



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



JONLENO COUTINHO PAIVA PITOMBO

**IMPACTO DE ANDRÓGENOS NA DIFERENCIAÇÃO E ATIVIDADE
DE OSTEOCLASTOS EM CULTURA CELULAR**

Araraquara
2016



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



JONLENO COUTINHO PAIVA PITOMBO

**IMPACTO DE ANDRÓGENOS NA DIFERENCIAÇÃO E ATIVIDADE
DE OSTEOCLASTOS EM CULTURA CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – Área de concentração em Periodontia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista – UNESP, para título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio
Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Steffens

Araraquara
2016

Pitombo, Jonleno Coutinho Paiva

Impacto de andrógenos na diferenciação e atividade de osteoclastos em cultura celular / Jonleno Coutinho Paiva Pitombo.-- Araraquara: [s.n.], 2016.

82 f. ; 30 cm.

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

Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio

Coorientador: Prof. Dr. João Paulo Steffens.

1. Cultura primária de células 2. Osteoclastos 3. Androgênios
I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marley C. Chiusoli Montagnoli, CRB-8/5646

Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Araraquara / UNESP

JONLENO COUTINHO PAIVA PITOMBO

**IMPACTO DE ANDRÓGENOS NA DIFERENCIAÇÃO E ATIVIDADE
DE OSTEOCLASTOS EM CULTURA CELULAR**

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio.

2º examinador: Profa. Dra. Ticiania Sidorenko de Oliveira Capote

3º examinador: Profa. Dra. Thallita Pereira Queiroz

Araraquara, 21 de março de 2016.

DADOS CURRICULARES

JONLENO COUTINHO PAIVA PITOMBO

NASCIMENTO: 18 de janeiro de 1988 – Feira de Santana – Bahia.

FILIAÇÃO: Jarleno de Paiva Pitombo
Maria do Carmo Coutinho Paiva

2007-2012: Graduação em Odontologia
Universidade Estadual de Feira de Santana-BA

2014-2016: Curso de Pós-Graduação em Odontologia
Área de Periodontia
Nível de Mestrado

Dedico este trabalho àqueles que são
minha força, meu alicerce, meu amor
verdadeiro...

Maria do Carmo Coutinho Paiva, minha mãe,
Jarleno de Paiva Pitombo, meu pai,
Sheila Coutinho Paiva Pitombo, minha irmã e
Jarleno Coutinho Paiva Pitombo, meu irmão.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por todos os benefícios que me tens feito. A ele por prover a vida, saúde, discernimento, amparo e por me proporcionar essa oportunidade de crescimento profissional e amadurecimento emocional.

Aos meus queridos avós, **Maria de Lourdes** e **Waldemar** por todo o amor, carinho e por cada ligação com a voz cheia de saudade.

Ao **Luís Carlos Leal Santana**, obrigado por tudo! Você foi essencial para a realização deste trabalho! Nesses dois anos de convivência construímos uma relação de amizade e companheirismo. Apesar das dificuldades que enfrentamos, sempre buscamos realizar nossas atividades com responsabilidade e da melhor forma possível! Pode contar comigo, sempre!

Ao **Prof. Dr. Luis Carlos Spolidorio**, obrigado por ter se disponibilizado a me orientar, por todo apoio, incentivo e confiança. Sou grato pelos ensinamentos, conselhos, pelos momentos de cobrança e sorrisos.

Ao Prof. **Dr. João Paulo Steffens**, meu coorientador, obrigado pelos conhecimentos transmitidos e colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À **Sarah Conceição**, minha amiga irmã, companheira e dupla dos tempos da graduação. Obrigado por me escutar, aconselhar e incentivar. Amo-te!

Aos meus amigos que mesmo à distância sempre estiveram presentes...**Caroline, Eliesita, Juliana, Monique, Nedson, Paulo e Verena**. Obrigado pelo carinho!

Aos amigos que ganhei em Araraquara...**Dayane, Kahena e Romerito**. Obrigado pela amizade e companhia. Graças a vocês os dias foram mais leves e divertidos!

Ao **Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza** pelos ensinamentos das técnicas laboratoriais e por todo o conhecimento compartilhado.

À todos os colegas da Pós-Graduação, em especial, ao **Fernando Magalhães**, pelo convívio e experiência de vida compartilhada.

Ao **Marcell Medeiros**, pela paciência e disponibilidade em ajudar.

Aos funcionários e a amigos do Departamento de Fisiologia e Patologia...**José Zuanon** e **Juliana Pirola**.

Ao **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa** e a **Dra. Fernanda Gonçalves Basso** por disponibilizaram o laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais sempre que necessário.

Aos Professores Doutores do Departamento de Diagnóstico e Cirurgia...**Adriana Marcantonio**, **Carlos Rossa Júnior**, **Daniela Zandim**, **Elcio Marcantonio Júnior**, **Silvana Orrico**, **Joni Augusto Cirelli** e **José Eduardo Sampaio**. Agradeço pela colaboração com minha formação como futuro professor de periodontia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, **Cristiano Afonso Lamounier** e **José Alexandre Garcia** por nos atenderem com gentileza, esclarecendo nossas dúvidas com paciência e agilidade.

Aos professores do curso de Odontologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, em especial à **Prof. Dra. Teresinha Costa de Santana** e ao **Prof. Dr. Isaac Suzart Gomes Filho**, por terem sido minha referência no ensino e pesquisa na área de periodontia.

Aos funcionários da Biblioteca, **Maria Inês**, **Adriano**, **Eliane**, **Maria**, **Marley** e **Ceres**, pela disposição em ajudar e no auxílio para a normalização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP)**, na pessoa de sua Diretora, Prof^a. Dr^a. Elaine Maria Sgavioli Massucato e do Vice-Diretor Prof^o. Dr^o. Edson Alves de Campos, pelas condições oferecidas para a minha formação acadêmica e realização desta pesquisa.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP**, pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho (Processo FAPESP: 2013/12014-6).

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos (Processo CNPq: 133815/2014-5)

**“MESMO QUANDO TUDO PARECE DESABAR, CABE A MIM DECIDIR
ENTRE RIR OU CHORAR, IR OU FICAR, DESISTIR OU LUTAR; PORQUE
DESCOBRI, NO CAMINHO INCERTO DA VIDA, QUE O MAIS IMPORTANTE É
O DECIDIR.”**

*Tudo tem seu tempo determinado e há tempo para
todo o propósito debaixo do céu.
Há tempo de nascer e tempo de morrer;
Tempo de plantar e tempo de colher;
Tempo de matar e tempo de curar;
Tempo de derrubar e tempo de edificar;
Tempo de chorar e tempo de rir;
Tempo de prantear e tempo de saltar;
Tempo de espalhar pedras e tempo de ajuntar pedras;
Tempo de guardar e tempo de deitar fora;
Tempo de rasgar e tempo de coser;
Tempo de estar calado e tempo de falar;
Tempo de amar e tempo de aborrecer;
Tempo de guerra e tempo de paz.”*

Pitombo JCP. Impacto de andrógenos na diferenciação e atividade de osteoclastos em cultura celular [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

RESUMO

Os mecanismos de ação dos andrógenos sobre homeostase e regulação das células que participam do turnover ósseo em fêmeas ainda são pouco compreendidos. Este trabalho teve como principal objetivo avaliar a participação de andrógenos na diferenciação e atividade de osteoclastos *in vitro*. Células totais de medula óssea de fêmur e tíbia de camundongos fêmeas foram utilizadas como fonte de células precursoras de osteoclastos, sendo cultivadas utilizando-se α -MEM suplementado e em presença de RANK-L (30ng/mL) e M-CSF (50ng/mL). As células foram tratadas com testosterona (T) diidrotestosterona (DHT) e antagonistas de receptores de hormônios sexuais, como flutamida (FLU) e fulvestranto (FUL). O anastrozol (ANA) foi usado para inibição da enzima aromatase e o etanol (0,01%) foi utilizado como controle. Após cinco dias, as células foram fixadas, coradas com TRAP e contadas, considerando-se células TRAP-positivas com 3 ou mais núcleos. Para o ensaio de atividade, foram utilizadas placas revestidas com fosfato de cálcio inorgânico e a área de reabsorção foi calculada com o auxílio de software. O estágio de diferenciação osteoclástica foi avaliado por RT-qPCR e a modulação da expressão de receptores para hormônios sexuais foi avaliada por Western Blot. Os andrógenos (T e DHT) não exerceram efeitos sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos (ANOVA; $p>0,05$). Por outro lado, os tratamentos com ANA, FLU e FUL, associados ou não a T, regularam positivamente a diferenciação e atividade de osteoclastos. A expressão gênica de RANK, Catepsina K, NFATc1 e $\beta 3$ integrina não foi alterada pelos tratamentos propostos (ANOVA; $p>0,05$). Além disso, os tratamentos com T, DHT, FLU e FUL modularam a expressão proteica do receptor de andrógeno (AR) e dos receptores de estrógeno (ER α e ER β) por Western Blot. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que os andrógenos exercem limitada participação na diferenciação e atividade de osteoclastos de camundongos fêmeas e que este processo é mediado, ao menos em parte, por ações indiretas da T e pela modulação de receptores de hormônios sexuais.

Palavras-chave: Cultura Primária de Células. Osteoclastos. Androgênios.

Pitombo JCP. Impact of androgens in differentiation and activity of osteoclasts in cell culture [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2016.

ABSTRACT

The action mechanisms of androgens on homeostasis and the regulation of cells that participate in bone turnover in females are still poorly understood. This study had as main objective to evaluate the participation of androgens in the differentiation and activity of in vitro osteoclasts. Total bone marrow cells from femur and tibia of female mice were used as a source of precursor cells of osteoclasts, they were cultivated using supplemented α -MEM and in the presence of RANK-L (30ng/mL) and M-CSF (50ng/mL). The cells were treated with testosterone (T), dihydrotestosterone (DHT) and antagonists of sexual hormone receptors such as flutamide (FLU) and fulvestrant (FUL). Anastrozole (ANA) was used for inhibiting the aromatase enzyme and ethanol (0.01%) was used as a control. After five days, the cells were fixed, colored with TRAP and counted, considering TRAP-positive cells those ones containing 3 or more nuclei. For the activity assay, were used plaques covered with inorganic calcium phosphate and the area of reabsorption was calculated with the assistance of a software. The osteoclast differentiation stage was evaluated by RT-qPCR and the modulation of the expression of receptors for sexual hormones was assessed by Western Blotting. The androgens (T and DHT) did not exert effects in differentiation and activity of osteoclasts (ANOVA, $p > 0.05$). On the other hand, the treatments with ANA, FLU and FUL, associated or not to T, positively regulated the differentiation and activity of osteoclasts. The genic expression of RANK, Cathepsin K, NFATc1 and $\beta 3$ integrin was not altered by the proposed treatments (ANOVA, $p > 0.05$). Moreover, the treatments with T, DHT, FLU and FUL modulated the protein expression of the androgen receptor (AR) and of the estrogen receptors (ER α and ER β) by Western Blotting. Taken together, our results indicate that the androgens exert limited participation in differentiation and activity of osteoclasts of female mice and that this process is mediated, at least in part, by indirect actions of T and by the modulation of sexual hormone receptors.

