



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Floriano Marcelino

Oncostatina M, através da ativação de Shc1, é uma indutora da expressão de RANKL e diferenciação de osteoclastos mais potente do que o Fator Inibidor de Leucemia

Araraquara

2020



UNESP - Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Thaís Floriano Marcelino

Oncostatina M, através da ativação de Shc1, é uma indutora da expressão de RANKL e diferenciação de osteoclastos mais potente do que o Fator Inibidor de Leucemia

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Odontologia, na Área de Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

Araraquara

2020

Marcelino, Thaís Floriano

Oncostatina M, através da ativação de Shc1, é uma indutora da expressão de RANKL e diferenciação de osteoclastos mais potente do que o Fator Inibidor de Leucemia / Thaís Floriano Marcelino.-- Araraquara: [s.n.], 2020

51 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

1. Oncostatina M. 2. Fator inibidor de Leucemia 3. Ligante RANK. 4. Proteína 1 de transformação que contém domínio 2 de homologia de Src. 5. Osteoclastos I. Título

Thaís Floriano Marcelino

Oncostatina M, através da ativação de Shc1, é uma indutora da expressão de RANKL e diferenciação de osteoclastos mais potente do que o Fator Inibidor de Leucemia

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Odontologia

Presidente e orientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

2º Examinador: Prof. Dr. Rafael Scaf de Molon

3º Examinador: Prof. Dr. Rubens Spin Neto

Araraquara, 5 de fevereiro de 2020

DADOS CURRICULARES

Thaís Floriano Marcelino

NASCIMENTO: 24/11/1994 – Fênix - Paraná

FILIAÇÃO: César Aparecido Marcelino
Edna Floriano

2013-2020: Graduação em Farmácia Bioquímica
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

2018-2020: Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Biociências
Nível: Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Dedico essa dissertação à minha mãe Edna, que nunca mediu esforços para me ajudar em todos os aspectos e momentos de minha vida e que me ensinou todos os valores que me tornaram a pessoa que sou hoje.

Ào meu orientador, Pedro Paulo Chaves de Souza, que me guiou durante todos esses anos, com quem aprendi o que é ciência de qualidade. Tenho a sorte de ter sido moldada para a vida acadêmica por uma pessoa extremamente ética e competente. Se hoje estou apta a trabalhar em um outro grupo de pesquisa, em outro país, é porque absorvi ao menos uma parte de tudo o que me ensinou.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas pessoas e oportunidades colocadas em meu caminho.

À minha mãe Edna pelo amor, cumplicidade, dedicação e incentivo durante toda a minha vida e especialmente durante os anos de graduação. Palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão a esta mulher guerreira, que sempre lutou pela minha educação e bem maior. A você mãe, meu muito obrigada!

À minha amiga Geovana e sua mãe Cida, pela amizade e companheirismo, com a qual sempre pude contar.

À minha família araraquense, Larissa, Julia, Thati, Giovanna, Aurora, Isabela, Letícia, Luísa e Ana Bia, pelos momentos incríveis vividos. Sou imensamente grata a cada uma de vocês, que tanto me ensinaram e fizeram desses anos os melhores da minha vida.

Ao Grupo de Pesquisa em Biologia Óssea (GPBO), Fernando, Gláucia, Jorge, Aline e Dubai, por terem feito do nosso laboratório a minha segunda casa. Fica fácil trabalhar quando as pessoas ao seu redor são vocês, que sempre me ajudaram em todos os momentos que precisei. Aos funcionários, professores e servidores da FCFAr e FOAr, em especial os do Departamento de Patologia, Juliana, Zé, Luís, sem os quais este trabalho não seria possível.

À José Alexandre Garcia e Cristiano Lamounier, da seção de Pós-Graduação da FOAr, pela competência e apoio prestado.

Por fim, ao meu orientador e amigo, Pedro, por todo o ensinamento ao longo desses anos. Devo a você cada uma das minhas conquistas acadêmicas e me orgulho em dizer que fui sua aluna. Sou imensamente grata por todas as oportunidades que você e o laboratório me proporcionaram.

À CAPES: o presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

“Quando você elimina o impossível, o que restar, não importa o quão improvável, deve ser a verdade. ”

Arthur Conan Doyle*

* Doyle CA. A liga dos cabeças-vermelhas. Londres: Strand Magazine; 1981.

Floriano-Marcelino T. Oncostatina M, através da ativação de Shc1, é uma indutora da expressão de RANKL e diferenciação de osteoclastos mais potente do que o Fator Inibidor de Leucemia [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

RESUMO

Reações inflamatórias crônicas próximas ao tecido ósseo geralmente levam à perda de estrutura tecidual, como no caso da artrite reumatoide e periodontite. Inúmeras citocinas foram identificadas como participantes do processo de modelação do tecido ósseo em condições inflamatórias, atuando diretamente em receptores presentes nas células ósseas. Citocinas da família gp130 (glicoproteína 130) são capazes de modular a formação de osteoclastos, bem como a sua atividade. Os membros dessa família sinalizam através da dimerização de receptores com a subunidade gp130 e caracteristicamente ativam STAT3 e MAPK. A Oncostatina M (OSM) é uma citocina única dentro da família gp130 já que seu receptor (OSMR) recruta a proteína adaptadora Shc1. Neste trabalho avaliamos o papel de Shc1 na reabsorção óssea induzida por OSM. Osteoblastos foram tratados com OSM e a ativação de Shc1 e STAT3 foi avaliada por PCR quantitativa e western blot. Para determinar a importância de Shc1 e STAT3 no aumento da expressão de RANKL e formação de osteoclastos induzida por OSM, utilizamos siRNA específico para Shc1 e STAT3 para silenciar esse mRNA e conseqüentemente reduzir os níveis destas proteínas. Os efeitos de OSM foram comparados aos de LIF (Fator Inibidor de Leucemia), por se tratar da citocina mais próxima a OSM dentro da família gp130. O tratamento de osteoblastos com OSM, mas não LIF, induziu aumento da expressão de mRNA e da fosforilação de Shc1. O silenciamento de Shc1 reduziu efeito indutor de OSM sobre a ativação de STAT3 e expressão de RANKL. O silenciamento de STAT3 não afetou a ativação de Shc1, mas suprimiu o aumento da expressão de RANKL induzida por OSM. Em coculturas de osteoblastos e macrófagos OSM estimula a formação de osteoclastos, e o silenciamento de Shc1 ou STAT3 bloqueou esse efeito. Em osteoblastos da calvaria e células derivadas da medula óssea, OSM é um indutor mais potente do que LIF da reabsorção óssea e da formação de osteoclastos, respectivamente. Em conclusão, a proteína Shc1 é crucial para os efeitos de OSM na diferenciação de osteoclastos e reabsorção óssea. Esse mecanismo é dependente da fosforilação de ERK e STAT3.

Palavras-chave: Oncostatina M. Fator Inibidor de Leucemia. Ligante RANK. Proteína 1 de Transformação que Contém Domínio 2 de Homologia de Src. Osteoclastos.

Floriano-Marcelino T. Oncostatin M, through activation of Shc1, is a more potent inducer of RANKL expression and osteoclast differentiation than Leukemia Inhibitor Factor. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2020.

ABSTRACT

Chronic inflammation near to bone tissue often lead to loss of tissue structure, as in the case of rheumatoid arthritis and periodontitis. Countless cytokines have been identified as participants in the process of bone tissue modeling under inflammatory conditions, acting directly on receptors present in bone cells. Cytokines of the gp130 (glycoprotein 130) can be able to modulate osteoclast formation as well as its activity. Members of this family signals through receptors dimerizing with the gp130 subunit and typically activates STAT3 and MAPK. Oncostatin M (OSM) is a unique cytokine within the gp130 family since receptor (OSMR) recruits the adapter protein Shc1. We have evaluated the role of Shc1 for OSM-induced bone resorption. Osteoblasts were treated with OSM and Shc1 and STAT3 activations were analyzed by quantitative PCR and western blot. To determine the role of Shc1 and STAT3 for OSM-induced RANKL expression and osteoclast formation we used siRNA targeting Shc1 and STAT3 to knock-down this mRNA and consequently reduce the proteins levels. The effects of OSM were compared to those of LIF (Leukemia Inhibitor Factor) because it is the closest cytokine to OSM within the gp130 family. Treatment of osteoblasts with OSM, but not LIF, induced increased mRNA expression and phosphorylation of Shc1. Silencing of STAT3 did not affect Shc1 activation, but suppressed OSM-induced increase in RANKL expression. In co-cultures of osteoblasts and macrophages OSM stimulates osteoclast formation, and silencing of Shc1 or STAT3 blocked this effect. In calvarial osteoblasts and bone marrow cells, respectively, OSM is a more potent inducer than LIF of bone resorption and osteoclast formation. In conclusion, the protein Shc1 is crucial for effects by OSM on osteoclasts differentiation and bone resorption. This mechanism is dependent of the phosphorylation of ERK and STAT3.

Keywords: Oncostatin M. Leukemia Inhibitor Factor. RANK Ligand. Src Homology 2 Domain-Containing. Osteoclasts.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Diferenciação de osteoclastos: Sistema RANK/RANKL/OPG	12
2.2 Família gp130.....	13
2.3 Oncostatina M (OSM)	14
2.4 Shc1	16
3 OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivos Específico	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Animais	19
4.2 Ensaio de Reabsorção Óssea	19
4.3 Isolamento e Cultura de Osteoblastos de Calvária	19
4.4 Diferenciação de Osteoclastos em Culturas de Células da Medula Óssea (BMC).....	20
4.5 Diferenciação de Osteoclastos em Culturas de Macrófagos Derivados da Medula Óssea (BMM)	21
4.6 Células Estromais	21
4.7 Silenciamento em Osteoblastos	21
4.8 Co-culturas de Osteoblastos e Macrófagos da Medula Óssea (BMM).....	23
4.9 Extração de RNA e síntese de cDNA	23
4.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Semi Quantitativo	23
4.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Quantitativo.....	24
4.12 Análise Proteica de RANKL e OPG	25
4.13 Lisado Celular.....	25
4.14 Western Blot	25
4.15 Análise Estatística.....	26

5 RESULTADOS.....	28
5.1. Ativação de ERK em osteoblastos da calvaria	28
5.2 Expressão gênica e fosforilação de STAT3 em osteoblastos da calvaria....	28
5.3 Ativação da proteína adaptadora Shc1 induzida por OSM em osteoblastos da calvária.....	29
5.4 Expressão de RANKL e osteoclastogênese	32
5.5 Liberação de ⁴⁵Ca e expressão de RANKL induzida por OSM em ossos e osteoblastos da calvaria.....	34
5.6 Diferenciação de osteoclastos e expressão de RANKL induzida por OSM em BMC.....	36
5.7 Efeito direto de OSM e LIF sobre a osteoclastogênese	38
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL.....	49
<u>APÊNDICE A - SEQUÊNCIA DE PRIMERS E SONDAS E TEMPERATURA DE ANELAMENTO (TA) UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR (RT-PCR E qPCR).</u>	50

1 INTRODUÇÃO

O esqueleto é um tecido dinâmico que sofre constante modelação e remodelação para fins de crescimento ou alteração de sua forma. Este processo é dado pela formação e reabsorção óssea, sendo estritamente controlado por diversos mediadores, como hormônios e citocinas, que permitem a homeostase corporal por meio da manutenção dos níveis de cálcio e de fosfato plasmáticos¹.

Os osteoblastos² e os osteoclastos³ são as principais células envolvidas na remodelação óssea. Suas funções estão fortemente ligadas, desempenhando a reabsorção do osso antigo e/ou danificado e em seguida substituindo por uma matriz óssea recém-formada (osteóide), que será então mineralizada para formar o novo osso. Os osteócitos, células derivadas dos osteoblastos, também estão envolvidos no processo, agindo como uma célula endócrina e um sensor mecânico⁴.

Um desbalanço entre formação e reabsorção óssea pode resultar em lesões osteolíticas, tais como aquelas observadas em patologias como osteoporose, doença periodontal e artrite reumatoide⁵. Na maioria dos pacientes, processos inflamatórios nas regiões próximas ao esqueleto leva a perda de tecido ósseo, conseqüente de uma remodelação óssea desequilibrada, onde predomina a osteoclastogênese⁶.

Para que a diferenciação de osteoclastos ocorra, a ativação do receptor ativador do fator nuclear- κ B (RANK) pela sua citocina ligante, RANKL, é uma condição essencial⁷. Esta citocina é expressa por células inflamatórias, osteoblastos e osteócitos e se liga ao RANK expresso por células de linhagem hematopoiética, previamente expostas ao fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), induzindo a ativação de diversas cascatas de sinalização intracelular e fatores de transcrição. A interação entre RANK e RANKL é inibida pela osteoprotegerina (OPG) que atua como inibidor da diferenciação de osteoclastos. Uma das explicações para o papel indutor de osteoclastogênese por algumas citocinas consiste no fato destas moléculas induzirem a expressão de RANKL por osteoblastos e células inflamatórias⁶.

Citocinas da família gp130 (glicoproteína 130) são capazes de modular a formação de osteoclastos, bem como a sua atividade. Os membros da família gp130 que estimulam a formação de osteoclastos incluem interleucina-6 (IL-6), após complexo com o seu receptor solúvel (IL-6+sIL-6R), oncostatina M (OSM), e de forma mais discreta, o fator inibidor de leucemia (LIF)⁸. Cada uma dessas citocinas se liga a subunidades de receptores de superfície celular e o complexo ligante-receptor

interage com a proteína transmembrana gp130 para a propagação do sinal⁹. OSM e LIF se diferenciam dos demais membros da família no uso de gp130 como um receptor α de baixa afinidade, ativando a heterodimerização de gp130 com o receptor de LIF (LIFR) ou o receptor específico de OSM (OSMR)¹⁰.

