, polimerizam-se formando filamentos de actina (F-actin) que compõem os anéis de actina (Han et al., 2019; Holliday et al., 2019). Já as integrinas como as $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \nu \beta 1$ e especialmente as $\alpha \nu \beta 3$ se ligam à sequência tri-peptídica RGD (*Arg-Gly-Asp* ou Arginina, Glicina e Aspartato) de proteínas da matriz óssea, como a vitronectina, osteopontina e sialoproteína óssea. Essa junção entre os anéis de actina e a ligação entre integrinas e proteínas não colágenas da matriz, promovem um selamento periférico que por sua vez, isolam a lacuna de Howship do restante do espaço extracelular (Kenkre; Bassett, 2018).

Após a adesão da célula clástica à matriz mineralizada, inicia-se o processo de dissolução dos cristais de hidroxiapatita por meio do bombeamento de íons H^+ e Cl^- , que gera uma acidificação na lacuna de reabsorção. Isso é possibilitado pela presença da bomba de prótons V-ATPase e canais de cloreto. Com a degradação da fase mineral, ocorre a exposição da matriz orgânica, que é então degradada por enzimas proteolíticas como a cisteína proteinase, metaloproteinases, serina proteinase e fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (Cappariello et al., 2014). Esses componentes degradados são englobados por vesículas, transportados por transcitose e liberados na superfície basolateral (domínio secretor) da célula clástica, finalizando o processo de reabsorção (Hirvonen et al., 2013).

Figura 1.1. Processo de reabsorção óssea pelos osteoclastos. A célula se torna polarizada, o citoesqueleto se reorganiza formando uma zona clara, onde ocorre a adesão do osteoclasto ao tecido ósseo.



Fonte: A autora

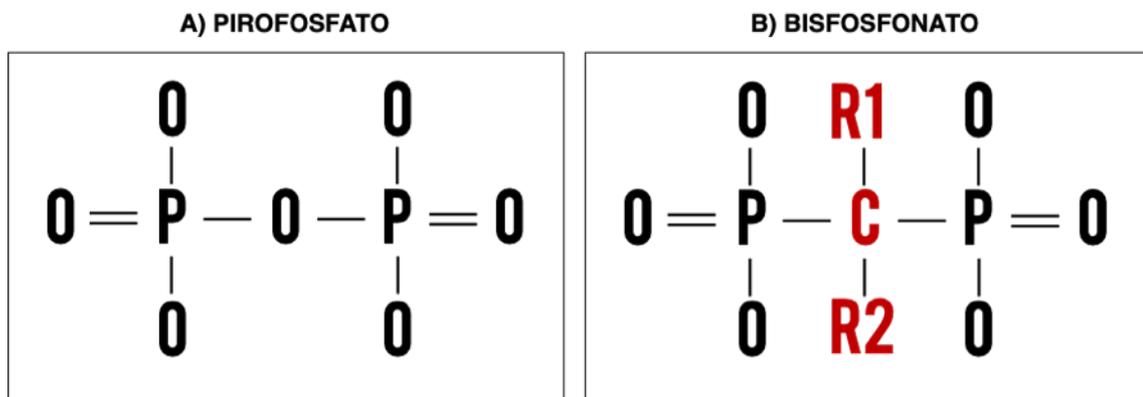
Diversos fatores influenciam os processos reabsortivos, como hormônios da paratireoide, estrógenos, insulina, 1,25(OH)2D3 (vitamina D), interleucinas, prostaglandinas e medicamentos, entre eles os bisfosfonatos e os glicocorticoides.

1.3 Bisfosfonatos

Os bisfosfonatos (BP) são medicamentos análogos ao pirofosfato inorgânico (PPI) que atuam sobre o metabolismo ósseo. Essas drogas são amplamente utilizadas no tratamento de múltiplas formas da osteoporose, doença de Paget, osteogênese imperfeita, hipercalcemia e metástases ósseas (Rogers et al., 2020; Russell, 2011).

Ao contrário das ligações lábeis encontradas no pirofosfato (P-O-P), os BP têm na sua composição química dois grupos fosfato ligados a um átomo de carbono (P-C-P), conferindo a esse medicamento maior estabilidade, resistência à hidrólise e alta afinidade à hidroxiapatita. Há também na sua estrutura, duas cadeias laterais R1 e R2, permitindo uma grande variação na composição dessas drogas (Russell, 2006).

Figura 1.2 Comparação entre as composições químicas do pirofosfato e do bisfosfonato. Um átomo de carbono substitui um de oxigênio e são adicionadas duas cadeias laterais, R1 e R2.



Fonte: A autora

Os BP de primeira geração, também chamados de bisfosfonatos não-nitrogenados (etidronato, clodronato e tiludronato) são os mais parecidos com o pirofosfato. Esses medicamentos são convertidos no interior das células clásticas em análogos não hidrolisáveis de adenosina trifosfato (ATP). O acúmulo destes compostos citotóxicos, provoca a apoptose dessas células, inibindo a atividade reabsortiva dos osteoclastos. Já os BPs de segunda e terceira geração, também chamados de bisfosfonatos nitrogenados, apresentam um átomo de nitrogênio na sua cadeia R2, o que promove um significativo aumento na sua potência. Os BP de segunda geração podem ser de 10 a 100 vezes mais potentes que os de primeira geração, enquanto os de terceira geração chegam a ser até 10000 vezes mais efetivo. Esse significativo aumento de potência nos BP de terceira geração se deve a estrutura química dessa molécula que além de ter o átomo de nitrogênio, apresenta na sua composição um anel heterocíclico (Rogers et al., 2011; Russell, 2006).

O mecanismo de ação dos BP de segunda e terceira geração ocorre através da inibição da via do mevalonato. Esta via, também conhecida como via da biossíntese do colesterol, tem papel fundamental no desenvolvimento de diversos processos celulares ao possibilitar a síntese de coleteróis e isoprenóides, como o farnesil difosfato (FPP) e geranil difosfato (GPP). Estes compostos (FPP e GPP) são requeridos para a prenilação de pequenas GTPases como Ras, Rab, Rho e Rac que por sua vez são essenciais para a regulação de diversos processos na célula clástica

como a organização do citoesqueleto, estabelecimento da morfologia da célula, formação da borda em escova e também da sinalização do tráfego intracelular de moléculas e vesículas (Jobke et al., 2014; Rogers et al., 2011).

O alendronato de sódio (ALN) é um bisfosfonato nitrogenado de segunda geração com alta afinidade à hidroxiapatita (Cummings et al., 2020). Apesar de não estar bem esclarecido como os BP são transferidos da circulação para a matriz óssea, acredita-se que ele entra no espaço extracelular e através do transporte paracelular é disponibilizado na superfície do osso. Uma vez aderido à essa superfície o ALN pode provocar efeitos diretamente nos clastos, que durante a reabsorção engloba por endocitose o medicamento aderido à matriz. Na sequência, já dentro da célula, o ALN inicia sua ação na via do mevalonato, inibindo os processos necessários à organização e adesão da célula à matriz (Rogers et al., 2020).

Em estudos histológicos onde foi feita a administração de ALN em animais, é possível observar um número substancial de células clásticas latentes, ou seja, inativas (Bradaschia-Correa et al., 2013; Rezende et al., 2017; Yamamoto-Silva et al., 2013). Essas células latentes também foram descritas por Jobke et al. (2014) em um estudo *in vivo* a partir de biópsias de osso da crista ilíaca de pacientes com osteoporose e em tratamento com BP nitrogenados. Os autores descreveram essas células como *biphosphonate-osteoclasts* (osteoclastos em pacientes tratados com BP). Estes osteoclastos latentes seriam células gigantes com mais de 10 núcleos e pelo menos 2 das características a seguir: 1) mais de 80 µm de diâmetro, 2) formato arredondado 3) descolamento da superfície óssea, 4) células de revestimento ósseo subjacente e 5) presença de núcleos picnóticos.

Essas alterações estruturais também são observadas em estudos *in vitro*. Alakangas et al. (2002), não encontraram diminuição do número de células clásticas ao serem tratadas com ALN, em cultura primária. Contudo, verificaram diversas alterações nos osteoclastos tratados com este bisfosfonato, incluindo organização incompleta do citoesqueleto, da borda em escova e do tráfego vesicular (Alakangas et al., 2002). Também tem sido indicado que a administração de pequenas doses de ALN pode inibir a liberação de citocinas como o RANKL, interferindo nas vias de recrutamento, diferenciação e atividade das células clásticas (Martins et al., 2015). Esse efeito sobre a atividade dos clastos tem se confirmado, através da diminuição

de células TRAP positivas ao serem tratadas com esse medicamento *in vitro* (Pasqualetti et al., 2015) e também *in vivo* (Rezende et al., 2017).

O ALN é um medicamento bastante utilizado no tratamento da osteoporose pós menopausa. Como sua eficácia nessa doença já é consolidada, tem sido bastante estudado como esta droga poderia atuar sobre a osteoporose induzida por glicocorticoides.

1.4 Glicocorticoides

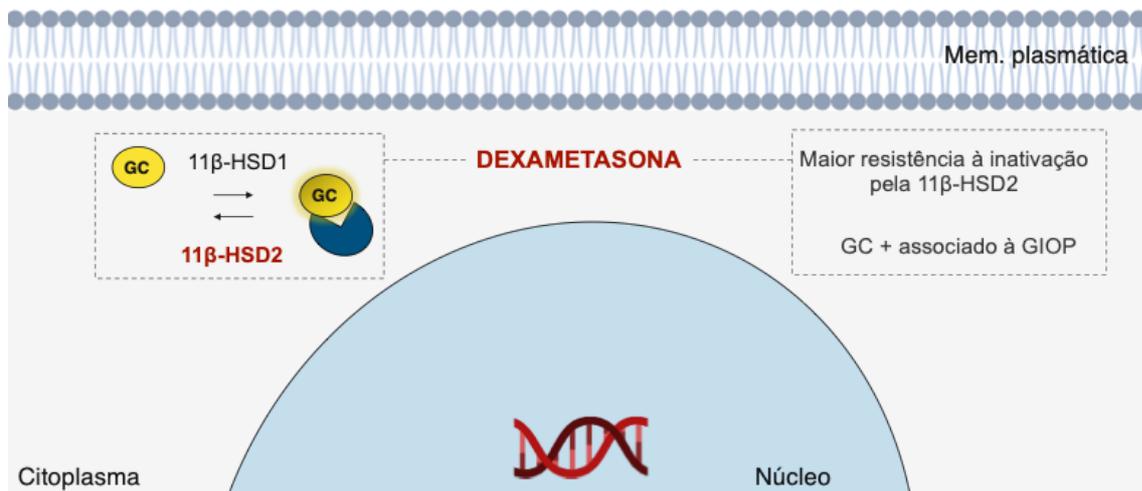
Os glicocorticoides (GC) são hormônios esteroidais, sintetizados endogenamente no córtex da glândula adrenal, sendo o cortisol o principal GC ativo nos humanos. Estes hormônios controlam o ritmo circadiano, com expressiva atividade anti-inflamatória e imunomoduladora (Ramamoorthy; Cidlowski, 2016).

O mecanismo de ação dos glicocorticoides começa a partir da entrada do GC pela membrana plasmática da célula para o citoplasma. Em seguida ele é convertido à sua forma ativa através da enzima 11 β -HSD1 (11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1). Em sua forma ativa, o GC se liga ao receptor GR (glucocorticoid receptor) e migra para o núcleo. Este complexo ativo no núcleo pode interagir com o DNA (ação genômica) ou com outras proteínas de transcrição (ação não genômica). O efeito anti-inflamatório acontece pela inibição de prostaglandinas e fosfolipase A2, enquanto o efeito imunossupressor ocorre pela inibição de linfócitos. Contudo, essas modificações na expressão gênica das células, pode atuar em praticamente todo o organismo, incluindo as células do tecido ósseo (Hachemi et al., 2018; Henneicke et al., 2014).

O controle endógeno da ativação do GC é feito pela enzima 11 β -HSD2 (11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2), que converte a forma ativa do GC (cortisol), na sua forma inativa (cortisona). Contudo, tem sido indicado que a dexametasona apresenta certa resistência à inativação pela 11 β -HSD2, podendo apresentar um maior grau de complicações esqueléticas (Weinstein, 2012). A dexametasona (9 α -fluoro-16 α -metilprednisolona) é um esteroide fluorado, com estrutura semelhante ao cortisol. Ela atua como agente adrenérgico, imunossupressor e anti-inflamatório,

sendo um GC muito receitado; especialmente por ter boa biodisponibilidade, alto poder anti-inflamatório e meia-vida de eliminação longa (Billington et al., 2017).

Figura 1.3. Mecanismo de ação do GC dexametasona nas células. O GC é convertido à sua forma ativa pela ação da enzima 11 β -HSD1, e o complexo ativo migra para o núcleo da célula, promovendo as ações genômicas.



Fonte: A autora

Um dos efeitos colaterais mais expressivos dos GC é a intensa perda de densidade óssea mineral em tratamentos crônicos, ou seja, quando esses medicamentos são administrados continuamente de 3 a 6 meses ou mais (Rizzoli; Biver, 2015). A consequência dessa perda de densidade óssea, ficou conhecida como osteoporose induzida por glicocorticoides (GIOP) (Jiang et al., 2020; Pasqualetti et al., 2015; Sousa et al., 2017). Uma importante diferença entre a GIOP e a osteoporose pós menopausa, é que enquanto na primeira há severa redução na atividade dos osteoblastos, na segunda a patogênese é caracterizada pelo aumento da reabsorção durante o *turnover* ósseo (Rizzoli; Biver, 2015).

Alguns autores em estudos *in vitro* relatam que estes medicamentos podem prolongar o tempo de vida da célula clástica (Weinstein et al., 2002) além de potencializar a atividade reabsortiva dessa célula ao promover redução da liberação de osteoprotegerina (OPG) e aumento de RANKL (Canalis et al., 2007; Sivagurunathan et al., 2005; Weinstein, 2011). Uma vez ocorrendo a ligação do RANKL ao RANK, são desencadeadas respostas celulares que promoverão a fusão e diferenciação das células clásticas aumentando a reabsorção. Foi demonstrado in

vitro que a dexametasona estimula a formação de células TRAP+ multinucleadas em co-cultura de adipócitos da medula óssea com precursores de clastos (Hozumi et al., 2009).

Além disso, também há a ação supressora destes medicamentos, ao promover diminuição do número de osteoblastos e suas funções, afetando os processos de neoformação óssea. Essa ação dos glicocorticoides pode ocorrer sobre a via de diferenciação dos osteoblastos, através da inibição da via Wnt/ β -catenina e da proteína morfogenética óssea (BMP-Runx2) (Hayashi et al., 2009), diminuindo a diferenciação osteoblástica (Canalis et al., 2007; Sivagurunathan et al., 2005); e há também indução de apoptose dessas células, levando a um rápido efeito sobre a neoformação óssea (Gori et al., 2015; Henneicke et al., 2014).

Essa combinação entre os efeitos sobre a neoformação e reabsorção, parece acontecer de forma mais intensa nos períodos iniciais do tratamento, já que ao promover a diferenciação dos osteoblastos, há também efeitos sobre a liberação das citocinas necessárias à diferenciação das células clásticas. Dessa forma, a exposição aos glicocorticoides exógenos provoca inicialmente grande perda de densidade mineral óssea nos primeiros meses de tratamento, diminuindo gradualmente, podendo chegar a 12% no primeiro ano de tratamento, e após esse período a diminuição é menos intensa (entre 2-3%) (Henneicke et al., 2014).

1.5 Tratamento combinado com alendronato e dexametasona

Clinicamente, são duas situações possíveis que podem levar ao tratamento combinado com o alendronato e a dexametasona. A primeira é o uso do bisfosfonato como opção de tratamento para a GIOP (osteoporose induzida por glicocorticoides) e a segunda, pacientes em tratamento contra osteoporose utilizando bisfosfonato, que por algum período (seja breve ou crônico), precise fazer uso de um glicocorticoide objetivando um controle inflamatório ou do sistema imune.

Para melhor compreensão desses fenômenos, foi realizada busca no PubMed em 01/02/2021 utilizando as palavras chaves: “dexamethasone”, “alendronate” e

“osteoclast”. Foram recuperados 7 artigos que correspondiam a esses critérios. Nenhum filtro adicional foi incluído e a busca detalhada pode ser observada abaixo:

Search: ((*dexamethasone*) AND (*alendronate*)) AND (*osteoclast*)

("dexamethason"[All Fields] OR "dexamethasone"[MeSH Terms] OR "dexamethasone"[All Fields] OR "dexamethasone s"[All Fields] OR "dexamethasones"[All Fields]) AND ("alendronate"[MeSH Terms] OR "alendronate"[All Fields] OR "alendronate s"[All Fields] OR "alendronates"[All Fields] OR "alendronic"[All Fields]) AND ("osteoclastic"[All Fields] OR "osteoclasts"[MeSH Terms] OR "osteoclasts"[All Fields] OR "osteoclast"[All Fields]).

Dos 7 artigos recuperados, 6 eram estudos experimentais (in vitro e in vivo) e um levantamento epidemiológico. Para os estudos in vivo, a DEX foi utilizada objetivando induzir à osteoporose induzida por GC (GIOP) e as doses variaram entre 0.6mg/kg a 1mg/kg. Nesses animais (ratas Wistar ou Sprague-Dawley), o ALN foi utilizado como um dos grupos experimentais para comparar tratamentos, e a dose variou de 1mg/kg a 2mg/kg. Em todos os trabalhos, a dose de DEX foi suficiente para a indução de GIOP e o tratamento com ALN, auxiliou na recuperação dos danos ósseos, seja melhorando a massa óssea, ou promovendo diminuição no número de osteoclastos (Fredoni et al., 2017; Mohsenifar et al., 2016; Ren et al., 2017).

Já nos estudos in vitro, as doses de ALN variaram entre 10^{-4} a 10^{-14} M, enquanto as doses de DEX variaram entre 10^{-7} a 10^{-10} M. Resultados bem diferentes foram observados com a mesma concentração de DEX (10^{-8} M). Foi observado que essa baixa concentração de DEX foi capaz de estimular a diferenciação de osteoclastos (Breuil et al., 1998) e de osteoblastos (Giuliani et al., 1998). Inclusive, foi observado que a adição de ALN, também em baixas concentrações (10^{-9} a 10^{-11} M) juntamente com a DEX, potencializava essa diferenciação dos osteoblastos (Giuliani et al., 1998). Outro efeito associado à DEX foi o prolongamento do tempo de vida do osteoclasto e diminuição da apoptose dessas células. Esse efeito foi observado inclusive quando as células eram tratadas com ALN, ou seja, um efeito não evitável pelos bisfosfonatos (Weinstein et al., 2002).

O levantamento epidemiológico discorre sobre uma série de casos de 119 pacientes que apresentaram osteonecrose induzida por BPs. Um fato bastante

relevante foi que desses 119 pacientes, 71 (59.7%) faziam o uso conjunto de um BP com a dexametasona, que era prescrita para o tratamento de outra comorbidade associada (Marx et al., 2005). Embora os autores não discorram sobre a possibilidade de haver correlação entre o uso concomitante de um BP e a DEX no aparecimento dessas desordens ósseas, é necessário reforçarmos que os GC também estão associados ao desenvolvimento de osteonecrose. Esse fenômeno é conhecido como *steroid-associated osteonecrosis* ou osteonecrose associada à esteroides (Weinstein, 2012; Xie et al., 2015).

Os mecanismos por trás da interação entre esses medicamentos não estão completamente estabelecidos. Dentre os desafios para a compreensão desses processos podemos citar a grande variação de doses, tanto de ALN quanto DEX, o tempo de tratamento e as comorbidades associadas.

Quadro 1.1. Levantamento bibliográfico dos estudos com destaque para os modelos experimentais utilizados, dose dos medicamentos e os achados principais (conclusões).