Keywords: Primary Cell Culture. Osteoclasts. Androgens.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF-1: Fator de ativação transcricional independente do ligante

ANA: Anastrozol

AR: Receptor de andrógeno

AREs: Elementos Responsivos aos andrógenos

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

c-fms: Receptor do fator estimulante de colônias 1

CMO: Células da medula óssea

CONCEA: Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

Ctsk: Catepsina K

DHT: Dihidrotestosterona

DNA: Ácido desoxirribonucleico

E2: Estradiol

ERK: Kinase regulada por sinais extracelulares

ERs: Receptores de estrógeno

ER- α : Receptor de estrógeno alfa

ER- β : Receptor de estrógeno beta

ET: Etanol

FBS: Soro fetal bovino

FLU: Flutamida

FSH: Hormônio folículo estimulante

FUL: Fulvestranto

GAPDH: Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GnRH: Hormônio liberador de gonadotrofinas

GPR30: Receptor de membrana acoplado à proteína G

HRE: Elementos de Resposta Hormonal

HRP: Anticorpo Secundário

HSPs: Proteínas chaperonas de choque térmico

ITGB3: Integrina beta-3

LH: Hormônio Luteinizante

MAPKs: Kinases proteicas ativadas por mitógenos

MCS-F: Fator estimulante de colônia de macrófagos

mRNA: Ácido Ribonucleico mensageiro

NFATc1: Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1

NF- κ B: Fator nuclear kappa B

OPG: Osteoprotegerina

PBS: Solução salina de fosfato tamponada

PKA: Proteína quinase A

PKC: Proteína quinase C

RANK: Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANK-L: Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B

RT-qPCR: Real time quantitative polymerase chain reaction

SHBG: Globulina ligadora de hormônios sexuais

T: Testosterona

TNF: Fator de necrose tumoral

TRAF-6: Receptor associado ao fator de necrose tumoral- 6

TRAP: Fosfatase ácida resistente ao tartarato

α -MEM: Meio Eagle Modificado por Dulbecco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Definição e Síntese dos Hormônios Esteroides Sexuais.....	18
2.2 Os Hormônios Esteroides Sexuais Exercem seus Efeitos Biológicos através da Ligação a Receptores Nucleares	20
2.3 Alterações dos Níveis Fisiológicos dos Andrógenos Causam o Desequilíbrio de Processos Biológicos nos Gêneros Masculino e Feminino	24
2.4 O Papel do Osteoclasto no Turnover Ósseo	25
2.5 Efeito Regulador de Hormônios Esteróides Sexuais sobre o Metabolismo Ósseo.....	28
2.6 Efeito Regulador de Hormônios Esteróides Sexuais sobre Osteoclastos.....	29
3 PROPOSIÇÃO	32
3.1 Hipótese Testada.....	32
3.2 Objetivo Geral	32
3.3 Objetivos Específicos.....	32
4 MATERIAL E MÉTODO	33
4.1 Animais	33
4.2 Extração de Células da Medula Óssea.....	33
4.3 Preparo das Soluções dos Hormônios Androgênicos Derivados Sintéticos da Testosterona, Diidrotestosterona e Antagonistas dos Receptores de Hormônios Sexuais.	34
4.4 Grupos Experimentais	35
4.5 Cultura de Células.....	36
4.6 Impacto de Andrógenos na Diferenciação de Osteoclastos	38
4.7 Western Blot.....	41
4.8 Impacto de Andrógenos na Atividade de Osteoclastos: Ensaio de Atividade.....	42
4.9 Análise Estatística.....	44
5 RESULTADO	45
5.1 Impacto de Andrógenos na Diferenciação de Osteoclastos: Ensaio de Diferenciação	45
5.2 Avaliação do Estágio de Diferenciação Osteoclástica por RT-qPCR.....	47
5.3 Impacto de Andrógenos na Atividade de Osteoclastos: Ensaio de Atividade.....	52
5.4 Western Blot.....	57
6 DISCUSSÃO	61
7 CONCLUSÃO.....	68

REFERÊNCIAS	69
ANEXO.....	82

1 INTRODUÇÃO

Os andrógenos exercem a função primária de regulação do sistema reprodutivo, sendo essenciais para o desenvolvimento das características sexuais e manutenção das funções reprodutivas, sobretudo no gênero masculino. Além disso, estão envolvidos na formação/manutenção do esqueleto e no equilíbrio homeostático do organismo em ambos os gêneros (Mooradian et al.⁹⁷, 1987; Riggs et al.¹²¹, 2002). A deficiência androgênica em mulheres pode ser causada por uma série de fatores, incluindo ovariectomia, quimioterapia, radioterapia de ovário, uso de contraceptivos orais e cortisona, estresse agudo e doenças crônicas (Guay, Davis⁵⁴, 2002), podendo causar alterações na função sexual, perda de massa muscular, redução da densidade mineral óssea e aumento do risco de fraturas (Manolagas et al.⁸⁶, 1995; Shifren et al.¹³¹, 2000; Bachmann et al.⁵, 2002).

Por outro lado, níveis elevados de andrógenos em mulheres podem ser causados pela síndrome de ovários policísticos (Morgante et al.⁹⁸, 2015), hiperplasia adrenal congênita (Krysiak et al.⁷⁰, 2016), tumores nos ovários ou nas glândulas adrenais (Glintborg et al.⁵², 2015) e utilização de esteroides anabolizantes sintéticos com finalidades estéticas ou para melhorar o desempenho esportivo de forma ilícita (Nieschlag, Vorona¹⁰³, 2015). Neste sentido, níveis suprafisiológicos de andrógenos estão associados com alterações na função reprodutiva e sexual, mudanças no comportamento/humor, aumento do tônus muscular, hipertensão, risco cardiovascular, dislipidemia e resistência à insulina (Davis³², 1999; Franquni et al.⁴⁸, 2013; Knobf et al.⁶⁷, 2016, Nieschlag, Vorona¹⁰³, 2015, Onakomaiya, Henderson¹⁰⁸, 2016). Além disso, o tratamento hormonal com andrógenos em homens transexuais, está associado com o aumento da massa muscular e do turnover ósseo (Van Caenegem et al.¹⁵¹, 2015). De modo geral, os andrógenos são críticos para o desenvolvimento, manutenção do esqueleto e equilíbrio homeostático, estimulando a formação e inibindo a reabsorção óssea, sobretudo no gênero masculino (Horstman et al.⁵⁸, 2012). Evidências mostram que a testosterona (T) possui um efeito modulador negativo sobre citocinas pró-inflamatórias e exercem influência sobre células do sistema imune (Ferrucci et al.⁴⁵, 2005), estando associada à perda óssea periodontal em homens com hipogonadismo (Steffens et al.¹⁴⁰, 2015). Apesar da ação dos andrógenos sobre o metabolismo ósseo nas mulheres não estar totalmente esclarecida (Vanderschueren et al.¹⁵⁵, 2004), sugere-se que a deficiência desses hormônios esteja associada a redução da densidade mineral óssea e aumento do risco de fraturas (Shifren et al.¹³¹, 2000; Bachmann et al.⁵, 2002). É bem estabelecido que a redução

dos níveis de estrógeno em mulheres pós-menopausadas, assim como baixos níveis de T em homens, estão associados ao desenvolvimento de osteoporose (Tirabassi et al.¹⁴⁷, 2014; Seven et al.¹²⁷, 2016). Atualmente, a terapia de reposição hormonal com T em mulheres é um assunto controverso, devido aos possíveis efeitos colaterais e discussões sobre os reais benefícios dos andrógenos sobre a prevenção da perda de massa óssea no gênero feminino (Davis, Wahlin-Jacobsen³³, 2015).

Os hormônios esteroides sexuais podem regular o metabolismo ósseo por ação direta e/ou indireta sobre osteoblastos e osteoclastos (Bellido et al.⁹, 1995; Liu et al.⁸², 2007; Leblebicioglu et al.⁷⁶, 2013; Steffens et al.¹³⁹, 2014). Algumas evidências apontam que a diminuição dos níveis de andrógenos e estrógenos disponíveis aumenta o tempo de vida de osteoclastos e favorece a apoptose de osteoblastos, induzindo o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Manolagas et al.⁸⁷, 2002). No entanto, o efeito direto dos andrógenos sobre osteoclastos são controversos (Sinnesael et al.¹³⁴, 2015; Ucer et al.¹⁵⁰, 2015).

Apesar da plausibilidade biológica da participação ativa de hormônios androgênicos na regulação do metabolismo ósseo associado à doença periodontal e osteoporose em homens, assim como do seu efeito regulador sobre osteoblastos e osteoclastos, os mecanismos de ação dos andrógenos sobre a homeostase e regulação do turnover ósseo em fêmeas ainda são pouco compreendidos.

Em vista do exposto e da necessidade de estudos sobre o tema, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos hormônios androgênicos sobre a diferenciação, atividade e modulação da expressão de receptores para hormônios sexuais em cultura de osteoclastos de camundongos fêmeas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Esta seção apresenta o embasamento teórico que fundamentou a pesquisa, seus conceitos e os principais estudos relacionados.

2.1 Definição e Síntese dos Hormônios Esteroides Sexuais

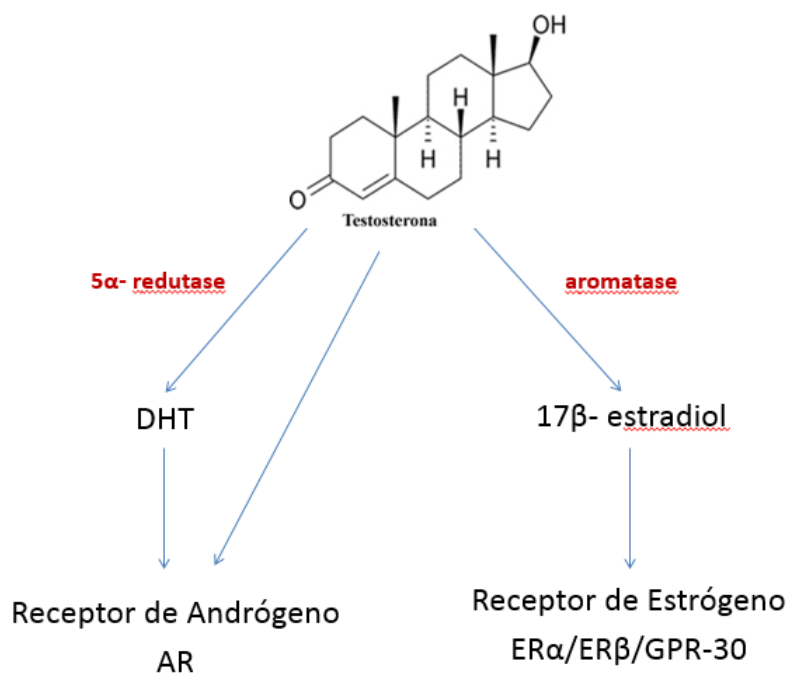
A biossíntese dos hormônios esteroides sexuais ocorre a partir do colesterol, que pode ser encontrado no organismo em sua forma esterificada e livre. Os ésteres de colesterol são convertidos em sua forma livre e posteriormente em pregnenolona, que é um precursor dos hormônios esteroides. Além disso, a regulação da biossíntese hormonal está sob controle do eixo hipotálamo-pituitária via gonodotrofinas (hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH)). A secreção das gonodotrofinas, por sua vez, é regulada pelo hormônio liberador de gonodotrofina (GnRH), o qual estimula a produção de hormônios esteroides gonadais. Com o envelhecimento, ocorre uma diminuição na produção de GnRH acarretando na redução dos níveis de testosterona, podendo levar a alterações fisiológicas e patológicas, sobretudo no gênero masculino (Baulieu et al.⁸, 1963; Zhang et al.¹⁶⁹, 2013; Manna et al.⁸⁴, 2015).

Os hormônios esteroides sexuais podem ser classificados em andrógenos, estrógenos e progestágenos. Em relação aos andrógenos, estes incluem a androstenediona, androstenediol, testosterona (T) e a dihidrotestosterona (DHT). A T é o principal hormônio androgênico, sendo sintetizada pelas células de Leydig nos testículos (no homem), nas células da teca e do estroma ovariano (na mulher) e pelo córtex adrenal em ambos. Em mulheres, o principal hormônio androgênico é a androstenediona, a qual é produzida ciclicamente pelos ovários até a menopausa. Porém, T e DHT são os andrógenos mais potentes, produzidos a partir de precursores secretados pelos ovários/córtex adrenal e por ação da enzima 5 α -redutase, respectivamente (Vanderschueren et al.¹⁵⁵, 2004; Guay, Davis⁵⁴, 2002).