Contudo, apesar da ativação de algumas vias em comum, muitos efeitos de OSM são mais potentes do que os de LIF, como a estimulação da formação de osteoclastos em cocultura de osteoblastos e células da medula óssea¹¹. Curiosamente, uma via de sinalização não redundante, que distingue OSMR dos demais receptores da família gp130, tal como LIFR, é o recrutamento da proteína adaptadora Shc1 (do inglês *Src homology and collagen 1*)^{12,13}. Após ligação a OSMR, a ativação de Shc1 resulta em uma cascata de sinalização que promove a ativação de MAPK, via importante para a diferenciação de osteoclastos¹⁰. Diferentemente, a ativação de MAPK induzida por LIF e mediada por LIFR recruta a tirosina fosfatase SHP-2 (do inglês *Src homology region 2-containing protein tyrosine phosphatase*)¹⁴, para a subunidade gp130¹⁵. O papel do eixo OSMR-Shc1 em osteoblastos ainda não foi elucidado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Diferenciação de Osteoclastos: Sistema RANK/RANKL/OPG

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas (1-50 núcleos por célula dependendo da espécie) derivados de células mononucleadas da linhagem de monócitos/macrófagos. Osteoclastos são formados a partir da fusão de macrófagos e é a única célula conhecida capaz de reabsorver osso¹⁶.

M-CSF-1 (Fator estimulante de colônia de macrófagos 1) e RANKL (ligante do receptor ativador de NF- κ B; expressa por células inflamatórias, osteoblastos e osteócitos) são citocinas essenciais para a sobrevivência e diferenciação de precursores de osteoclastos *in vitro* e *in vivo*¹⁷. De fato, camundongos deficientes em RANKL não possuem osteoclastos e desenvolvem severa osteopetrose (aumento generalizado na densidade óssea) além de defeitos imunológicos¹⁸. A diferenciação depende da sinalização através da ligação de M-CSF em seu receptor c-fms (receptor do fator estimulante de colônia de macrófagos) expresso em células precursoras mononucleadas que, por sua vez, aumentam a expressão de RANK (receptor ativador de NF- κ B) para sua ativação por sua citocina ligante, RANKL. A interação entre RANKL e RANK é inibida pela osteoprotegerina (OPG) que atua como inibidor da diferenciação de osteoclastos¹⁹ (Figura 1).

Figura 1 – Sistema RANK/RANKL/OPG

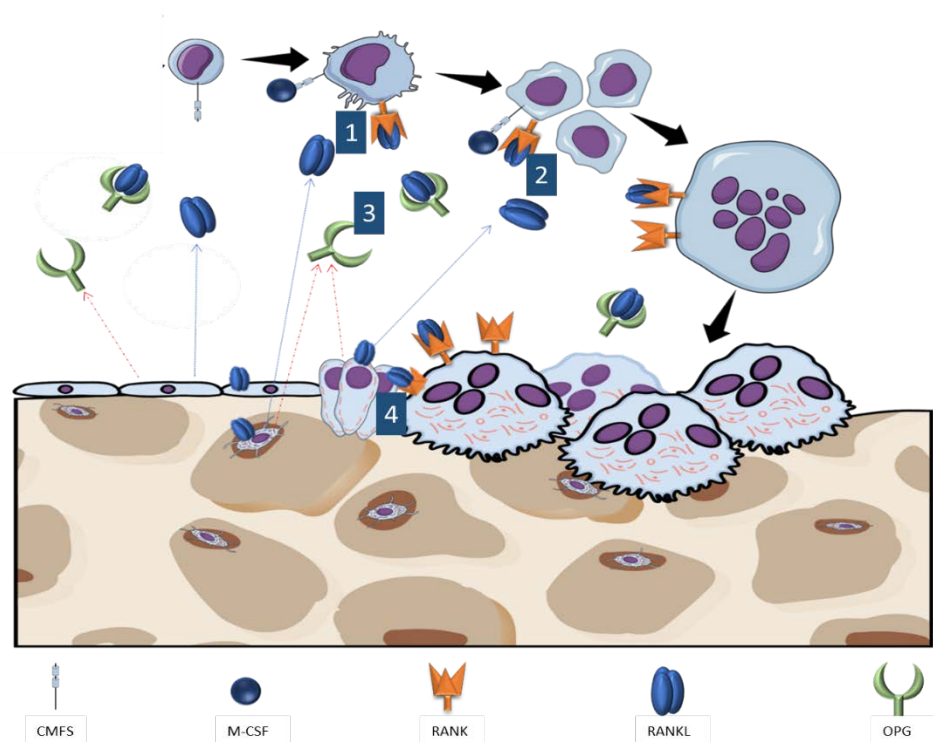


Figura esquemática da regulação da osteoclastogênese pelo Sistema RANK-RANKL-OPG. Os macrófagos da medula óssea expressam receptores para MCSF e RANKL (1); os osteoblastos e os osteócitos secretam RANKL, a citocina chave para diferenciação de osteoclastos (2) que também pode ativar osteoclastos pelo contato célula a célula (4). Por outro lado, estas células também secretam OPG, que se liga a RANKL, impedindo a ligação deste ao RANK, assim regulando negativamente a osteoclastogênese (3).

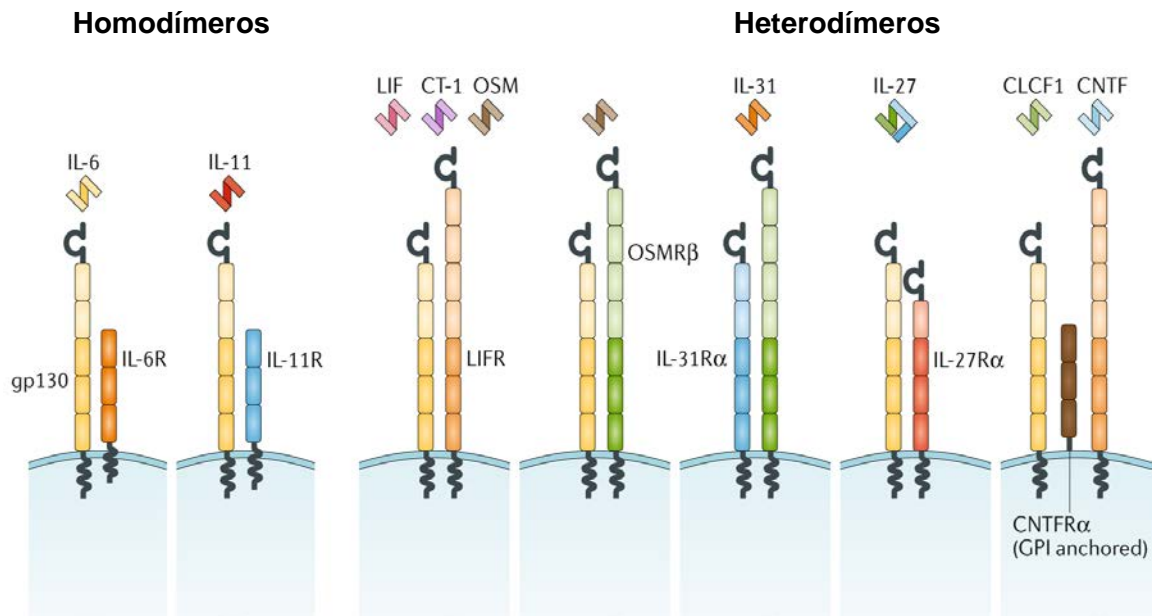
Fonte: Magalhães²⁰.

2.2 Família gp130

A família gp130 é composta por citocinas pró-inflamatórias e hematopoiéticas como IL-6, IL-11, LIF, OSM, fator neutrófico ciliar (CNTF), citocina tipo cardiotrofina (CLC), cardiotrofina -1 (CT-1), IL-27 e IL-31⁶. O efeito celular similar causado por essas citocinas, conhecido como redundância funcional, pode ser explicado pelo uso em comum de uma subunidade de receptor, a glicoproteína130 (gp130)²¹. Gp130 é homodimerizada por IL-6 e IL-11 após a ligação destes aos seus respectivos receptores α (IL-6R α e IL-11R α). Quase todas as demais citocinas da família formam heterodímeros de gp130 e outro receptor β . LIF se liga a LIFR e a uma subunidade gp130. CT-1, CLC e CTNF (em complexo com CTNFR) também utilizam o complexo

LIFR/gp130. OSM se liga à gp130 para formar um complexo com LIFR ou OSMR para sinalização^{10,6} (Figura 2).

Figura 2 - Membros da família gp130 e seus respectivos receptores



Fonte: Adaptado de Jones et al.²².

Intracelularmente, a ativação de complexos que utilizam gp130 resulta na ativação da via de sinalização JAK/STAT. JAKs (proteína tirosina-quinase Janus) são trans e auto-fosforiladas e por sua vez fosforilam a região citoplasmática de subunidades do receptor, criando um sítio de ancoragem para transdutores de sinal e ativadores das proteínas de transcrição (STATs). Uma das marcas registradas da sinalização dependente de gp130 é a ativação de STAT3, a qual dimeriza, transloca para o núcleo e ativa a transcrição de genes alvo²³.

2.3 Oncostatina M (OSM)

A Oncostatina M pertence à família gp130 de citocinas. Foi descoberta como um polipeptídeo liberado por macrófagos diferenciados a partir de células de linfoma histiocítico U-937, capaz de inibir a proliferação de células melanocíticas e de outras células tumorais²⁴. A expressão de OSM também foi descrita em monócitos, células dendríticas, células T, neutrófilos¹⁵, células estromais intestinais²⁵, osteoblastos^{26,27} e osteócitos²⁷. Essa citocina está envolvida em uma variedade de funções^{27,28}, como

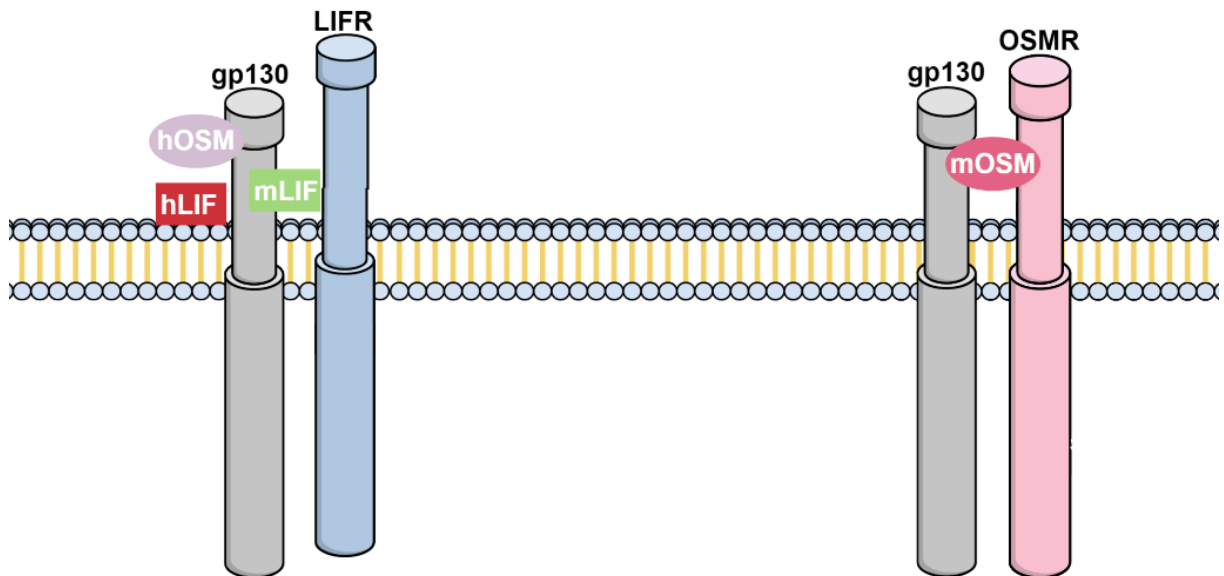
remodelação óssea²⁹, desenvolvimento embriológico, regeneração hepática, hematopoese³⁰, progressão tumorigênica^{31,32} além de processos inflamatórios tais como fibrose pulmonar^{33,34}, asma³⁵, doença periodontal³⁶ e artrite reumatoide³⁷.

OSM aumenta a formação de osteoclastos em culturas de células da medula óssea^{38,39}, efeito associado ao aumento da expressão de RANKL³⁸. Camundongos deficientes em receptor para OSM (*Osmr*) têm maior massa óssea e um número reduzido de osteoclastos²⁷.

Em humanos, hOSM pode se ligar com afinidade equivalente tanto a um complexo receptor formado por gp130 e LIFR (gp130/LIFR) quanto ao formado por gp130 e OSMR (gp130/OSMR). Em células de camundongo, mLIF, hLIF e hOSM ligam-se exclusivamente ao complexo gp130/LIFR enquanto mOSM possui maior afinidade de ligação ao complexo gp130/OSMR β ¹⁵ o que torna o camundongo um organismo adequado para o estudo da sinalização específica de OSM via OSMR β e LIFR β ^{15, 28} (Figura 3).