Título do trabalho	Modelo de estudo	Detalhes	Dose ALN	Dose DEX	Conclusão
Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. V Breuil et al. (1998)	In vitro	Co-cultura de sangue periférico com células ST2	Entre 10^{-13} a 10^{-5} M	10^{-8} M	ALN inibiu a reabsorção óssea em concentrações $\leq 10^{-7}$ M e com 10^{-5} M, o número de OC e a reabsorção diminuíram profundamente.
Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. Marx et al. (2005)	Casos clínicos	119 casos de paciente que tiveram exposição óssea relacionada ao uso de BPs			59.7% dos casos de exposição óssea em decorrência do uso de BPs, faziam uso concomitante de Dexametasona.
Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. Weinstein et al. (2002)	In vitro e in vivo	Medula óssea de camundongo C57Bl para estudo in vitro com ALN+DEX. In vivo foi estudado ALN + prednisolona	10^{-5} M	10^{-7} a 10^{-10} M	A perda precoce de osso pelo uso de glicocorticóides é causada pelo aumento do tempo de vida dos osteoclastos, um efeito não evitável pelos bisfosfonatos.
Promotion effect of extracts from plastrum testudinis on alendronate against glucocorticoid-induced osteoporosis in rat spine. Ren et al. (2017)	In vivo	Ratas Sprague-Dawley tratados com ALN, DEX e extrato de testudinis	2 mg/kg	0.6 mg/kg	ALN e ALN + extrato de testudinis melhoraram a GIOP, sendo a combinação dos dois compostos mais efetiva
Evaluation of the effects of photobiomodulation on vertebrae in two rat models of experimental osteoporosis. Fredoni et al. (2017)	In vivo	Ratas Wistar; a osteoporose induzida por ovariectomia ou com GC. Tratamentos com ALN, laser ou a combinação dos dois.	1 mg/kg	1 mg/kg	Tratamento com ALN melhorou significativamente o volume total do osso; a combinação de ALN + Laser tiveram um aumento de volume ósseo inferior.

Evaluation of the effects of pulsed wave LLLT on tibial diaphysis in two rat models of experimental osteoporosis, as examined by stereological and real-time PCR gene expression analyses. Mohsenifar et al. (2016)	In vivo	Ratas Wistar; a osteoporose foi induzida pela ovariectomia com GC. Em ambos os modelos os tratamentos foram o uso de Alendronato, laser ou a combinação dos dois.	1 mg/kg	1 mg/kg	As ratas ovariectomizadas sem outro tratamento foram o grupo que mais perderam volume ósseo total; o tratamento com ALN e ALN+Laser diminuiu consideravelmente o número de osteoclastos.
Bisphosphonates Stimulate Formation of Osteoblast Precursors and Mineralized Nodules in Murine and Human Bone Marrow Cultures In Vitro and Promote Early Osteoblastogenesis in Young and Aged Mice In Vivo. Giuliani et al. (1998)	In vitro e in vivo	Células de medula óssea de Swiss/Webster e células da crista ilíaca de mulheres em menopausa. Para o modelo in vivo, também foram utilizados camundongos Swiss/Webster.	10 ⁻⁵ a 10 ⁻¹⁴ M;	10 ⁻⁸ M	Bisfosfonatos, em doses relativamente baixas, exercem influência benéfica nas células da linhagem osteoblástica na medula humana e murina in vitro e in vivo.

Fonte: A autora

1.6 Cultura celular

O cultivo celular tem sido um importante aliado na busca de respostas na pesquisa biológica. Essa metodologia tem possibilitado inúmeros avanços ao longo dos anos como o desenvolvimento de vacinas, testes de toxicidade para o desenvolvimento de novos medicamentos, além de permitir um melhor conhecimento sobre as respostas celulares frente a diversos estímulos (Yao; Asayama, 2017).

Existem dois tipos de cultivo celular; o primeiro é cultivo realizado a partir de células de linhagem (também conhecidas como imortalizadas) e o segundo é feito a partir de um tecido doador, chamada de cultura primária (McKeehan et al., 1990).

As células imortalizadas têm a vantagem de manter a estabilidade do fenótipo e genótipo ao longo das passagens, terem boa reprodutibilidade experimental com crescimento e respostas mais homogêneas. Além disso, a manutenção de células de linhagem é relativamente simples. Contudo, um dos desafios no cultivo de células imortalizadas é justamente manter a pureza da linhagem ao longo das passagens. Contaminações cruzadas, que podem alterar as características genóticas ou fenotípicas das células podem acontecer, comprometendo a qualidade da pesquisa (Freedman et al., 2015).

Já a cultura primária, como dito anteriormente, é realizada a partir de um tecido doador (McKeehan et al., 1990). Dentre as vantagens da cultura celular primária podemos destacar a maior proximidade biológica e genética comparando com modelos *in vivo* e também o fato de que os modelos *in vitro* evitam algumas questões éticas quando comparado aos experimentos em animais. Contudo, há também algumas limitações como o menor tempo de vida e crescimento mais lento das células (dependendo da origem do tecido doador). Outro desafio da cultura primária é a maior variabilidade nas respostas celulares de diferentes amostras doadoras. Isso faz com que seja necessário um número maior de amostras quando comparado com o cultivo de células de linhagem, aumentando o custo experimental.

1.7 Cultivo de osteoclastos

Um dos primeiros modelos descritos de cultivo de osteoclastos foi proposto por Nelson e Bauer. Foram utilizados fêmures de coelhos jovens, que foram mecanicamente picados, liberando a suspensão de células que posteriormente se diferenciaram em osteoclastos (Nelson; Bauer, 1977). Mas existem outros modelos de cultura primária de células clásticas como o cultivo a partir de ossos longos de frangos (Collin-Osdoby; Osdoby, 2012) e murinos (Arnett; Dempster, 1986). Todas essas técnicas tiveram sua importância contudo, as limitações ainda eram bastante significativas. Os osteoclastos obtidos através dos ossos de frango não apresentavam receptores de calcitonina, enquanto que os osteoclastos diferenciados a partir de ossos de coelhos e ratos possuíam um tempo de vida muito curto e não eram capazes de reabsorver os ossos efetivamente (não promovia a formação de concavidades ou “*pits*” de reabsorção) (Chambers; Magnus, 1982; Rucci et al., 2019).

Esses problemas foram contornados através do modelo de cultura primária a partir da medula óssea de camundongos jovens (entre 4-8 semanas). A medula óssea é uma fonte de diversas células, em diferentes estágios de formação. Nesse modelo foi proposto que os osteoblastos eram capazes de liberar fatores que possibilitariam a diferenciação das células progenitoras de osteoclastos em osteoclastos gigantes ou multinucleados (Takahashi et al., 1988). O cultivo de osteoclastos a partir das células da medula óssea de camundongo precisa promover um estímulo para que os osteoblastos liberassem os fatores de diferenciação (como o RANKL) e esse estímulo foi obtido através da adição de dihidroxivitamina D3 ao meio de cultura (Holliday et al., 1995).

Atualmente, a diferenciação das células também pode ser feita adicionando diretamente os fatores de diferenciação RANKL e M-CSF com as células de medula óssea de camundongos e até com células do sangue periférico humano. Outros modelos propostos incluem a co-cultura e para o estabelecimento deste cultivo são necessários três fatores: 1. fonte de células osteoblásticas (como por exemplo as células derivadas da calvária de camundongos), 2. fonte de células hematopoiéticas (exemplo: medula óssea de camundongos) e 3. fatores de diferenciação (Kartsogiannis; Ng, 2004). Contudo, pela dificuldade técnica, os modelos utilizando

apenas a medula óssea de camundongos ou células do sangue periférico, acabam sendo mais utilizados.

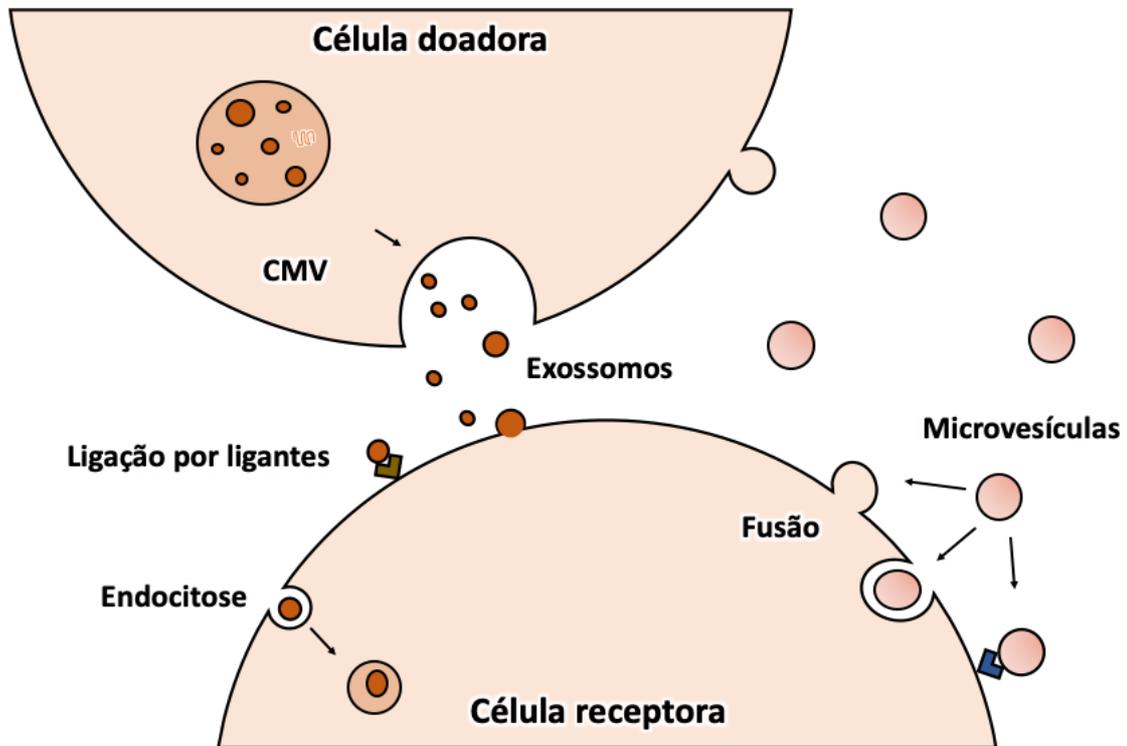
Outra técnica amplamente utilizada é o cultivo a partir de células da linhagem Raw 264.7. As células imortalizadas Raw 264.7 foram criadas a partir da estimulação de um tumor pela infecção do vírus A-MuLV (Abelson murine leukemia vírus) em camundongos (Raschke et al., 1978). Estas células são semelhantes às células de origem monocítica/macrofágica e são capazes de se diferenciarem em osteoclastos ao serem estimuladas com RANKL (Taciak et al., 2018). As células imortalizadas têm a vantagem de terem ampla disponibilidade, permitem replicação através das passagens celulares e evitam o uso de animais. Porém, elas podem não reagir de forma semelhante às células de cultura primárias e seu uso deve ser usado preferencialmente em estudos preliminares (Marino et al., 2014).

1.8 Vesículas extracelulares e seu impacto na sinalização celular

As vesículas extracelulares (EVs) são partículas derivadas de células de várias origens e com diferentes funções. Podemos classificar as EVs, de acordo com a sua origem, em dois tipos: microvesículas, que são originadas por brotamento diretamente da membrana plasmática da célula e exossomos, que são um tipo intraluminal de vesículas derivadas de corpos multivesiculares. Os exossomos, que também podem ser chamados de nanovesículas, têm tamanho variando entre 50-150nm. Já as microvesículas variam entre 50-500nm, podendo chegar até a 1µm (van Niel et al., 2018).

As EVs podem carregar grande variedade de componentes, dependendo da origem de cada uma delas. Em geral, podem ser encontrados ácidos nucleicos (DNA, RNA, mRNA, miRNA, etc), moléculas do citoesqueleto, lipídeos e diversas proteínas.

Figura 1.4. Liberação e comunicação das EVs. Observar os dois tipos de vesículas liberadas pelas células: microvesículas, brotando diretamente da membrana plasmática da célula e os exossomos, que foram liberados a partir de corpos multivesiculares (CMV).



Fonte: A autora

Tem sido relacionado às EVs funções de comunicação intercelular, tanto em processos fisiológicos como em patológicos, como o câncer. Para que a comunicação intracelular ocorra, as EVs precisam se ligar à célula alvo, também chamada de receptora. Essa ligação pode ocorrer através de processos de endocitose, fusão e também pela ligação direta entre ligantes/receptores (Figura 1.4). Apesar de ainda não estar completamente esclarecido como as EVs se ligam de forma específica às células-alvo, tem sido proposto que essa especificidade está relacionada a interações entre vários ligantes e receptores das superfícies, tanto das células quanto das EVs (Xu et al., 2018). Dentre essas moléculas de superfície podemos citar as tetraspaninas, integrinas, lipídios, lectinas, proteoglicanos e até mesmo componentes de matriz extracelular (van Niel et al., 2018).

Com os recentes avanços na pesquisa biomolecular, novas possibilidades têm sido atribuídas às EVs, permitido um melhor entendimento de diversos processos que ocorrem no organismo (de Camargo et al., 2020; Semionatto et al., 2020). Além disso,

tem sido estudado meios de utilização de EVs como biomarcadores de progressão de patologias e também o seu uso como veículo de entrega de compostos determinados a um alvo específico.

A possibilidade da sua detecção e caracterização tem permitido que sejam revistos diversos processos, inclusive a sinalização das células do tecido ósseo. O estudo detalhado das vesículas extracelulares evidenciou que os osteoclastos liberam EVs contendo o receptor RANK (Huynh et al., 2016), podendo inibir competitivamente a interação entre o RANKL e o RANK da superfície dos osteoclastos. Dessa forma, as EVs contendo RANK podem alterar os processos de formação e atividade dos osteoclastos. Também foi demonstrado que as EVs contendo RANK podem se ligar ao RANKL na superfície dos osteoblastos, promovendo sinalização “reversa” (Ikebuchi et al., 2018; Sims; Martin, 2020). Ou seja, eram capazes de estimular a ativação do osteoblasto. Contudo, embora essas novas descobertas sejam empolgantes, ainda há muitas perguntas em aberto, principalmente em relação à regulação das EVs. Os mecanismos e estímulos por trás da liberação das EVs ainda não foram elucidados, havendo ainda um vasto campo de estudos a ser explorado.

1.9 Escopo da tese

Esta tese discorre sobre os efeitos de um bisfosfonato (ALN), um glicocorticoide (DEX) e a combinação de ambos sobre os processos de diferenciação e atividade das células clásticas.

No Capítulo 2, é apresentada a quantificação da absorção do BP na matriz óssea e o efeito do ALN, DEX e a combinação de ambos sobre osteoclastos obtidos a partir de células de medula óssea de camundongos. Para isso, foram avaliados tanto os processos de diferenciação quanto de atividade dessas células.

Já no Capítulo 3, é apresentado o estudo sobre um possível novo efeito associado ao tratamento com ALN: a sua interferência na liberação de vesículas extracelulares em células Raw 264.7.

O Capítulo 4 é dedicado à discussão integrada dos Capítulos 2 e 3 e a conclusão dessa tese.

REFERÊNCIAS

- Alakangas A, Selander K, Mulari M, Halleen J, Lehenkari P, Mönkkönen J, Salo J, Väänänen K. Alendronate disturbs vesicular trafficking in osteoclasts. *Calcif Tissue Int.* 2002 Jan;70(1):40-7. doi: 10.1007/s002230010047.
- Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009 Mar;41(3):446-50. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.007.
- Arnett TR, Dempster DW. Effect of pH on bone resorption by rat osteoclasts in vitro. *Endocrinology.* 1986 Jul;119(1):119-24. doi: 10.1210/endo-119-1-119.
- Billington EO, Horne A, Gamble GD, Maslowski K, House M, Reid IR. Effect of single-dose dexamethasone on acute phase response following zoledronic acid: a randomized controlled trial. *Osteoporos Int.* 2017 Jun;28(6):1867-1874. doi: 10.1007/s00198-017-3960-0.
- Bradaschia-Correa V, Moreira MM, Arana-Chavez VE. Reduced RANKL expression impedes osteoclast activation and tooth eruption in alendronate-treated rats. *Cell Tissue Res.* 2013 Jul;353(1):79-86. doi: 10.1007/s00441-013-1623-9.
- Breuil V, Cosman F, Stein L, Horbert W, Nieves J, Shen V, Lindsay R, Dempster DW. Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res.* 1998 Nov;13(11):1721-9. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.11.1721.
- Canalis E, Mazziotti G, Giustina A, Bilezikian JP. Glucocorticoid-induced osteoporosis: pathophysiology and therapy. *Osteoporos Int.* 2007 Oct;18(10):1319-28. doi: 10.1007/s00198-007-0394-0.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys.* 2014 Sep 15;558:70-8. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.017.
- Chambers TJ, Magnus CJ. Calcitonin alters behaviour of isolated osteoclasts. *J Pathol.* 1982 Jan;136(1):27-39. doi: 10.1002/path.1711360104.
- Collin-Osdoby P, Osdoby P. Isolation and culture of primary chicken osteoclasts. *Methods Mol Biol.* 2012;816:119-43. doi: 10.1007/978-1-61779-415-5_9.
- Cummings SR, Santora AC, Black DM, Russell RGG. History of alendronate. *Bone.* 2020 Aug;137:115411. doi: 10.1016/j.bone.2020.115411.

Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):577-87. doi: 10.1136/jcp.2007.048868.

de Camargo LCB, Guaddachi F, Bergerat D, Ourari N, Coillard L, Parietti V, Le Bras M, Lehmann-Che J, Jauliac S. Extracellular vesicles produced by NFAT3-expressing cells hinder tumor growth and metastatic dissemination. *Sci Rep*. 2020 Jun 2;10(1):8964. doi: 10.1038/s41598-020-65844-x.

Dirckx N, Moorer MC, Clemens TL, Riddle RC. The role of osteoblasts in energy homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2019 Nov;15(11):651-665. doi: 10.1038/s41574-019-0246-y.

Fredoni M, Ghatrehsamani M, Abdollahifar MA, Bayat S, Bayat M. Evaluation of the effects of photobiomodulation on vertebrae in two rat models of experimental osteoporosis. *Lasers Med Sci*. 2017 Sep;32(7):1545-1560. doi: 10.1007/s10103-017-2278-7.

Freedman LP, Gibson MC, Ethier SP, Soule HR, Neve RM, Reid YA. Reproducibility: changing the policies and culture of cell line authentication. *Nat Methods*. 2015 Jun;12(6):493-7. doi: 10.1038/nmeth.3403.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*. 1998 May;22(5):455-61. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00033-7.

Gori F, Lerner U, Ohlsson C, Baron R. A new WNT on the bone: WNT16, cortical bone thickness, porosity and fractures. *Bonekey Rep*. 2015 May 13;4:669. doi: 10.1038/bonekey.2015.36.

Hachemi Y, Rapp AE, Picke AK, Weidinger G, Ignatius A, Tuckermann J. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture. *J Mol Endocrinol*. 2018 Jul;61(1):R75-R90. doi: 10.1530/JME-18-0024.

Han G, Zuo J, Holliday LS. Specialized Roles for Actin in Osteoclasts: Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. *Biomolecules*. 2019 Jan 9;9(1):17. doi: 10.3390/biom9010017.

Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, Kanazawa I, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):261-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.035.

Henneicke H, Gasparini SJ, Brennan-Speranza TC, Zhou H, Seibel MJ. Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. *Trends Endocrinol Metab.* 2014 Apr;25(4):197-211. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.006.

Hirvonen MJ, Fagerlund K, Lakkakorpi P, Väänänen HK, Mulari MT. Novel perspectives on the transcytotic route in osteoclasts. *Bonekey Rep.* 2013 Mar 13;2:306. doi: 10.1038/bonekey.2013.40.

Holliday LS, Faria LP, Rody WJ Jr. Actin and Actin-Associated Proteins in Extracellular Vesicles Shed by Osteoclasts. *Int J Mol Sci.* 2019 Dec 25;21(1):158. doi: 10.3390/ijms21010158.

Holliday LS, Dean AD, Greenwald JE, Glucks SL. C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated mouse bone marrow cultures. *J Biol Chem.* 1995 Aug 11;270(32):18983-9. doi: 10.1074/jbc.270.32.18983.

Hozumi A, Osaki M, Goto H, Sakamoto K, Inokuchi S, Shindo H. Bone marrow adipocytes support dexamethasone-induced osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May 15;382(4):780-4. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.03.111.

Huynh N, VonMoss L, Smith D, Rahman I, Felemban MF, Zuo J, Rody WJ Jr, McHugh KP, Holliday LS. Characterization of Regulatory Extracellular Vesicles from Osteoclasts. *J Dent Res.* 2016 Jun;95(6):673-9. doi: 10.1177/0022034516633189.

Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature.* 2018 Sep;561(7722):195-200. doi: 10.1038/s41586-018-0482-7.

Jiang Y, Lu Y, Jiang X, Hu J, Li R, Liu Y, Zhu G, Rong X. Glucocorticoids induce osteoporosis mediated by glucocorticoid receptor-dependent and -independent pathways. *Biomed Pharmacother.* 2020 May;125:109979. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109979.

Jobke B, Milovanovic P, Amling M, Busse B. Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone.* 2014 Feb;59:37-43. doi: 10.1016/j.bone.2013.10.024.

Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2004 Dec 30;228(1-2):79-102. doi: 10.1016/j.mce.2003.06.002.

Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018 May;55(3):308-327. doi: 10.1177/0004563218759371.

Madel MB, Ibáñez L, Wakkach A, de Vries TJ, Teti A, Apparailly F, Blin-Wakkach C. Immune Function and Diversity of Osteoclasts in Normal and Pathological Conditions. *Front Immunol.* 2019 Jun 19;10:1408. doi: 10.3389/fimmu.2019.01408.

Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep.* 2014 Sep 10;3:570. doi: 10.1038/bonekey.2014.65.

Martins CA, Leyhausen G, Volk J, Geurtsen W. Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. *J Endod.* 2015 Jan;41(1):45-9. doi: 10.1016/j.joen.2014.07.010.

Marx RE, Sawatari Y, Fortin M, Broumand V. Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov;63(11):1567-75. doi: 10.1016/j.joms.2005.07.010.

McKeehan WL, Barnes D, Reid L, Stanbridge E, Murakami H, Sato GH. Frontiers in mammalian cell culture. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990 Jan;26(1):9-23. doi: 10.1007/BF02624149.

Mohsenifar Z, Fridoni M, Ghatrehsamani M, Abdollahifar MA, Abbaszadeh H, Mostafavinia A, Fallahnezhad S, Asghari M, Bayat S, Bayat M. Evaluation of the effects of pulsed wave LLLT on tibial diaphysis in two rat models of experimental osteoporosis, as examined by stereological and real-time PCR gene expression analyses. *Lasers Med Sci.* 2016 May;31(4):721-32. doi: 10.1007/s10103-016-1916-9.

Nelson RL, Bauer GE. Isolation of osteoclasts by velocity sedimentation at unit gravity. *Calcif Tissue Res.* 1977 Feb 11;22(3):303-13. doi: 10.1007/BF02010369.

Pasqualetti S, Congiu T, Banfi G, Mariotti M. Alendronate rescued osteoporotic phenotype in a model of glucocorticoid-induced osteoporosis in adult zebrafish scale. *Int J Exp Pathol.* 2015 Feb;96(1):11-20. doi: 10.1111/iep.12106.

Ramamoorthy S, Cidlowski JA. Corticosteroids: Mechanisms of Action in Health and Disease. *Rheum Dis Clin North Am.* 2016 Feb;42(1):15-31, vii. doi: 10.1016/j.rdc.2015.08.002.

Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell.* 1978 Sep;15(1):261-7. doi: 10.1016/0092-8674(78)90101-0.

Ren H, Shen G, Tang J, Qiu T, Zhang Z, Zhao W, Yu X, Huang J, Liang D, Yao Z, Yang Z, Jiang X. Promotion effect of extracts from plastrum testudinis on alendronate against glucocorticoid-induced osteoporosis in rat spine. *Sci Rep.* 2017 Sep 6;7(1):10617. doi: 10.1038/s41598-017-10614-5.

Rezende E, Bradaschia-Correa V, Siviero F, Ambrosio LMB, Arana-Chavez VE. Effects of bisphosphonates on osteogenesis and osteoclastogenesis signaling during the endochondral ossification of growing rats. *Cell Tissue Res.* 2017 May;368(2):287-300. doi: 10.1007/s00441-017-2574-3.

Rizzoli R, Biver E. Glucocorticoid-induced osteoporosis: who to treat with what agent? *Nat Rev Rheumatol.* 2015 Feb;11(2):98-109. doi: 10.1038/nrrheum.2014.188.

Robling AG, Bonewald LF. The Osteocyte: New Insights. *Annu Rev Physiol.* 2020 Feb 10;82:485-506. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034332.

Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone.* 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.

Rogers MJ, Mönkkönen J, Munoz MA. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. *Bone.* 2020 Oct;139:115493. doi: 10.1016/j.bone.2020.115493.

Rucci N, Zallone A, Teti A. Isolation and Generation of Osteoclasts. *Methods Mol Biol.* 2019;1914:3-19. doi: 10.1007/978-1-4939-8997-3_1.

Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Apr;1068:367-401. doi: 10.1196/annals.1346.041.

Russell RG. Bisphosphonates: the first 40 years. *Bone.* 2011 Jul;49(1):2-19. doi: 10.1016/j.bone.2011.04.022.

Semionatto IF, Palameta S, Toscaro JM, Manrique-Rincón AJ, Ruas LP, Paes Leme AF, Bajgelman MC. Extracellular vesicles produced by immunomodulatory cells harboring OX40 ligand and 4-1BB ligand enhance antitumor immunity. *Sci Rep.* 2020 Sep 16;10(1):15160. doi: 10.1038/s41598-020-72122-3.

Sims NA, Martin TJ. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 2020 Feb 10;82:507-529. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034425.

Sivagurunathan S, Muir MM, Brennan TC, Seale JP, Mason RS. Influence of glucocorticoids on human osteoclast generation and activity. *J Bone Miner Res.* 2005 Mar;20(3):390-8. doi: 10.1359/JBMR.041233.

Sousa LH, Moura EV, Queiroz AL, Val D, Chaves H, Lisboa M, Furlaneto F, Brito GA, Goes P. Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2017 May;77:55-61. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.01.014.

Taciak B, Białasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga Ł, Rygiel T, Król M. Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW 264.7 cell line through serial passages. *PLoS One.* 2018 Jun 11;13(6):e0198943. doi: 10.1371/journal.pone.0198943.

Takahashi N, Akatsu T, Udagawa N, Sasaki T, Yamaguchi A, Moseley JM, Martin TJ, Suda T. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology.* 1988 Nov;123(5):2600-2. doi: 10.1210/endo-123-5-2600.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Apr;19(4):213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

Weinstein RS. Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease. *N Engl J Med.* 2011 Jul 7;365(1):62-70. doi: 10.1056/NEJMcp1012926.

Weinstein RS. Glucocorticoid-induced osteonecrosis. *Endocrine.* 2012 Apr;41(2):183-90. doi: 10.1007/s12020-011-9580-0.

Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):1041-8. doi: 10.1172/JCI14538.

Xie XH, Wang XL, Yang HL, Zhao DW, Qin L. Steroid-associated osteonecrosis: Epidemiology, pathophysiology, animal model, prevention, and potential treatments (an overview). *J Orthop Translat.* 2015 Jan 13;3(2):58-70. doi: 10.1016/j.jot.2014.12.002.

Xu R, Rai A, Chen M, Suwakulsiri W, Greening DW, Simpson RJ. Extracellular vesicles in cancer - implications for future improvements in cancer care. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018 Oct;15(10):617-638. doi: 10.1038/s41571-018-0036-9.

Yamamoto-Silva FP, Bradaschia-Correa V, Lima LA, Arana-Chavez VE. Ultrastructural and immunohistochemical study of early repair of alveolar sockets

after the extraction of molars from alendronate-treated rats. *Microsc Res Tech.* 2013 Jun;76(6):633-40. doi: 10.1002/jemt.22210.

Yao T, Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017 Mar 21;16(2):99-117. doi: 10.1002/rmb2.12024.

CAPÍTULO 2 Efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a osteoclastogênese

2.1 Introdução

Os osteoclastos são células altamente especializadas, formadas a partir da fusão de células mononucleares (origem hematopoiética); o controle da sua diferenciação é regulado principalmente por duas citocinas: M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) e o RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa B ligand) (Cappariello et al., 2014; Udagawa et al., 2021).

A principal função das células clásticas é a reabsorção da matriz extracelular calcificada, composta por moléculas orgânicas e hidroxiapatita, sendo os osteoclastos responsáveis pela reabsorção e, em conjunto com os osteoblastos, pela remodelação óssea (Arana-Chavez; Bradaschia-Correa, 2009).

Diversos fatores podem influenciar os processos reabsortivos, inclusive medicamentos. Os bisfosfonatos são drogas com capacidade de inibir a reabsorção óssea, utilizados para prevenir e tratar doenças que provocam um aumento da atividade dos osteoclastos, tais como a osteoporose. A sua estrutura é semelhante à do pirofosfato inorgânico, uma molécula que regula a biomineralização óssea (Rogers et al., 2011). O alendronato (ALN) é um bisfosfonato nitrogenado de 2ª geração, sendo um dos medicamentos mais utilizados atualmente no tratamento da osteoporose; seu mecanismo de ação ocorre através da inibição da via do mevalonato, inativando a célula clástica (Cummings et al., 2020).

Os glicocorticoides (GC), por sua vez, são medicamentos que possuem efeitos variados na resposta imune, podendo ter ação anti-inflamatória e imunossupressiva (Hachemi et al., 2018). Contudo, diversos estudos têm demonstrado que o tratamento crônico com estes medicamentos pode provocar perda óssea e causar osteoporose, um fenômeno conhecido como Osteoporose Induzida por Glicocorticoide (GIOP) (Jiang et al., 2020; Pasqualetti et al., 2015; Sousa et al., 2017).

A dexametasona (DEX) é um GC muito receitado, pela sua biodisponibilidade e alto poder anti-inflamatório, contudo, é bastante relacionada a complicações esqueléticas. A ação dos GC na perda óssea ocorre nos processos de neoformação e de reabsorção. Na neoformação óssea, este efeito está relacionado à diminuição na quantidade e atividade dos osteoblastos (Pereira et al., 2001), enquanto na reabsorção, provoca aumento na proliferação e diferenciação de precursores de osteoclastos (Kim et al., 2007).

A ação dos bisfosfonatos sobre a osteoporose induzida pelos glicocorticoides e sua capacidade de reversão do quadro osteoporótico tem sido estudada (Hayashi et al., 2009; Pasqualetti et al., 2015). Considerando que o mecanismo de ação dos glicocorticoides sobre os osteoclastos não está completamente estabelecido, nosso estudo pretende elucidar os efeitos de um bisfosfonato, um glicocorticoide e a combinação de ambos sobre osteoclastos de camundongos em culturas primárias.

2.2 Proposição

Avaliar, *in vitro*, o efeito do alendronato, da dexametasona e da associação de ambos sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos a partir de células da medula óssea de camundongos.

Objetivos específicos:

- Avaliação do processo de remoção da *smear layer* nos discos de osso bovino por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Análise da concentração de ALN absorvida pelos substratos ósseos;
- Análise da viabilidade celular após as células serem tratadas com ALN e DEX;
- Análise dos efeitos do alendronato e da dexametasona sobre a diferenciação e atividade clástica através da contagem de células TRAP+;
- Análise dos efeitos do alendronato e da dexametasona na detecção de RANKL por imunofluorescência;
- Análise da atividade reabsortiva das células clásticas no substrato ósseo por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Análise gênica dos marcadores de diferenciação e ativação RANKL e OPG.

2.3 Material e métodos

Após aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FOUSP (parecer nº 015/2017 – Anexo A), os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Oral, na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

2.3.1 Delineamento experimental

Cada análise experimental foi realizada com 2 diferentes animais doadores de medula óssea, totalizando 10 animais (n=10).

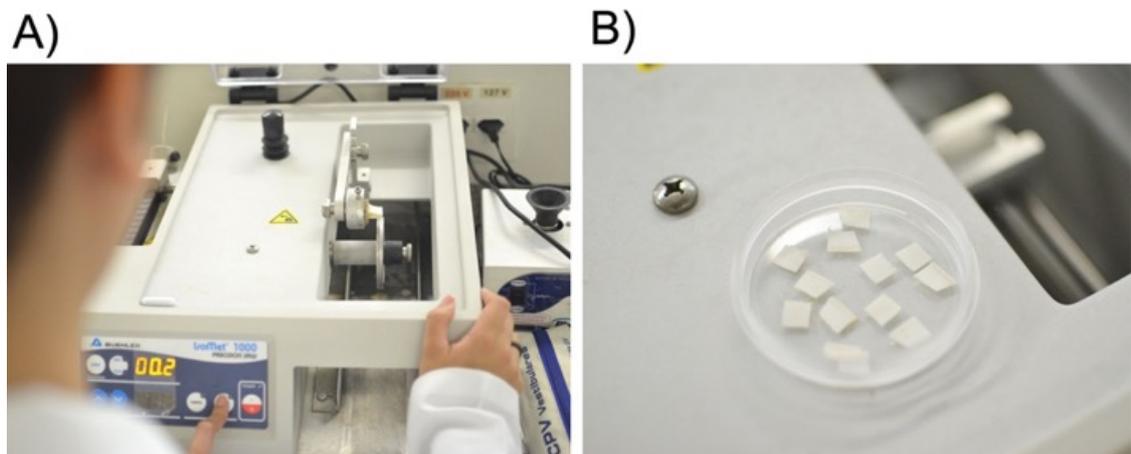
Grupos Experimentais

- Controle (C): Células indiferenciadas da medula óssea cultivadas com 1,25-dihidroxitamina D3 a 10^{-8} M, sobre substrato ósseo e nas condições ideais.
- Alendronato (A): Células indiferenciadas da medula óssea cultivadas com 1,25-dihidroxitamina D3 a 10^{-8} M sobre substrato ósseo tratado com alendronato sódico a $10 \mu\text{M}$ (10^{-5} M).
- Dexametasona (D6): Células indiferenciadas da medula óssea cultivadas com 1,25-dihidroxitamina D3 a 10^{-8} M, sobre substrato ósseo e tratadas com Dexametasona a $1 \mu\text{M}$ (10^{-6} M).
- Dexametasona e Alendronato (AD6): Células indiferenciadas da medula óssea cultivadas com 1,25-dihidroxitamina D3 a 10^{-8} M, sobre substrato ósseo tratado com alendronato sódico a $10 \mu\text{M}$ (10^{-5} M) e tratadas com Dexametasona a $1 \mu\text{M}$ (10^{-6} M).

2.3.2 Obtenção e tratamento dos substratos ósseos

Para obtenção dos substratos ósseos, discos de osso cortical bovino foram cortados em máquina de corte de precisão (Isomet 1000) com 100 μm de espessura. Para simular com mais fidelidade a condição *in vivo*, os discos tiveram a camada de esfregaço ou *smear layer* (resultante do processo de corte) removida. Para isso, os substratos foram inicialmente imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% durante trinta minutos, seguido de enxágue com água ultrapura (MilliQ) com agitação em ultrassom por dez minutos. Na sequência, foram imersos em solução de EDTA a 4,13% durante cinco minutos, seguido de novo enxágue em água ultrapura (MilliQ) com agitação em ultrassom por dez minutos. Foram novamente imersos em solução de hipoclorito de sódio a 1% por cinco minutos, submetidos a lavagem com água ultrapura (MilliQ) em ultrassom por dez minutos, seguido por um período *overnight* também com água ultrapura (MilliQ) e deixados para secar. Esses discos foram esterilizados e guardados até sua utilização. Os discos de osso utilizados no grupo ALN foram previamente incubados *overnight* em solução de ALN.

Figura 2.1. Processo de obtenção dos discos de osso cortical bovino. Em (A) é exibido o processo de corte dos discos em cortadora Isomet e em (B) os discos obtidos.



Fonte: A autora

2.3.3 Análise da saturação dos substratos ósseos com alendronato

Para confirmar a concentração de ALN a ser utilizada no experimento, foram realizados testes para detectar a quantidade mínima necessária deste bisfosfonato

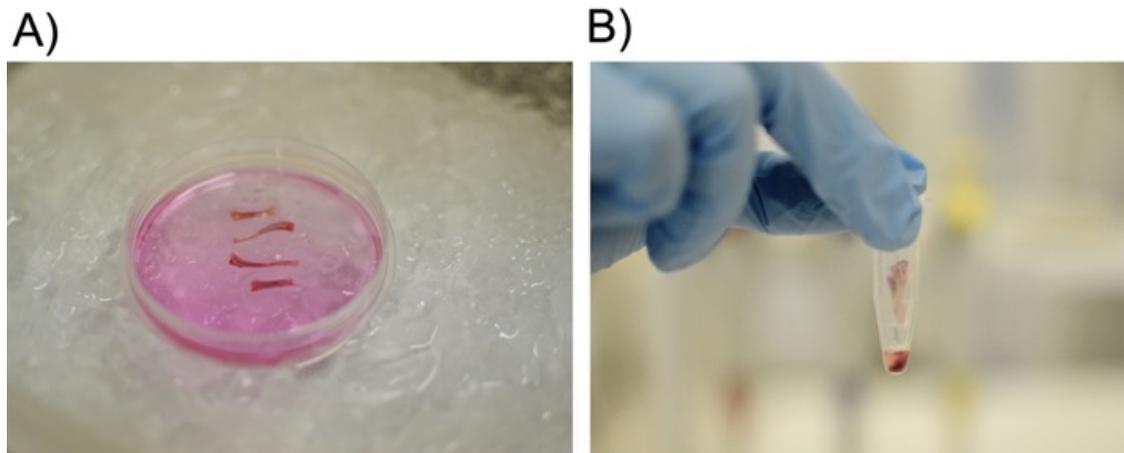
para saturar o substrato ósseo. Utilizamos uma adaptação do protocolo estabelecido por Al Deeb et al. (2004) para detectar o ALN em espectrofotômetro. Para isso, foi preparada uma solução de O-phtalaldehyde (OPA) e mercaptoetanol (ME), que reage com o ALN em uma reação de derivatização, tornando-se detectável em espectrofotômetro (al Deeb et al., 2004).

Foram preparadas soluções de ALN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) nas concentrações de 1 mM, 100 μ M, 10 μ M, 1 μ M e 100 nM que reagiram na proporção de 1:1 com a solução de OPA-ME por 60 minutos em placa de 96 *wells*. Na sequência foi feita a leitura em espectrofotômetro a 333 nm. Após a leitura no tempo zero, discos de osso bovino foram incubados nessas soluções para que o ALN incorporasse na matriz óssea. A solução reagiu *overnight*, e após isso, os ossos foram removidos e uma nova leitura foi realizada para detectar a concentração mínima necessária para saturar o substrato ósseo.

2.3.4 Obtenção da cultura primária e diferenciação de células clásticas

Para obtenção das células para a cultura primária utilizamos camundongos Balb-c de ambos os sexos com 30 dias de idade, obtidos no Biotério da Faculdade de Medicina da USP e mantidos no Biotério do Laboratório de Biologia Oral da FOU SP. Eles foram anestesiados com isoflurano (BioChimico, Itatiaia, RJ, Brasil) e sacrificados por deslocamento cervical. As tíbias e os fêmures foram dissecados e as epífises removidas. As células foram obtidas a partir da medula óssea, que foi expelida do canal medular através do processo de centrifugação. As células foram lavadas duas vezes com meio α -MEM e plaqueadas na densidade de 1×10^6 em placas de 24 ou 96 *wells*, sobre o substrato ósseo previamente tratado. O meio α -MEM foi acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina e suplementado com 1,25-dihidroxitamina D3 (Biovision, Milpitas, CA, EUA) a 10^{-8} M (Holliday et al., 1995). Nos grupos tratados o meio foi acrescido de dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 1 μ M e foram feitas trocas de meio a cada 2 dias.

Figura 2.2. Obtenção da medula óssea de tíbias e fêmures de camundongo Balb-c. Em (A) os ossos obtidos após procedimento cirúrgico e em (B), a medula óssea obtida após centrifugação.



Fonte: A autora

2.3.5 Viabilidade celular pela técnica do MTT

Após 5, 7 e 9 dias de cultivo em placa de 96 *wells* com substrato ósseo, as células dos grupos controle (C) e tratadas (A, D6, AD6), além de um poço correspondente ao controle de morte (CM), tiveram o meio de cultura removido e foram lavadas com PBS estéril duas vezes. Foi adicionado a cada poço 100 μ l de solução de MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na concentração de 5 mg/mL, seguido de incubação em estufa de CO₂ por 3 horas. Após esse período, a solução de MTT foi removida dos poços, aos quais foram adicionados 100 μ l de DMSO. A placa foi agitada durante 5 minutos, seguido de um período adicional de 5 minutos sem agitação para estabilização da cor. Após, foi feita leitura em espectrofotômetro a 540 nm.

2.3.6 Método histoquímico da TRAP

Após 7 dias de cultivo em placa de 24 *wells* com substrato ósseo, as células dos grupos controle (C) e tratadas (A, D6, AD6) foram lavadas em PBS 0,01 M e fixadas em formaldeído a 2%, sendo a placa posicionada sobre gelo picado durante os 20 minutos de fixação. Em seguida, foram novamente lavadas com PBS,

permeabilizadas com Triton X100 1% e submetidas ao protocolo informado no kit Leucocyte acid phosphatase (TRAP) da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a fixação e coloração, 3 fotos não sobrepostas e representativas foram obtidas com aumento de 100x para cada poço. As células TRAP positivas multinucleadas (com 2 a 5 núcleos) e gigantes (com 6 ou mais núcleos) foram contadas. Também foi analisado o maior diâmetro da célula TRAP+ por poço, que foi mensurado no ImageJ.