Os hormônios esteroides sexuais ligam-se reversivelmente a proteínas carreadoras no plasma, que os transportam e distribuem para células-alvo, onde exercem sua ação através da ligação a receptores localizados na superfície celular. Por serem substâncias lipofílicas, podem atravessar a membrana plasmática por difusão simples e ligar-se a receptores intracelulares (Nemere et al.¹⁰², 2003). Aproximadamente 45% da T, o principal andrógeno presente na circulação no gênero masculino, encontra-se ligada à globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG), porém apenas a fração não ligada é considerada bioativa. Além

disso, T pode ser encontrada em sua forma livre ou fracamente ligada com outras proteínas plasmáticas, principalmente à albumina. (Dunn et al.⁴⁰, 1981; Callewaert et al.¹⁷, 2010). Apenas a fração da T que não é ligada à SHBG pode ser convertida em seu metabólito mais ativo e não aromatizável, 5- α diidrotestosterona (DHT), sob ação enzimática da 5 α -redutase. A DHT liga-se ao receptor de andrógeno (AR) com mais afinidade e especificidade, sendo por isso metabolicamente mais ativa que a testosterona. DHT difere de T pela ausência de uma única ligação dupla, o que proporciona um aumento da sua afinidade para o AR e reduz a taxa de dissociação em relação à T (Gimpl et al.⁵¹, 2002; Mariotti, Mawhinney⁹⁰, 2013). Além disso, T pode ser aromatizada em 17 beta-estradiol (E₂, principal estrógeno) pela ação da enzima P450 aromatase, a qual está presente em muitos tecidos periféricos, incluindo o tecido ósseo (Davison, Davis³⁵, 2003). O E₂ pode atuar através de receptores de estrógeno (ER) α e β (Rochira et al.¹²², 2015). Estudos evidenciam que o receptor de membrana acoplado à proteína G (GPR-30) é também um receptor de estrógeno funcional (Revankar et al.¹²⁰, 2005; Sharma, Prossnitz¹²⁸, 2016). O esquema simplificado do metabolismo da testosterona está representado na Figura 1.

Figura 1 – Esquema simplificado do metabolismo da testosterona.



Fonte: Adaptado de Vanderschueren et al.¹⁵³, 1998.

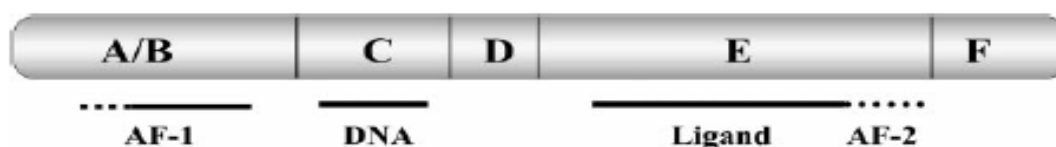
2.2 Os Hormônios Esteroides Sexuais Exercem seus Efeitos Biológicos através da Ligação a Receptores Nucleares

Os hormônios esteroides sexuais regulam a diferenciação e induzem várias respostas fisiológicas em organismos eucarióticos. A resposta biológica aos hormônios é desencadeada por meio da sua interação com receptores nucleares (Chang et al.²⁰, 1988). Os receptores nucleares constituem uma superfamília de proteínas que se ligam a hormônios específicos e atuam como fatores de transcrição para determinados genes. Os hormônios esteroides sexuais ao se ligarem ao seu receptor, ativam regiões específicas no DNA, chamadas de elementos de resposta hormonal (HRE), que estão localizados na região promotora dos genes alvo. Os receptores nucleares são compostos de três domínios estruturais independentes: o domínio NH₂ terminal ou A/B, que contém o domínio de transativação independente do ligante AF-1; o domínio C ou de ligação ao DNA altamente conservado, com dois dedos de zinco; e o domínio de ligação ao ligante ou D/E/F N-terminal variável, o qual apresenta o domínio AF-2 onde se liga proteínas de choque térmico e co-reguladoras (Figura 2) (Nilsson et al.¹⁰⁵, 2001; Speirs, Walker¹³⁶, 2007, Tan et al.¹⁴⁵, 2015).

A ligação de um hormônio com o seu receptor inicia um processo de transdução de sinal, que consiste em uma série de eventos que resultam em respostas celulares que podem ser divididas em duas categorias: (a) respostas genômicas que são caracterizadas por alteração na transcrição gênica, necessitando de um tempo maior para alterar o comportamento celular e, (b) respostas não genômicas, resultantes de rápidos eventos de sinalização, como a interação com receptores de membrana (como os receptores transmembrana acoplados às proteínas G) e/ou modulação do influxo de cálcio (Prossnitz et al.¹¹⁸, 2008; Wang et al.¹⁵⁶, 2014).

Os hormônios esteroides sexuais circulam na corrente sanguínea principalmente ligados à proteínas plasmáticas. A fração hormonal livre pode entrar na célula por difusão simples e ligar-se aos receptores localizados no citoplasma e/ou no núcleo (Laurent et al.⁷⁴, 2014). A ligação entre o hormônio e o seu receptor promove a formação do complexo hormônio-receptor ativado que se liga com alta afinidade e especificidade com as sequências específicas de nucleotídeos no DNA, levando à ativação e transcrição do RNAm. A regulação da transcrição gênica pelo complexo hormônio-receptor parece ser a principal ação biológica dos hormônios esteroides sexuais (Nemere et al.¹⁰², 2003; Mariotti, Mawhinney⁹⁰, 2013).

Figura 2 – Esquema representativo dos domínios estruturais dos receptores nucleares. O domínio A/B na região terminal NH₂ contém o sítio de interação dos fatores de transcrição (AF-1). O domínio C/D de ligação ao DNA. O domínio E/F contém a região de ligação ao ligante, bem como o domínio AF-2 que são sítios que se ligam com proteínas co-ativadoras.



Fonte: Nilsson et al.¹⁰⁵, 2001

2.2.1 Receptor de andrógeno

A ação dos andrógenos é mediada pelo receptor de andrógeno (AR) que é um membro da superfamília de receptores nucleares, codificado por genes localizados no cromossomo X (De Gendt et al.³⁶, 2004). A ligação de T ou DHT promove alterações conformacionais no AR e recrutamento de proteínas co-ativadoras que permitem a interação do receptor com Elementos Responsivos aos Andrógenos (AREs) em vários genes alvo, sendo que a DHT liga-se com mais afinidade ao receptor. A formação do complexo hormônio-receptor promove a dissociação das proteínas chaperonas de choque térmico (HSPs), conduzindo a interação entre os domínios NH₂ terminal e o domínio C/D de ligação ao DNA. Uma vez ativado, ocorre a fosforilação e dimerização do receptor com subsequente translocação para o núcleo, onde liga-se com AREs na região promotora dos genes alvo, caracterizando, deste modo, uma resposta genômica (Kimura et al.⁶⁶, 2007; Li, Al-Azzawi⁷⁹, 2009; Tan et al.¹⁴⁵, 2015). Além disso, os andrógenos podem influenciar a expressão de uma variedade de genes que não contém AREs, envolvendo efeitos indiretos por modulação de fatores de transcrição, interações diretas proteína-proteína com o AR ou por interações mediadas por proteínas co-reguladoras (Lee, Chang⁷⁷, 2003). Ressalte-se, também, que os andrógenos podem exercer sua ação mediante rápidas respostas não genômicas, caracterizadas pela ativação de cascatas de transdução de sinal e produção de segundos mensageiros, incluindo o aumento intracelular de cálcio livre e ativação da proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativa por mitógeno (MAPK). Assim, o AR é capaz de ativar vias de sinalização como MAPK/ERK através de um mecanismo independente da atividade transcricional e dessa forma, exercer seus efeitos biológicos (Li, Al-Azzawi⁷⁹, 2009).

Os ligantes para o AR são classificados em agonistas e antagonistas, de acordo com a capacidade de ativar ou inibir a transcrição de genes alvo, modulando a função do receptor (Tan et al.¹⁴⁵, 2015). Antiandrógenos são ligantes do AR que antagonizam a ação hormonal por competir pelo sítio de ligação do receptor, podendo ser classificados em esteroidais ou não-esteroidais. Os antiandrógenos esteroidais possuem limitada aplicação clínica devido seus efeitos adversos, o que levou ao desenvolvimento de fármacos não-esteroidais como a flutamida (FLU) (Singh et al.¹³³, 2000), a qual é principalmente utilizada para o tratamento do câncer de próstata avançado (Nakai et al.⁹⁹, 2015). A FLU compete pelo sítio de ligação do AR, bloqueando a ação endógena e exógena da T e/ou DHT (Singh et al.¹³³, 2000).

2.2.2 Receptor de estrógeno

Os efeitos biológicos dos estrógenos são mediados por receptores hormonais. O primeiro clone do receptor de estrógeno, denominado ER α , foi identificado a partir da linhagem celular MCF-7 de tumor de mama (Green et al.⁵³, 1986). Anos depois, uma segunda isoforma do receptor foi identificada em camundongos, ratos e humanos e denominado ER β (Kuiper et al.⁷², 1996). Receptores de estrógeno (ERs) α e β pertencem a uma superfamília de receptores nucleares que compartilham características estruturais comuns e que atuam como fatores de transcrição, estando localizados no citoplasma ou núcleo (Nilsson et al.¹⁰⁵, 2001).

ER α e ER β apresentam homologia genética, contendo aproximadamente 90% de sequências idênticas de aminoácidos no domínio de ligação ao DNA. Porém, existem diferenças em relação ao domínio NH₂ terminal, o qual codifica uma função de ativação independente do ligante (AF-1), contendo aproximadamente 55% de sequências idênticas de aminoácidos. O domínio AF-1 do ER α é mais ativo na estimulação da expressão gênica a partir de uma variedade de elementos de resposta a estrogênio (EREs) quando comparado ao ER β . Devido a essa diferença no domínio NH₂ terminal, esses dois subtipos podem responder ao estradiol com afinidades diferentes em determinados tecidos-alvo (Kuiper et al.⁷¹, 1997).

A via genômica de ação do receptor de estrógeno envolve a ligação do hormônio ao receptor, induzindo mudanças conformacionais no domínio de ligação do receptor, dissociação de HSPs e recrutamento de proteínas co-ativadoras. As HSPs formam complexos com os receptores localizados no citoplasma ou no núcleo, contribuindo para a alteração na conformação e ativação dos mesmos. A ligação do hormônio ao receptor induz a dissociação destes complexos, levando a formação de homodímeros ou heterodímeros (dimerização) que migram para o núcleo e ligam-se diretamente ao DNA da célula por meio da interação com

EREs localizados na região promotora dos genes alvo (Nilsson et al.¹⁰⁵, 2001; Hall et al.⁵⁵, 2001). Além disso, a ativação do ER pode regular a expressão gênica sem ligar-se diretamente ao DNA e independente da ligação com EREs, envolvendo a modulação de fatores de transcrição que interagem diretamente com o complexo hormônio-receptor (Bjornstrom, Sjoberg¹³, 2005).

A via não genômica é mediada através de ERs associados à membrana, sendo caracterizada por uma resposta rápida ao estímulo hormonal e que não depende da ativação do RNA e síntese proteica, sendo frequentemente associada a várias cascatas de proteínas quinases (Arpino et al.⁴, 2008). Nesse contexto, um terceiro receptor de estrógeno denominado de receptor de estrógeno acoplado à proteína G (GPR30) medeia rápidos eventos de sinalização celular em resposta ao estímulo hormonal, envolvendo quinases, canais iônicos e segundos mensageiros (Marino et al.⁸⁹, 2006; Wang et al.¹⁵⁶, 2014; Sharma, Prossnitz¹²⁸, 2016).