A dimerização de OSMR com gp130 ativa a via de sinalização JAK-STAT, como é característico de complexos que utilizam gp130. JAKs promovem a transfosforilação de domínios intracelulares de gp130 e OSMR, com subsequente recrutamento do fator de transcrição STAT3^{40,41}. O dímero de STAT3 ativo transloca para o núcleo e se liga a sequências específicas do DNA, em regiões de diversos genes alvos. A fosforilação de gp130 por JAKS promove, ainda, recrutamento e ativação da tirosina fosfatase SHP-2, que forma um complexo com Grb2 (*growth factor receptor-binding protein 2*) e Sos (*Son of sevenless*), o qual ativa a via Ras/Raf/MAPK, comum a muitos receptores de citocinas hematopoiéticas⁴².

Figura 3 – Complexo gp130/OSMR β e gp130/LIFR β



Fonte: Elaboração própria.

O recrutamento da proteína adaptadora Shc1 (proteína contendo domínio homólogo a SRC) por OSMR, ao qual mOSM se liga com maior afinidade, o distingue dos demais receptores da família de citocinas gp130^{10,43}.

2.4 Shc1

Shc são proteínas adaptadoras fosfotirosinas que ligam receptores transmembrana ativos a cascata de sinalização *downstream*²⁸. A família de proteínas adaptadoras Shc em mamíferos inclui quatro membros: ShcA (Também denominada Shc1), ShcB, ShcC e ShcD, caracterizadas por um arranjo sequencial de um domínio N-terminal de ligação a fosfotirosina (PTB) e um domínio C-terminal SH2⁴⁴.

Dentre as proteínas Shc, Shc1 é a mais expressa em adultos, estando presente em todos os tecidos, com exceção do sistema nervoso central (SNC)⁴⁵. Shc1 possui 3 isoformas descritas, p46Shc, p52Shc e p66Shc (sendo p66Shc resultado de *splicing* alternativo), nomeadas para corresponder a sua mobilidade na análise por SDS-PAGE: 66, 52 e 46 kDa^{12,44}. As isoformas p46Shc e p52Shc, após serem fosforiladas, acoplam receptores tirosina quinases ativados a Ras, através do recrutamento do complexo Grb2/Sos e estão envolvidas na propagação citoplasmática de sinais mitogênicos^{46,47}. p66Shc não media a ativação de Ras, mas está ligada a vias de transdução de sinais que regulam a resposta celular ao estresse

oxidativo e tempo de vida (*life span*)^{47,48,49}. Durante os estágios iniciais da embriogênese em camundongos, Shc1 é expressa em células do sistema cardiovascular, regulando o desenvolvimento e a angiogênese do coração e, conseqüentemente, a letalidade embrionária precoce é alta em camundongos Shc1^{-/-}⁵⁰. Contudo, camundongos deficientes apenas em pShc66, são viáveis^{48,49}, sugerindo que as isoformas 46/52 kDa de Shc1 são essenciais para o desenvolvimento embriológico⁵⁰.

A fosforilação de OSMR permite a ligação de Shc1 ativa a OSMR, recrutamento de Grb2 ao domínio SH2 e subsequente indução de uma cascata de fosforilação que resulta na ativação de MAPK¹⁰. Em contrapartida, a ativação de MAPK induzida por LIF recruta SHP-2 para a subunidade gp130 do heterodímero gp130:LIFR. Uma vez que OSMR não possui o sítio de recrutamento para SHP-2, esse é substituído por Shc1 para a ativação de MAPK.

3 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi investigar a importância do eixo OSMR-Shc1 na expressão de RANKL por osteoblastos e subsequente diferenciação de osteoclastos induzida por OMS.

3.1 Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito do silenciamento de Shc1 sobre a expressão de RANKL em osteoblastos.
2. Avaliar o papel de Shc1 e STAT3 na diferenciação de osteoclastos induzida por Oncostatina M.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos CsA da Universidade de Umeå, camundongos Swiss da Faculdade de Odontologia de Araraquara e camundongos C57Bl/6 da Universidade de Gotemburgo foram utilizados para o isolamento de osteoblastos da calvaria, células da medula óssea ou explantes ósseos da calvária. Os Comitês Institucionais de Cuidado e Ética em Animais da Universidade de Umeå, da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Anexo A) e da Universidade de Gotemburgo aprovaram todos os estudos experimentais.

A observação de que OSM é um estimulador mais potente do que LIF da expressão do mRNA de *Tnfsf11* (que codifica RANKL) foi feita em células de todos os três genótipos. A fosforilação de Shc1 induzida por OSM foi avaliada em células de camundongos CsA e Swiss, com ativação de Shc1 em ambas as espécies.

4.2 Ensaio de Reabsorção Óssea

A reabsorção óssea foi avaliada em cultura de ossos parietais (n=6 ossos por grupo) de camundongos de 6 a 7 dias de idade, analisando a liberação de ⁴⁵Ca de ossos pré-marcados como descrito anteriormente por Lerner 1987⁵¹ e Ljunggren 1991⁵². A liberação do isótopo foi expressa como a porcentagem de liberação da quantidade inicial de isótopo (calculada como a soma de radioatividade no meio e osso após cultura). Os dados foram recalculados e os resultados expressos em porcentagem do controle que foi fixado em 100%.

4.3 Isolamento e Cultura de Osteoblastos de Calvária

Camundongos de 2 a 3 dias de idade (*Mus musculus*, Swiss) foram sacrificados por decapitação. Cada calvária foi então dissecada (com o auxílio de um bisturi), e armazenada em um Erlenmeyer contendo solução "A" previamente preparada (8g NaCl + 200 mg KCl + 350 mg NaH₂PO₄, pH 7,2). Seguiu-se então uma sequência de lavagens, realizadas em fluxo laminar, iniciada com 1 - adição de 5 mL de solução "A", incubada a 37°C com agitação orbital a 150 rpm, por 10 minutos e posterior descarte

deste meio; 2 - três lavagens com solução “B” previamente preparada (Solução “A” + 1,489 g de EDTA), nas mesmas condições de incubação, e descarte do meio; 3 - cinco lavagens com solução “C” (*Collagenase type 2*) (Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, EUA), preparada no momento de uso e mantida em gelo, nas mesmas condições de incubação, sendo o meio coletado a partir da segunda lavagem com solução “C”. Este meio de lavagem coletado e que contém as células foi centrifugado por 5 min a 10000 rpm (Sorvall™ ST 8) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). O sobrenadante foi descartado.

Após o isolamento, as células foram mantidas em garrafas de 75 cm² suplementadas com α -MEM + 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 μ g/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Após 3 dias, as células foram tripsinizadas, contadas e utilizadas para a realização dos experimentos (cultura primária).

4.4 Diferenciação de Osteoclastos em Culturas de Células da Medula Óssea (BMC)

As células da medula óssea (BMC, do inglês *Bone Marrow Cells*) foram obtidas a partir da técnica de *flush* de ossos longos (fêmur e tíbia de camundongos de 6 semanas de idade). Após o corte das epífises, uma seringa contendo meio α -MEM + 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 μ g/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) é introduzida no canal medular para liberar as células. Este meio, contendo as células da medula óssea, foi então recolhido e centrifugado a 1000 rpm (Sorvall™ ST 8) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao precipitado adicionou-se água e PBS 10x estéreis e gelados, repetindo as condições de centrifugação. As células obtidas no novo precipitado foram semeadas (n = 4 poços por grupo) em placas de 48 poços contendo α -MEM/10% de FBS (do inglês, *Fetal Bovine Serum*) e incubadas *overnight*. As células foram então cultivadas no mesmo meio com ou sem LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL), paratormônio (PTH) ou vitamina D3 1,25(OH)₂ (ambos a 10⁻⁸ M) (R&D Systems, Abingdon, UK), por 7 a 9 dias. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado com PBS pH 7,4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e coradas para TRAP (fosfatase ácida resistente ao

tartarato) de acordo com o protocolo do fabricante (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Células com coloração TRAP e contendo três ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos e o número de osteoclastos multinucleados TRAP-positivos (TRAP + MuOCL) foi contado.

4.5 Diferenciação de Osteoclastos em Culturas de Macrófagos Derivados da Medula Óssea (BMM)

Células da medula óssea de camundongos de 6 a 12 semanas de idade foram isoladas (*flush* de ossos longos, conforme descrito anteriormente) e incubadas na presença de M-CSF (30 ng/mL) por 3 dias em placas de cultura, nas quais células estromais e linfoides não conseguem aderir, como descrito anteriormente por Granholm 2007⁵³ e Takeshita 2000⁵⁴. As células aderentes ao fundo das placas foram desprendidas mecanicamente com o auxílio de um raspador de células (*cell scraper*) e utilizadas como macrófagos derivados da medula óssea (BMM). As células BMM foram semeadas (n = 4 poços por grupo) em placas de 96 poços e incubadas em M-CSF (30 ng/mL) ou M-CSF + RANKL (30 ng/mL + 4 ng/mL) com ou sem LIF (100 ng/mL) ou OSM (100 ng/mL) (R&D Systems, Abingdon, UK). Células com coloração positiva para TRAP e contendo três ou mais núcleos foram consideradas osteoclastos e o número de TRAP + MuOCL foi contado.

4.6 Células Estromais

As células ST-2 (Riken BRC Cell Bank) foram semeadas (n = 4 poços por grupo) em placas de múltiplos poços e incubadas em α -MEM/10% de FBS *overnight*. Após a incubação, meio com e sem LIF (100 ng/mL) ou OSM (100 ng/mL) foi adicionado e as células incubadas por 24 h para posterior análise da expressão gênica.

4.7 Silenciamento em Osteoblastos

As células foram semeadas (n = 4 poços por grupo) na densidade de 2×10^3 por poço, em placa de 48 poços em meio α -MEM contendo 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 μ g/mL) e estreptomicina (100 μ g/mL). Vinte e quatro horas após serem

semeadas, iniciou-se o protocolo de silenciamento de *Osmr*, *Lifr*, *Il6st*, *Sch* ou *Stat3* utilizando o reagente lipofectamina RNAiMAX, de acordo com o protocolo do fabricante (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) e 30 nM do siRNA apropriado, listado na Tabela 1. O siRNA e a lipofectamina foram diluídos em meio Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e misturados na proporção de 1:1. A mistura foi homogeneizada lentamente e incubada por 15 minutos em temperatura ambiente antes de ser adicionada aos poços. Esse procedimento foi repetido após 48 horas. Células tratadas com uma sequência aleatória (siSCR) serviram como controle. 48 horas após o segundo silenciamento, estas células foram expostas ao veículo (α -MEM/10% FBS), LIF (100 ng/ml) ou OSM (100 ng/ml). Ao final do tratamento, RNA ou proteína foram extraídas. Em alguns experimentos os osteoblastos foram co-cultivados com BMMs.

Tabela 1 – Informações sobre os siRNAs (Applied Biosystems) utilizados no protocolo de silenciamento

Gene Alvo	RefSeq	ID Assay
IL6st	NM_010560.3	s68298
LIFR	NM_00111338 6.1 NM_013584.2	s69223
OSMR	NM_011019.3	s71149
SHC1	NM_00111333 1.2 NM_011368.5	s73682
STAT3	NM_011486.4 NM_213659.2 NM_213660.2	s74451
Controle Negativo	-	AM4635

Fonte: Elaboração própria.

4.8 Co-culturas de Osteoblastos e Macrófagos da Medula Óssea (BMM)

Após o silenciamento de *Shc1* ou *Stat3* em osteoblastos, 2×10^4 BMMs foram adicionadas a cada poço em placas de 96 poços contendo osteoblastos ($n = 4$ poços por grupo). As co-culturas foram expostas ao veículo ou OSM (100 ng/mL) e após 3 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% tamponado com PBS pH 7,4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) e coradas para TRAP. O número de células multinucleadas TRAP⁺ foi contado em cada poço, em microscópio invertido (Optka, Ponteranica, BG, ITA), por um examinador calibrado cego para os grupos de tratamento.

4.9 Extração de RNA e Síntese de cDNA

O RNA total foi extraído utilizando kits comercialmente disponíveis (Ambion ou Qiagen), seguindo o protocolo do fabricante. Para o PCR quantitativo o RNA foi extraído de um único poço de cultura celular, ou de ossos individuais. Para o PCR semi-quantitativo, o RNA foi extraído de 3 poços e misturado (*pool*) por grupo de tratamento. O RNA foi quantificado em placa para microvolumes Take3 utilizando o Espectrofotômetro de Microplacas Epoch e o software Gen5 (Biotek, Winooski, VT, EUA). A qualidade do RNA foi verificada através da razão $260/280 \leq 2$. 100 ng de cada amostra foi utilizado na síntese de cDNA (DNA complementar sintetizado a partir de uma molécula de RNA mensageiro) seguindo o protocolo do fabricante do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

4.10 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Semi Quantitativo

As análises de reação em cadeia da polimerase foram realizadas utilizando um protocolo padrão. As condições da reação foram: desnaturação a 94°C por 2 min, anelamento por 40 s e alongamento a 72°C por 60 s; nos ciclos subsequentes, a desnaturação foi realizada a 94°C por 40 s. As condições de reação para OPG e RANKL foram as seguintes: desnaturação a 94°C por 35 s, anelamento a 65°C por 35 s e alongamento a 72°C por 60 s por 10 ciclos. Nos ciclos subsequentes, a temperatura de anelamento do *primer* foi reduzida gradualmente em 5°C a cada 5 ciclos de 65 para 45°C. As expressões dos genes alvo foram comparadas na fase

logarítmica da reação PCR. Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizados usando brometo de etídio. A sequência de *primers* e sondas e temperatura de anelamento utilizadas estão descritas no Apêndice A.