2.3.7 Imunofluorescência para RANKL

Para a análise de imunofluorescência de RANKL, após 7 dias de cultura sobre lamínula de vidro em placa de 24 *wells*, as células foram fixadas em metanol a -20° C durante 10 minutos, lavadas com PBS e permeabilizadas com Tween 5%. Na sequência, os espécimes foram bloqueados com leite desnatado por 1 hora e incubados a 4°C por 1 hora na solução de anticorpo primário RANKL (Santa Cruz, California, USA). Após lavagem com PBS, os espécimes foram incubados com o anticorpo secundário anti-rabbit (Vector Laboratories, UK) por 1 hora, lavados e incubados por 30 minutos em Fit-C em 1:100. Em seguida as lâminas foram montadas utilizando Vectoshield conjugado ao DAPI (Vector Laboratories, UK) e examinadas no microscópio Olympus BX60.

2.3.8 Análise da expressão gênica por qPCR

Após 7 dias de cultura sobre substrato ósseo, as células foram removidas do substrato e da placa através da raspagem com cell-lifter e o RNA foi isolado utilizando o kit Charge Switch Total RNA Cell (Thermo Fischer Scientific).

O cDNA foi obtido com o kit SuperScript First Strand (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. Na sequência, foram preparadas soluções contendo cDNAs dos grupos C, ALN, AD6 e D6 nas concentrações de 1 µg. Foi adicionado TaqMan® Master Mix, as sondas RANKL e OPG, e água DEPC num volume total de 20 µL por reação. A expressão gênica dos reguladores de osteoclastogênese OPG e RANKL foram verificados no aparelho StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific). O gene housekeeping HMBS foi utilizado como gene de

referência. Todas as reações foram realizadas em triplicata. A especificação das sondas é detalhada no Quadro 2.1.

Quadro 2.1. Sondas utilizadas

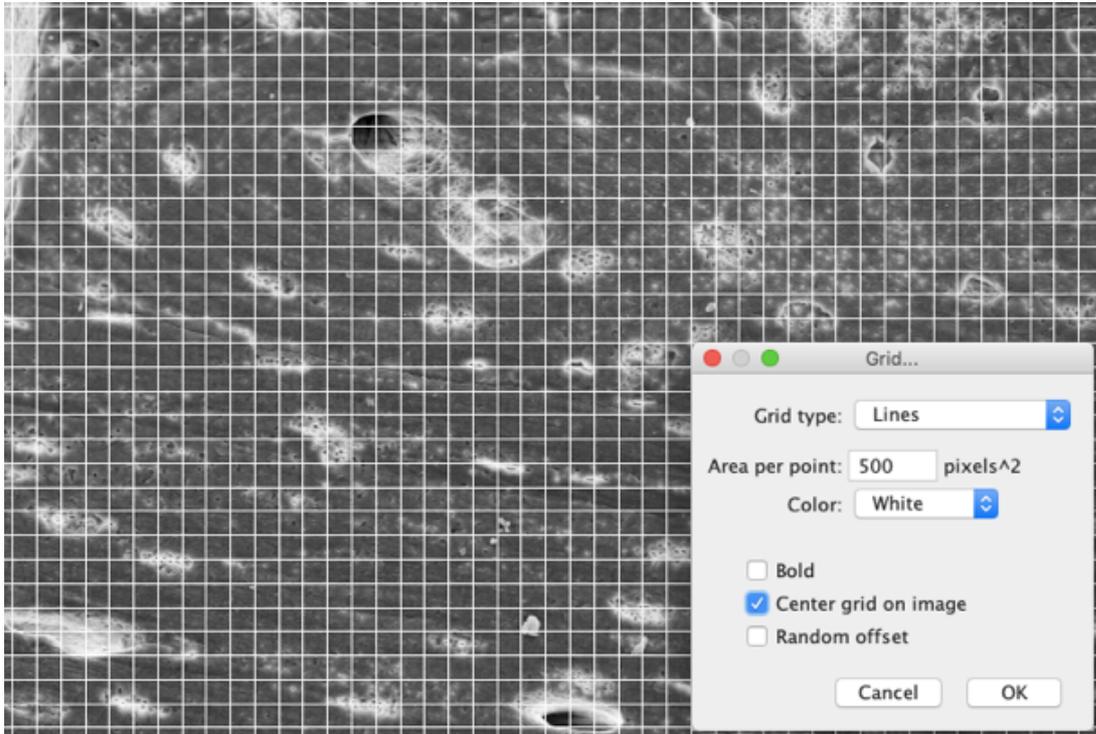
GENE	Referência
RANKL	Mm00441906_m1
OPG	Mm01205928_m1
HMBS	Mm01143545_m1

Fonte: A autora

2.3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os discos de osso cortical, previamente utilizados no cultivo celular (grupo controle (C) e tratamento (A, D6, AD6), foram tratados com hipoclorito de sódio 2,5% por 15 minutos em repouso e 15 minutos sob agitação para que houvesse lise das células presentes. Em seguida, foram cuidadosamente lavados com água ultrapura (MilliQ), desidratados em concentrações crescentes de etanol e deixados para secar em capela com exaustão. Uma vez secos, os espécimes foram posicionados sobre stubs de alumínio e recobertos com aproximadamente 25 nm de ouro em um aparelho Balzers SDC 050. A seguir, foram examinados e fotografados em microscópio de varredura LEO operando a 10-15 kV. A determinação das áreas reabsorvidas foi feita utilizando as fotomicrografias no programa ImageJ. Para quantificar as áreas de reabsorção, grades foram sobrepostas às micrografias eletrônicas. Foi utilizado o programa ImageJ e a área por ponto da grade (grid) foi de 500 pixels² (Figura 2.12). As áreas de reabsorção foram consideradas nas intersecções do grid e contados o número total de pits por amostra óssea e a porcentagem da área total de reabsorção (para isso foi considerado o número de *pits* pelo número total de intersecções).

Figura 2.3. Grades sobrepostas à fotomicrografia (MEV) para avaliação de áreas de reabsorção.



Fonte: A autora

2.3.10 Análise estatística

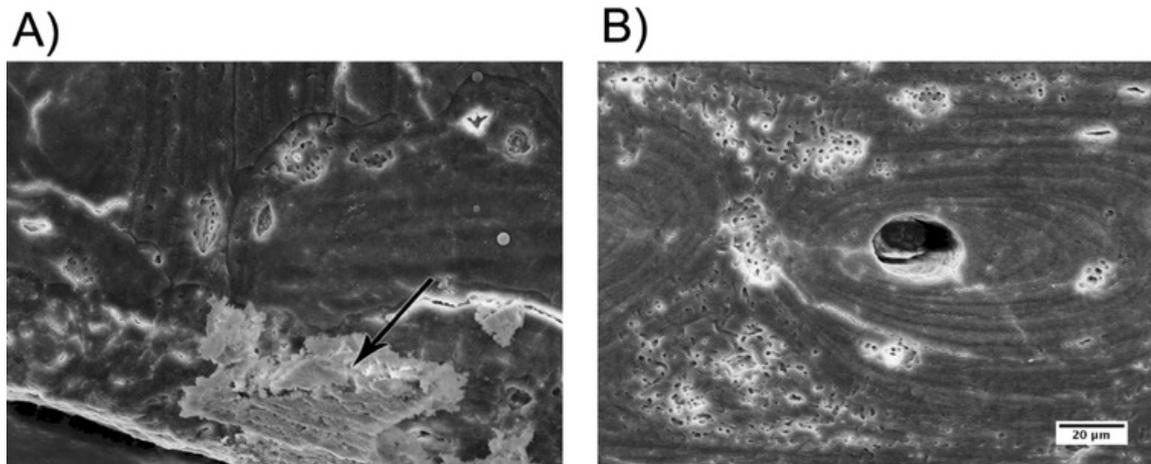
Os resultados das análises quantitativas do MTT, contagem de células TRAP+ e dados das áreas reabsorvidas avaliadas pela MEV estão apresentados como média e desvio padrão. Esses dados foram submetidos à análise de variância ANOVA e post hoc Tukey utilizando o programa Minitab 19; o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Demais dados foram tabulados e analisados utilizando o programa Excel.

2.4 Resultados

2.4.1 Obtenção e tratamento dos substratos ósseos

Para confirmar a eficácia do protocolo de remoção de *smear layer*, submetemos discos de osso bovino previamente tratados ou não, ao cultivo com osteoclastos por 7 dias. As amostras foram avaliadas em microscópio eletrônico de varredura. O protocolo de remoção de *smear layer* aplicado se mostrou efetivo, tendo em vista que a camada de esfregaço formada durante o processo de corte dos discos de osso bovino, foi removida (Figura 2.3). É possível observar com mais detalhes as estruturas da matriz óssea mineralizada, como os sistemas de Havers, canais vasculares e lacunas de osteócitos nos discos de osso sem a presença de *smear layer* (Figura 2.4 B).

Figura 2.4. Fotomicrografia do substrato ósseo. Em (A) substrato ósseo que não foi submetido ao processo de remoção de *smear layer*. Observar a presença de *smear layer* (seta preta). Em (B), substrato ósseo após o protocolo de remoção, sem a camada de esfregaço.



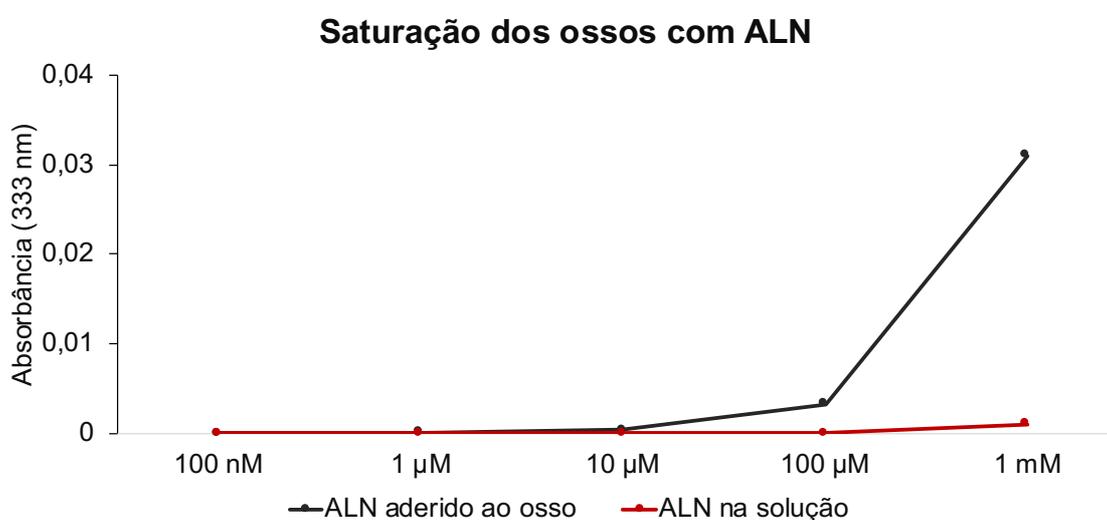
Fonte: A autora

2.4.2 Saturação dos substratos ósseos com alendronato

Após avaliação em espectrofotômetro, foi possível observar quanto de ALN foi realmente incorporado à matriz óssea. Nas concentrações de 100 nM, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M, o ALN incubado juntamente ao disco de osso bovino não foi detectado após

a remoção do disco, indicando que o ALN foi completamente incorporado à matriz óssea. Em concentrações acima de 1 mM, foi detectado ALN livre na solução, que não se incorporou à matriz óssea, um indicativo que ocorreu a saturação a partir dessa concentração (Gráfico 2.1). A concentração de 10 μ M de ALN foi utilizada nos demais experimentos.

Gráfico 2.1. Análise da saturação dos discos de osso bovino com ALN. Em concentrações inferiores a 1 mM, todo o ALN é incorporado à matriz óssea. Acima de 1 mM, pode-se observar a presença de ALN na solução, indicando que o osso atingiu sua saturação e o BP excedente não foi incorporado.

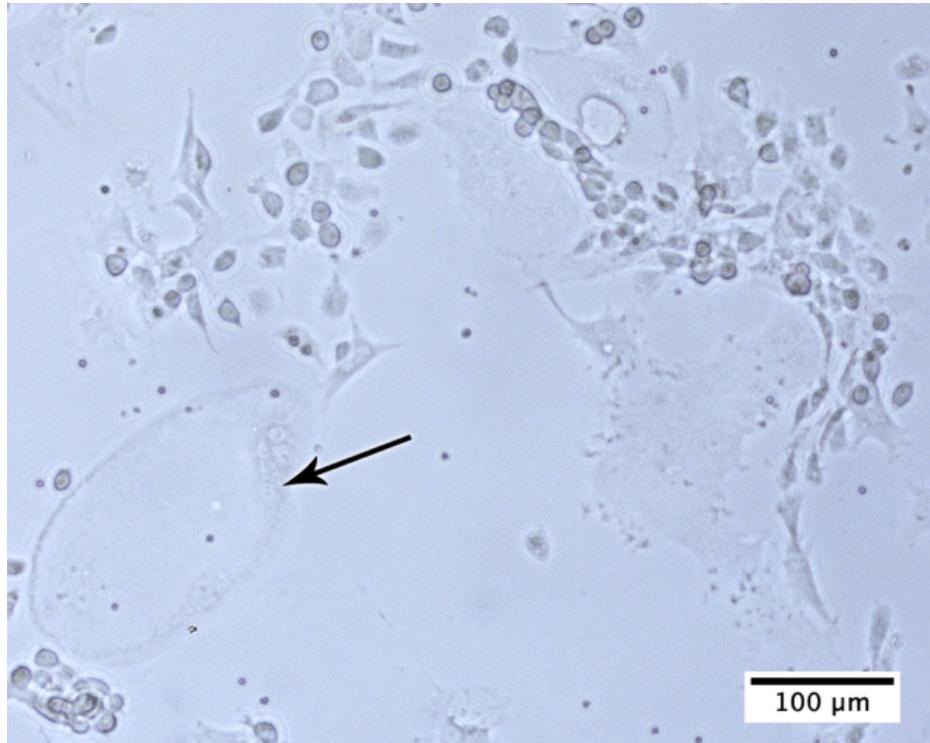


Fonte: A autora

2.4.3 Obtenção da cultura primária e diferenciação de células clásticas

Ao quinto dia de cultivo foi possível observar a diferenciação das células provenientes da medula óssea de camundongo Balb-c suplementadas com dihidroxitamina D3. Ao microscópio de luz, foram detectadas células mononucleadas arredondadas e fusiformes, células multinucleadas e células gigantes (Figura 2.5).

Figura 2.5. Fotomicrografia de células provenientes de medula óssea de camundongo Balb-c, tratadas com dihidroxivitamina D3 a 10^{-8} M após 5 dias de cultivo. Observar a presença de numerosas células mononucleadas e a formação de células gigantes (seta preta).



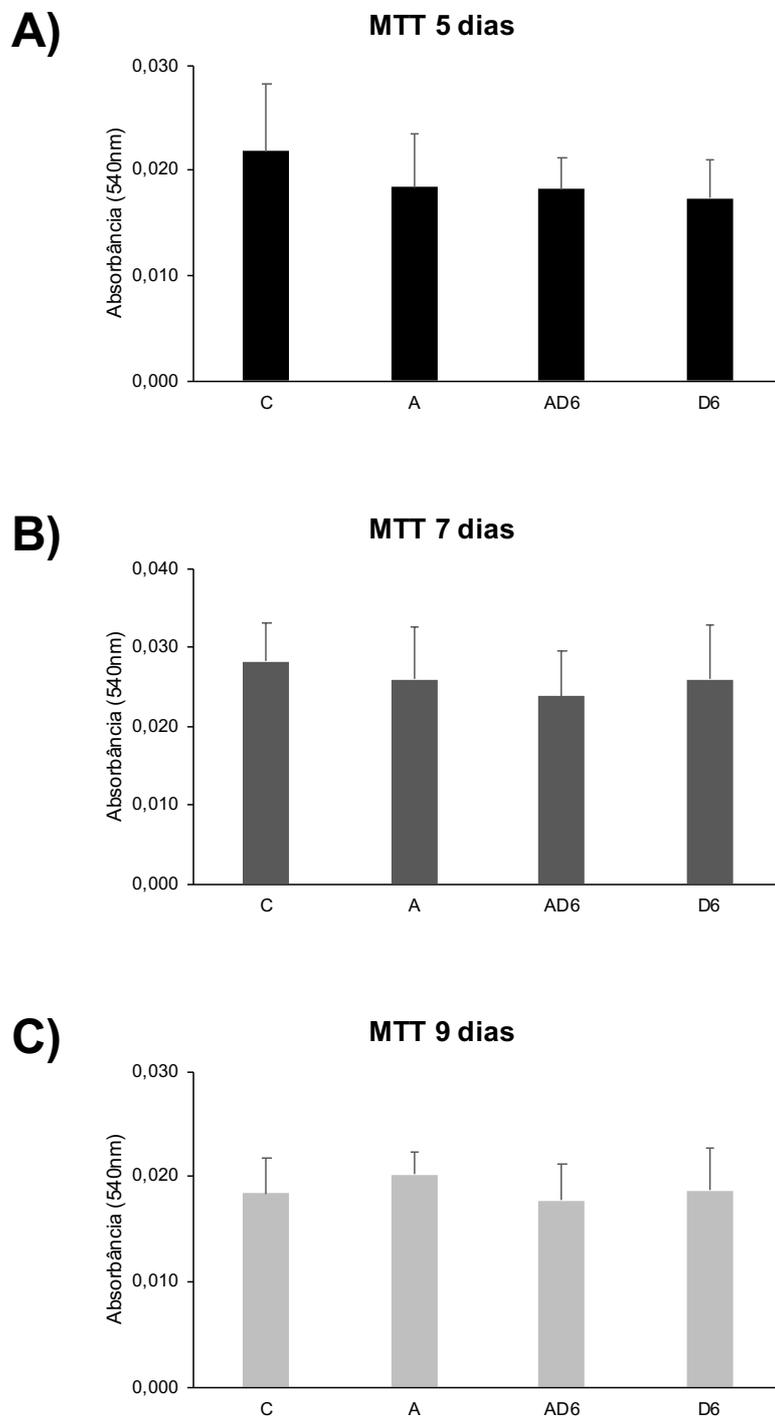
Fonte: A autora

2.4.4 Viabilidade celular pela técnica do MTT

A viabilidade das células provenientes da medula óssea de camundongo Balb-c e suplementadas com dihidroxivitamina D3 foi testada após 5, 7 e 9 dias. As doses de ALN e DEX utilizadas não provocaram nenhum efeito citotóxico, não havendo diferenças significantes entre os grupos tratados e controle em cada tempo experimental (Gráfico 2.2).

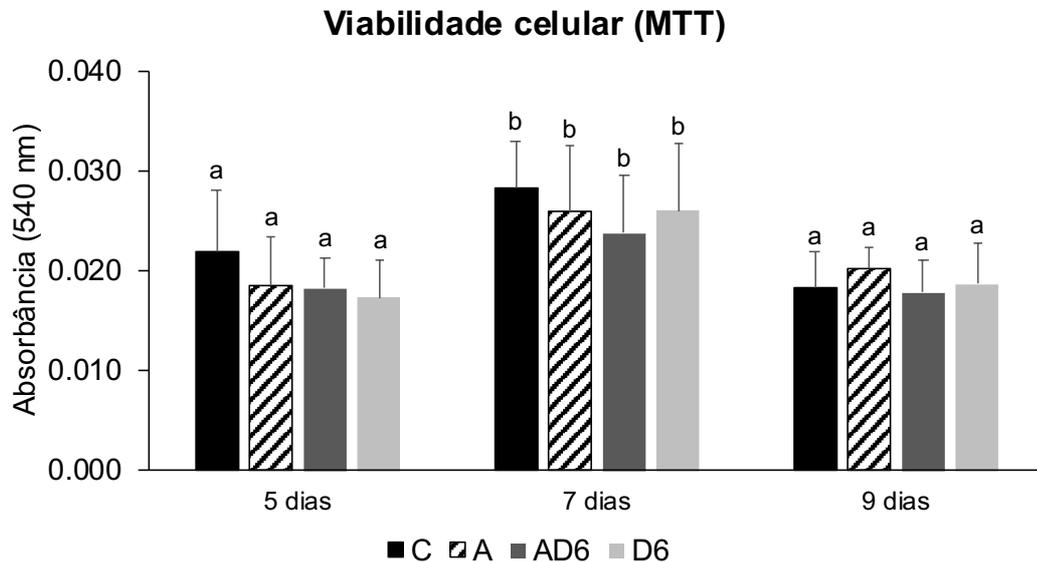
Contudo, quando comparados os grupos experimentais ao longo dos dias (5, 7 e 9), foi observado o aumento na proliferação celular do dia 5 para o dia 7, e a diminuição da quantidade de células viáveis no dia 9. A quantidade de células viáveis foi significamente maior ao 7º dia de cultivo ($p < 0,05\%$), em todos os grupos (Gráfico 2.3).