A atividade dos ERs também pode ser modulada pela ação de fármacos antagonistas como o fulvestranto (IC 182.780), o qual é utilizado como tratamento adjuvante do câncer de mama em pacientes com progressão da doença após terapia anti-estrógeno (Ciruelos et al.²⁵, 2014). O fulvestranto (FUL) é um antagonista competitivo do ER, atuando de maneira dose dependente e não possuindo qualquer atividade agonista. A ação do IC 182.780 ocorre por bloqueio da dimerização e transcrição gênica, promovendo a redução dos níveis celulares do ER (Howell⁵⁹, 2006). Em contrapartida, atua sobre receptores GPR30 estimulando a proliferação e migração de células cancerígenas (Pandey et al.¹¹³, 2009), agindo como agonista para esses receptores (Prossnitz et al.¹¹⁸, 2008).

Sabe-se que a ativação dos ERs também pode ocorrer através de estrógenos sintetizados a partir da interconversão hormonal de andrógenos pela ação da enzima P450 aromatase, a qual está presente no tecido ósseo (Yanase et al.¹⁶⁴, 2001). Inibidores da aromatase, tais como o anastrozol (ANA), tem sido utilizados para o tratamento do câncer de mama em pacientes com tumores positivos para receptores de estrógeno (Forbes et al.⁴⁶, 2015), sendo classificados quanto ao tipo (esteroidal e não esteroideal) e quanto a geração (primeira, segunda ou terceira). O ANA é um fármaco não esteroideal de terceira geração (mais seletivo) que compete com os andrógenos pelo sítio ativo da enzima aromatase, formando com este uma ligação reversível e inibindo a síntese de estrógeno por bloqueio da ação enzimática (Berry¹⁰, 2005).

2.3 Alterações dos Níveis Fisiológicos dos Andrógenos Causam o Desequilíbrio de Processos Biológicos nos Gêneros Masculino e Feminino

Os andrógenos exercem a função primária de regulação do sistema reprodutivo, sendo essenciais para o desenvolvimento das características sexuais e manutenção das funções reprodutivas, sobretudo no gênero masculino. Além disso, estão envolvidos na formação/manutenção do esqueleto e no equilíbrio homeostático do organismo em ambos os gêneros (Mooradian et al.⁹⁷, 1987; Riggs et al.¹²¹, 2002).

Com o envelhecimento ocorre uma perda gradual de várias funções fisiológicas que podem comprometer a saúde e qualidade de vida do indivíduo. Embora os homens não experimentem uma queda abrupta dos níveis hormonais como ocorre com as mulheres durante a menopausa, os níveis séricos de T declinam progressivamente com a idade (Bhasin et al.¹¹, 2010; Yeap et al.¹⁶⁷, 2012). Por outro lado, a idade está associada com o aumento da concentração de SHBG, e consequentemente, redução dos níveis de T livre e biodisponível, o que pode levar ao desenvolvimento do hipogonadismo (Feldman et al.⁴³, 2002), o qual está relacionado com o risco de fratura óssea, osteoporose (Tirabassi et al.¹⁴⁷, 2014) e doença periodontal (Steffens et al.¹³⁷, 2012).

Ressalte-se que os níveis séricos de andrógenos também diminuem com a idade em mulheres (Davison et al.³⁴, 2005). Além disso, deficiência androgênica em mulheres pode ser causada por uma série de fatores, incluindo ovariectomia, quimioterapia, radioterapia de ovário, uso de contraceptivos orais e cortisona, estresse agudo e doenças crônicas (Guay, Davis⁵⁴, 2002), podendo causar alterações na função sexual, perda de massa muscular, redução da densidade mineral óssea e aumento do risco de fraturas (Manolagas et al.⁸⁶, 1995; Shifren et al.¹³¹, 2000; Bachmann et al.⁵, 2002).

Por outro lado, níveis elevados de andrógenos em mulheres podem ser causados pela síndrome de ovários policísticos (Morgante et al.⁹⁸, 2015) hiperplasia adrenal congênita (Krysiak et al.⁷⁰, 2016), tumores nos ovários ou nas glândulas adrenais (Glintborg et al.⁵², 2015) e utilização de esteroides anabolizantes sintéticos com finalidades estéticas ou para melhorar o desempenho esportivo de forma ilícita (Nieschlag, Vorona¹⁰³, 2015). Neste sentido, níveis suprafisiológicos de andrógenos estão associados com alterações na função reprodutiva e sexual, mudanças no comportamento/humor, aumento do tônus muscular, hipertensão, risco cardiovascular, dislipidemia e resistência à insulina (Davis³², 1999;

Franquni et al.⁴⁸, 2013; Nieschlag, Vorona¹⁰³, 2015, Onakomaiya, Henderson¹⁰⁸, 2016). Além disso, o tratamento hormonal com andrógenos em homens transexuais (mulheres que mudaram de sexo), está associado com o aumento da massa muscular e do turnover ósseo (Van Caenegem et al.¹⁵¹, 2015).

2.4 O Papel do Osteoclasto no Turnover Ósseo

O tecido ósseo sofre um processo contínuo de renovação e remodelação de acordo com as demandas funcionais, ocorrendo um equilíbrio entre formação e reabsorção óssea, dois processos intermediados respectivamente por osteoblastos e osteoclastos (Cohen²⁶, 2006). Estes são derivados de células progenitoras da linhagem hematopoiética, enquanto aqueles de precursores da linhagem mesenquimal (Narducci et al.¹⁰¹, 2011). Um terceiro tipo celular, os osteócitos, são osteoblastos que foram incorporados em lacunas na matriz e regulam a atividade das células ósseas (Delgado-Calle, Bellido³⁷, 2015). O turnover ósseo está relacionado com uma complexa interação entre diversos tipos de células, incluindo osteoblastos, osteoclastos, bem como uma vasta gama de citocinas, hormônios, fatores de crescimento e quimiocinas (Narducci et al.¹⁰¹, 2011). Desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea, assim como alteração na quantidade e atividade de osteoclastos pode resultar em perda óssea patológica como ocorre na osteoporose (Qi et al.¹¹⁹, 2015), doença de Paget (Teramachi et al.¹⁴⁶, 2014), artrite reumatoide (Duarte³⁹, 2015) e doença periodontal (Steffens et al.¹³⁸, 2015).

Os osteoclastos são células que tem como principal função a reabsorção óssea. A proliferação e diferenciação dos progenitores formam pré-osteoclastos mononucleados que são recrutados da medula óssea para os locais onde a matriz óssea será reabsorvida (Lerner⁷⁸, 2000). Em seguida, sofrem fusão via DC-STAMP (Yagi et al.¹⁶³, 2005) e/ou ATP6V0d2 (Oh et al.¹⁰⁶, 2015), formando osteoclastos maduros multinucleados. A formação osteoclástica também pode ocorrer por fusão entre células mononucleadas com multinucleadas, e entre células multinucleadas (Jansen et al.⁶², 2012). Além disso, microRNAs (miRNAs) também podem estar envolvidos na fusão de osteoclastos (Dou et al.³⁸, 2014). Por outro lado, osteoclastos multinucleados também podem sofrer fissão, dividindo-se em células compartimentadas e com núcleo reduzido (Lerner⁷⁸, 2000; Jansen et al.⁶², 2012). Pré-osteoclastos e osteoclastos maduros apresentam positividade na coloração para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) (Nijweide et al.¹⁰⁴, 1986).

Osteoclastos multinucleados são apenas encontrados em contato com a superfície do osso, ou dentro de uma lacuna na matriz óssea formada por sua própria atividade reabsortiva (lacuna de Howship), não circulando na corrente sanguínea. Possuem uma região denominada borda em escova, no interior da qual utilizam bombas de prótons para acidificar o compartimento extracelular. Essas bombas liberam na lacuna de Howship prótons H^+ e disponibilizam íons Cl^- gerados intracelularmente pela ação da enzima anidrase carbônica II, promovendo a formação de HCl e a diminuição do pH (Lerner⁷⁸, 2000).

Nas extremidades da borda em escova existem zonas citoplasmáticas desprovidas de organelas, conhecidas como “zonas claras”, que são locais de adesão à matriz óssea. Essas regiões são ricas em filamentos de β -actina, formando um “anel de actina” que é um marcador de osteoclasto ativo. A interação entre o anel de actina e a matriz óssea forma a zona de selamento, composta pelas lacunas de Howship citadas anteriormente. Estas isolam o sítio de reabsorção no qual são secretadas enzimas proteolíticas, MMPs, TRAP e catepsina K. Esta última enzima é uma cisteína protease lisossomal expressa em osteoclastos, responsável pela degradação enzimática da porção orgânica da matriz óssea durante a atividade reabsortiva (Bai et al.⁶, 2010; Panwar et al.¹¹⁴, 2016). A adesão de osteoclastos à superfície óssea é essencial para a reabsorção, sendo este processo mediado pela ação de proteínas localizadas na superfície celular, principalmente à ITGB3 (codificada pela $\alpha v \beta 3$ integrina), a qual é capaz de ligar-se a peptídeos contendo a sequência de aminoácidos Arg-Gly-Asp presentes em proteínas da matriz óssea como osteopontina e sialoproteína óssea, estando envolvida em interações célula-célula e célula-matriz (Chellaiah, Hruska²¹, 2003).

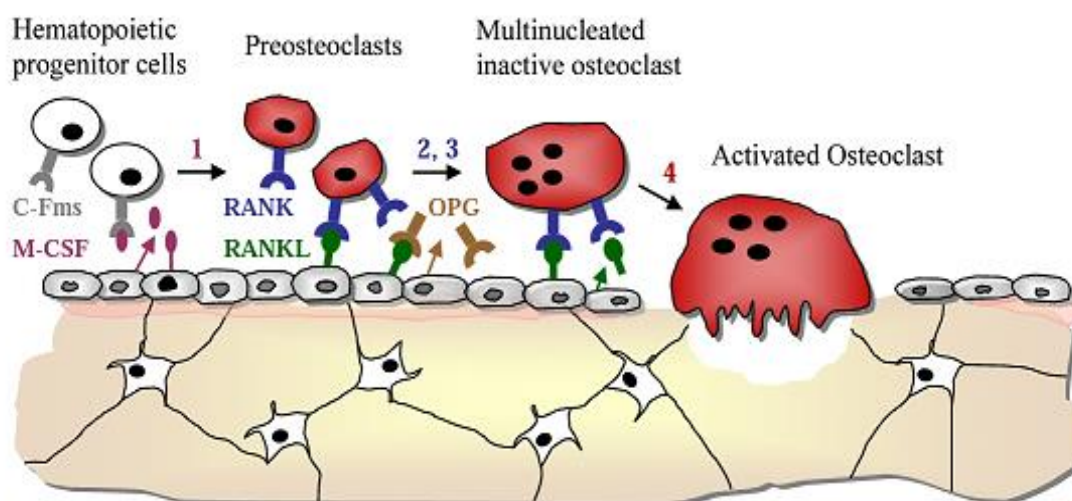
O processo de formação de osteoclastos, também conhecido como osteoclastogênese, é um mecanismo mediado pela regulação do sistema RANK/RANKL/OPG (Figura 3). Inicia-se a partir da proliferação de células progenitoras hematopoiéticas, devido à ligação do fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) ao receptor expresso na superfície celular (c-Fms). A ligação do M-CSF induz a autofosforilação do receptor, promovendo interações com proteínas adaptadoras e indução de diferentes vias de sinalização intracelular como ERK1/2, PI3K e MAPKs (Yasuda et al.¹⁶⁶, 1998; Bourette, Rohrschneider¹⁴, 2000). A depleção do c-Fms em camundongos causa o desenvolvimento de severa osteopetrose, evidenciando a importância funcional do receptor para o homeostase óssea (Dai et al.³⁰, 2002).

O ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL) é um membro da família do fator de necrose tumoral (TNF), expresso por osteoblastos, células estromais e linfócitos T e B ativados, o qual liga-se com o seu receptor (RANK) presente tanto em células precursoras como em osteoclastos multinucleados (Jules et al.⁶³, 2010). A sinalização

RANKL /RANK regula a diferenciação e fusão de células progenitoras em preosteoclastos e osteoclastos multinucleados, bem como a sua ativação e maturação (Boyce, Xing¹⁵, 2007). O RANK ativa o receptor associado ao fator de necrose tumoral-6 (TRAF6) que está relacionado com as vias de sinalização NF- κ B e MAPKs. A ativação dessas vias induz a expressão do fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1) que regula positivamente a osteoclastogênese sob estímulo do RANKL (Matsuo et al.⁹², 2004; Miyamoto⁹⁵, 2011).

A expressão do RANKL por osteoblastos é regulada por diversas citocinas e hormônios, incluindo os andrógenos, os quais tem a capacidade de prevenir a osteoclastogênese tanto direta quanto indiretamente. (Steffens et al.¹³⁹, 2014). Além disso, osteoblastos também expressam osteoprotegerina (OPG), a qual é uma proteína solúvel com elevada afinidade pelo RANK que bloqueia a ligação do RANKL e impede a diferenciação das células progenitoras de osteoclastos (Boyce, Xing¹⁵, 2007). Hormônios esteroides sexuais regulam a expressão de OPG e RANKL in vitro (Hofbauer, Schoppet⁵⁶, 2004) e in vivo (Franklin et al.⁴⁷, 2006), sendo o eixo RANK/RANKL/OPG o principal regulador da osteoclastogênese (Shaw, Gravallese¹²⁹, 2015).

Figura 3 - Ilustração esquemática da osteoclastogênese. Este processo inclui a proliferação de células progenitoras hematopoiéticas e diferenciação em preosteoclastos, induzidas pelo M-CSF (1), A sinalização RANKL /RANK regula a fusão de preosteoclastos em osteoclastos multinucleados (2,3), bem como a sua ativação e maturação (4).



Fonte: Brechter¹⁶, 2006.

2.5 Efeito Regulador de Hormônios Esteróides Sexuais sobre o Metabolismo Ósseo

O osso é um tecido metabolicamente ativo que expressa receptores de andrógenos e estrógenos, bem como enzimas que metabolizam os hormônios esteroides sexuais (Colvard et al.²⁷, 1989; Laurent et al.⁷⁴, 2014). Os efeitos biológicos dos andrógenos sobre o osso podem ocorrer diretamente via AR ou indiretamente por ligação ao ER α ou ER β , como consequência a aromatização em E2 (Syed, Khosla¹⁴³, 2005; Sims et al.¹³², 2002). Os hormônios esteroides sexuais são importantes reguladores do crescimento, maturação e manutenção do esqueleto em homens e mulheres (Callewaert et al.¹⁷, 2010). Assim, a diminuição dos níveis hormonais está relacionada com a perda de massa óssea em ambos os gêneros (Gielen et al.⁵⁰, 2011; Gambacciani, Levancini⁴⁹, 2014).

Nesta perspectiva, a deficiência androgênica em homens exerce efeitos no tecido ósseo semelhantes aos observados em mulheres pós-menopausadas (Laurent et al.⁷⁵, 2013). Similarmente, pacientes com câncer de próstata submetidos a terapia de privação androgênica apresentam um maior risco para o desenvolvimento de osteoporose e fraturas ósseas (Lassemillante et al.⁷³, 2015). Em modelos animais, a deficiência androgênica em ratos machos causa redução do volume ósseo trabecular e aumento da porosidade, porém a terapia de reposição hormonal é capaz de prevenir essas alterações degenerativas em animais orquiectomizados (Chin, Ima-Nirwana²⁴, 2015). Porém, não apenas níveis baixos, mas também níveis elevados de andrógenos afetam o equilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Steffens et al.¹³⁷, 2012). De modo semelhante, a superativação do AR inibe a formação e prejudica as propriedades biomecânicas do osso, sugerindo que os efeitos anabólicos dos andrógenos sobre o tecido ósseo estão associados com situações de deficiência hormonal, porém na presença de níveis fisiológicos podem favorecer à perda óssea (Wiren et al.¹⁶⁰, 2008).

Além disso, os andrógenos estão associados com alterações no sistema imune inato e adaptativo. Deficiência hormonal promove a ativação de linfócitos B e T, as quais induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas na reabsorção óssea (Horowitz et al.⁵⁷, 2010; Pacifici¹¹², 2012). Os efeitos dos hormônios masculinos podem ocorrer diretamente via AR ou indiretamente pela aromatização da testosterona em estrógeno, como comentado anteriormente. Estudos em camundongos fêmeas knockout para a enzima aromatase, demonstraram um aumento do turnover ósseo, osteopenia e diminuição da espessura/volume trabecular, sugerindo um efeito indireto da T sobre o metabolismo ósseo (Oz et al.¹¹¹, 2000).

Por outro lado, existem evidências que a deleção do AR em camundongos fêmeas não causa alterações ósseas (Kawano et al.⁶⁵, 2003).

Atualmente tem se discutido os riscos e benefícios da terapia de reposição com T em mulheres pós-menopausadas, a qual pode favorecer ao aumento da densidade mineral óssea (Davey³¹, 2012; Davis, Wahlin-Jacobsen³³, 2015), sugerindo que os andrógenos podem ter um papel na modulação do metabolismo ósseo em fêmeas. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos neste processo.

2.6 Efeito Regulador de Hormônios Esteróides Sexuais sobre Osteoclastos

Estudos mostram o efeito regulador dos hormônios esteroides sexuais sobre células ósseas, as quais expressam AR, ER α e ER β (Bellido et al.⁹, 1995; Liu et al.⁸², 2007; Ucer et al.¹⁵⁰, 2015). Além disso, a distribuição dos receptores parecem não variar com o gênero, e acredita-se que níveis semelhantes de AR e ERs são encontrados em células ósseas de machos e fêmeas (Vanderschueren et al.¹⁵⁵, 2004). Há evidências que os andrógenos exercem efeitos sobre o metabolismo ósseo através da ativação de ARs presentes em osteoblastos, assim como podem inibir a reabsorção óssea por regular a diferenciação e atividade de osteoclastos (Pederson et al.¹¹⁷, 1999; Huber et al.⁶⁰, 2001; Michael et al.⁹³, 2005).

Huber et al.⁶⁰ (2001) demonstraram que os andrógenos inibem a formação de osteoclastos a partir de células precursoras da medula óssea de camundongos orquiectomizados e de macrófagos murinos RAW264.7. Adicionalmente, relataram que células precursoras de fêmeas ovariectomizadas apresentaram resultados semelhantes, mesmo quando tratadas com E2. A deficiência de estrógeno em ratas está associada com o aumento da osteoclastogênese e reabsorção óssea (Koh et al.⁶⁸, 2009). In vitro, a terapia de reposição hormonal com E2 reduz a expressão de mRNA de Ctsk e TRAP em osteoclastos derivados de células RAW264.7, regulando negativamente a reabsorção óssea (Imai et al.⁶¹, 2009).

Sabe-se que os estrógenos induzem a apoptose de osteoclastos por um mecanismo não clássico mediado pelo ER α . O tratamento com DHT promove a apoptose de osteoclastos maduros com deleção do ER α , sugerindo que os andrógenos exercem um efeito direto mediado pelo AR. In vivo, ER α inibe a reabsorção óssea por ação direta em osteoclastos de fêmeas, mas não de machos (Nakamura et al.¹⁰⁰, 2007; Martin-Millan et al.⁹¹, 2010).

Chen et al.²³ (2001) demonstraram que T e DHT inibem a formação de osteoclastos induzida por paratormônio. No entanto, os grupos tratados com associações de T com FUL ou inibidor da aromatase, não mostraram alteração na formação de osteoclastos, indicando um

mecanismo de ação dos andrógenos independente de ERs. Além disso, o tratamento com FLU reverteu os efeitos inibitórios dos andrógenos, porém isoladamente não afetou a osteoclastogênese.

O AR tem função supressora na atividade de osteoclastos, inibindo a reabsorção óssea. In vivo, camundongos knockout para o AR apresentam um aumento do número e do tempo de vida de osteoclastos, e por conseguinte, aumento da reabsorção óssea (Yeh et al.¹⁶⁸, 2002; Kawano et al.⁶⁵, 2003). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou in vivo um aumento do número de osteoclastos em ratos orquiectomizados. In vitro, demonstramos que T inibiu de maneira dose dependente a diferenciação de osteoclastos a partir de macrófagos murinos RAW264.7. Como era esperado, a inibição farmacológica do receptor de andrógeno antagonizou os efeitos da T, regulando positivamente a diferenciação e atividade de osteoclastos (Steffens et al.¹³⁸, 2015).

De modo semelhante, Michael et al.⁹³ (2005) demonstraram que T inibe de maneira dose dependente a diferenciação e atividade de osteoclastos derivados de sangue periférico humano, assim como o potencial da FLU em antagonizar os efeitos da T e favorecer a osteoclastogênese. Além disso, utilizando um modelo de co-cultura com osteoblastos, observaram um aumento da produção de OPG, sugerindo que T pode exercer um efeito indireto sobre osteoclastos.

Nesta perspectiva, nosso grupo de pesquisa também mostrou in vitro que níveis fisiológicos de testosterona (10nM), têm a capacidade de prevenir a osteoclastogênese através da diminuição da expressão de RANKL por osteoblastos murinos (Steffens et al.¹³⁹, 2014). Similarmente, a deleção do AR em osteoblastos aumenta a expressão de RANKL (Kawano et al.⁶⁵, 2003). De fato, andrógenos estimulam osteoblastos a produzirem OPG e reduzem a expressão de RANKL através da ativação da via de sinalização Wnt, exercendo efeitos indiretos sobre a osteoclastogênese. Ressalte-se, também, que os andrógenos podem atuar diretamente sobre células precursoras de osteoclastos, reduzindo a expressão do mRNA de marcadores de diferenciação, como TRAP e calcitonina (Sun et al.¹⁴¹, 2013).

A deleção do gene para AR em células formadores de osso (osteoblastos e osteócitos) tem sido associado com o aumento do número de osteoclastos e redução do volume trabecular em camundongos machos. Em fêmeas, o papel do AR na regulação da homeostase óssea permanece pouco compreendido, porém existem evidências que os andrógenos estão associados com a manutenção da arquitetura do osso trabecular (Maatta et al.⁸³, 2013). Com base nesses estudos, pode-se discutir se os efeitos dos andrógenos sobre osteoclastos são, ao

menos em parte, mediados por células da linhagem dos osteoblastos (Weinstein et al.¹⁵⁸, 1997).

Wang e Stern¹⁵⁷ (2011) avaliaram as ações da T e E2 (10nM) sobre osteoclastos derivados de células precursoras mononucleares de sangue periférico humano de homens e mulheres. Os resultados mostraram que os hormônios sexuais afetam a expressão gênica de osteoclastos, porém com diferentes respostas nos dois gêneros. As células provenientes de mulheres foram mais sensíveis ao E2, porém o tratamento com T promoveu maior expressão gênica quando comparado com as células de homens, sugerindo que a resposta hormonal sobre osteoclastos pode variar de acordo com o gênero.

No entanto, é importante salientar que a ausência de efeitos dos andrógenos sobre osteoclastos também são relatadas na literatura (Tobias, Chambers¹⁴⁸, 1991; Turner¹⁴⁹, 2008). Além disso, há evidências que os efeitos anti-reabsortivos dos andrógenos não são devido a ação hormonal direta sobre osteoclastos (Kawano et al.⁶⁵, 2003; Ucer et al.¹⁵⁰, 2015; Sinnesael et al.¹³⁴, 2015). Vale ressaltar que as ações dos andrógenos via receptores podem ser mediadas através de mecanismos não genômicos, por meio da ativação de vias de sinalização e de fatores de transcrição, o que pode explicar a complexidade na compreensão do efeito hormonal em nível celular e molecular. T inibe a ativação de MAPKs (p38, ERK e JNK) em células de medula óssea (Liu et al.⁸¹, 2006) bem como a ativação de NF-kB em osteoclastos (Wiren et al.¹⁶¹, 2004) e monócitos (Cutolo et al.²⁹, 2005).