4.11 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Quantitativo

A análise quantitativa da PCR foi realizada utilizando a Cinética TaqMan. Em cada reação, o cDNA foi amplificado utilizando o kit TaqMan Universal PCR Master Mix, 300 nmol/L de cada *primer* e 100 nmol/L de sonda em um Sistema de Detecção de Sequência ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Cidade de Foster, CA, EUA) (Apêndice A) ou Taqman Assays (Tabela 2) e Taqman Fast Advance Master Mix utilizando StepOnePlus Real-Time PCR System. *Gapdh* (para BMM) ou β -*actina* ou *36B4* (para BMC e osteoblastos da calvária) foram usados como padrão interno para corrigir diferenças nas concentrações iniciais de mRNA

Tabela 2 – Taqman Assays (Applied Biosystems) utilizados na detecção dos genes alvo

Gene Alvo	RefSeq	ID Assay
IL6st	NM_010560.3	Mm00439665_m1
LIFR	NM_00111338 6.1 NM_013584.2	Mm00442942_m1
OSMR	NM_011019.3	Mm01307326_m1
STAT3	NM_011486.4 NM_213659.2 NM_213660.2	Mm01219775_m1

Fonte: Elaboração própria.

4.12 Análise Proteica de RANKL e OPG

Os níveis proteicos de RANKL e OPG nos ossos da calvária (n=6 ossos por grupo) foram analisados utilizando kits ELISA disponíveis no mercado (R&D Systems, Abingdon, UK). Células da calvária foram lisadas com Triton X-100 a 0,2% e as amostras extraídas foram analisadas seguindo o protocolo do fabricante.

4.13 Lisado Celular

Os osteoblastos da calvaria foram semeados (n = 4 poços por grupo) em placas de 60 cm² a uma densidade de 2×10^4 células/cm². Após 3 dias de cultura com uma troca de meio, as células foram incubadas na ausência (controle) ou presença das substâncias teste (LIF ou OSM; 100 ng/ml) por diferentes períodos de tempo. Seguindo a incubação, as células foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,4 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) antes da adição de tampão de lise (1% Igepal CA-630, 0,1% SDS 2 mM EDTA, 50 mM de NaF, 0,1 mg/mL de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil), 10 µg/mL de leupeptina, 10µg/mL de pepstatina A, em PBS pH 7,4). As placas foram mantidas em gelo por 15 min, seguido por raspagem e coleta dos lisados celulares. Antes de usar no Western blot, os lisados celulares foram concentrados usando filtro de centrifugação Microcon, de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de proteína dos lisados celulares foi medida usando o método BCA com albumina bovina como padrão.

4.14 Western Blot

Quantidades equivalentes de proteína (Tabela 3) foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Bis-Tris a 4–12% (Bolt, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em tampão Bolt MES SDS Running Buffer (1X) e transferidas para membranas de nitrocelulose segundo protocolo do iBlot Dry Blotting System (iBlot, Thermo Fisher Scientific, MA, USA).

As membranas foram bloqueadas em solução de BSA (Bovine Serum Albumin) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA) a 5% em tampão TBST (2,4 g de Tris base, 8,8 g de NaCl; 0,05% de Tween 20) pH 7,4 por 1 hora e incubadas *overnight* em

geladeira (2-8°C) com seus respectivos anticorpos primários. Uma série de 3 lavagens de 10 min em TBST pH 7,4 foi então realizada para posterior incubação com os anticorpos secundários (temperatura ambiente) por 1 hora, seguida por novas lavagens com TBST. As bandas foram reveladas utilizando um kit de detecção de quimiluminescência de acordo com o protocolo do fabricante. As especificações dos anticorpos e diluições utilizadas estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Anticorpos e condições utilizadas na análise por western blot

Especificidade	Resíduo fosforilado	Marca	Cat.	Diluição	Diluyente	Proteína carregada no gel	Tamanho da banda
Mouse IgG	-	Santa Cruz	sc-2005	1:5000	BSA 1%	-	-
Rabbit IgG	-	Santa Cruz	sc-2004	1:5000	BSA 1%	-	-
Goat IgG	-	Santa Cruz	sc-2768	1:5000	BSA 1%	-	-
ERK1 (C-16)	-	Santa Cruz	sc-93	1:100	BSA 1%	3 µg	44kDa
p-ERK (E-4)	Tyr 204	Santa Cruz	sc-7383	1:100	BSA 1%	3 µg	42/44kDa
pSHC (Y427)	Tyr 427	Abcam	ab68166	1:1000	BSA 1%	4 µg	66/52/46kDa
pSTAT3 (Y705)	Tyr 705	Abcam	ab76315	1:10000	BSA 1%	3 µg	88 kDa
SHC (H-108)	-	Santa Cruz	sc-1695	1:100	BSA 1%	4 µg	66/52/46 kDa
STAT3 (9D8)	-	Abcam	ab119352	1:1000	BSA 1%	3 µg	86/91 kDa
Vinculin (SPM227)	-	Abcam	Ab18058	1:1000	BSA 1%	3 µg	124kDa
β-actin (I-19)	-	Santa Cruz	sc-1616	1:5000	BSA 1%	3 µg	42kDa

Fonte: Elaboração própria.

4.15 Análise Estatística

A diferença estatística foi determinada por ANOVA utilizando o Teste de Levene e Dunnett (bilateral), complementado pelo teste *post hoc* de Tukey ou Dunnett. Quando comparados dois grupos, o teste não paramétrico Mann-Whitney U, ou teste *t* de Student (bilateral), foram utilizados, quando aplicável. P valor < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. As diferenças estatísticas são apresentadas como: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0.001. Os dados são apresentados como média dos valores ± SEM. Os valores numéricos são expressos como uma

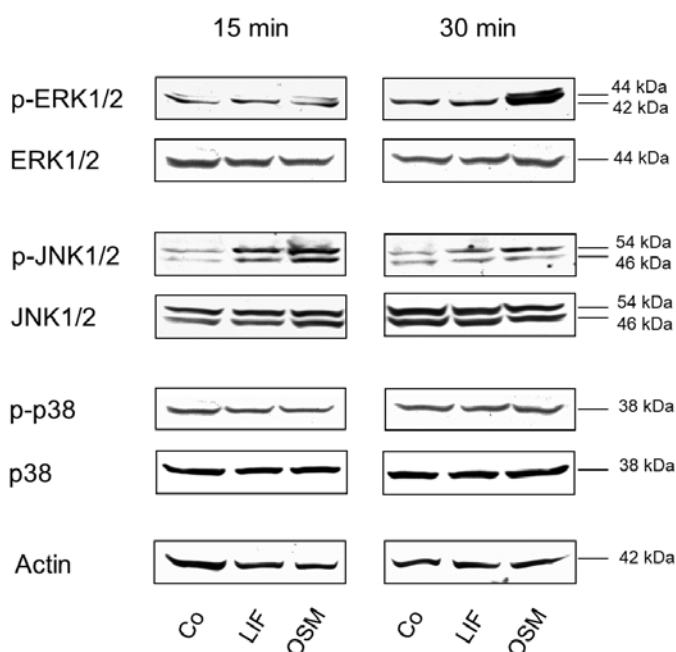
porcentagem do controle não tratado, com o controle representado como 100%. Foram utilizados 4 poços ou 6 ossos (liberação de ^{45}Ca) por tratamento para cada grupo e os experimentos foram repetidos utilizando a mesma metodologia de 2 a 3 vezes com resultados similares.

5 RESULTADOS

5.1. Ativação de ERK em Osteoblastos da Calvaria

O tratamento de osteoblastos da calvária com OSM (100 ng/mL) leva a uma ativação robusta e tempo-dependente da MAP quinase ERK (Figura 4). Em contraste, o tratamento com LIF (100 ng/mL) não afeta a fosforilação de ERK ou p38. Os níveis totais de proteína de p38, JNK e ERK não foram alterados em ambos os tratamentos. Esse efeito sugere diferentes sinalizações *downstream* aos receptores de OSM e LIF em calvarias de osteoblastos.

Figura 4 – Fosforilação de MAP quinases induzida por LIF e OSM



Avaliação da fosforilação de MAP quinases induzida por LIF e OSM. Osteoblastos da calvaria foram cultivados na ausência (Co) ou presença de LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL), por 15 e 30 minutos, seguido de lise celular para a análise por Western Blot da fosforilação de ERK, JNK e p38. Actina foi utilizada como controle interno.

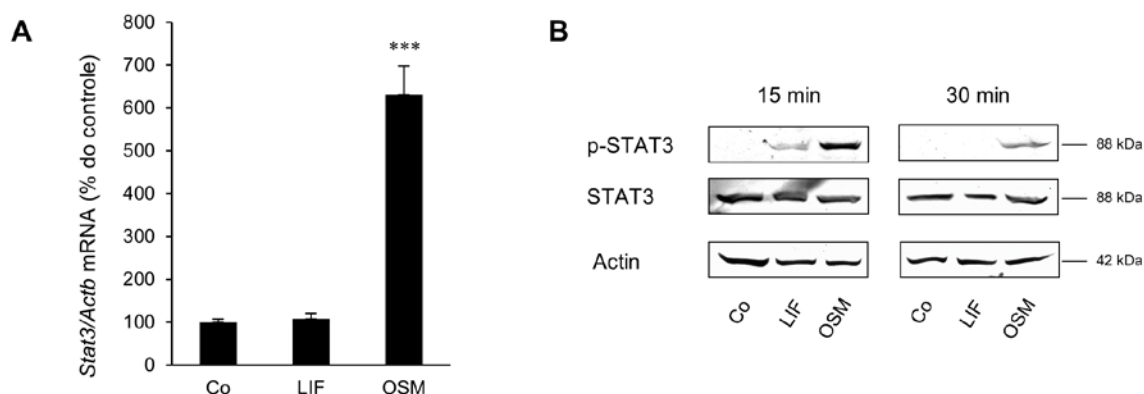
Fonte: Persson⁴².

5.2 Expressão Gênica e Fosforilação de STAT3 em Osteoblastos da Calvaria

O tratamento de osteoblastos da calvaria com OSM (100 ng/ml) aumenta a expressão gênica de *Stat3* em contraste ao tratamento com LIF (Figura 5A). A análise

por western blot mostra que a fosforilação de STAT3 é maior após o tratamento com OSM quando comparado a LIF (Figura 5B). Os resultados indicam que, assim como observado para ERK, OSM é uma potente indutora da fosforilação de STAT3.

Figura 5 – Efeito de LIF e OSM na expressão gênica e fosforilação de STAT3



STAT3 é expressa e ativada por LIF e OSM de forma distinta. Osteoblastos da calvaria foram cultivados na ausência (Co) ou presença de LIF e OSM (ambos 100 ng/mL) por 48 h para avaliar a expressão gênica de *Stat3* por RT-qPCR (**A**) ou por 15 e 30 minutos para avaliar a fosforilação de STAT3 por Western Blot (**B**). Os valores em (**A**) representam a média de quatro poços e o erro padrão (SEM) é indicado por barras verticais. A diferença estatística comparada as células não tratadas (Co) está definida por *** $P < 0,001$ analisado por one-way ANOVA seguido pela comparação múltipla de Dunnett vs Co.

Fonte: Persson⁴².

5.3 Ativação da Proteína Adaptadora Shc1 Induzida por OSM em Osteoblastos da Calvária

Em vista das diferenças observadas na ativação de MAPK e STAT3 em osteoblastos da calvaria tratados com OSM e LIF, e sabendo que o recrutamento da proteína adaptadora Shc1 foi descrita apenas por OSM em outros tipos de células, analisamos a influência de Shc1 na robusta fosforilação de ERK e STAT3 induzida por OSM em osteoblastos.

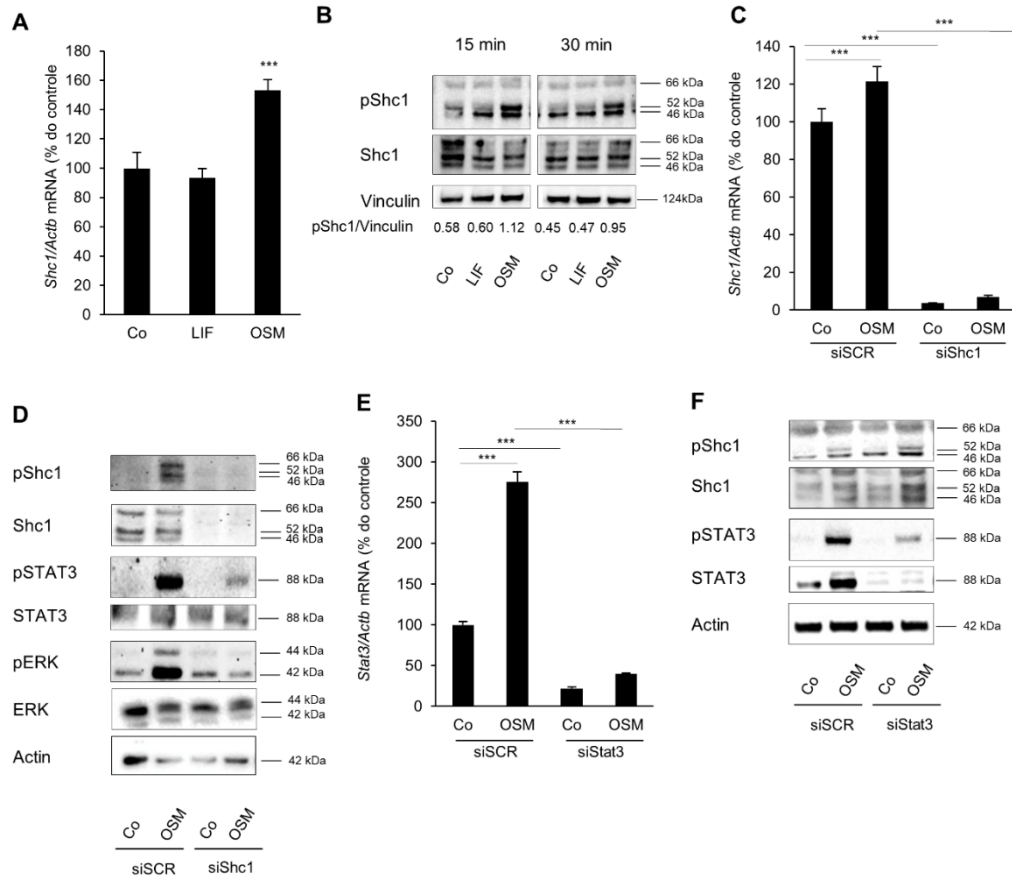
Osteoblastos da calvaria expressam *Shc1* e o tratamento com OSM (100 ng/ml) estimula a sua expressão (Figura 6A). As três isoformas descritas da proteína Shc1, p46 kDa, p52 kDa e p66 kDa foram expressas por osteoblastos e o tratamento com

OSM promoveu a fosforilação de Shc1 (Figura 6B). LIF não afetou a expressão gênica nem a fosforilação de Shc1 (Figuras 6A,B).