Gráfico 2.2. Viabilidade celular pelo método MTT. Em (A) grupos tratados e controle após 5 dias de cultivo celular. Em (B), 7 dias de cultivo e (C) 9 dias. Nenhum efeito citotóxico foi detectado entre os diferentes tratamentos nos três períodos, já que não houve diferenças significantes entre os grupos tratados e controle ($p > 0,05$).



Fonte: A autora

Gráfico 2.3. Avaliação da viabilidade celular pelo método MTT entre os dias 5, 7 e 9 de cultivo celular. A maior viabilidade celular foi detectada ao 7º dia de cultivo em todos os grupos ($p < 0,05$).



Fonte: A autora

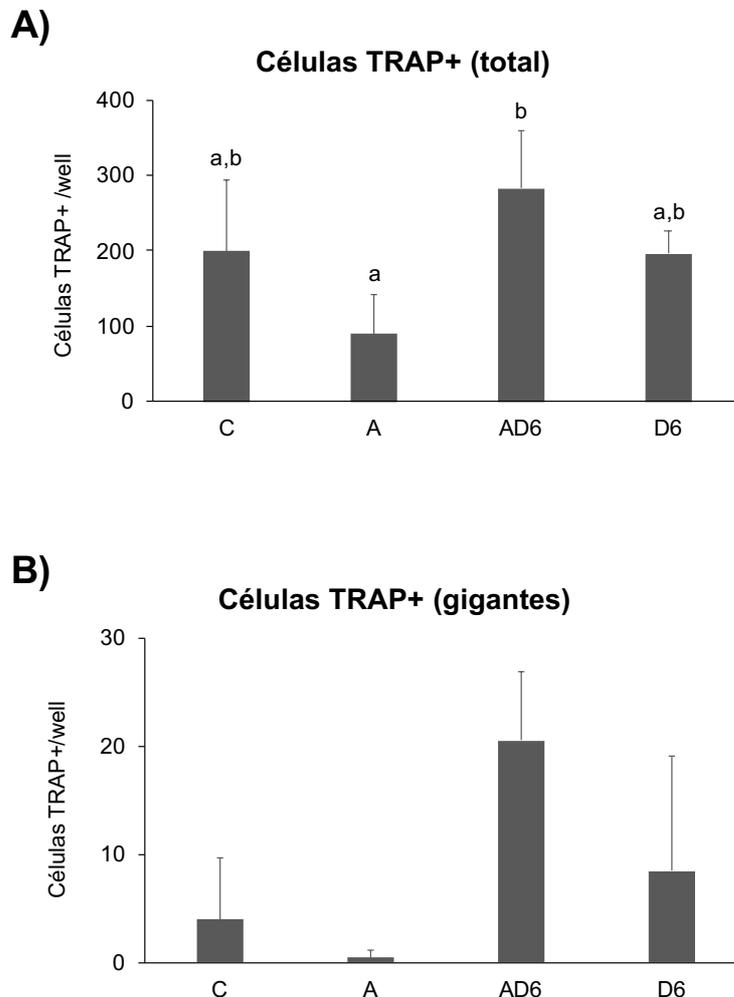
2.4.5 Método histoquímico da TRAP

Ao sétimo dia de cultivo sobre os substratos previamente tratados, foram observadas células TRAP+ remanescentes na placa após a remoção do substrato ósseo. As células TRAP+ apresentavam a coloração róseo-avermelhada característica. Foram contadas e somadas as células multinucleadas (2 a 5 núcleos) e gigantes (6 ou mais núcleos).

O maior número de células TRAP+ foi detectado no grupo AD6 e esse número foi estatisticamente significativo comparado ao grupo A ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças significantes entre os demais grupos (Gráfico 2.4.A).

O número total de células gigantes é exibido no Gráfico 2.4.B. Apesar da maior quantidade de células gigantes no grupo AD6 e D6, essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

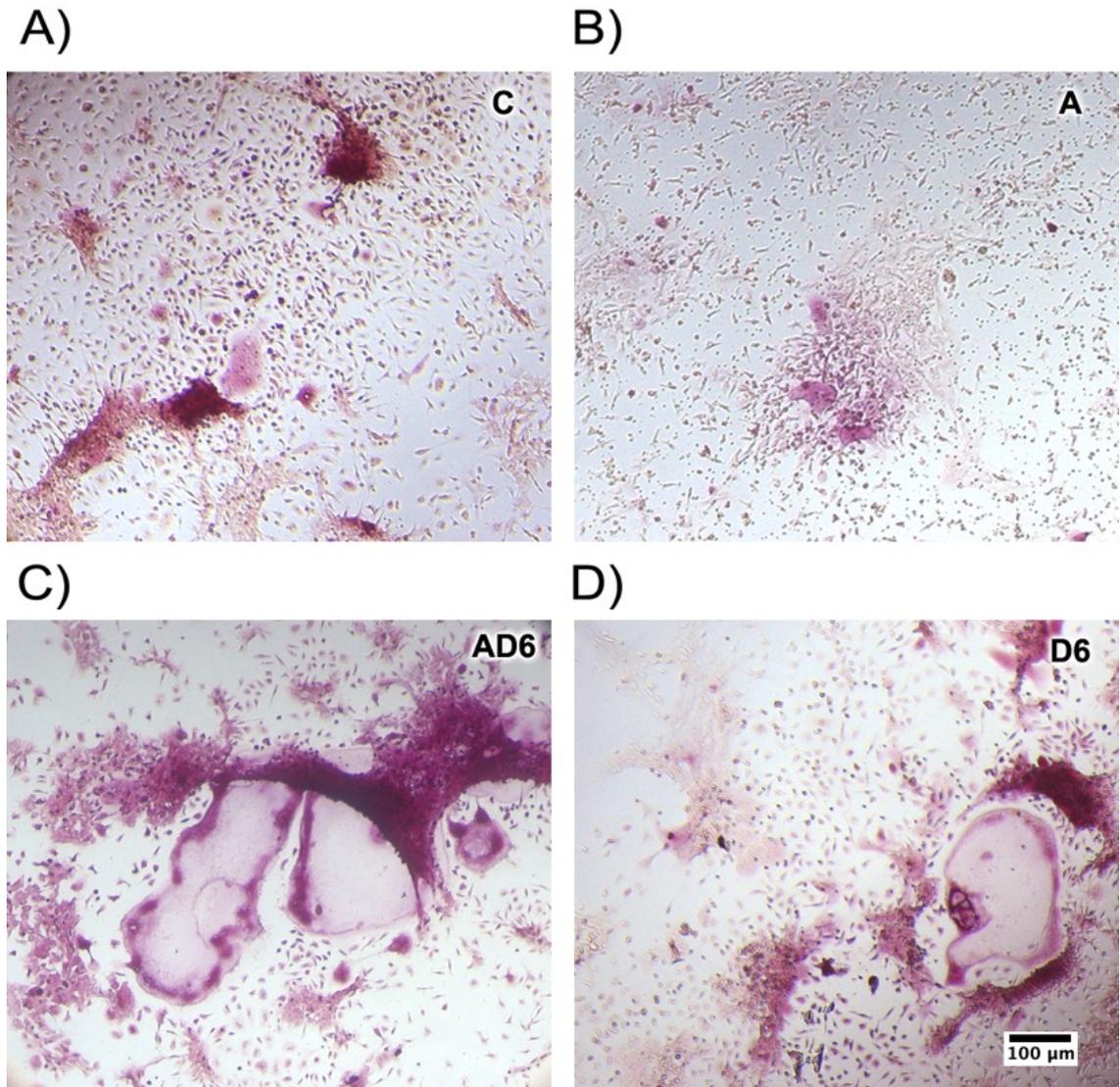
Gráfico 2.4. Quantificação de células TRAP+ após 7 dias de cultivo. Em (A) foram consideradas células multinucleadas e gigantes na contagem. Foi observado maior quantidade de células TRAP+ no grupo AD6, significativamente maior do que no grupo A ($p < 0,05$). Não foram detectadas diferenças significantes entre os demais grupos. Em (B) contagem de células gigantes TRAP+; não houve diferença estatística entre os grupos ($p > 0,05$).



Fonte: A autora

O tamanho e as características das células TRAP+ foram também analisados (Figura 2.6). O maior diâmetro de célula TRAP+ foi detectado no grupo AD6 (Figura 2.7). Os maiores diâmetros de cada grupo estão dispostos no Quadro 2.2. O tamanho e quantidade das células gigantes foi muito variável entre as amostras, inclusive entre amostras do mesmo grupo. O diâmetro de 565 μm encontrado no grupo AD6 foi observado em um *well* onde havia outras células gigantes de tamanho mais robusto, porém esse achado não foi detectado de forma equilibrada entre as amostras.

Figura 2.6. Características das células após 7 dias de tratamento e submetidas ao método histoquímico da TRAP. Em (A) grupo C, em (B) grupo A, em (C) grupo AD6 e em (D) grupo D6. Observar a presença de maiores células gigantes nos grupos AD6 e D6.



Fonte: A autora

Figura 2.7. Diâmetro de célula TRAP+ do grupo AD6, mensurada utilizando o programa ImageJ. A linha azul representando o diâmetro da célula tem a medida de 565 μm (aumento de 100x).



Fonte: A autora

Quadro 2.2. Diâmetro (em μm) das maiores células TRAP+ por grupo.

C	A	AD6	D6
150	110	565	220

Fonte: A autora

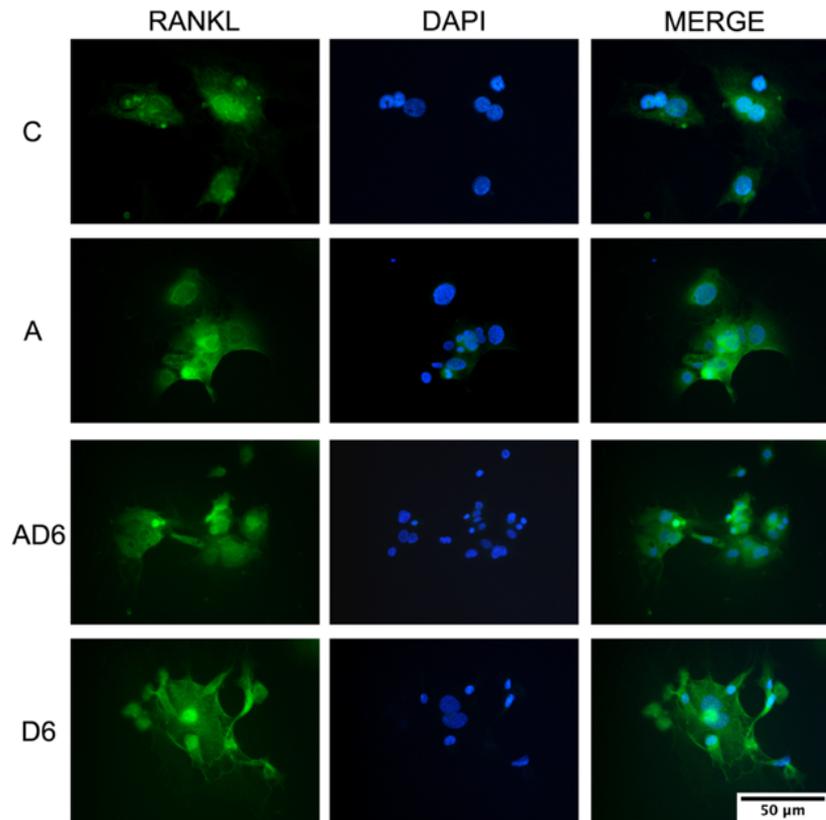
2.4.6 Imunofluorescência para RANKL

Ao sétimo dia de cultivo, células cultivadas sobre lamínula de vidro foram processadas pelo protocolo de imunofluorescência para RANKL.

O RANKL foi detectado com distribuição homogênea nas células, evidenciando que ocorreu a liberação de RANKL por osteoblastos ou células indiferenciadas da medula óssea e este se ligou ao RANK do osteoclasto (Figura 2.8).

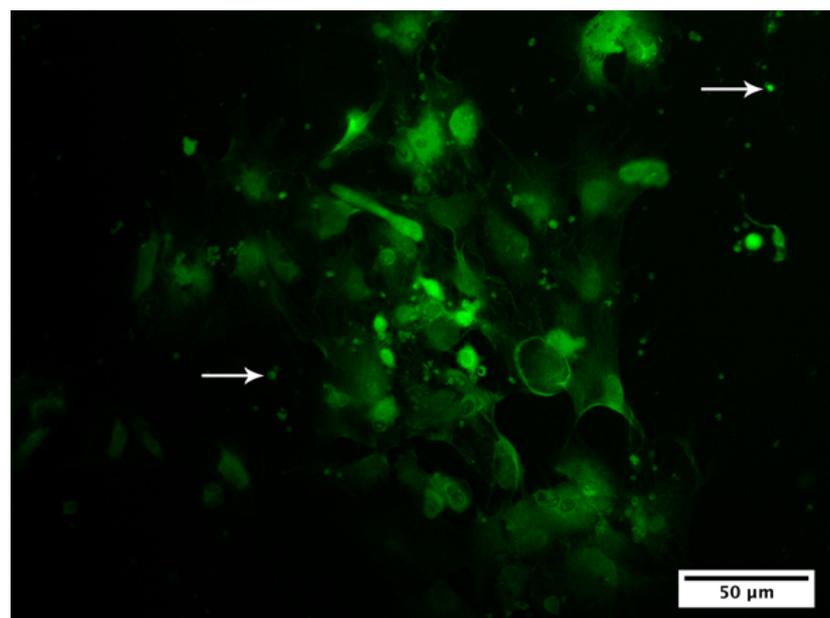
Também foi possível observar marcações em partículas menores. Sugere-se ser RANKL associados aos prolongamentos das células já diferenciadas (Figura 2.9).

Figura 2.8. Imunofluorescência para RANKL. Em verde, imunomarcação para RANKL e em azul para DAPI. Observa-se distribuição homogênea do RANKL entre os grupos, sendo o anticorpo visível pelo citoplasma e membrana da célula



Fonte: A autora

Figura 2.9. Imunofluorescência para RANKL. Observar marcações em partículas menores (setas)



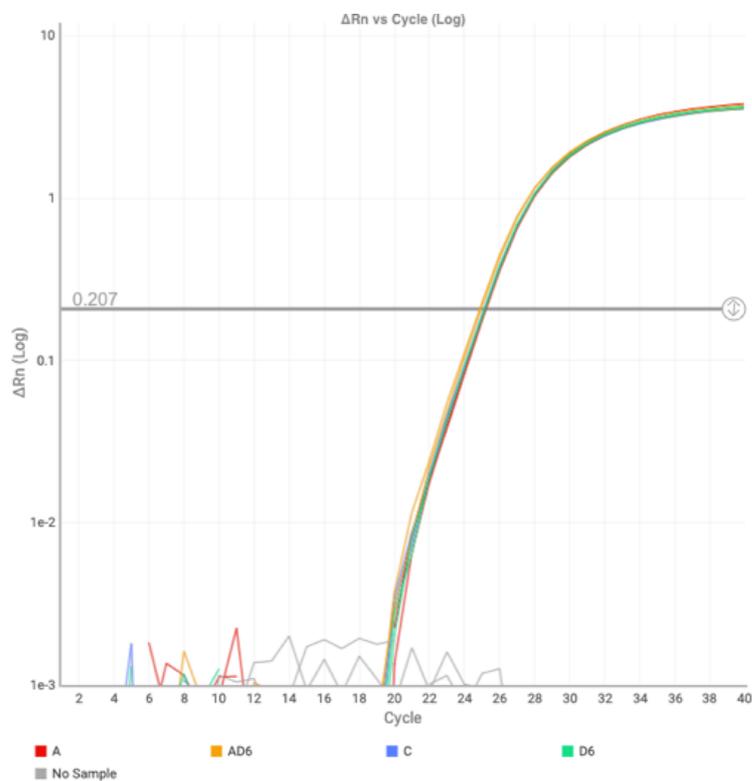
Fonte: A autora

2.4.7 Análise da expressão gênica por qPCR

A expressão gênica das citocinas reguladoras da osteoclastogênese, RANKL e OPG, além do gene de referência HBMS foram quantificados ao sétimo dia de cultivo.

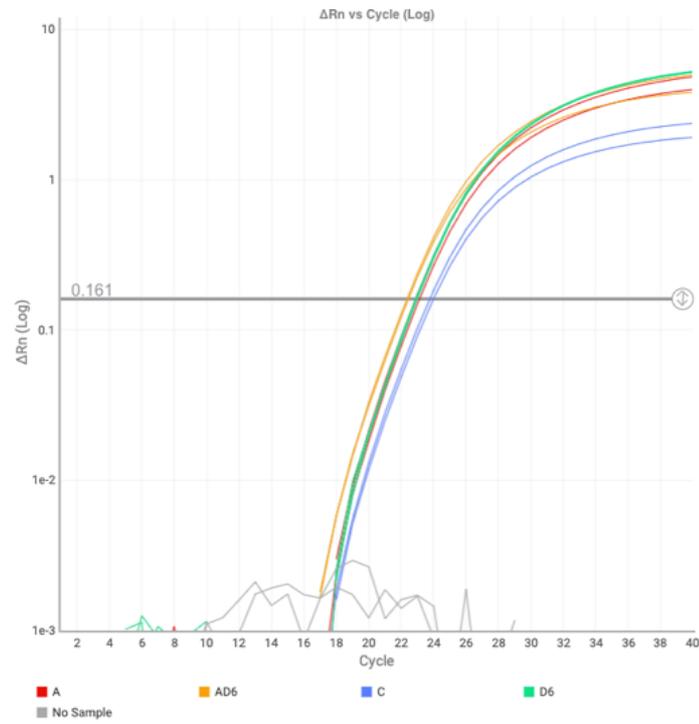
As curvas de amplificação do gene HMBS (Figura 2.8), RANKL (Figura 2.9) e OPG (Figura 2.10) exibem uma linha de *threshold*. A quantificação do cDNA ocorre na intersecção da curva de amplificação com a linha do *threshold*, e esses valores são expressos em Ct (*cycle threshold*); ou seja, a quantidade de ciclos necessária para que o material fosse quantificado.

Figura 2.10. Curva de amplificação do gene de referência HMBS.



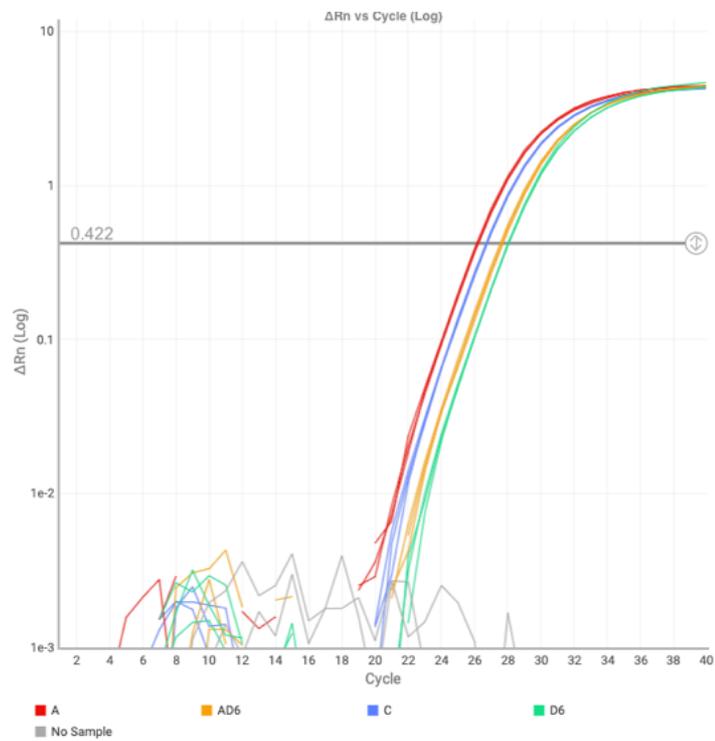
Fonte: A autora

Figura 2.11. Curva de amplificação do gene RANKL.



Fonte: A autora

Figura 2.12. Curva de amplificação do gene OPG.