Diante do exposto, verifica-se que as ações diretas dos andrógenos sobre osteoclastos permanecem controversas e podem envolver mecanismos complexos. Além disso, poucas informações são encontradas na literatura sobre os efeitos dos hormônios androgênicos em células de fêmeas.

3 PROPOSIÇÃO

Esta seção apresenta a hipótese testada e os objetivos do presente estudo.

3.1 Hipótese Testada

Os hormônios androgênicos apresentam capacidade de alterar a diferenciação de osteoclastos e sua atividade, bem como modular a expressão de receptores para hormônios sexuais.

3.2 Objetivo Geral

Avaliar, in vitro, o efeito dos hormônios androgênicos sobre células precursoras de osteoclastos de camundongos fêmeas.

3.3 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o efeito de andrógenos sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos.
- b) Avaliar o estágio da diferenciação osteoclástica por RT-qPCR, usando como alvos RANK, NFATc1, $\beta 3$ integrina e Catepsina K.
- a) Avaliar a modulação da expressão do AR, ER α e ER β por Western Blot.

4 MATERIAL E MÉTODO

Esta seção apresenta os materiais e a metodologia empregada para a realização do presente estudo.

4.1 Animais

O protocolo experimental deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Experimentação Animal da Faculdade de Odontologia de Araraquara (Processo CEUA nº 19/2013) (Anexo A) e realizado de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CONCEA).

Foram utilizadas como precursoras de osteoclastos células da medula óssea de camundongos fêmeas C57BL/6 com 3-5 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas em um ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade (65-75%) e ciclos de luz (12h claro-12h escuro) controlados e alimentados com água e ração *ad libitum*, até o momento da realização dos experimentos.

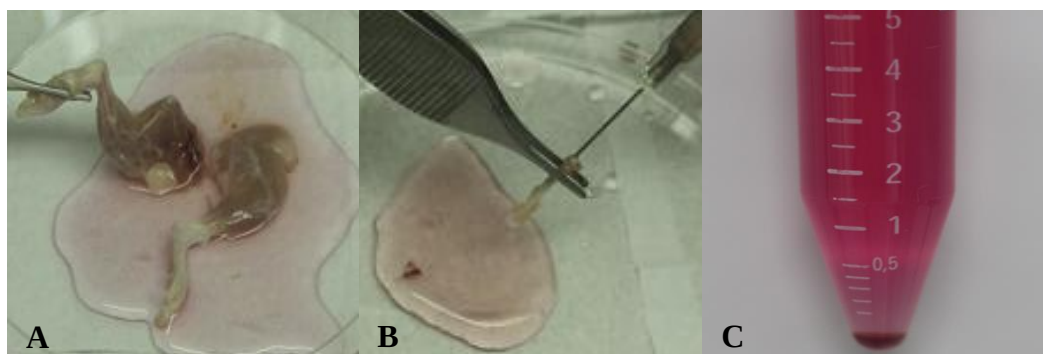
4.2 Extração de Células da Medula Óssea

A extração das células da medula óssea (CMO) foi realizada após o sacrifício dos camundongos através do procedimento de deslocamento cervical e remoção cirúrgica e estéril dos fêmures e tíbias bilaterais em câmara de fluxo laminar. Após a dissecação, as epífises ósseas foram seccionadas com o auxílio de uma tesoura para permitir a visualização da luz do canal medular. Os ossos foram posicionados sobre uma placa de Petri e a extração das CMO foi realizada através da lavagem do canal medular (“flushing”) com meio de cultura pré-aquecido à 37°C (α -MEM—GIBCO, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor (HI FBS, GIBCO) 1% de penicilina-estreptomicina (100 IU/mL-100 $\mu\text{g/mL}$, GIBCO), conforme protocolo descrito por Arai et al.³ (1999) (Figura 4-A e B).

Após a coleta, as CMO foram transferidas para um tubo de centrifugação de 15mL estéril e colocadas em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos para sedimentação dos detritos. Em seguida, a suspensão foi coletada, transferida para um outro tubo e centrifugada

por 10 min à 1.200 rpm, à temperatura de 10-15°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” celular ressuspense em 0,5mL de meio de cultura α -MEM contendo 10% FBS e 1% penicilina-estreptomicina (Figura 4-C). Após a ressuspensão, uma alíquota das células foi diluída e corada para a contagem celular em microscópio óptico pelo método de exclusão do azul de Trypan com o auxílio de uma câmara de Neubauer. Este reagente é excluído do citoplasma de células viáveis, pois pode atravessar a membrana celular apenas de células mortas, tornando-as azuis. Deste modo, foram contadas as células viáveis presentes no quadrado central. A concentração celular foi ajustada para 3×10^5 células/mL para a posterior realização dos experimentos.

Figura 4 - Membros posteriores dos animais antes da dissecação para remoção do fêmur e tíbia (A); “Flushing” com meio de cultura no interior do osso (B); “Pellet” celular formado após a centrifugação (C).



Fonte: Elaboração própria

4.3 Preparo das Soluções dos Hormônios Androgênicos Derivados Sintéticos da Testosterona, Diidrotestosterona e Antagonistas dos Receptores de Hormônios Sexuais.

Foram utilizados hormônios androgênicos derivados sintéticos da testosterona (T; Durateston, MSD, Campinas, SP, Brasil) e di-hidrotestosterona (DHT; 5α -Androstan-17 β -ol-3-one, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), antagonistas dos receptores de hormônios sexuais, como a flutamida (FLU; antagonista do receptor de andrógeno; Sigma-Aldrich) e/ou fulvestranto (FUL; antagonista do receptor de estrógeno; Sigma-Aldrich) associados ou não a testosterona (T). O anastrozol (ANA; Sigma-Aldrich) também em associação ou não a T foi utilizado para inibição farmacológica da enzima aromatase. Todos os fármacos foram diluídos em etanol (ET; Sigma-Aldrich) obtendo-se a concentração das soluções de estoque. A

concentração final dos fármacos foi obtida pela diluição das soluções (estoque e trabalho) em meio de cultura e determinada a partir da realização de um experimento piloto prévio. Etanol a 0,01 % foi usado como controle, com base no fármaco com menor diluição.

4.4 Grupos Experimentais

Utilizou-se 1 grupo controle e 8 grupos experimentais, sendo que cada grupo era formado por no mínimo 3 amostras. Os grupos foram divididos da seguinte forma:

Grupo ET (G1): Meio de cultura contendo ET na concentração de 0,01%. **Grupo T (G2):** Meio de cultura contendo T na concentração de 1nM. **Grupo DHT (G3):** Meio de cultura contendo DHT na concentração de 1nM. **Grupo ANA (G4):** Meio de cultura contendo ANA na concentração de 10nM **Grupo T+ANA (G5):** Meio de cultura contendo T em associação com ANA na concentração de 1nM e 10nM, respectivamente. **Grupo FLU (G6):** Meio de cultura contendo FLU na concentração de 10nM. **Grupo T+FLU (G7):** Meio de cultura contendo T em associação com FLU na concentração de 1nM e 10nM, respectivamente. **Grupo FUL (G8):** Meio de cultura contendo FUL na concentração de 10nM. **Grupo T+FUL (G9):** Meio de cultura contendo T em associação com FUL na concentração de 1nM e 10nM, respectivamente.

4.5 Cultura de Células

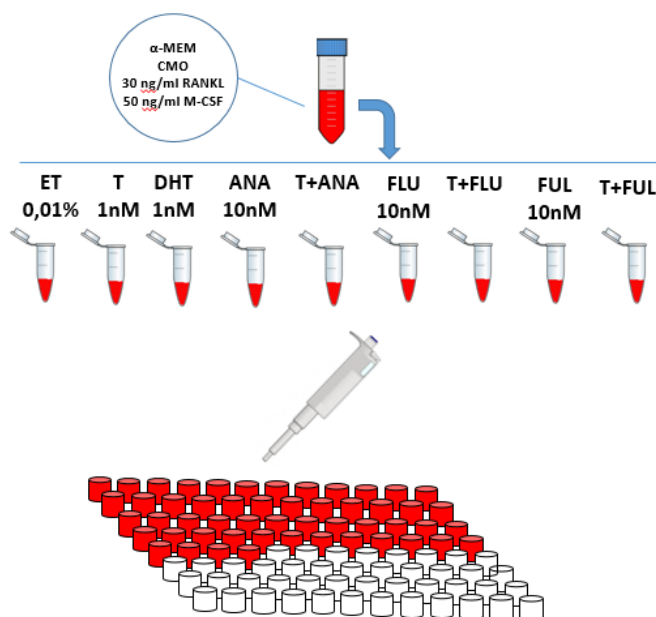
Brevemente, após a contagem celular e ajuste da concentração, a diferenciação dos osteoclastos foi induzida adicionando-se 50 ng/mL de M-CSF (Peprotech, Rocky Hill, NJ) e 30 ng/mL de RANK-L (Peprotech) em meio α -MEM contendo 10% de soro fetal bovino inativado e 1% penicilina-estreptomicina.

Em seguida, as células dos diferentes grupos experimentais foram distribuídas em microtubos de centrifugação tipo eppendorf para a administração dos fármacos e semeadas em placas de 96 poços, na densidade de 6×10^4 células/0.2mL/poço, em triplicata, sendo mantidas a 37°C, sob uma atmosfera úmida com 5% de CO₂ e 95% de ar (Figura 5).

O meio de cultura condicionado com os fármacos foi substituído em intervalos de 48h, retirando-se 100 μ L com o auxílio de uma micropipeta e adicionando o mesmo volume de meio condicionado com os tratamentos propostos. As culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido e o término do experimento ocorreu após 5 dias.

Cada experimento foi repetido por no mínimo três vezes, de forma independente, realizado a partir das células extraídas dos fêmures e tíbias bilaterais de três animais, sendo coletadas e plaqueadas individualmente e contendo os mesmos grupos e réplicas.

Figura 5 - Esquema representativo demonstrando o cultivo das células em placas de 96 poços em meio de cultura condicionado com os fármacos; fotomicrografia das células cultivadas após o plaqueamento.

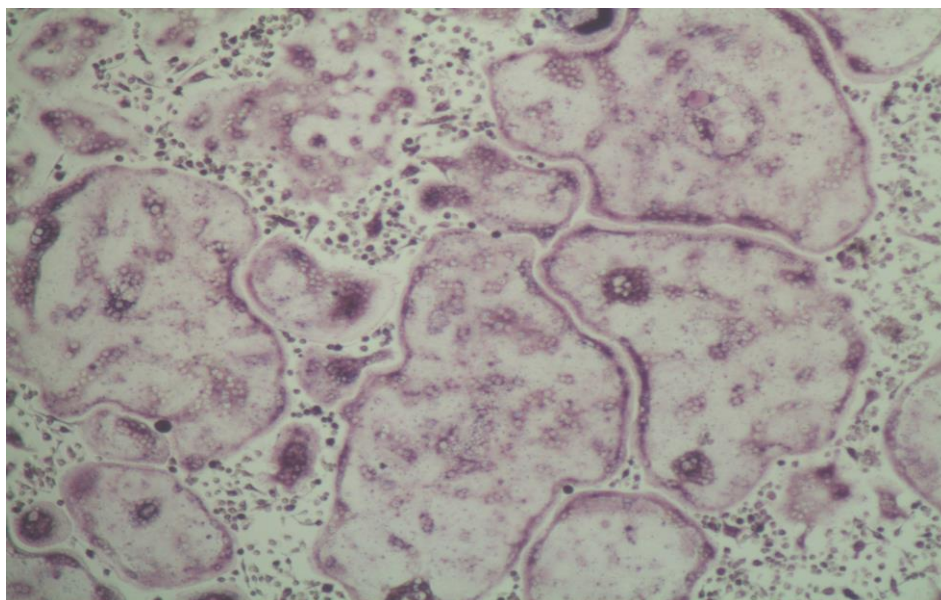


Fonte: Elaboração própria

4.5.1 Coloração para fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

Ao final do período experimental, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados com solução salina tamponada de fosfato de pH 7,4 (PBS; Phosphate Buffered Saline, Sigma-Aldrich). As células foram fixadas em paraformaldeído 4% por 05 minutos, lavadas duas vezes em 100µL de PBS e em seguida coradas por TRAP (Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato) (Figura 6), seguindo protocolo proposto pelo fabricante do Acid Phosphatase, TRAP-kit (Sigma Aldrich).