Para determinar a importância de Shc1 na fosforilação de STAT3 e ERK induzida por OSM, a expressão de *Shc1* foi silenciada em osteoblastos da calvaria. A eficácia do silenciamento é comprovada por uma redução de 97% da expressão gênica de *Shc1* nas células controle (Figura 6C). O silenciamento promoveu significativa redução na expressão gênica de *Shc1* e na fosforilação da proteína induzida por OSM (Figura 6D). Conseqüentemente à uma menor ativação de Shc1, o efeito da fosforilação de ERK e STAT3 induzido por OSM foi afetado (Figura 6D).

Uma vez estabelecida a forte fosforilação de STAT3 por OSM, o seu papel na ativação de Shc1 foi avaliado. Osteoblastos tratados com OSM (100 ng/mL) apresentaram aumento na expressão gênica de *Stat3* (Figura 6E). O Silenciamento de *Stat3* é evidenciado por uma redução de 80% em sua expressão em células controle, e diminui significativamente o efeito de OSM (Figura 6E). A níveis proteicos, o silenciamento de *Stat3*, como esperado, resulta em uma menor fosforilação de STAT3 induzida por OSM, mas não afeta a fosforilação de *Shc1* (Figura 6F), indicando que a ativação de Shc1 é anterior (*upstream*) a STAT3.

Figura 6 – Ativação da proteína adaptadora Shc1 em osteoblastos da calvaria

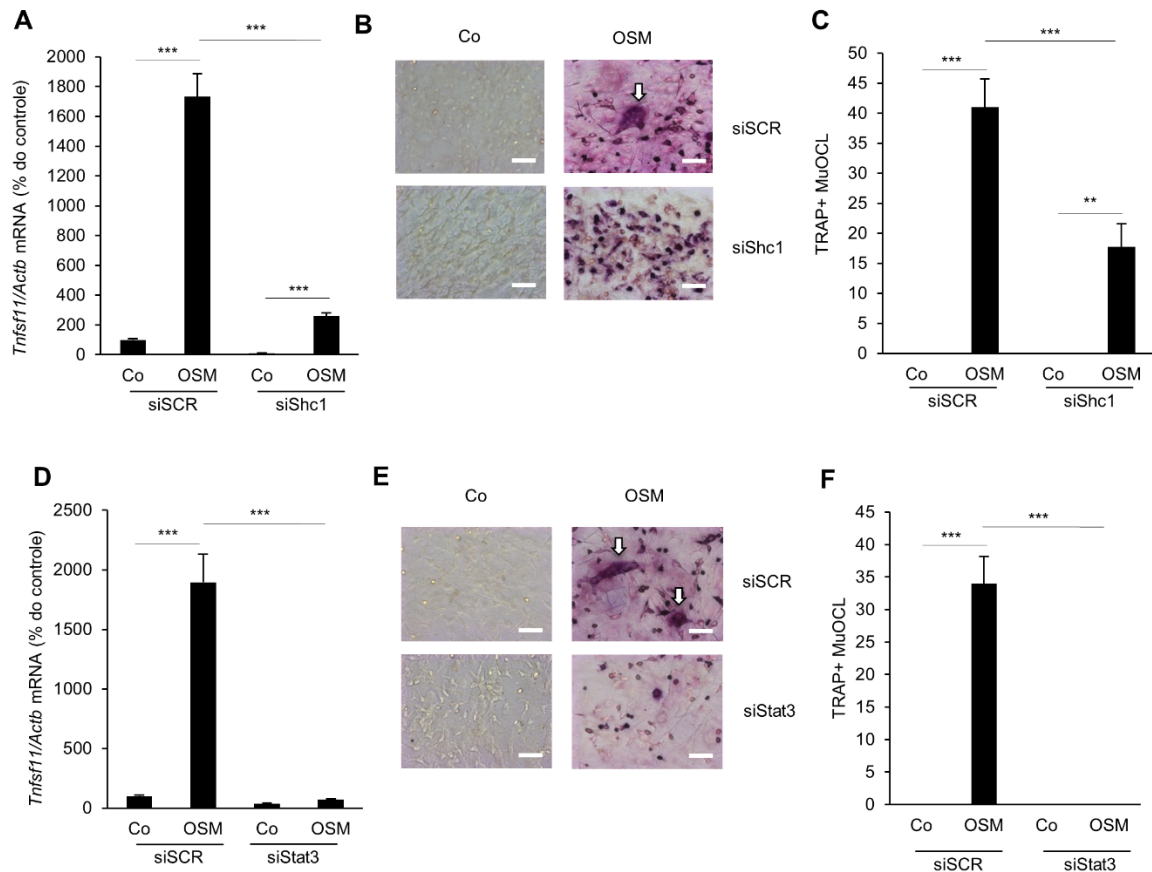


OSM induz a fosforilação de STAT3 e ERK através da ativação de Shc1. **(A)** Osteoblastos da calvaria foram cultivados na ausência (Co) ou presença de LIF e OSM (ambos 100 ng/mL) por 24 h para avaliar a expressão gênica de *Shc1* por RT-qPCR. **(B)** Células expostas a LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL) por 15 e 30 minutos foram lisadas para avaliação da fosforilação de Shc1 por Western Blot. As bandas foram quantificadas e normalizadas por vinculina. **(C)** Osteoblastos de calvaria que tiveram o gene *Shc1* silenciado por micro RNA de interferência (siRNA) e células controle expostas a uma sequência aleatória (Scr) foram expostos a OSM (100 ng/ml) ou veículo (Co) por 24h antes da extração de RNA e análise da expressão de *Shc1* por RT-qPCR. **(D)** Osteoblastos de calvaria que tiveram o gene *Shc1* silenciado por micro RNA de interferência (siRNA) e células controle expostas a uma sequência aleatória (Scr) foram tratadas com OSM (100 ng/ml) ou veículo (Co) por 15 minutos para a análise da fosforilação de Shc1, ERK e STAT3. **(E)** O gene *Stat3* foi silenciado em osteoblastos tratados com OSM (100ng/ml) ou veículo (Co) por 24h para a análise da expressão de *Stat3* por RT-qPCR. **(F)** Análise do silenciamento de *Stat3* na fosforilação de STAT3 e Shc1 em osteoblastos tratados com OSM (100 ng/mL) por 15 minutos. **(A, C, E)** Os valores representam a média de quatro poços e o erro padrão (SEM) é indicado por barras verticais. **(A)** As diferenças estatísticas comparadas as células não tratadas (Co) em cada *time point* é definida por *** $p < 0,001$; analisada por one-way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Dunnett. **(C, E)** As diferenças estatísticas são indicadas por linhas horizontais onde *** $p < 0,001$ two-way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. A diferença entre a resposta induzida por OSM com e sem silenciamento analisada por two-way ANOVA foi estatisticamente significativa [p valor da interação em **C** ($p < 0,005$) e em **E** ($p < 0,0001$)]. OSM não teve efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$) na expressão de mRNA de *Shc1* ou *Stat3* em células que foram silenciadas para *Shc1* ou *Stat3*, respectivamente **(C,E)**.

5.4 Expressão de RANKL e Osteoclastogênese

Em seguida avaliamos o papel da ativação das vias Shc1-ERK e STAT3 na expressão de RANKL mediada por OSM. O silenciamento de *Shc1* reduz significativamente o efeito de OSM sobre o aumento da expressão de *Tnfs11* (RANKL) (Figura 7A). A formação de osteoclastos, induzida por OSM, em co-culturas de osteoblastos da calvaria e BMM foi reduzida pelo silenciamento de *Shc1* (7B-C). O silenciamento de *Stat3* também resultou em uma menor expressão de *Tnfs11* induzida por OSM (7D) e suprimiu a formação de osteoclastos em co-culturas de osteoblastos e BMM (7E-F).

Figura 7 – Ativação de STAT3 e da proteína adaptadora Shc1 por OSM é crucial para a expressão de RANKL e osteoclastogênese



A expressão de RANKL em osteoblastos e a osteoclastogênese em co-cultura de osteoblastos e BMM induzida por OSM é dependente de Shc1 e STAT3. Osteoblastos em que o gene **(A)** *Shc1* e **(D)** *Stat3* foi silenciado e tratados com OSM (100 ng/mL) ou veículo (Co) para análise da expressão de *Tnfsf11* por RT-qPCR. Osteoblastos em que o gene **(B-C)** *Shc1* e **(D-E)** *Stat3* foi silenciado e tratados com OSM (100 ng/mL) ou veículo (Co) foram co-cultivados com BMM por 3 dias para coloração TRAP e contagem das células TRAP⁺ multinucleadas. **(A, C, D, F)**. Os valores representam a média de quatro poços e o erro padrão (SEM) é indicado por barras verticais. As diferenças estatísticas são indicadas por linhas horizontais onde ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; analisado por two-way ANOVA seguido do teste *post hoc* de Tukey. A diferença entre a resposta induzida por OSM com e sem silenciamento analisada por two-way ANOVA foi estatisticamente significativa [p valor da interação em **A** ($p < 0,0001$), **C** ($p < 0,005$), **D** ($p < 0,0001$) e **F** ($p < 0,0001$)]. Barra de escala em **(B-E)** 50 μm .

Fonte: Persson⁴².

5.5 Liberação de ⁴⁵Ca e Expressão de RANKL Induzida por OSM em Ossos e Osteoblastos da Calvaria

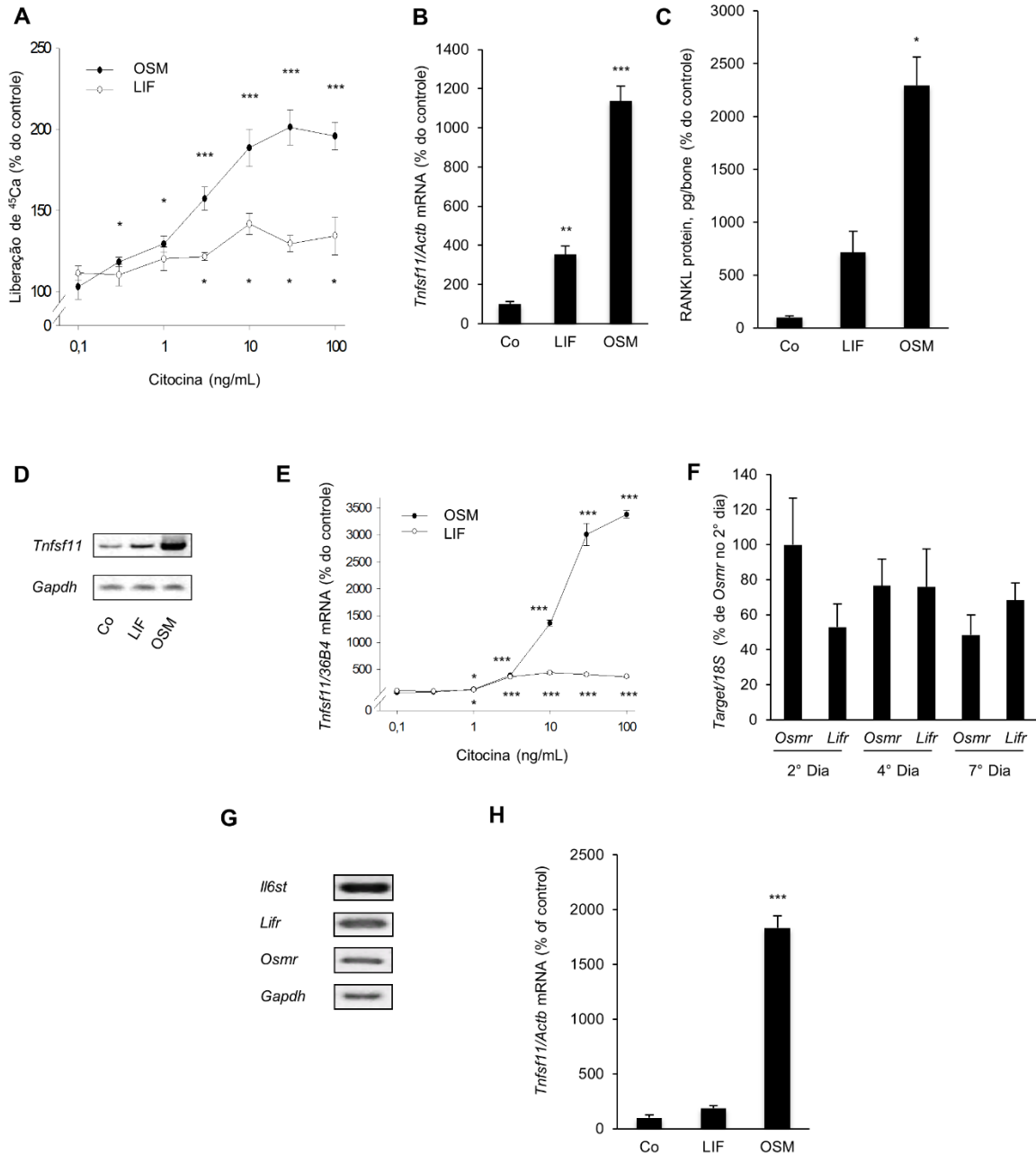
Uma vez observado que o OSM mas não LIF ativa uma via de sinalização dependente de Shc1, avaliamos a relevância dessa diferença na reabsorção óssea, expressão de RANK e osteoclastogênese. Ambos OSM e LIF estimularam reabsorção óssea, analisada pela liberação de ⁴⁵Ca em ossos da calvaria de camundongos recém-nascidos, de forma concentração-dependente, sendo o efeito de OSM mais potente (Figura 8A).