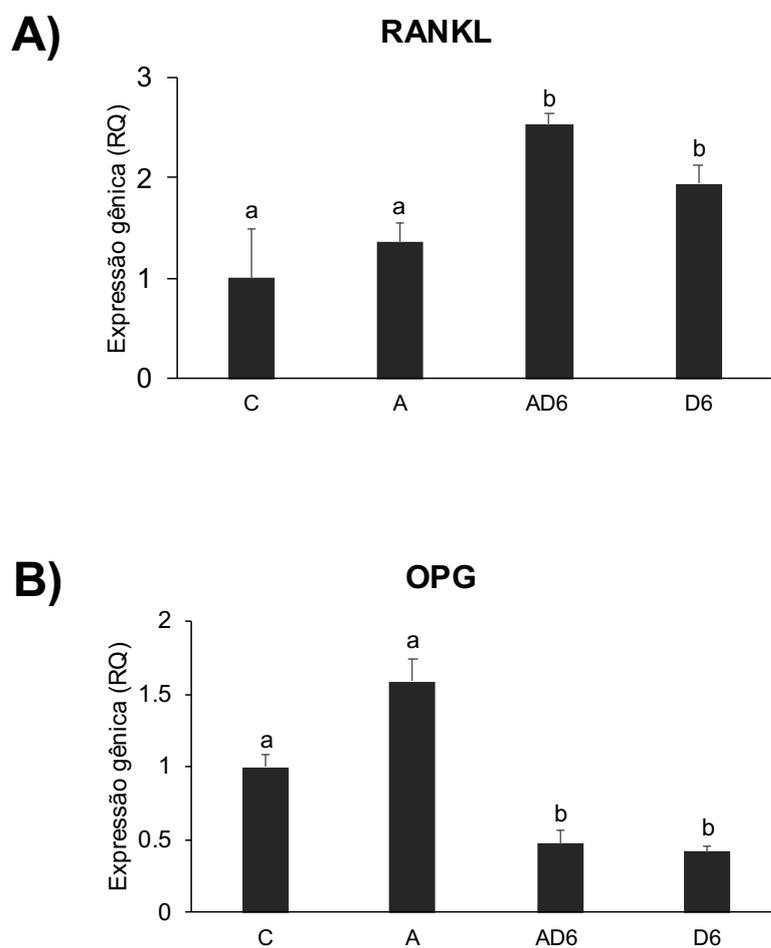


Fonte: A autora

A expressão gênica foi calculada pelo método da quantificação relativa (RQ) ou $2^{-\Delta\Delta CT}$. Esse método faz a comparação entre uma amostra controle, que terá um RQ de 1, e a variação das demais amostras tratadas (A, AD6, D6) comparado ao controle (C).

O gene RANKL foi significativamente mais expresso em ambos os grupos tratados com dexametasona (D6 e AD6). Já o gene OPG foi menos expresso nesses mesmos grupos ($p < 0,05$). Não houve diferenças significantes entre os grupos C e A, em ambos os genes (Gráfico 2.5).

Gráfico 2.5. Expressão gênica dos marcadores RANKL (A) e OPG (B) em células de medula óssea de camundongo cultivadas por 7 dias. Letras diferentes denotam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$)

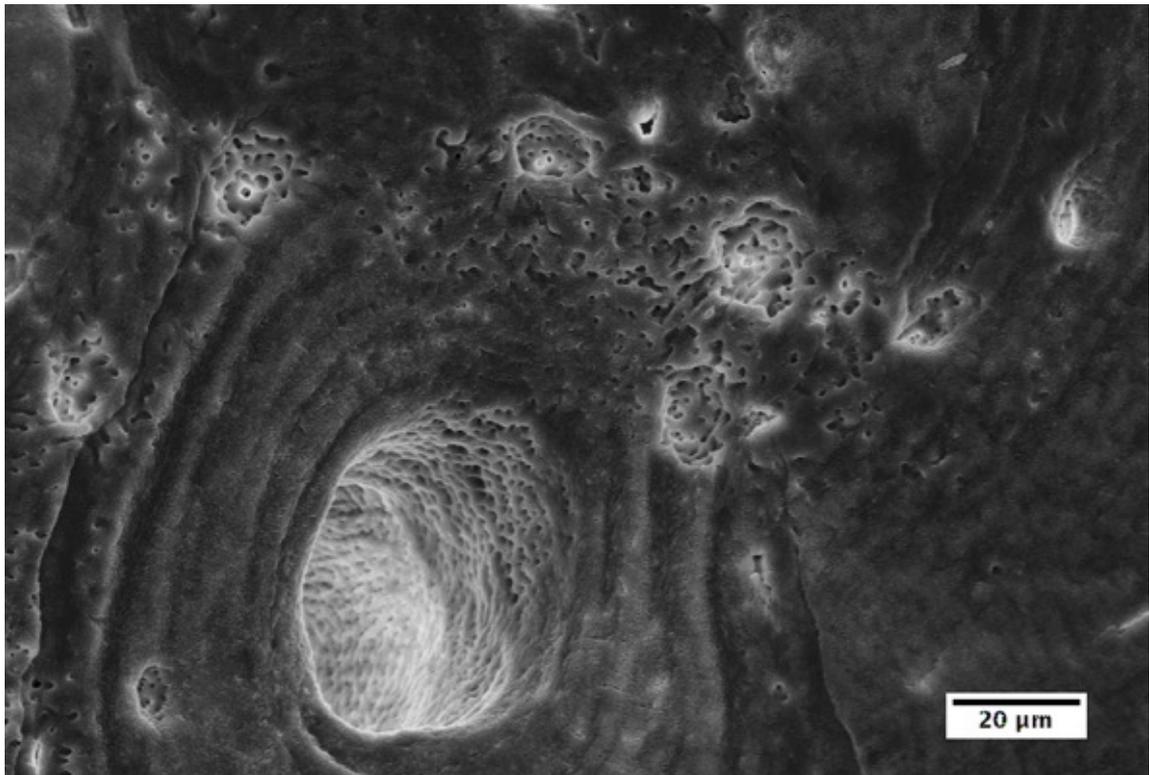


Fonte: A autora

2.4.8 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Ao sétimo dia, foram analisados em MEV os discos de osso cortical bovino utilizados no cultivo. Toda a área do disco foi observada para análise descritiva e imagens representativas de cada osso foram digitalizadas para a análise quantitativa da reabsorção óssea.

Figura 2.13. Micrografia eletrônica de varredura do osso cortical bovino. Observar áreas de reabsorção rasas dispersas pela superfície óssea, inclusive dentro do canal de Havers.

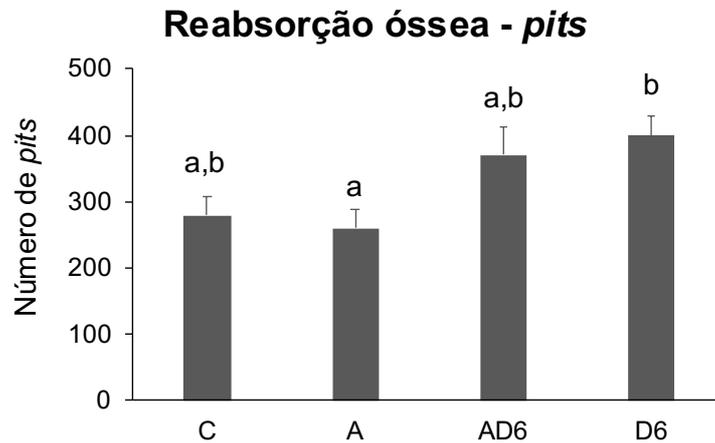


Fonte: A autora

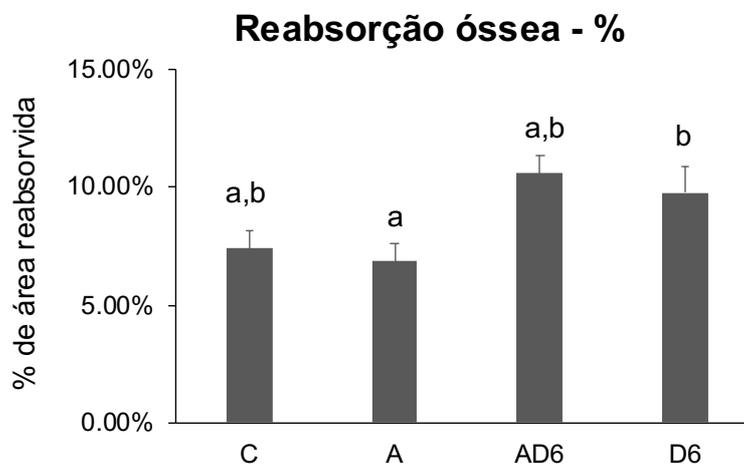
A menor quantidade de pites de reabsorção foi observada no grupo A, sem diferença significativa comparando com o grupo C ou AD6. Contudo, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) ao comparar o grupo A com o grupo D6, sendo quantificado um número superior de *pits* de reabsorção no grupo tratado com a dexametasona. Ao quantificar a reabsorção por área, observamos o mesmo padrão entre os grupos, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) apenas entre os grupos A e D6.

Gráfico 2.6. Quantificação da reabsorção óssea nos discos de osso cortical bovino, após 7 dias de cultivo. Em (A) a quantidade de poços (*pits*) de reabsorção na amostra avaliada e em (B) a porcentagem da área reabsorvida na amostra. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos A e D6, em ambas análises.

A)



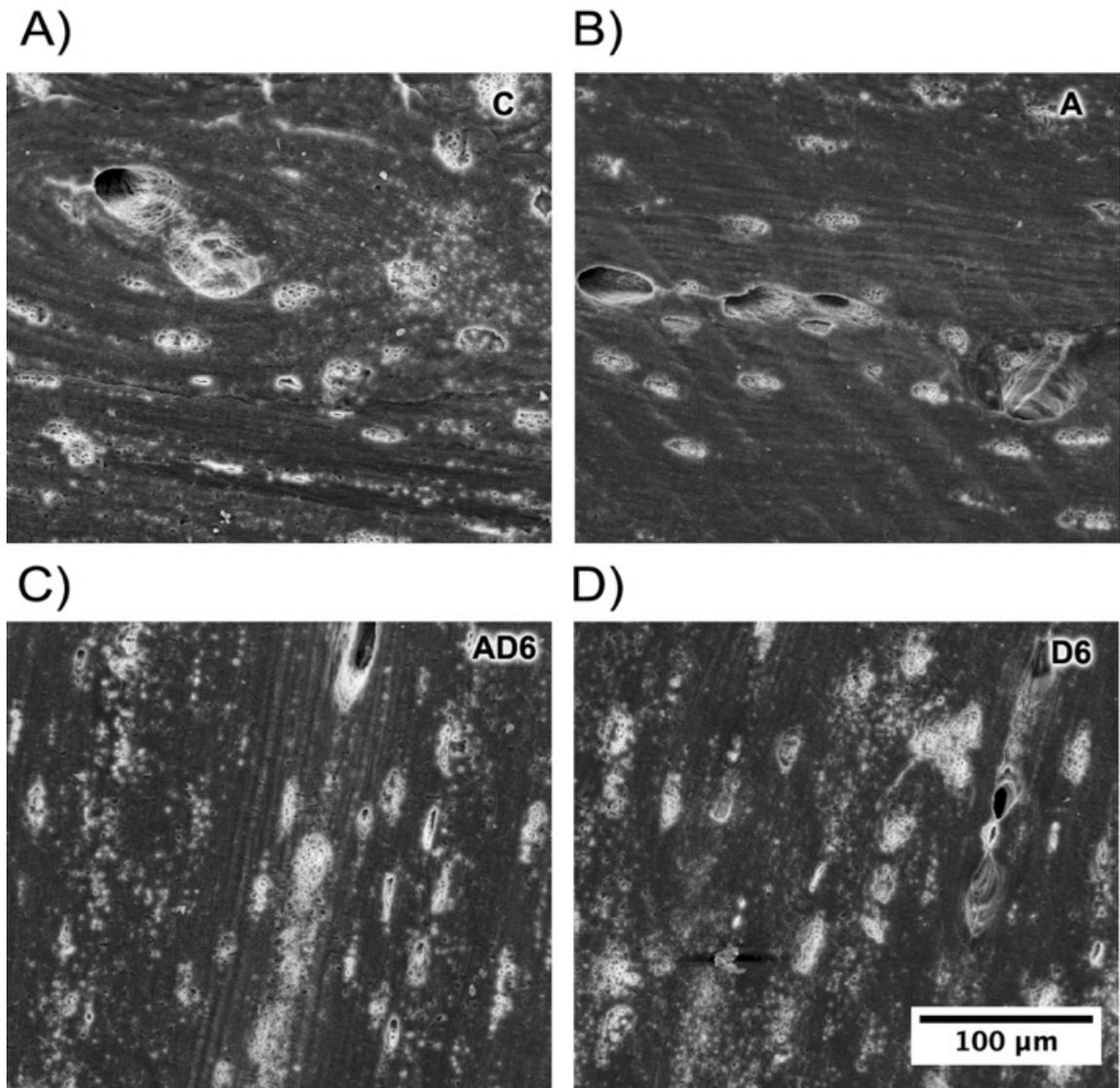
B)



Fonte: A autora

As áreas de reabsorção também foram avaliadas de forma qualitativa. Foi realizada a varredura completa dos discos de osso cortical bovino em aumentos variados. Nessa análise, foram observados os padrões de reabsorção, como por exemplo, as áreas específicas onde o osso era mais reabsorvido e a profundidade dos *pits*, trazendo mais informações sobre as características da reabsorção.

Figura 2.14. Micrografias representativas exibindo o padrão de reabsorção em cada tratamento. Em (A) grupo C, em (B) grupo A, em (C) grupo AD6 e em (D) grupo D6.



Fonte: A autora

Ao quantificar apenas os *pits* por amostra óssea, é visto um número muito semelhante entre os grupos C e A. Contudo, ao serem avaliados de forma individualizada, tem-se uma mudança no padrão. Enquanto no grupo C foram observadas áreas mais profundas de reabsorção, no grupo A, as áreas eram mais superficiais. Lacunas mais profundas também foram detectadas no grupo AD6 e D6. Em todos os grupos lacunas rasas foram observadas, principalmente nas bordas do osso e em regiões entre os sistemas de Havers.

REFERÊNCIAS

- Al Deeb SK, Hamdan II, Al Najjar SM. Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine. *Talanta*. 2004 Oct 20;64(3):695-702. doi: 10.1016/j.talanta.2004.03.044.
- Arana-Chavez VE, Bradaschia-Correa V. Clastic cells: mineralized tissue resorption in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2009 Mar;41(3):446-50. doi: 10.1016/j.biocel.2008.09.007.
- Cappariello A, Maurizi A, Veeriah V, Teti A. The Great Beauty of the osteoclast. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Sep 15;558:70-8. doi: 10.1016/j.abb.2014.06.017.
- Cummings SR, Santora AC, Black DM, Russell RGG. History of alendronate. *Bone*. 2020 Aug;137:115411. doi: 10.1016/j.bone.2020.115411.
- Hachemi Y, Rapp AE, Picke AK, Weidinger G, Ignatius A, Tuckermann J. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture. *J Mol Endocrinol*. 2018 Jul;61(1):R75-R90. doi: 10.1530/JME-18-0024.
- Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, Kanazawa I, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):261-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.035.
- Holliday LS, Dean AD, Greenwald JE, Glucks SL. C-type natriuretic peptide increases bone resorption in 1,25-dihydroxyvitamin D3-stimulated mouse bone marrow cultures. *J Biol Chem*. 1995 Aug 11;270(32):18983-9. doi: 10.1074/jbc.270.32.18983.
- Jiang Y, Lu Y, Jiang X, Hu J, Li R, Liu Y, Zhu G, Rong X. Glucocorticoids induce osteoporosis mediated by glucocorticoid receptor-dependent and -independent pathways. *Biomed Pharmacother*. 2020 May;125:109979. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109979.
- Kim HJ, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya S, Brewer JA, Muglia LJ, Patrick Ross F, Teitelbaum SL. Glucocorticoids and the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci*. 2007 Nov;1116:335-9. doi: 10.1196/annals.1402.057.

Pasqualetti S, Congiu T, Banfi G, Mariotti M. Alendronate rescued osteoporotic phenotype in a model of glucocorticoid-induced osteoporosis in adult zebrafish scale. *Int J Exp Pathol*. 2015 Feb;96(1):11-20. doi: 10.1111/iep.12106.

Pereira RM, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone*. 2001 May;28(5):484-90. doi: 10.1016/s8756-3282(01)00422-7.

Rogers MJ, Crockett JC, Coxon FP, Mönkkönen J. Biochemical and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Bone*. 2011 Jul;49(1):34-41. doi: 10.1016/j.bone.2010.11.008.

Sousa LH, Moura EV, Queiroz AL, Val D, Chaves H, Lisboa M, Furlaneto F, Brito GA, Goes P. Effects of glucocorticoid-induced osteoporosis on bone tissue of rats with experimental periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2017 May;77:55-61. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.01.014.

Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab*. 2021 Jan;39(1):19-26. doi: 10.1007/s00774-020-01162-6.

CAPÍTULO 3 Efeito do alendronato sobre a liberação de vesículas extracelulares

3.1 Introdução

O alendronato (ALN) é um bisfosfonato (BP) nitrogenado de segunda geração descoberto na década de 1970. Seu efeito potente na inibição da reabsorção óssea pelos osteoclastos, tornou esse medicamento amplamente utilizado no tratamento de distúrbios ósseos como a osteoporose (Cummings et al., 2020).

Os BPs, pela sua semelhança ao pirofosfato inorgânico, têm a característica de se aderirem fortemente à matriz óssea. Quando o osteoclasto é recrutado para reabsorção, ele engloba por endocitose o ALN aderido ao osso, dando início aos seus efeitos na célula clástica. O mecanismo de ação desse medicamento ocorre através da inibição de etapas na via do mevalonato. O ALN age inibindo a farnesil difosfato sintase (FPPS), uma importante enzima desta via, que por sua vez, são essenciais para a prenilação de pequenas GTPases. As GTPases como a Ras, Rab, Rho, Rac são necessárias para a ativação da célula clástica e atuam na reorganização do citoesqueleto da célula, permitindo que ela seja capaz de se ligar à matriz óssea para a reabsorção. Sem essas moléculas, não é estabelecida a morfologia característica de um osteoclasto ativo, como a formação dos anéis de actina e da borda em escova (Jobke et al., 2014; Rogers et al., 2020).

Embora a função primária do osteoclasto seja reabsorver o tecido ósseo, novas funções têm sido associadas a ele (Sims; Martin, 2020). Estudos recentes têm sugerido que os osteoclastos liberam vesículas extracelulares (EVs), sendo capazes de contribuir na comunicação e regulação intracelular. Um dos componentes identificados nas EVs liberadas pelos osteoclastos foi o RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa B*). O RANK acoplado às EVs eram capazes de se ligar ao RANKL na superfície dos osteoblastos, promovendo a sua ativação e secreção de matriz óssea (Huynh et al., 2016; Ikebuchi et al., 2018).

Os efeitos do ALN no citoesqueleto dos osteoclastos são amplamente discutidos na literatura, contudo, este pode não ser o seu único mecanismo de ação. Seja por

ação direta do ALN, ou indireta, provocada pela inativação da célula clástica, existe a possibilidade que o tratamento com BPs alterem a liberação de moléculas de sinalização, como as EVs. Dessa forma, nosso estudo pretende avaliar o efeito de duas concentrações de ALN sobre os osteoclastos em cultura.

3.2 Proposição

Avaliar, *in vitro*, o efeito de duas concentrações de ALN sobre os processos de diferenciação, atividade e liberação de EVs pelos osteoclastos diferenciados a partir de células RAW 264.7

Objetivos específicos:

- Análise dos efeitos do ALN sobre a diferenciação e atividade da célula clástica através da contagem de células TRAP+ e detecção de anéis de actina;
- Análise quantitativa da liberação de EVs através do método NTA

3.3 Material e métodos

Os experimentos foram realizados no Department of Orthodontics na University of Florida (EUA).

3.3.1 Delineamento experimental

As culturas foram realizadas em duplicata utilizando células da linhagem Raw 264.7.

Grupos Experimentais:

- Controle (CON): Células Raw 264.7 cultivadas com RANKL sobre substrato ósseo.
- Alendronato (ALN10): Células Raw 264.7 cultivadas com RANKL sobre substrato ósseo saturado com Alendronato Sódico a 10 μM .
- Alendronato (ALN100): Células Raw 264.7 cultivadas com RANKL sobre substrato ósseo saturado com Alendronato Sódico a 100 μM .

3.3.2 Obtenção e tratamento dos substratos ósseos

Para obtenção dos substratos ósseos, discos de osso cortical bovino foram cortados em máquina de corte de precisão (Isomet 1000) com 200 μm de espessura e área de aproximadamente 2 cm^2 . Esses discos foram esterilizados utilizando solução de α -MEM com pen-strep 1% (penicilina e estreptomicina) e guardados até sua utilização.