Figura 6 - Cultura de Osteoclastos corada com TRAP. Observa-se a presença de células TRAP⁺, gigantes e multinucleadas, além de células mononucleares.



Fonte: Elaboração própria

4.6 Impacto de Andr6genos na Diferencia73o de Osteoclastos

Esta se733o apresenta a metodologia empregada para a realiza733o do ensaio de diferencia733o.

4.6.1 Contagem celular e avalia733o da forma7333o de osteoclastos

A identifica7333o dos osteoclastos foi realizada atrav3s de colora7333o com TRAP. Alternativamente, os n3cleos celulares foram contra-corados com hematoxilina. Realizou-se a quantifica7333o da diferencia7333o osteocl3stica por meio da contagem manual sob microscopia de luz, considerando-se osteoclastos como c3lulas multinucleadas TRAP-positivas contendo 3 ou mais n3cleos. Foram tra7333adas linhas verticais e horizontais no fundo da placa de cultura utilizando caneta para retroprojetor, de forma que os po733os ao serem visualizados sob microscopia 3ptica se mostrassem divididos em quatro quadrantes. A contagem foi realizada por dois examinadores cegos, independentes e calibrados, onde em cada po733o eram contados osteoclastos presentes nos quatro quadrantes e sobre as linhas que os delimitavam.

4.6.2 Avalia7333o do Est3gio de Diferencia7333o Osteocl3stica por RT-qPCR

Esta se7333o apresenta os passos para a an3lise da express3o g4nica relativa por RT-qPCR.

4.6.2.1 Extra73333o de RNA e RT-qPCR em tempo real

O est3gio da diferencia73333o osteocl3stica foi avaliado por transcri73333o reversa seguida da rea73333o em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), por meio da quantifica73333o da express33o de mRNA, usando como alvos RANK, NFATc1, β 3 integrina e Catepsina K. As c3lulas provenientes de 6 animais foram cultivadas separadamente em placas de 96 po733os, em quadruplicata, seguindo o protocolo descrito anteriormente. Ao t3rmino do per3odo experimental, o sobrenadante foi descartado e as c3lulas lisadas com 100 μ L/po733o de tamp3o de lise do kit RNAqueous-4PCR (Ambion; Life Technologies). Os lisados celulares foram coletados das r3plicas de cada grupo experimental por animal e acondicionados em microtubos de centrifuga7333o tipo eppendorf de 1.5 ml para a obten73333o de um “pool”. Em seguida, foram armazenadas em freezer -20°C at3 o momento da extra73333o de RNA total e RT-qPCR.

4.6.2.2 Extração de RNA total

A extração do RNA total das 54 amostras (9 grupos experimentais x 6 animais) foi realizada com o kit RNAqueous-4PCR (Ambion; Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

Os lisados celulares previamente armazenados foram homogeneizados e alíquotas de 100µL foram transferidas para microtubos de centrifugação. Etanol absoluto (50µl) foi adicionado aos lisados antes de transferi-los para cartuchos de microfiltro compostos por uma membrana de sílica que possui afinidade para a ligação com o RNA presente na amostra. Na sequência, foram centrifugados por 10 segundos a 13.000 rpm (13.400-16.500 g) e realizadas sucessivas lavagens para a remoção de impurezas e eluição do ácido desoxirribonucleico.

A quantificação e pureza das amostras de RNA foram estimadas em um espectrofotômetro de microplaca (Synergy H1, Biotek, EUA) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente. Foram utilizadas apenas amostras livre de contaminantes ($A_{260}/A_{230} \sim 1,8$) e de proteínas ($A_{260}/A_{280} = 1,8-2,0$).

4.6.2.3 Síntese de cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) ao RNA de fita simples foi realizada utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit por reação de transcrição reversa (RT) a partir do RNA total extraído e quantificado das amostras de cada grupo experimental. Para cada amostra foram utilizados 300ng de RNA total e o volume ajustado para 10 µL com água ultrapura, adicionando à reação uma solução de 2X RT Master Mix (2µL de 10X RT Buffer, 0.8µL de 25X dNTP Mix, 2µL de 10X RT Random Primers; 1µL de MultiScribe Reverse Transcriptase e 4.2µL de Nuclease-free H₂O, totalizando um volume de 10µl/reação), segundo o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas e incubadas em termociclador (aparelho MyCycler - Bio-Rad, Califórnia, EUA) para a realização da reação de transcrição reversa em ciclos programados da seguinte forma: 25°C por 10 minutos, 37°C por 120 minutos, 85°C por 5 minutos.

4.6.2.4 PCR em tempo real

Após o término da reação de transcrição reversa e produção do cDNA, iniciou-se a reação em cadeia da polimerase em tempo real utilizando o aparelho *StepOne Real Time PCR System*. A detecção da expressão gênica na amostra foi realizada utilizando o sistema TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; Life Technologies- Califórnia - USA) que inclui além dos primers específicos para os genes alvo uma sonda conjugada com um fluoróforo e um “quencher”.

Inicialmente foi estabelecida a curva padrão utilizando diluições seriadas (1:1; 1:10; 1:100; 1:1000) de um “pool” contendo 2µL do cDNA de cada amostra, além de dois controles negativos que continham o mix da reação mais os primers, na ausência do cDNA. As amostras de cDNA foram diluídas 40 vezes e as reações foram feitas em placas de 96 poços (MicroAmp Fast Optical, Applied Biosystems) para um volume final de 15µL/reação, contendo 7,5µL do TaqMan Fast Universal PCR Master Mix, 0,75µL do primer para cada gene alvo, 4,5µL do cDNA para cada amostra e água. Os primers utilizados para amplificação dos genes alvo de camundongos são desenhados e otimizados pelo fabricante (Applied Biosystems) e estão descritos na Tabela 1. O gene utilizado como normalizador dos experimentos foi o GAPDH, considerado um controle endógeno por ser expresso constitutivamente e não sofrer a interferência de tratamentos. A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: 50° C por 2 min, 95° C por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60° C por 1 minuto.

Para avaliar a expressão gênica relativa entre as diferentes amostras foi utilizado o método comparativo Delta-Delta Ct ($\Delta\Delta Ct$), comparando a eficiência de amplificação dos genes-alvo em relação ao controle endógeno (GAPDH), denominado “housekeeping”.

Tabela 1 - Primers utilizados para a reação de amplificação do cDNA.

Gene	Reference	Reference Sequence (NCBI)	Amplicon Length (pb)
<i>Tnfrsf1</i>	Mm00437132_m1	NM_009399.3	65
<i>NfAtc1</i>	Mm00479445_m1	NM_001164109.1	75
<i>Ctsk</i> (Cathepsina k)	Mm00484039_m1	NM_007802.4	73
<i>Itgb3</i> ($\beta 3$ integrina)	Mm00443980_m1	NM_016780.2	64
<i>Gapdh</i>	Mm99999915 g1	NM_008084.2	107

Fonte: Adaptado do site da Applied Biosystems

4.7 Western Blot

A modulação da expressão de receptores para andrógenos (AR) (SC-816 rabbit monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA) e estrógenos (ER) α (ab32063 rabbit monoclonal, Abcam, Cambridge, EUA) e β (ab3576 rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, EUA) pelos tratamentos propostos foi avaliada por Western Blot. Brevemente, osteoclastos foram cultivados em placas de 12 poços a uma densidade de 6×10^5 células/poço/2mL, conforme o protocolo experimental descrito anteriormente. O experimento foi realizado em quadruplicata biológica e repetido por duas vezes, contendo um grupo controle: ET (0,01%) e quatro grupos experimentais: T (1nM); DHT (1nM); FLU (10nM) e FUL (10nM).

Transcorridos cinco dias do início do experimento, o lisado de células foi coletado utilizando-se RIPA buffer (70 μ L/poço), sobre o gelo, contendo inibidor de protease (Protease Inhibitor Cocktail tablet, EDTA-free, Ultra-Cruz). As amostras foram diluídas 1:3 em água destilada e a quantificação proteica foi realizada pelo método de Bradford (Quick Start Bradford 1x Dye Reagent, Bio-Rad Lab. Inc., EUA). Para cada amostra, utilizou-se 40 μ g de proteína total diluída em um tampão contendo 3X SDS (Sample Buffer Blue) e DTT (Dithiothreitol) desnaturada por aquecimento a 95°C por 05 minutos, seguido de choque térmico em gelo por 10 minutos.

Então, preparou-se e correu o gel de poliacrilamida à 10% para separação das proteínas por eletroforese a 100 V constantes por 60 minutos. Em seguida, realizou-se a transferência para membranas de nitrocelulose a 300mA constante, overnight. Para a solução de bloqueio, utilizou-se o BSA 5% em TBS-T por 1 hora, seguido de lavagens com solução de TBS-T e incubação das membranas com diluições otimizadas dos anticorpos primários (Tabela 2), overnight a 4°C, sob agitação. Na fase seguinte, as membranas foram lavadas em TBS-T e incubadas com anticorpo secundário conjugado a HRP (sc-2030, Santa Cruz, 1:2000) por 1 hora (sob agitação, a 4°C), desenvolvimento com substrato quimioluminescente (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific), seguido de visualização e documentação em tempo real por câmara para quimioluminescência (Chemi-Doc MP, Bio-Rad, EUA). As bandas identificadas referentes às proteínas alvo, foram quantificadas por meio de densitometria óptica através do software ImageLab/Chemi-Doc MP. A β -actina foi utilizada como controle endógeno para normalização e comparação dos resultados.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados nas análises por Western blot.

Anticorpo	Código	Diluição
Receptor de Andrógeno (AR)	SC-816	1:500
Receptor de Estrógeno alfa (ER α)	AB32063	1:1000
Receptor de Estrógeno beta (ER β)	AB3557	1 ug/ml
Beta Actina	AB8227	1:1000
Anticorpo Secundário (HRP)	SC-2030	1:2000

Fonte: Elaboração própria

4.8 Impacto de Andrógenos na Atividade de Osteoclastos: Ensaio de Atividade

O impacto dos andrógenos sobre a atividade dos osteoclastos foi determinada por *pit assays*, realizando as culturas em placas de 96 poços revestidas com fosfato de cálcio sintético (Osteologic Corning Plate, Corning), como descrito anteriormente e seguindo as instruções do fabricante.

Após o término do período experimental, o sobrenadante foi descartado e as células lavadas rapidamente com hipoclorito de sódio a 1% e posteriormente com água Milli-Q por três vezes. As placas foram secas em temperatura ambiente por 24 horas e fotografadas em microscópio invertido com câmera acoplada (Lumenera's INFINITY3-1) na objetiva de 4x (amplificação total 40x), de forma que os poços de reabsorção fossem visualizados como áreas claras. Na próxima etapa, utilizando-se o software *ImageJ* (Figura 7) as imagens obtidas que possuíam 12 MB em RGB, foram reduzidas para 3 MB com 8 bits (Figura 8) e binarizadas, utilizando-se da ferramenta *Threshold* (limiarização) no menu *Image/Adjust*, com inversão das tonalidades de branco e preto (Figura 9). A partir da imagem binária e com o auxílio do software *ImageTool*, foi possível calcular a atividade osteoclástica entre os diferentes grupos experimentais pela obtenção da porcentagem de áreas pretas que representam os poços de reabsorção vistos em microscopia óptica como áreas claras.