Em ossos da calvaria, o tratamento com OSM e LIF, o último de forma mais discreta, aumenta a expressão de *Tnfs11* (Figura 8B) o que corrobora com o resultado do aumento dos níveis proteicos de RANKL (Figura 8C).

Osteoblastos da calvaria respondem a OSM e LIF (ambos 100 ng/mL) com o aumento da expressão de *Tnfs11*, sendo OSM claramente mais efetiva (Figura 8D). A diferença entre o efeito de OSM e LIF na expressão de *Tnfs11* pode ser observada em diversas concentrações (Figura 8E), o que parece não estar relacionado a diferenças na expressão dos receptores, como analisado pela expressão de *Osmr* e *Lifr*. (Figura 8F).

Células estromais ST-2 expressam mRNA para *Il6st*, *Lifr* e *Osmr* (Figura 8G) e respondem a OSM com um aumento robusto da expressão de *Tnfs11*, enquanto LIF não possui efeito significativo (Figura 8H).

Figura 8 – Efeito de OSM sobre a liberação de ^{45}Ca e expressão de RANKL em ossos e osteoblastos de calvaria



OSM estimula a reabsorção óssea e produção de RANKL em ossos e osteoblastos da calvaria, e em células estromais. **(A)** Ossos da calvaria foram cultivados na presença ou ausência de OSM (ambos 0,1-100 ng/ml) e a reabsorção óssea avaliada pela liberação de ^{45}Ca após 5 dias de cultura. **(B)** Expressão de *Tnfsf11* em ossos da calvaria após 24h de tratamento com LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL), avaliada por RT-qPCR. **(C)** Análise da expressão proteica de RANKL após 48h de tratamento com LIF ou OSM em ossos da calvaria. **(D)** Osteoblastos da calvaria incubados na ausência (Co) ou presença de LIF ou OSM (ambos

100 ng/mL) por 48h para análise da expressão de *Tnfs11* por RT-qPCR. **(E)** Expressão de *Tnfs11* em osteoblastos da calvaria tratados com LIF e OSM em diferentes concentrações. (ambos 0,1-100 ng/ml). **(F)** Expressão de *Osmr* e *Lifr* em osteoblastos em diferentes tempos. **(G)** Expressão de *Il6st*, *Osmr* e *Lifr* em células estromais ST-2 por RT-PCR. **(H)** Expressão de *Tnfs11* em células estromais ST-2 tratadas por 48h com LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL). Os valores representam a média de seis ossos (ossos da calvaria) ou quatro poços (experimentos de cultura celular) e o erro padrão (SEM) é indicado por barras verticais. *, **, e ***, indicam a diferença estatística comparada as células não tratadas (Co), *p < 0,05, **p < 0,01, e ***p < 0,001, respectivamente. A diferença estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de homogeneidade de Levene's seguido pelo teste *post hoc* de Dunnett vs Co. Em **(F)**, O teste *post hoc* de Tukey foi usado para comparar todos os grupos e nenhuma diferença estatística foi observada.

Fonte: Persson 2019⁴²

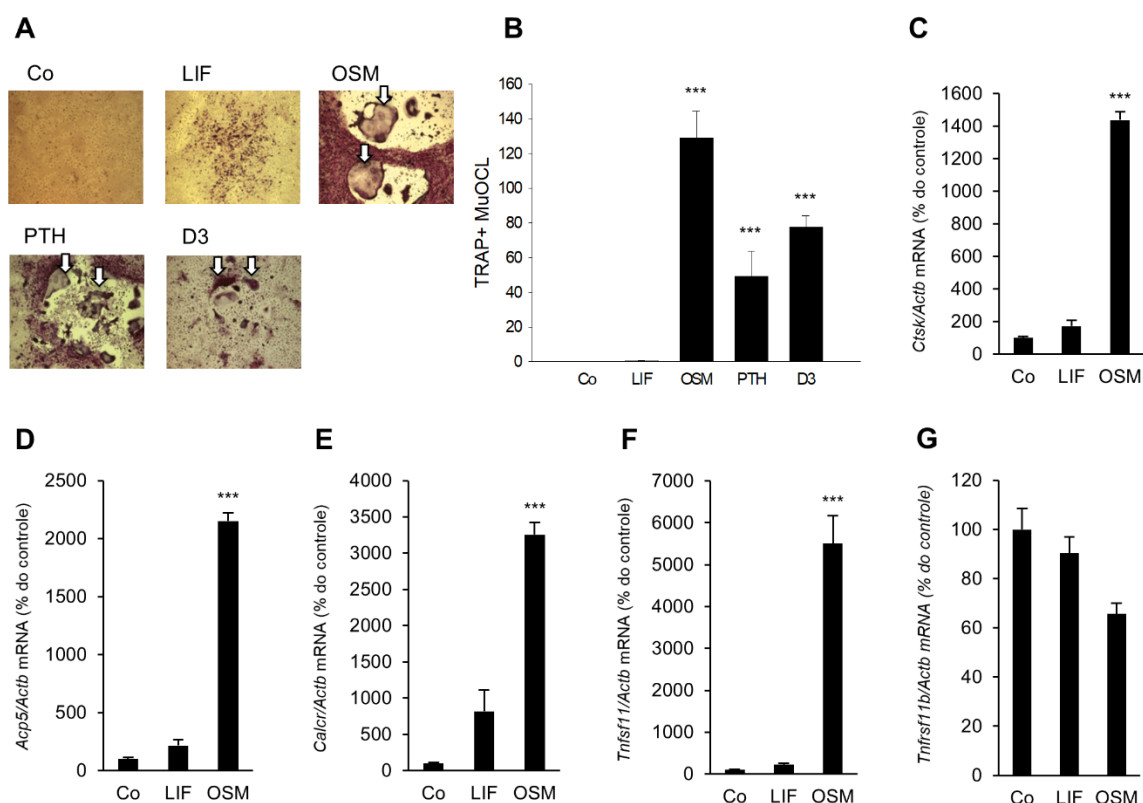
5.6 Diferenciação de Osteoclastos e Expressão de RANKL Induzida por OSM em BMC

Adição de OSM (100 ng/mL) por 7 dias a cultura de células da medula óssea (BMC) estimulou significativamente a formação de células multinucleadas TRAP⁺ (Figuras 9A,B). O efeito de OSM foi mais proeminente do que o hormônio da paratireoide (PHT) e vitamina D3 1,25(OH)₂ em suas concentrações de eficácia máxima (Figuras 9A,B).

OSM (100 ng/ml) também aumenta a expressão de marcadores fenotípicos de osteoclastos *Ctsk* (catepsina K), *Acp5* (TRAP, fosfatase ácida resistente ao tartarato) e *Calcr* (receptor de calcitonina), de forma mais efetiva do que LIF (100 ng/mL) (Figuras 9C-E).

OSM aumenta a expressão de *Tnfs11* em culturas de BMC mas não afeta *Tnfs11b* (Figuras 9F,G). Não foram observados efeitos significativos de LIF na expressão de *Tnfs11* e *Tnfs11b* em culturas de BMC (Figuras 9F,G).

Figura 9 – Efeito de OSM sobre a expressão de RANKL e diferenciação de osteoclastos em cultura de BMC.



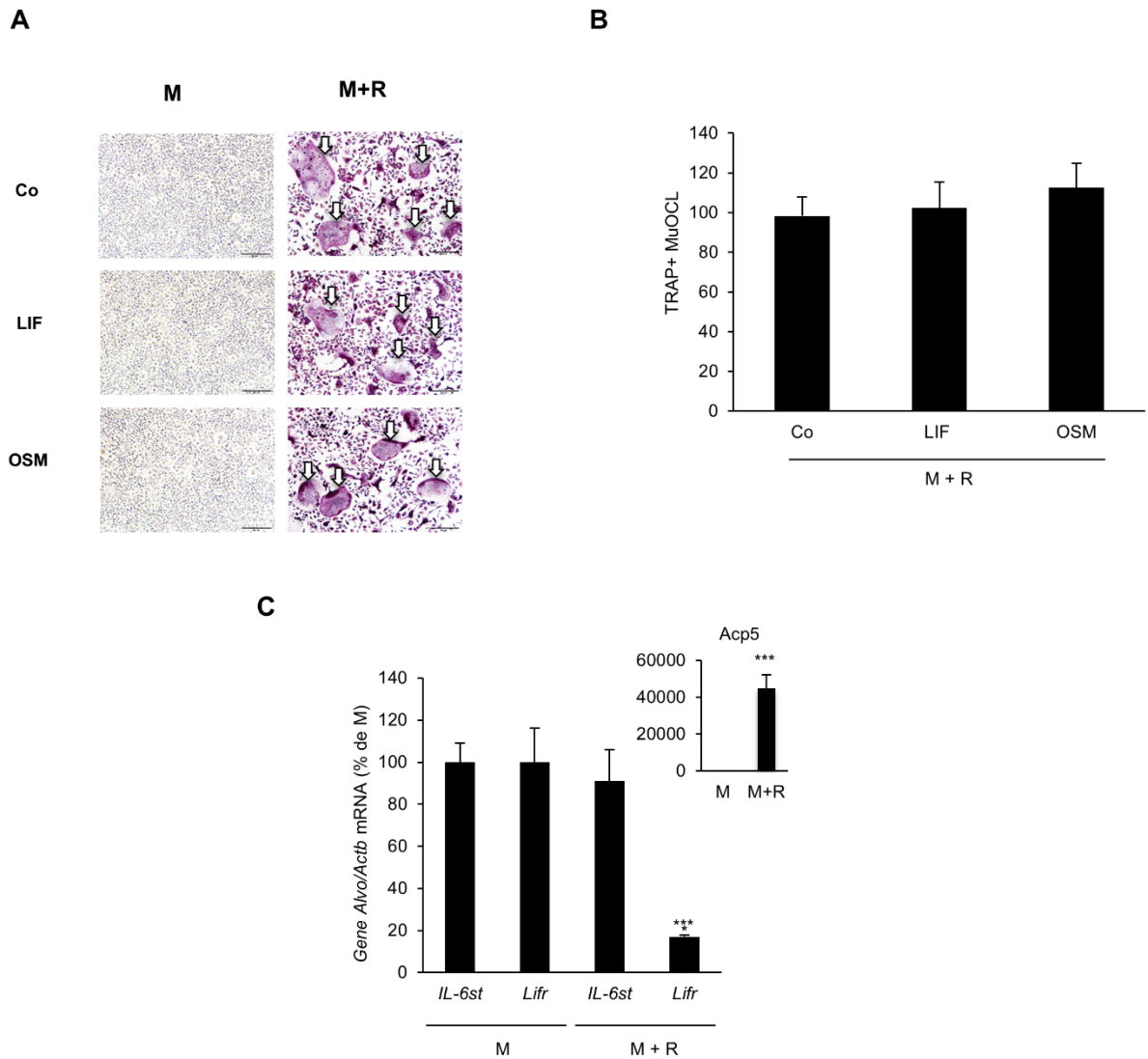
OSM, mas não LIF, estimula a osteoclastogênese em culturas de células da medula óssea. BMC foram cultivadas na ausência (Co) ou presença de LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL), PHT ou vitamina D3 1,25(OH)₂ (ambos a 10⁻⁸ M) por 7 dias antes da **(A)** coloração e **(B)** contagem de osteoclastos multinucleados TRAP⁺. RT-qPCR avaliando a expressão de catepsina K (*Ctsk*, **C**), TRAP (*Acp5*, **D**), receptor de calcitonina (*Calcrl*, **E**), RANKL (*Tnfs11*, **F**) e OPG (*Tnfs11b*, **G**) em culturas de BMC tratadas com OSM ou LIF (100 ng/mL) por 7 dias. Os valores representam a média de quatro poços e o erro padrão (SEM) é indicado por barras verticais. ***, indica a diferença estatística comparada as células não tratadas (Co), ***p < 0,001. A diferença estatística foi determinada por ANOVA usando o teste de homogeneidade de Levene's seguido pelo teste bilateral de Dunnett. **(B-F)**, ou teste *post hoc* de Dunnett **(G)**.