3.3.3 Obtenção das células clásticas

Para obtenção das células foram utilizadas células Raw 264.7. As células foram cultivadas em placas de 6 *wells* sobre o osso cortical bovino na densidade de 1×10^6 . Foi utilizado meio α -MEM acrescido de 10% de soro fetal bovino exo free (System

Biosciences), 1% de glutamina, 1% de pen/strep e suplementado com 5 ng/mL RANKL, sobre o osso cortical bovino previamente tratado. As células foram cultivadas por 5 dias em estufa a 37° e CO₂. O meio foi trocado ao terceiro dia.

3.3.4 Método histoquímico da TRAP

Ao quinto dia, após detectar ao microscópio de luz a presença de células gigantes multinucleadas, foi realizado o histoquímico da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP). As células foram fixadas em formaldeído a 2%, por 20 minutos sobre gelo. Na sequência foram permeabilizadas com Triton 1% por 20 minutos, lavadas com PBS e submetidas ao protocolo informado no kit Leucocyte acid phosphatase (TRAP) da Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As células TRAP⁺ presentes foram contadas em 4 áreas distintas dos *wells* (1000 µm × 1000 µm) e classificadas de acordo com o número de núcleos, sendo consideradas as multinucleadas (com 2 a 5 núcleos) ou gigantes (com 6 ou mais núcleos).

3.3.5 Identificação da presença de anéis de actina com Faloidina-FITC

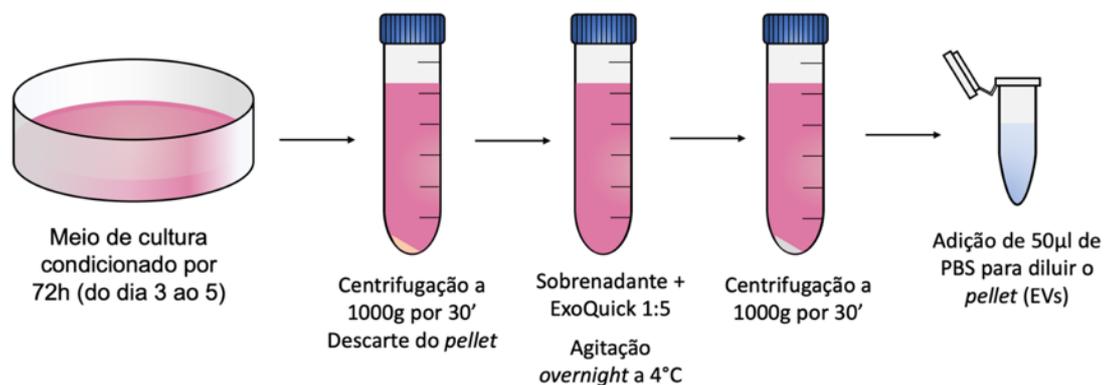
Para detecção dos anéis de actina nos osteoclastos, as células sobre os substratos ósseos foram fixadas com formaldeído a 2% por 20 minutos sobre gelo, permeabilizadas com Triton 1% por 20 minutos e coradas utilizando 10 µg/mL de Faloidina-FITC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) por 30 minutos, sob leve agitação. Na sequência, os substratos ósseos foram lavados 3 vezes com PBS e examinados imediatamente no microscópio Zeiss Axioplan II (Zeiss, Thornwood, NY, USA). Os anéis de actina foram contados em 5 áreas representativas de cada substrato ósseo.

3.3.6 Isolamento das vesículas extracelulares (EVs)

O meio de cultura condicionado do dia 3 ao dia 5 foi cuidadosamente removido, dispensado em tubo cônico estéril de 15 ml e centrifugado por 30 minutos a 3000 g. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e foi adicionado ExoQuick TC (System Biosciences) na proporção de 1:5, como recomendado pelo fabricante. As

amostras foram incubadas *overnight* a 4°C com leve agitação. No dia seguinte os tubos com as amostras foram novamente centrifugados por 30 minutos a 3000 g, o sobrenadante descartado e o *pellet* ressuspensionado com 50 µl de PBS estéril. Essas amostras foram armazenadas em freezer de -80° C para análises futuras.

Figura 3.1. Sequência do método utilizado para o isolamento das vesículas extracelulares liberadas por células Raw 264.7.



Fonte: A autora

3.3.7 Análise das (EVs) utilizando o método NTA

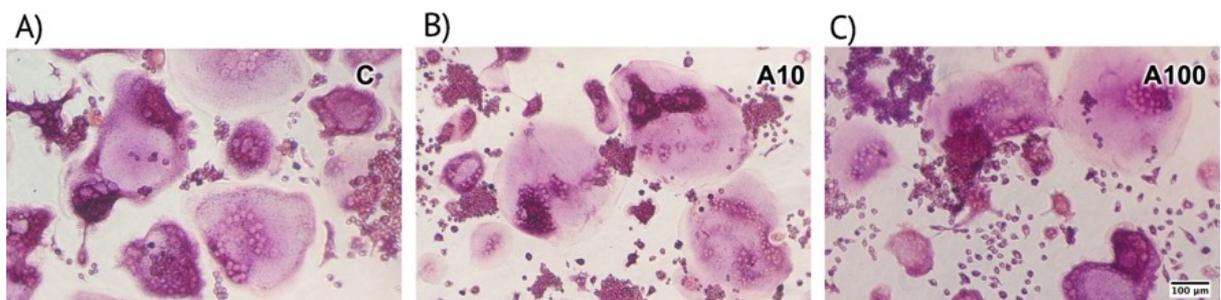
As EVs previamente isoladas foram analisadas utilizando-se o método Nanoparticle Tracking Analysis (NTA) utilizando o aparelho NanoSight NS-300 (Malvern). Esse método permite a análise quantitativa da concentração e quantidade de EVs por tamanho. As amostras foram diluídas em PBS na proporção de 1:20 e foram estabelecidos os seguintes parâmetros no aparelho: captura de imagens a 25 frames por segundo, temperatura entre 21-25°C e captura de vídeo por 60 segundos. Os vídeos foram analisados utilizando o software Nanosight NTA no formato raw em triplicata.

3.4 Resultados

3.4.1 Método histoquímico da TRAP

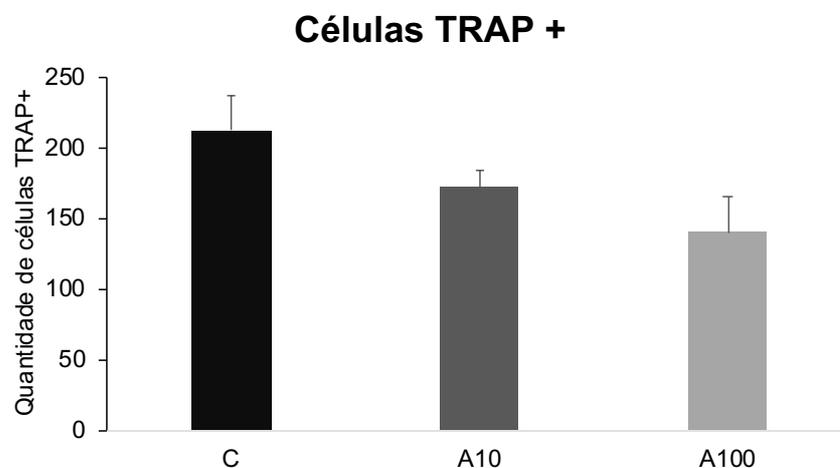
Após 5 dias de cultivo celular sobre os substratos ósseos, as células remanescentes na placa foram submetidas ao protocolo histoquímico da TRAP. Foram somadas as células multinucleadas e gigantes de quatro áreas distintas de cada *well* e submetidas ao teste ANOVA. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,0937$).

Figura 3.2. Células Raw 264.7 cultivadas por 5 dias na presença de substrato ósseo coradas pelo método histoquímico da TRAP (aumento de 100x). Observar a presença de células gigantes e multinucleadas nos três grupos, com distribuição muito semelhante (A = controle; B = ALN 10 μ M; C = ALN 100 μ M).



Fonte: A autora

Gráfico 3.1. Quantificação de células TRAP+ após 5 dias de cultivo. Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos ($p > 0.05$).

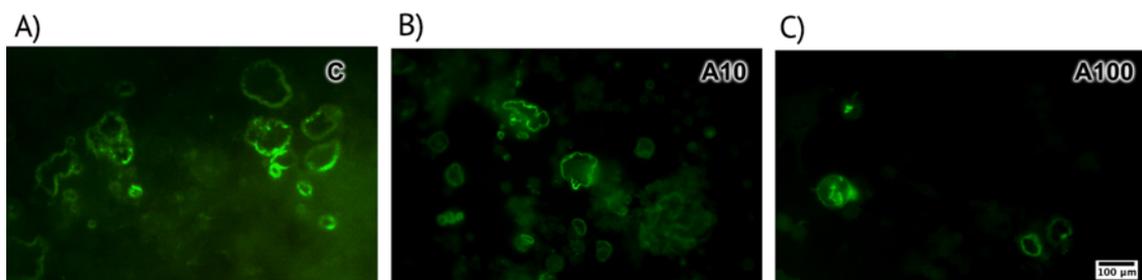


Fonte: A autora

3.4.2 Identificação da presença de anéis de actina com Faloidina-FITC

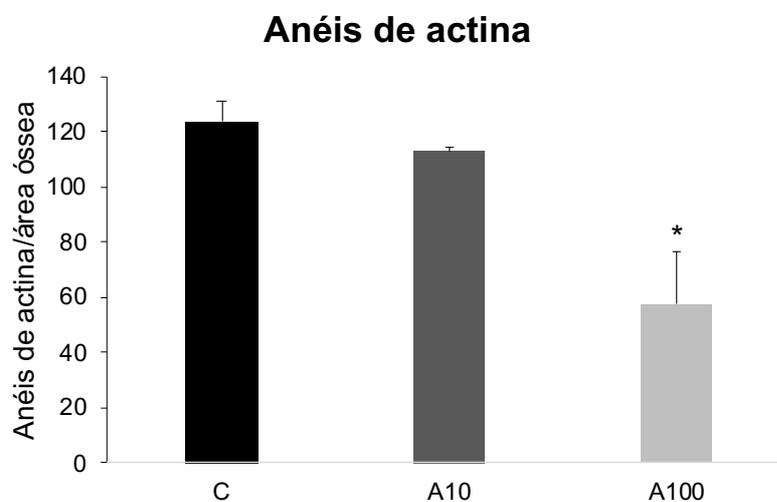
Após 5 dias de cultivo celular, as células clásticas que ficaram aderidas ao substrato ósseo foram submetidas à coloração com Faloidina-FITC. Os anéis de actina foram identificados e contados em 5 áreas diferentes do osso. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e o pós teste de Tukey com 5% de significância. Foi identificada diminuição estatisticamente significativa ($p < 0.05$) na quantidade de anéis de actina nas células tratadas com ALN a $100\mu\text{M}$, quando comparadas ao grupo C e ALN a $10\mu\text{M}$.

Figura 3.3. Células Raw 264.7 cultivadas por 5 dias sobre substrato ósseo coradas com Faloidina-FITC (aumento de 100x). Pode-se observar a presença de anéis de actina em todos os grupos, em maior quantidade em A (Controle) e em B (Alendronato $10\mu\text{M}$), quando comparado com o grupo Alendronato $100\mu\text{M}$ (C). Em (D) é possível observar a distribuição da quantidade de anéis de actina por grupo.



Fonte: A autora

Gráfico 3.2. Quantificação dos anéis de actina por área óssea. A menor quantidade foi exibida no grupo A100 ($p < 0.05$).



Fonte: A autora

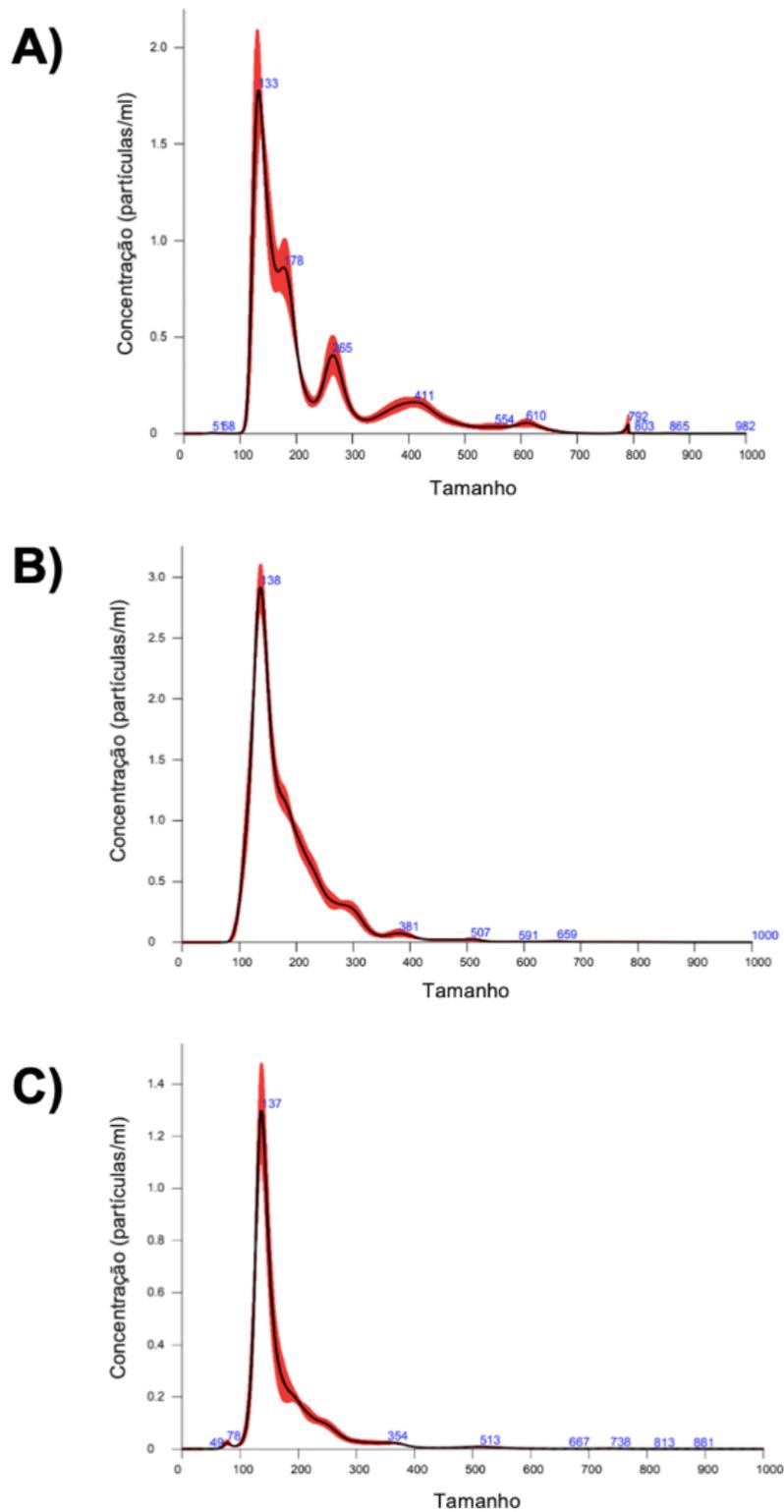
3.4.3 Análise das EVs utilizando o método NTA

As vesículas foram isoladas como descrito anteriormente (Figura 3.1), e na sequência, foram submetidas ao método NTA. Em todos os grupos pode-se observar maior quantidade de EVs com tamanho entre 100-200 nm, consistente com o tamanho dos exossomos.

A média e a moda do tamanho das EVs são descritas em nm com os respectivos erros padrão: C (tamanho médio das EVs: 227.9 +/- 4.9 nm e moda: 136.4 +/- 3.6 nm); A10 (tamanho médio das EVs: 183.6 +/- 1.8 nm e moda: 137.3 +/- 1.3 nm); A100 (tamanho médio das EVs: 173.4 +/- 2.2 nm e moda: 136.7 +/- 1.4 nm). Já a concentração das EVs é descrita como partículas por ml, sendo encontradas: C (1.43×10^9 partículas/ml), A10 (2.2×10^9 partículas/ml) e A100 (6×10^8 partículas/ml).

No grupo tratado com Alendronato a 100 μ M é possível observar um pequeno pico de EVs menores do que 100 nm, o que não é visto no grupo controle e Alendronato 10 μ M. A menor concentração total de partículas por ml também é observada no grupo tratado com Alendronato 100 μ M.

Figura 3.4. Tamanho e concentração das EVs previamente isoladas avaliadas pelo método NTA. Em (A) grupo C, (B) A10 (ALN 10 μ M) e (C) A100 (ALN 100 μ M).



Fonte: A autora

REFERÊNCIAS

Cummings SR, Santora AC, Black DM, Russell RGG. History of alendronate. *Bone*. 2020 Aug;137:115411. doi: 10.1016/j.bone.2020.115411.

Huynh N, VonMoss L, Smith D, Rahman I, Felemban MF, Zuo J, Rody WJ Jr, McHugh KP, Holliday LS. Characterization of Regulatory Extracellular Vesicles from Osteoclasts. *J Dent Res*. 2016 Jun;95(6):673-9. doi: 10.1177/0022034516633189.

Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature*. 2018 Sep;561(7722):195-200. doi: 10.1038/s41586-018-0482-7.

Jobke B, Milovanovic P, Amling M, Busse B. Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone*. 2014 Feb;59:37-43. doi: 10.1016/j.bone.2013.10.024.

Rogers MJ, Mönkkönen J, Munoz MA. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. *Bone*. 2020 Oct;139:115493. doi: 10.1016/j.bone.2020.115493.

Sims NA, Martin TJ. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol*. 2020 Feb 10;82:507-529. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034425.

CAPÍTULO 4 Discussão geral e conclusão

4.1 Discussão

Este estudo *in vitro* teve como objetivo primordial a avaliação dos possíveis efeitos do alendronato, da dexametasona e da associação destes medicamentos sobre osteoclastos. Na primeira parte experimental desta Tese foram observados os efeitos destes medicamentos sobre osteoclastos provenientes de medula óssea de camundongo. Já na segunda parte, a investigação focou na ação do ALN sobre a liberação de EVs pelos osteoclastos obtidos através de células Raw 264.7.

Foi evidenciado neste estudo que a DEX estimulou maior expressão gênica de citocinas promotoras da osteoclastogênese e atividade do osteoclasto; esse efeito não foi minimizado pela presença do ALN. Contudo, o ALN aderido ao osso permitiu uma diminuição na profundidade das lacunas de reabsorção. Quando doses maiores de ALN foram incubadas no substrato ósseo, a redução na atividade reabsortiva foi mais evidente ao promover a diminuição na formação dos anéis de actina e redução na liberação de EVs pelos osteoclastos.

Ao simular *in vitro* as complexas condições que ocorrem no complexo sistema biológico *in vivo*, diversos fatores devem ser considerados para tentar aproximar estes ambientes. Mesmo não sendo possível replicar na íntegra o que ocorre *in vivo* no cultivo celular, um dos fatores que foram mimetizados com mais fidelidade, foi o substrato ósseo.

Durante o processo de corte dos discos de ossos bovinos é gerada uma camada de esfregaço formada pela ação mecânica. Essa camada é conhecida como *smear layer* e contém restos de material orgânico e inorgânico do tecido (Violich; Chandler, 2010). Contudo, essa camada não está presente em sistemas biológicos em condições normais. A remoção da camada de matriz não mineralizada (osteóide no osso) e a exposição da superfície mineralizada precedem a adesão das células clásticas e, portanto, o processo de reabsorção em si.

Buscando mimetizar com mais precisão o ambiente *in vivo*, optou-se pelo desenvolvimento de um protocolo de remoção da *smear layer* dos discos de osso bovino. Para isso, os substratos ósseos foram submetidos à remoção química da *smear layer* com hipoclorito de sódio e EDTA, seguido por lavagens seriadas com água ultrapura em cuba ultrassônica. Tanto o hipoclorito, quanto o EDTA são compostos já utilizados há anos na Odontologia para limpeza dos condutos radiculares em procedimentos endodônticos. Contudo, quando eles são aplicados diretamente sobre células em cultivo, podem apresentar alguns efeitos citotóxicos (Marins et al., 2012; Vouzara et al., 2016). Para contornar esse possível efeito, os discos de osso bovino foram submetidos a uma série de lavagens com água ultrapura MilliQ, incluindo um período *overnight*. O substrato foi avaliado em MEV, confirmando-se que a camada de esfregaço foi removida.