Fonte: Persson 2019⁴²

5.7 Efeito Direto de OSM e LIF Sobre a Osteoclastogênese

A análise das culturas de BMM revelou que OSM e LIF não induzem a formação de osteoclastos multinucleados TRAP positivos (Figura 10A). A osteoclastogênese também não foi afetada por OSM e LIF em BMM estimulados por M-CSF e RANKL (Figuras 10A, B). Em BMM estimulados com M-CSF e MCSF+RANKL não foi detectada a expressão de *Osmr*, apenas de *Il6st* (gp130) e *Lifr* (Figura 10C). A diferenciação induzida por RANKL, como demonstrado pelo aumento da expressão de *Acp5* (TRAP), não afetou a expressão de *Il6st*, mas reduziu a expressão de *Lifr* (Figura 10C).

Figura 10 – OSM e LIF não possuem efeito direto sobre a osteoclastogênese



OSM e LIF não induzem a formação de osteoclastos em cultura de macrófagos derivados da medula óssea. **(A,B)** BMMs foram cultivadas em M-CSF (30 ng/mL) ou diferenciadas em osteoclastos pela adição de M-CSF + RANKL (30 ng/mL e 4 ng/mL, respectivamente) na presença ou ausência de LIF ou OSM (ambos 100 ng/mL) antes de serem coradas para TRAP. As células TRAP⁺ multinucleadas foram contadas. **(C)** Expressão de *Il6st*, *Lifr* e *Acp5* em BMM cultivadas por 72h com M-CSF (30 ng/mL) ou M-CSF + RANKL (30 ng/mL e 4 ng/mL, respectivamente). Os valores representam a média de quatro poços e o erro padrão (SEM) é indicado por barras verticais. Em **(C)** *******, indica a diferença estatística comparada as células tratadas com M-CSF (M), $p < 0,001$. Em **(B)** a diferença estatística foi determinada por one-way ANOVA seguido pelo teste *post hoc* de Tukey e em **(C)** o teste *t* de Student foi usado para a comparação ente os grupos M e M+R para cada gene. Fonte: Persson 2019⁴².

6 DISCUSSÃO

Os resultados desse estudo indicam que OSM, comparado a LIF, é um indutor mais potente da reabsorção óssea em ossos da calvaria de camundongos e da diferenciação de osteoclastos em culturas de células da medula óssea. Em macrófagos derivados da medula óssea, OSM não induziu a formação de osteoclastos, nem afetou a osteoclastogênese em células (BMM) previamente expostas a M-CSF + RANKL, evidenciando seu efeito indireto, mediado por osteoblastos/células estromais, dado principalmente pelo aumento da expressão de RANKL em osteoblastos, ao invés de efeitos diretos em células progenitoras de osteoclastos. Em um experimento comparando os efeitos das citocinas da família gp130, Tamura et al⁵⁴ descreve o efeito de LIF na estimulação da formação de osteoclastos em co-culturas de osteoblastos e células da medula óssea como menos potente do que OSM. De fato, outros estudos que avaliam a ação dessas duas citocinas em diversos tipos celulares relatam uma potência elevada de OSM em relação a LIF⁵⁵⁻⁵⁸. Nesse estudo não foi observado diferença na expressão de *Osmr* e *Lifr* em osteoblastos que justifique a maior formação de osteoclastos induzida por OSM e, portanto, esse efeito dificilmente está vinculado a uma diferença no número de receptores e sim em diferenças na sinalização *downstream* a estes.

Em osteoblastos da calvaria de camundongos, OSM foi um indutor mais potente do que LIF da fosforilação de JNK e ERK. Igualmente, Walker et al²⁷ demonstrou que OSM ativa ERK de forma mais robusta do que LIF em cultura de osteoblastos primários. Esse efeito sugere, novamente, diferentes sinalizações *downstream* aos receptores de OSM e LIF. A ativação da sinalização JAK/STAT é característica a complexos que utilizam gp130⁴⁰. Foi descrita anteriormente a ativação de STAT1, STAT3 e STAT5 induzida por OSM e LIF em osteoblastos, sendo que a sinalização via OSMR resulta em uma maior ativação desses fatores de transcrição²⁷. Em acordo com esses dados, no presente estudo foi observado que OSM é uma potente indutora da fosforilação de STAT3 comparada a LIF. Esse resultado pode ser uma explicação para OSM ser mais potente no aumento da expressão gênica e proteica de RANKL.

O recrutamento da proteína adaptadora Shc1 para a subunidade OSMR pode ser o motivo para OSM ser um ativador da sinalização JAK/STAT e MAPK mais potente do que LIF, já que Shc1 não é recrutada para o complexo LIFR:gp130¹⁰. Nesse estudo é descrito, pela primeira vez, que Shc1 é expressa em osteoblastos e

que OSM, mas não LIF, aumenta a expressão de *Shc1*, bem como a sua fosforilação. O silenciamento dessa proteína reduz significativamente a ativação de STAT3 e ERK induzida por OSM. No entanto, o silenciamento de *Stat3* em osteoblastos não afetou a fosforilação de *Shc1*, indicando que STAT3 atua *downstream* a *Shc1*. Um estudo recente em células de câncer de mama também descreve *Shc1 upstream* a STAT3¹³. Esses resultados reafirmam a participação de STAT3 na cascata de sinalização que ocorre após a ativação dos receptores de OSM e LIF.

O mecanismo pelo qual OSM induz a expressão de *Tnfs11* e a formação de osteoclastos é dependente do recrutamento de *Shc1* por OSMR, dado que o silenciamento dessa proteína reduz esse efeito. O silenciamento de *Stat3* também resultou em uma menor expressão de *Tnfs11* induzida por OSM e suprimiu a formação de osteoclastos em co-culturas de osteoblastos e BMM, indicando dependência a expressão de *Stat3*.

Os resultados demonstram que OSM é mais potente do que LIF na indução de reabsorção óssea em ossos da calvaria e formação de osteoclastos em cultura de células da medula óssea. O mecanismo envolvido é um aumento da fosforilação de STAT3 e JNK por OSM e sua habilidade de, diferentemente de LIF, ativar ERK, resultando em um grande estímulo da expressão de RANKL por osteoblastos/células estromais. No presente estudo, apresentamos o recrutamento da proteína adaptadora *Shc1* ao heterodímero OSMR:gp130, ausente ao complexo gp130:LIFR, como peça chave na sinalização responsável pelos potentes efeitos de OSM.

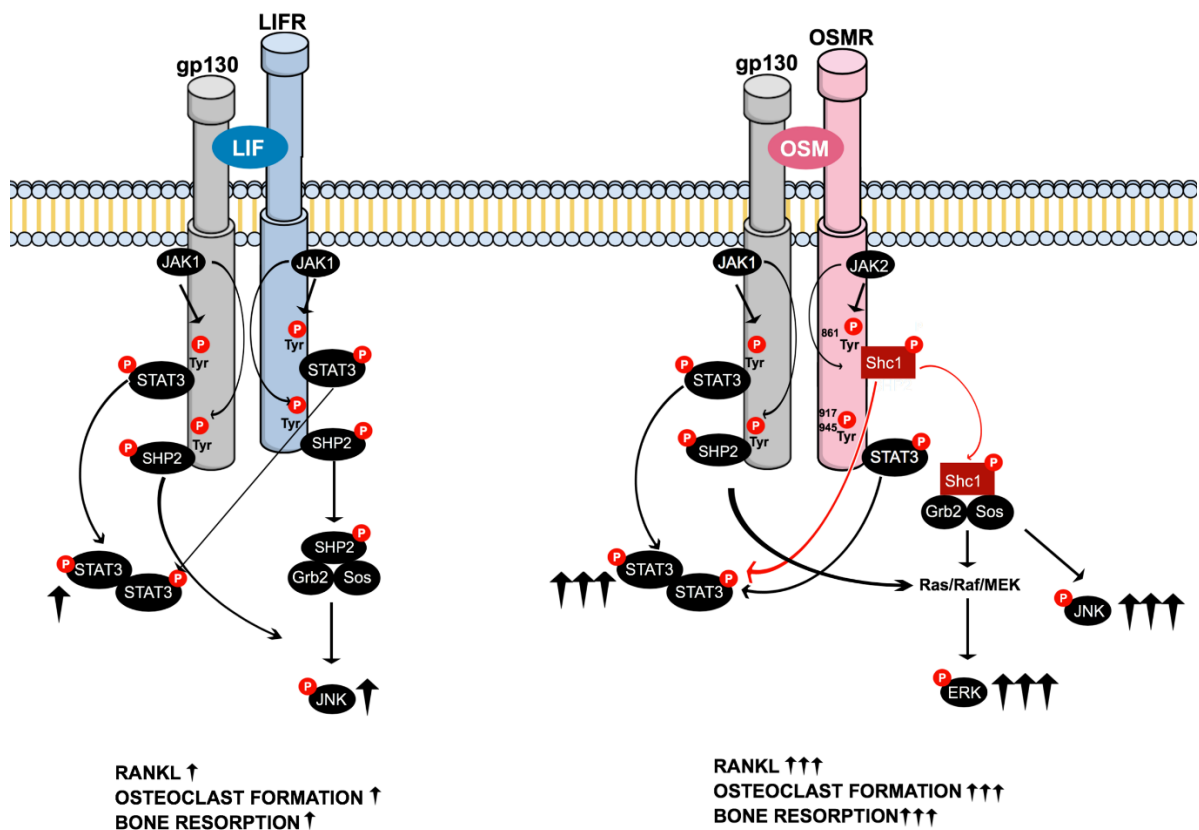
Do ponto de vista clínico, *Shc1* pode ser um mecanismo para a reduzir a perda óssea mediada por OSM em doenças inflamatórias, como a evidenciada na doença periodontal, em que há um aumento nos níveis séricos de OSM em pacientes com periodontite³⁶. No entanto, a letalidade embrionária precoce de embriões *Shc1*^{-/-50} dificulta a sua caracterização *in vivo*.

7 CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostram o recrutamento da proteína adaptadora Shc1 para a subunidade OSMR, resultando em ativação robusta induzida por OSM da sinalização ERK/STAT3 e aumento da expressão de RANKL, comparada a sinalização mediada por LIFR.

O silenciamento de *Shc1* reduziu a expressão de STAT3 e RANKL estimulada por OSM, mas o silenciamento de *Stat3* não afetou a fosforilação de Shc1, estabelecendo STAT3 *downstream* ao recrutamento de Shc1 por OSMR. Este mecanismo explica os diferentes efeitos entre OSM e LIF na osteoclastogênese e reabsorção óssea. As diferenças na sinalização entre OSMR e LIFR estão propostas na Figura 11.

Figura 11 – Representação esquemática da via de sinalização dos receptores de OSM e LIF em osteoblastos.



Sinalização via LIFR/OSMR induzida pela fosforilação do transdutor de sinal gp130, mediada por JAK, envolve a ativação de STAT3 e JNK através de uma possível cascata SHp2/Ras/Raf/MAPK (**Esquerda**). Além da via mediada por gp130, comum a LIFR e OSMR,

o receptor de OSM recruta a proteína adaptadora Shc1, também demonstrado em estudos prévios^{10,43}. Shc1 ativa é recrutada ao complexo Grb2:SoS, o qual por sua vez induz a cascata Ras/Raf/MAPK culminando na ativação de ERK. A via mediada por Shc1 (**Direita**) é proposta como a responsável pelos fortes efeitos de OSM na expressão de fatores osteoclastogênicos, formação de osteoclastos e reabsorção óssea, em comparação a ativação do complexo LIFR:gp130 por LIF.

Fonte: Elaboração própria.

REFERÊNCIAS*

1. Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H. Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev.* 2002; 23(1): 90–119.
2. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009; 25: 629–48.
3. Teitelbaum SL. Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol.* 2007; 170(2): 427–35.
4. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008; 42(4): 606–15.
5. Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol.* 2009; 201(3): 309–20.
6. Souza PPC, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest.* 2013; 42(7): 555–622.
7. Boyce BF. Advances in osteoclast biology reveal potential new drug targets and new roles for osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(4): 711–22.
8. Richards CD, Langdon C, Deschamps P, Pennica D, Shaughnessy SG. Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine.* 2000; 12(6): 613–21.
9. Kishimoto T, Akira S, Narazaki M, Taga T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood.* 1995; 86(4): 1243–54.
10. Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines: the adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275(52): 40742–8.
11. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(24): 11924–8.
12. Wills MKB, Jones N. Teaching an old dogma new tricks: twenty years of Shc adaptor signalling. *Biochem J.* 2012; 447(1): 1–16.
13. Ahn R, Sabourin V, Bolt AM, Hébert S, Totten S, De Jay N et al. The Shc1 adaptor simultaneously balances Stat1 and Stat3 activity to promote breast cancer immune suppression. *Nat Commun.* 2017; 8(1):14638.

** De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>.

14. Anhuf D, Weissenbach M, Schmitz J, Sobota R, Hermanns HM, Radtke S et al. Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation. *J Immunol.* 2000;165(5): 2535–43.
15. Hermanns HM. Oncostatin M and interleukin-31: cytokines, receptors, signal transduction and physiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2015 Oct; 26(5): 545–58.
16. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999; 13(23): 3037–51.
17. Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H et al. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature.* 1990; 345(6274): 442–4.
18. Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature.* 1999; 397(6717): 315–23.
19. Sims NA, Martin TJ. Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: how are messages transmitted between these temporary visitors to the bone surface? *Front Endocrinol.* 2015 Mar 24; 6: 41.
20. Magalhães FAC. Mecanismos moleculares envolvidos no controle da osteoclastogênese. 2017. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara.
21. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood.* 2003 Nov; 102(9): 3154–62.
22. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol.* 2018; 18(12): 773–89.
23. Kuropatwinski KK, De Imus C, Gearing D, Baumann H, Mosley B. Influence of subunit combinations on signaling by receptors for oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin-6. *J Biol Chem.* 1997; 272(24):15135–44.
24. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(24): 9739–43.
25. West NR, Hegazy AN, Owens BMJ, Bullers SJ, Linggi B, Buonocore S, et al. Oncostatin M drives intestinal inflammation and predicts response to tumor necrosis factor-neutralizing therapy in patients with inflammatory bowel disease. *Nat Med.* 2017 May;23(5):579–89.
26. Su C-M, Chiang Y-C, Huang C-Y, Hsu C-J, Fong Y-C, Tang C-H. Osteopontin promotes Oncostatin M production in human osteoblasts: implication of rheumatoid arthritis therapy. *J Immunol.* 2015; 195(7): 3355–64.

27. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest.* 2010; 120(2): 582–92.
28. Richards CD. The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease. *ISRN Inflamm.* 2013 Dec; 2013: 512103.
29. Sims NA. Cell-specific paracrine actions of IL-6 family cytokines from bone, marrow and muscle that control bone formation and resorption. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Oct; 79: 14–23.
30. Tanaka M, Hirabayashi Y, Sekiguchi T, Inoue T, Katsuki M, Miyajima A. Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis. *Blood.* 2003; 102(9): 3154–62.
31. Bolin C, Tawara K, Sutherland C, Redshaw J, Aranda P, Moselhy J et al. Oncostatin m promotes mammary tumor metastasis to bone and osteolytic bone degradation. *Genes Cancer.* 2012; 3(2): 117–30.
32. Sterbova S, Karlsson T, Persson E. Oncostatin M induces tumorigenic properties in non-transformed human prostate epithelial cells, in part through activation of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). *Biochem Biophys Res Commun.* 2018; 498(4): 769–74.
33. Ayaub EA, Dubey A, Imani J, Botelho F, Kolb MRJ, Richards CD et al. Overexpression of OSM and IL-6 impacts the polarization of pro-fibrotic macrophages and the development of bleomycin-induced lung fibrosis. *Sci Rep [Internet].* 2017; 7(1): 13281.
34. Mozaffarian A, Brewer AW, Trueblood ES, Luzina IG, Todd NW, Atamas SP et al. Mechanisms of oncostatin M-induced pulmonary inflammation and fibrosis. *J Immunol.* 2008; 181(10): 7243–53.
35. Simpson JL, Baines KJ, Boyle MJ, Scott RJ, Gibson PG. Oncostatin M (OSM) is increased in asthma with incompletely reversible airflow obstruction. *Exp Lung Res.* 2009; 35(9): 781–94.
36. Pradeep AR, S TM, Garima G, Raju A. Serum levels of oncostatin M (a gp 130 cytokine): an inflammatory biomarker in periodontal disease. *Biomarkers Biochem Indic Expo response, susceptibility to Chem.* 2010; 15(3): 277–82.
37. Lisignoli G, Piacentini A, Toneguzzi S, Grassi F, Cocchini B, Ferruzzi A et al. Osteoblasts and stromal cells isolated from femora in rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) patients express IL-11, leukemia inhibitory factor and oncostatin M. *Clin Exp Immunol.* 2000; 119(2): 346–53.
38. O'Brien CA, Gubrij I, Lin SC, Saylor RL, Manolagas SC. STAT3 activation in stromal/osteoblastic cells is required for induction of the receptor activator of NF-kappaB ligand and stimulation of osteoclastogenesis by gp130-utilizing cytokines or interleukin-1 but not 1,25-dihydroxyvitamin D3 or parathyroid horm. *J Biol Chem.* 1999 Jul; 274(27): 19301–8.

39. Richards CD, Langdon C, Deschamps P, Pennica D, Shaughnessy SG. Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone. *Cytokine*. 2000; 12(6): 613–21.
40. Hermanns HM, Radtke S, Haan C, Schmitz-Van de Leur H, Tavernier J, Heinrich PC et al. Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130. *J Immunol*. 1999; 163(12): 6651–8.
41. Hintzen C, Evers C, Lippok BE, Volkmer R, Heinrich PC, Radtke S et al. Box 2 region of the oncostatin M receptor determines specificity for recruitment of Janus kinases and STAT5 activation. *J Biol Chem*. 2008; 283(28): 19465–77.
42. Persson E, Souza PPC, Floriano-Marcelino T, Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Activation of Shc1 allows Oncostatin M to induce RANKL and osteoclast formation more effectively than leukemia inhibitory factor. *Front Immunol*. 2019; 10: 1164.
43. Wang Y, Robledo O, Kinzie E, Blanchard F, Richards C, Miyajima A et al. Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem*. 2000; 275(33): 25273–85.
44. Wright KD, Staruschenko A, Sorokin A. Role of adaptor protein p66Shc in renal pathologies. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2018; 314(2): F143–53.
45. Finetti F, Savino MT, Baldari CT. Positive and negative regulation of antigen receptor signaling by the Shc family of protein adapters. *Immunol Rev*. 2009; 232(1): 115–34.
46. Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G et al. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J*. 1997;16(4): 706–16.
47. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A et al. Proteomics: tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347(6220): 1260419.
48. Ciciliot S, Albiero M, Menegazzo L, Poncina N, Scattolini V, Danesi A et al. p66Shc deletion or deficiency protects from obesity but not metabolic dysfunction in mice and humans. *Diabetologia*. 2015; 58(10): 2352–60.
49. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 1999; 402(6759): 309–13.
50. Lai KM, Pawson T. The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev*. 2000; 14(9): 1132–45.
51. Lerner UH. Modifications of the mouse calvarial technique improve the responsiveness to stimulators of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 1987; 2(5): 375–83.

52. Granholm S, Lundberg P, Lerner UH. Calcitonin inhibits osteoclast formation in mouse haematopoietic cells independently of transcriptional regulation by receptor activator of NF- κ B and c-Fms. *J Endocrinol.* 2007; 195(3): 415–27. *J Bone Miner Res.* 1987; 2(5): 375–83.
53. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and characterization of the new osteoclast progenitor with macrophage phenotypes being able to differentiate into mature osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2000; 15(8): 1477–88.
54. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90(24): 11924–8.
55. Richards CD, Kerr C, Tanaka M, Hara T, Miyajima A, Pennica D et al. Regulation of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in fibroblasts and acute phase proteins in hepatocytes in vitro by mouse oncostatin M, cardiotrophin-1, and IL-6. *J Immunol.* 1997;159(5): 2431–7.
56. Langdon C, Kerr C, Hassen M, Hara T, Arsenault AL, Richards CD. Murine oncostatin M stimulates mouse synovial fibroblasts in vitro and induces inflammation and destruction in mouse joints in vivo. *Am J Pathol.* 2000; 157(4): 1187–96.
57. Langdon C, Leith J, Smith F, Richards CD. Oncostatin M stimulates monocyte chemoattractant protein-1- and interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-1 production by human synovial fibroblasts in vitro. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(12): 2139–46.
58. Langdon C, Kerr C, Tong L, Richards CD. Oncostatin M regulates eotaxin expression in fibroblasts and eosinophilic inflammation in C57BL/6 mice. *J Immunol.* 2003; 170(1): 548–55.

ANEXO A – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO ANIMAL



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araraquara - Faculdade de Odontologia



Proc. CEUA nº 11/2015


Araraquara, 30 de maio de 2016.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal – CEUA desta Faculdade, procedeu a análise do Relatório Parcial do projeto de pesquisa de sua responsabilidade intitulado ***“EFEITO DA INTERLEUCINA-4 SOBRE A REABSORÇÃO ÓSSEA INDUZIDA POR LIPOPROTEÍNAS”*** (Proc. CEUA nº 11/2015), e considerou-o APROVADO, bem como sua solicitação de alteração na metodologia e no título da pesquisa que passou a ser ***“ENTENDENDO O PAPEL CATABÓLICO E ANABÓLICO DA INFLAMAÇÃO SOBRE O TECIDO ÓSSEO”***.

Lembramos que o Relatório Final deste projeto deverá ser entregue em **AGOSTO/2018**.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. PEDRO PAULO CHAVES DE SOUZA
DD. Pesquisador Responsável
Departamento de Fisiologia e Patologia

APÊNDICE A - SEQUÊNCIA DE PRIMERS E SONDAS E TEMPERATURA DE ANELAMENTO (TA) UTILIZADOS PARA REAÇÃO DE PCR (RT-PCR E qPCR).

Gene Alvo	Sequencia	5' e 3'	GenBank	Pares de Base	Ta
36B4 (qPCR)	649-710	BC_011106	62		
Sense	5'-CCCTGAAGTGCTCGACATCA-3'				
Antisense	5'-TGCGGACACCCTCCAGAA-3'				
Probe	VIC-AGAGCAGGCCCTGCACTCTCGC-TAMRA				
<i>Acp5</i> (qPCR)	771-847	BC019160	77		
Sense	5'-CGACCATTGTTAGCCACATACG-3'				
Antisense	5'-TCGTCCTGAAGATACTGCAGGTT-3'				
Probe	VIC-CACTGCCTACCTGTGTGGACATGA-TAMRA				
<i>Acp5</i> (RT-PCR)		1072-1384	NM_007388	313	58
Sense	5'-AAATCACTCTTCAAGACCAG-3'				
Antisense	5'-TTATTGAACAGCAGTGACAG-3'				
<i>Actb</i> (qPCR)		471-563	M12481	93	
Sense	5'-GGACCTGACGGACTACCTCATG-3'				
Antisense	5'-TCTTTGATGTCACGCACGATTT-3'				
Probe	VIC-CCTGACCGAGCGTGGCTACAGCTTC-TAMRA				
<i>Ctsk</i> (qPCR)	606-695	NM_007802	90		
Sense	5'-ATATGTGGGCCAGGATGAAAGTT-3'				
Antisense	5'-TCGTTCCCCACAGGAATCTCT-3'				
Probe	VIC-CCACGGCAAAGGCAGCTAAATGCA-TAMRA				
<i>Ctr</i> (qPCR)		689-764	NM_007588	76	
Sense	5'-AGTTGCCCTCTTATGAAGGAGAAG-3'				
Antisense	5'-GGAGTGTCGTCCCAGCACAT-3'				
Probe	VIC-TCTGTACTGCAACCGCACCTGGGA-TAMRA				
<i>Ctr</i> (RT-PCR)		1483-1650	U185421	167	64
Sense	5'-TGCTGGCTGAGTGCAGAAACC-3'				
Antisense	5'-GGCCTTCACAGCCTTCAGGTAC-3'				

Gene Alvo	Sequencia	5' e 3'	GenBank	Pares de Base	Ta
<i>Gapdh</i> (RT-PCR)		957-1223	M32599	267	57
Sense	5'-ACTTTGTCAAGCTCATTTC-3'				
Antisense	5'-TGCAGCGAACTTTATTGATG-3'				
<i>Ilf6st</i> (RT-PCR)		330-632	X62646	303	57
Sense	5'-TCATCAACAGAACCCGTCC-3'				
Antisense	5'-CCATACATGAAGTGCCATGC-3'				
<i>Lifr</i> (RT-PCR)		2595-2758	NM_013584	164	55
Sense	5'-GCTGTCATTGTTGGCGTGG-3'				
Antisense	5'-TTCATTTCCAATGTCTTAAGAGC-3'				
<i>Osmr</i> (RT-PCR)		2571-2990	NM_011019	420	57
Sense	5'-GATGTACCCACTAAGCCGCC-3'				
Antisense	5'-GAGGACCGTTGAGGTCAAGC-3'				
<i>Shc1</i> (qPCR)		60-169	NM_011368.5	109	60
Sense	5'-GGTCCTGGGGTGAAAGTT-3'				
Antisense	5'-TGTTTCATGTCCAGGGTCTCA-3'				
<i>Tnfs11b</i> (qPCR)	845-958	U94331	114		
Sense	5'-AGCTGCTGAAGCTGTGGAA-3'				
Antisense	5'-GGTTCGAGTGGCCGAGAT-3'				
Probe	VIC-CCAAGACATTGACCTCTGTGAAAGCA-TAMRA				
<i>Tnfs11b</i> (RT-PCR)		428-1147	NM_008764	720	
Sense	5'-TGGAGATCGAATTCTGCTTG-3'				
Antisense	5'-TCAAGTGCTTGAGGGCATAAC-3'				
<i>Tnfs11</i> (qPCR)	606-680	AF053713	75		
Sense	5'-TGGAAGGCTCATGGTTGGAT-3'				
Antisense	5'-CATTGATGGTGAGGTGTGCAA-3'				
Probe	VIC-AGGCTTGCCTCGCTGGGCCAG-TAMRA				
<i>Tnfs11</i> (RT-PCR)		929-1739	AF013170	810	
Sense	5'-GGTCGGGCAATTCTGAATT-3'				
Antisense	5'-GGGAATTACAAAGTGCACCAG-3'				

Autorizo a reprodução deste trabalho.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 5 de fevereiro de 2020

Thaís Floriano Marcelino