Apesar de não terem sido feitos testes específicos de citotoxicidade para o protocolo de *smear layer* nesse trabalho, foi observado em microscópio de luz como as células se comportaram durante os 7 dias de cultivo sobre os discos de osso com *smear layer* e sem a *smear* (após o protocolo de remoção); não foram observadas alterações no padrão de crescimento e diferenciação das células cultivadas sobre o osso com e sem *smear*. Já na avaliação do substrato, em MEV, confirmou-se que a camada de esfregaço foi removida. Além disso, nenhum efeito prejudicial foi detectado sobre a atividade das células clásticas, já que foram visualizadas diversas áreas de reabsorção nos dois grupos, demonstrando então, a efetividade do protocolo de remoção de *smear layer*.

Outro fator importante foi a concentração utilizada para cada medicamento. Como visto anteriormente, os bisfosfonatos têm a capacidade de se aderirem fortemente à matriz óssea. Em um paciente que faz uso de BP como o ALN, o BP é disponibilizado na matriz óssea e tem sua ação no osteoclasto, após ser englobado durante a reabsorção. Dessa forma, foi simulado essa condição clínica incorporando o BP previamente nos discos de ossos bovinos. O desafio, no entanto, era compreender quanto do BP acrescentado ao meio era efetivamente incorporado ao osso. Para isso, foi adaptada a metodologia de al Deeb et al. (2004) e em análise em espectrofotômetro observou-se que todo o ALN na concentração de 10 μ M foi incorporado à matriz óssea. Como essa mesma concentração de ALN foi utilizada previamente em outros estudos de cultivo de osteoclastos (Breuil et al., 1998; Giuliani

et al., 1998; Weinstein et al., 2002), tendo os efeitos esperados deste BP, essa foi a concentração utilizada neste trabalho. Já a concentração de DEX foi determinada a partir de estudos prévios. Em um trabalho *in vivo* e *in vitro* Shi et al., (2015) observaram que a DEX promovia a osteoclastogênese de forma dose-dependente. Na cultura de células Raw 264.7 e de células da medula óssea de camundongos, o pico da ação promotora da DEX sobre os osteoclastos foi atingida com 1 μ M, tendo redução dos efeitos com concentrações superiores (Shi et al., 2015). Considerando esses resultados, a concentração de 1 μ M de DEX foi utilizada nesta pesquisa.

O método utilizado na primeira parte deste estudo foi o cultivo primário a partir de células da medula óssea de camundongos, estimuladas por dihidroxivitamina D3 (calcitriol). Este modelo tem a vantagem de simular a interação das diferentes células do ambiente ósseo, proporcionando maior semelhança com o modelo *in vivo*. A dihidroxivitamina D3 promove a liberação de RANKL e M-CSF pelas células indiferenciadas mesenquimais presentes na medula óssea, estimulando a diferenciação dos osteoclastos. Além disso, esse modelo tem a vantagem de gerar osteoclastos com real capacidade de reabsorção, que foi uma das variáveis avaliada neste estudo.

Os estudos têm indicado que os osteoclastos obtidos através da medula óssea de camundongos começam a surgir a partir do 5º dia de cultivo (Marino et al., 2014), porém o tempo de vida dessas células não é muito longo, variando entre 7-11 dias. Segundo Rucci et al. (2019), após o surgimento de células gigantes multinucleadas, as células podem começar a sofrer apoptose em um período de 48h. Dessa forma, o crescimento e diferenciação das células foi acompanhado ao microscópio de luz e ao 5º dia já era possível observar algumas células multinucleadas se formando. Foi realizado o teste de viabilidade celular nos dias 5, 7 e 9, não havendo nenhum efeito citotóxico entre os diferentes tratamentos nos 3 períodos, com a maior quantidade de células viáveis detectada no dia 7. Dessa forma, o dia 7 foi o período de escolha para os demais experimentos.

Neste estudo, foi determinada a expressão gênica das citocinas RANKL e OPG. Em ambos os grupos tratados com dexametasona, associada ou não ao ALN, foi observado o aumento na expressão gênica do RANKL e diminuição da expressão da OPG, promovendo a osteoclastogênese. Através da avaliação por

imunofluorescência, o RANKL foi observado com ampla distribuição pela célula, de forma homogênea entre os grupos, tendo maior concentração na membrana plasmática. Pequenas marcações de RANKL foram identificadas de forma mais dispersa. Considerando as inúmeras lavagens que são executadas na realização deste protocolo, apenas células com capacidade de adesão seriam marcadas pelo fluoróforo. A hipótese levantada é que essas partículas dispersas estariam associadas a finos prolongamentos dos osteoclastos, considerando que as células em cultura possuem formato diferente do encontrado *in vivo*. Também é importante destacar que o formato das células em cultura e analisadas em microscópio de luz é visualizado em apenas 2 dimensões, ocorrendo frequentemente sobreposições de imagem. Além disso, nesta avaliação por imunofluorescência as células foram cultivadas sobre lamínula de vidro e não sobre substrato ósseo. Variações no formato das células também são encontradas dependendo dos substratos utilizados (vidro, plástico e osso) (Conaway et al., 2016).

A alteração na liberação dessas citocinas representa ação indireta sobre os osteoclastos, já que as células que controlam essa liberação são os osteoblastos e as células mesenquimais indiferenciadas. Os estudos têm associado aos glicocorticoides esse estímulo sobre as células do estroma e da linhagem osteoblástica, com efeitos indiretos sobre a osteoclastogênese (Wang et al., 2019), como por exemplo, redução na via Wnt/ β -catenina e BMP/2 (Hayashi et al., 2009; Mak et al., 2009; Hildebrandt et al., 2018), levando a redução da osteoblastogênese. No entanto, é necessário destacar que a grande variedade de modelos experimentais, tipos e doses dos glicocorticoides utilizados, dificultam a compreensão desses efeitos. Neste estudo, como foram utilizadas células provenientes da medula óssea, deve-se considerar que parte dos efeitos encontrados sobre os osteoclastos, estão indiretamente relacionadas às demais células da medula.

A contagem de células multinucleadas e gigantes TRAP+ foi realizada tanto na cultura primária, quanto na cultura de células de linhagem Raw 264.7. Na cultura primária, foi detectado aumento do número total de células TRAP+ nos grupos tratados com DEX, inclusive quando ela foi administrada conjuntamente ao ALN. A TRAP é uma enzima lisossomal detectável em análises histoquímicas, sendo um importante marcador da presença e atividade dos osteoclastos. Os estudos têm indicado que os glicocorticoides promovem esse aumento inicial na quantidade de

osteoclastos (Shi et al., 2015; Hachemi et al., 2018; Henneicke et al., 2014). Neste estudo, considerando o tempo de vida das células em cultura, somente foi possível avaliar os efeitos iniciais dos medicamentos sobre as células. Essa variação no número de células TRAP+ não foi identificada nos grupos tratados com ALN, tanto na cultura primária, quanto no cultivo de células Raw 264.7.

Deve-se destacar também, a variabilidade na diferenciação das células em cultura primária. As células gigantes tiveram grande variação de tamanho entre as amostras no mesmo grupo. Ainda que não houvesse diferença estatisticamente significativa com os diferentes tratamentos, principalmente por essa grande variabilidade, as maiores células gigantes foram detectadas nos grupos tratados com a DEX, com destaque para o grupo associado ao ALN. Autores sugeriram que essas alterações morfológicas do osteoclasto poderiam representar um pré estágio de apoptose prolongada (Jobke et al., 2014). Considerando o aumento de RANKL e diminuição da OPG nos grupos tratados com DEX, além dos efeitos descritos na literatura sobre o aumento do número de osteoclastos quando tratados com dexametasona e as possíveis alterações morfológicas nas células clásticas tratadas com BP nitrogenado, é possível explicar a presença das maiores células gigantes quando as culturas foram tratadas com ambas as drogas.

Para compreender se o aumento do número e tamanho das células TRAP+ significaria aumento da atividade dessas células, foi avaliada a reabsorção no substrato ósseo promovida pelos osteoclastos de medula óssea, através da MEV e, análise dos anéis de actina das células Raw 264.7 cultivadas sobre o substrato ósseo. Foi detectado aumento na área reabsorvida no osso em que as células foram tratadas exclusivamente com DEX. Esse aumento não ocorreu nas células submetidas ao tratamento conjunto de DEX e ALN. Esse achado sugere que o alendronato aderido à matriz foi capaz de minimizar os efeitos da dexametasona sobre os osteoclastos. É importante destacar que o BP aderido à matriz óssea não impede inicialmente a adesão do osteoclasto ao osso. A célula ativada se adere à matriz, reorganiza o citoesqueleto e inicia o bombeamento ácido. Nesse momento, com a acidificação da lacuna, ocorre a dissociação dos íons do BP na matriz que são englobados pelo osteoclasto por endocitose. Essas moléculas, agora no citoplasma da célula, iniciam seus efeitos inibitórios sobre a atividade do osteoclasto (Rogers et al., 2020). Ou seja, mesmo no osso tratado com ALN, é possível ocorrer áreas de reabsorção inicial.

Neste estudo, apesar da quantidade de *pits* de reabsorção entre o grupo controle e tratados com ALN serem semelhantes, a profundidade das lacunas de reabsorção diferiu nas amostras. Enquanto as lacunas do osso tratado com ALN eram superficiais, as áreas de reabsorção do controle já eram mais profundas. Isso também foi observado nos grupos tratados com a DEX, principalmente naquele submetido somente ao tratamento com esse glicocorticoide, onde foi observado a maior quantidade de *pits* e também a maior profundidade das lacunas.

Considerando essa ação inibitória do ALN na reabsorção, foi testado com células Raw 267.4 se concentrações maiores deste BP poderiam potencializar esse efeito. Através da avaliação dos anéis de actina, foi visualizado um número semelhante entre o controle e ALN a 10 μM (mesma concentração utilizada com as células da medula óssea), contudo, ocorreu diminuição substancial na quantidade de anéis de actina no grupo tratado com dose 10 vezes maior de ALN (100 μM). Os anéis de actina são constituídos a partir da polimerização de microfilamentos, formando filamentos de actina (F-actin) (Han et al., 2019; Holliday et al., 2019). Como visto anteriormente, a formação dos anéis de actina são reflexo da ativação dos osteoclastos. Quando as células são tratadas com BP nitrogenados ocorre entre outras ações, a prenicação de pequenas GTPases como as Rho, Rac e Rab, que atuam sobre o citoesqueleto dos osteoclastos, prejudicando a formação dos anéis de actina, além de ações sobre a adesão, migração da célula, polarização e também do tráfego intravesicular (Rogers et al., 2020).

Curiosamente, alguns elementos do citoesqueleto também parecem ser requeridos para a biogênese das EVs, incluindo membros da família das hidrolases (GTPases) como a Rho (van Niel et al., 2018). Este modelo experimental com as células Raw 264.7 permitiu a avaliação das EVs liberadas apenas por osteoclastos sob o efeito de ALN, diferentemente da cultura primária, onde há presença de diversas células da medula óssea, principalmente nos primeiros dias da cultura.

Após o isolamento das EVs, elas foram avaliadas utilizando o método Nanoparticle Tracking Analysis ou NTA. Este método permite, através da análise do espalhamento de luz e movimento browniano das partículas, obter o tamanho das partículas individualmente e a concentração por ml. Em todos os grupos foi visualizado EVs com tamanho entre 100-200 nm, consistente com o tamanho dos exossomos. A

menor concentração total de partículas ou EVs foi observada no grupo tratado com a maior dose de ALN, evidenciando um possível novo efeito deste BP sobre o osteoclasto. Mais estudos deverão ser realizados para compreender se há um efeito direto do ALN sobre a liberação das EVs, ou se é apenas consequência dos efeitos desse medicamento sobre o citoesqueleto da célula e tráfego intravesicular. Além disso, a caracterização futura dessas EVs poderá trazer dados mais fortes sobre quais moléculas elas estariam carregando e se essas moléculas poderiam interferir na regulação óssea. Caso o RANK fosse um dos componentes dessas EVs, poderia ser feita uma investigação sobre a ação dos BP nitrogenados não apenas sobre os osteoclastos, mas também sobre os osteoblastos, já que as EVs contendo RANK já foram amplamente associadas na literatura à sinalização “reversa” dos osteoblastos promovida pelos osteoclastos (Ikebuchi et al., 2018; Sims; Martin, 2020).

Considerando esse possível novo efeito sobre a liberação das EVs com células tratadas com 100 μ M de ALN, ficam alguns questionamentos: essa dose poderia reverter ou minimizar efetivamente os efeitos da DEX nos períodos iniciais? Se ocorre essa diminuição na liberação das EVs pelos osteoclastos, poderia haver efeitos indiretos na atividade dos osteoblastos? Existe correlação entre a inativação do osteoclasto e a liberação de EVs? Mais estudos deverão ser realizados para melhor embasar esses novos questionamentos.

Desta forma, o presente estudo demonstrou que a administração de DEX nas culturas aumentou a liberação de RANKL e diminuiu a liberação de OPG, estimulando a osteoclastogênese e a ativação dos osteoclastos. Consequentemente, a DEX potencializou a reabsorção óssea. Este maior estímulo reabsortivo, não foi revertido pelo tratamento conjunto com ALN. No entanto, os efeitos do ALN foram dose-dependentes. Enquanto doses mais leves promoveram a diminuição da profundidade das lacunas de reabsorção, doses mais elevadas levaram à significativa redução na formação dos anéis de actina e na liberação de EVs pelos osteoclastos.

4.2 Conclusão

Considerando os parâmetros utilizados neste estudo foi possível concluir que o tratamento com ALN, DEX e a combinação de ambos, não promoveu alterações significantes no número de células TRAP+ tanto em cultivo primário de células da medula óssea, quanto de células Raw 264.7. Contudo, o ALN aderido ao substrato ósseo promoveu redução na profundidade das lacunas de reabsorção. A DEX estimulou aumento na expressão gênica de marcadores de osteoclastogênese, mesmo quando administrada em conjunto com o ALN. Doses maiores de ALN inibiram ainda mais intensamente a reabsorção (diminuição na formação dos anéis de actina) e reduziram a liberação de EVs pelos osteoclastos.

REFERÊNCIAS¹

Al Deeb SK, Hamdan II, Al Najjar SM. Spectroscopic and HPLC methods for the determination of alendronate in tablets and urine. *Talanta*. 2004 Oct 20;64(3):695-702. doi: 10.1016/j.talanta.2004.03.044.

Breuil V, Cosman F, Stein L, Horbert W, Nieves J, Shen V, Lindsay R, Dempster DW. Human osteoclast formation and activity in vitro: effects of alendronate. *J Bone Miner Res*. 1998 Nov;13(11):1721-9. doi: 10.1359/jbmr.1998.13.11.1721.

Conaway HH, Henning P, Lie A, Tuckermann J, Lerner UH. Activation of dimeric glucocorticoid receptors in osteoclast progenitors potentiates RANKL induced mature osteoclast bone resorbing activity. *Bone*. 2016 Dec;93:43-54. doi: 10.1016/j.bone.2016.08.024.

Giuliani N, Pedrazzoni M, Negri G, Passeri G, Impicciatore M, Girasole G. Bisphosphonates stimulate formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures in vitro and promote early osteoblastogenesis in young and aged mice in vivo. *Bone*. 1998 May;22(5):455-61. doi: 10.1016/s8756-3282(98)00033-7.

Hachemi Y, Rapp AE, Picke AK, Weidinger G, Ignatius A, Tuckermann J. Molecular mechanisms of glucocorticoids on skeleton and bone regeneration after fracture. *J Mol Endocrinol*. 2018 Jul;61(1):R75-R90. doi: 10.1530/JME-18-0024.

Han G, Zuo J, Holliday LS. Specialized Roles for Actin in Osteoclasts: Unanswered Questions and Therapeutic Opportunities. *Biomolecules*. 2019 Jan 9;9(1):17. doi: 10.3390/biom9010017.

Hayashi K, Yamaguchi T, Yano S, Kanazawa I, Yamauchi M, Yamamoto M, Sugimoto T. BMP/Wnt antagonists are upregulated by dexamethasone in osteoblasts and reversed by alendronate and PTH: potential therapeutic targets for glucocorticoid-induced osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Feb 6;379(2):261-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.035.

Henneicke H, Gasparini SJ, Brennan-Speranza TC, Zhou H, Seibel MJ. Glucocorticoids and bone: local effects and systemic implications. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Apr;25(4):197-211. doi: 10.1016/j.tem.2013.12.006.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Hildebrandt S, Baschant U, Thiele S, Tuckermann J, Hofbauer LC, Rauner M. Glucocorticoids suppress Wnt16 expression in osteoblasts in vitro and in vivo. *Sci Rep*. 2018 Jun 7;8(1):8711. doi: 10.1038/s41598-018-26300-z.

Holliday LS, Faria LP, Rody WJ Jr. Actin and Actin-Associated Proteins in Extracellular Vesicles Shed by Osteoclasts. *Int J Mol Sci*. 2019 Dec 25;21(1):158. doi: 10.3390/ijms21010158.

Ikebuchi Y, Aoki S, Honma M, Hayashi M, Sugamori Y, Khan M, Kariya Y, Kato G, Tabata Y, Penninger JM, Udagawa N, Aoki K, Suzuki H. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. *Nature*. 2018 Sep;561(7722):195-200. doi: 10.1038/s41586-018-0482-7.

Jobke B, Milovanovic P, Amling M, Busse B. Bisphosphonate-osteoclasts: changes in osteoclast morphology and function induced by antiresorptive nitrogen-containing bisphosphonate treatment in osteoporosis patients. *Bone*. 2014 Feb;59:37-43. doi: 10.1016/j.bone.2013.10.024.

Mak W, Shao X, Dunstan CR, Seibel MJ, Zhou H. Biphasic glucocorticoid-dependent regulation of Wnt expression and its inhibitors in mature osteoblastic cells. *Calcif Tissue Int*. 2009 Dec;85(6):538-45. doi: 10.1007/s00223-009-9303-1.

Marino S, Logan JG, Mellis D, Capulli M. Generation and culture of osteoclasts. *Bonekey Rep*. 2014 Sep 10;3:570. doi: 10.1038/bonekey.2014.65.

Marins JS, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J*. 2012;23(5):527-33. doi: 10.1590/s0103-64402012000500010.

Rogers MJ, Mönkkönen J, Munoz MA. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates and new insights into their effects outside the skeleton. *Bone*. 2020 Oct;139:115493. doi: 10.1016/j.bone.2020.115493.

Rucci N, Zallone A, Teti A. Isolation and Generation of Osteoclasts. *Methods Mol Biol*. 2019;1914:3-19. doi: 10.1007/978-1-4939-8997-3_1.

Shi J, Wang L, Zhang H, Jie Q, Li X, Shi Q, Huang Q, Gao B, Han Y, Guo K, Liu J, Yang L, Luo Z. Glucocorticoids: Dose-related effects on osteoclast formation and function via reactive oxygen species and autophagy. *Bone*. 2015 Oct;79:222-32. doi: 10.1016/j.bone.2015.06.014.

Sims NA, Martin TJ. Osteoclasts Provide Coupling Signals to Osteoblast Lineage Cells Through Multiple Mechanisms. *Annu Rev Physiol.* 2020 Feb 10;82:507-529. doi: 10.1146/annurev-physiol-021119-034425.

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Apr;19(4):213-228. doi: 10.1038/nrm.2017.125.

Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. *Int Endod J.* 2010 Jan;43(1):2-15. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01627.x.

Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016 Aug;49(8):764-73. doi: 10.1111/iej.12517.

Wang L, Heckmann BL, Yang X, Long H. Osteoblast autophagy in glucocorticoid-induced osteoporosis. *J Cell Physiol.* 2019 Apr;234(4):3207-3215. doi: 10.1002/jcp.27335.

Weinstein RS, Chen JR, Powers CC, Stewart SA, Landes RD, Bellido T, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. Promotion of osteoclast survival and antagonism of bisphosphonate-induced osteoclast apoptosis by glucocorticoids. *J Clin Invest.* 2002 Apr;109(8):1041-8. doi: 10.1172/JCI14538.

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)


UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

 Comissão de Ética no Uso de Animais
 Tel. (11) 3091 7842
 ceuafou@usp.br
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo do efeito de glicocorticoides associados à bisfosfonatos sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos de camundongo em cultura.", registrada com o nº 015/2017, sob a responsabilidade de Victor Elias Arana-Chavez, Lorraine Perciliano de Faria, Elisangela Chinen e Giuliana Sueyoshi que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Faculdade de Odontologia da USP, em reunião de 05/06/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/06/2017 A 05/06/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico / Balb-c
Nº de animais	80
Peso/Idade	23g / 30 dias
Sexo	Masculino/Feminino
Origem	Biotério da FM-USP

São Paulo, 06 de junho de 2017.


 Prof. Dr. Victor Elias Arana-Chavez
 Coordenador do CEUA-FOUSP