Figura 7 - Lista de subcomandos do software *ImageJ*. Em azul, as sequências File>Open abre as imagens para análise (A) e Type>8-bit converte-as para tons de cinza (B).

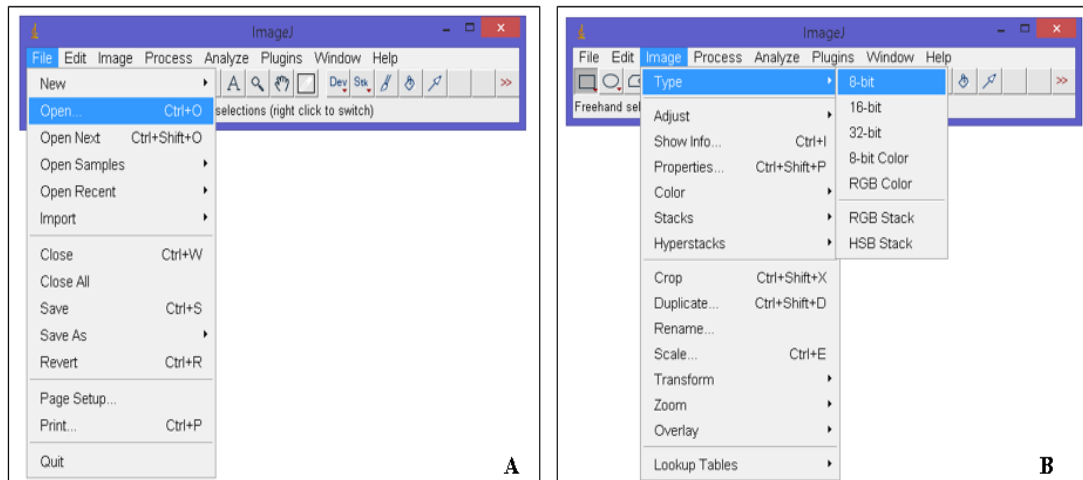


Figura 8 - Imagem com 12 MB em RGB (A) e após a redução para 3 MB com 8 bits em tons de cinza (B). Aumento de 10x (Amplificação total 100x).

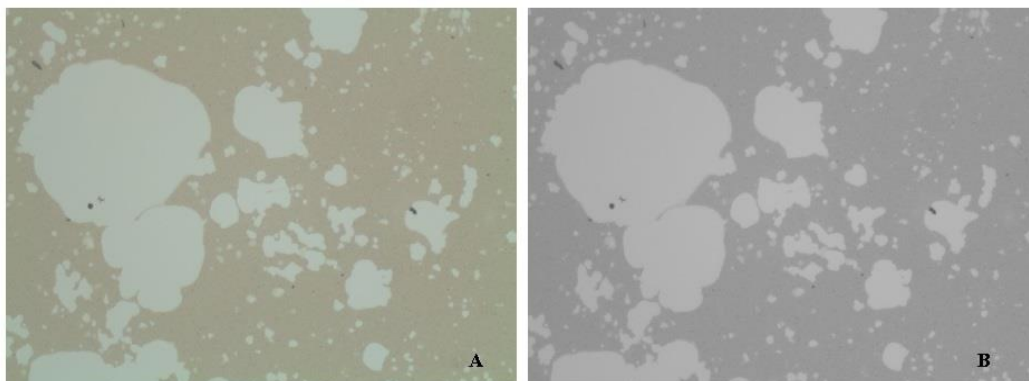
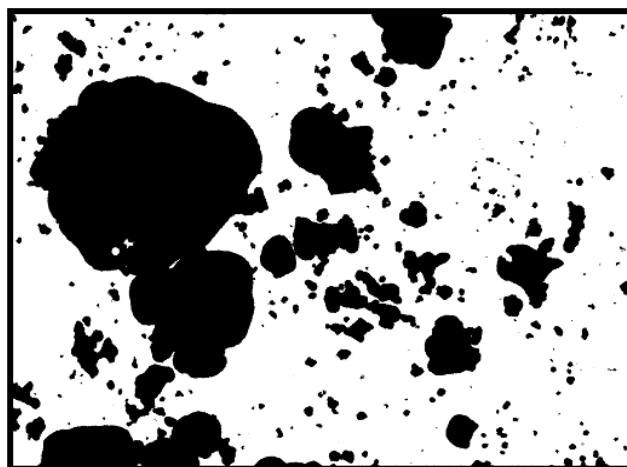


Figura 9 - Imagem binarizada em tons de preto e branco. As áreas pretas representam os poços de reabsorção osteoclástica.



4.9 Análise Estatística

Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas pelo software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O conjunto de dados de cada experimento foi avaliado quanto à sua distribuição normal e homocedasticidade. Para fazer a comparação dos grupos experimentais em relação ao controle, foi realizado o cálculo do “fold change”. Para o conjunto de dados que apresentaram uma distribuição normal, foi empregado o teste de análise de variância de um critério (one way ANOVA) e o pós-teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre os diferentes grupos experimentais. Todos os testes estatísticos foram aplicados com nível de confiança de 95%. Para a análise dos resultados do Western Blot, os valores da densitometria das bandas foram normalizados pelo valor da leitura da β -actina e expressos em “Fold change” em relação ao grupo controle (considerado 100%).

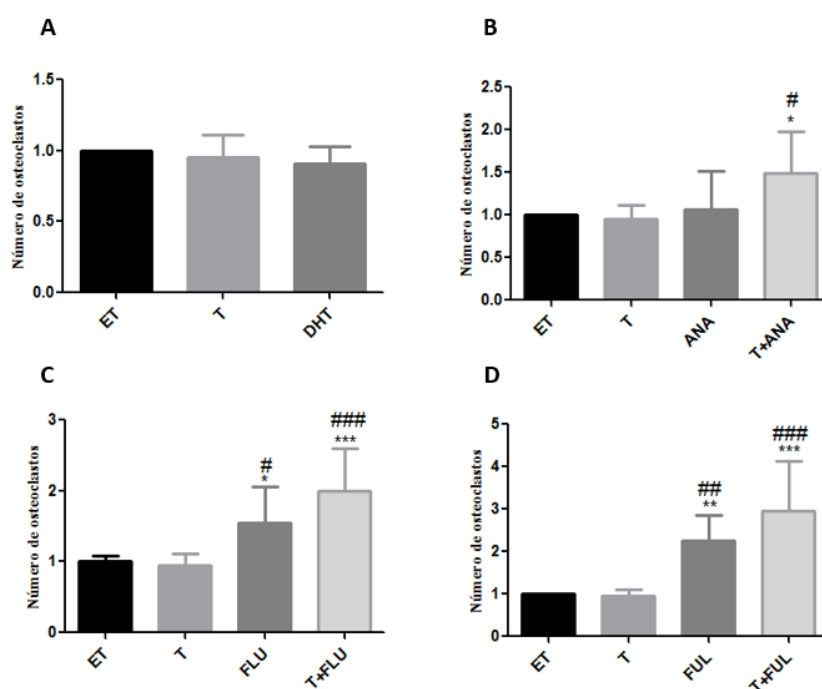
5 RESULTADO

Esta seção apresenta os resultados do presente estudo.

5.1 Impacto de Andrógenos na Diferenciação de Osteoclastos: Ensaio de Diferenciação

Os efeitos dos andrógenos e antagonistas dos receptores de hormônios sexuais sobre a diferenciação de CMO em osteoclastos foram avaliados por meio do ensaio de diferenciação osteoclástica, sob estímulo do RANKL e M-CSF. Comparado ao grupo controle, o número de osteoclastos foi maior quando submetido ao tratamento com T+ANA (Figura 10-B) (ANOVA; $p<0,05$). Quando comparado a T, o tratamento com T+ANA também apresentou maior número de osteoclastos (ANOVA; $p<0,05$) (Figura 10-B). Os grupos FLU, T+FLU (Figura 10-C) FUL e T+FUL (Figura 10-D) também apresentaram aumento significativo do número de osteoclastos tanto em relação ao controle quanto ao grupo T. Por outro lado, os tratamentos com T, DHT e ANA não alteraram o número de osteoclastos, quando comparados entre si ou com o grupo controle (Figura 10 - A e B).

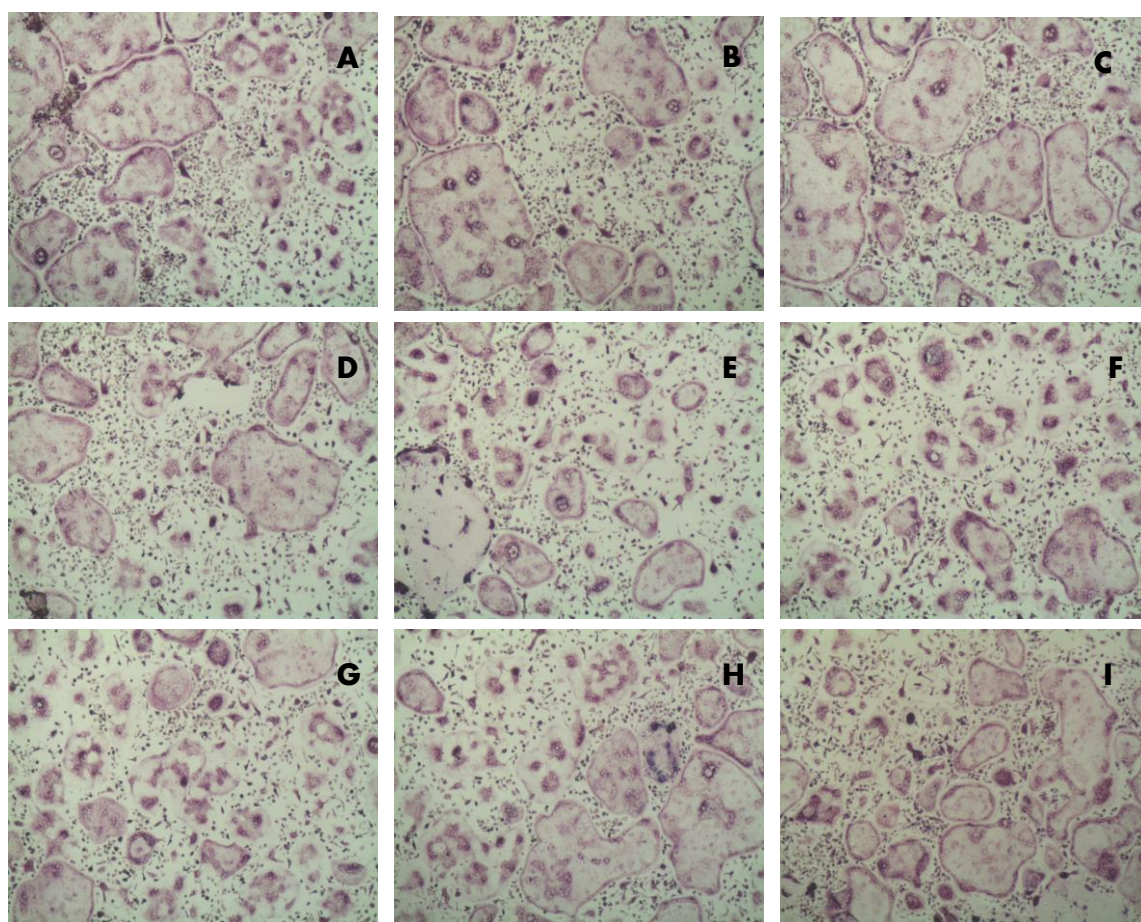
Figura 10 (A, B, C e D) - Gráficos representativos do “fold change” do número de osteoclastos entre os diferentes tratamentos. (média $\pm$ DP, $n=3$, quadruplicata). * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparado ao grupo ET; # $p<0,05$; ## $p<0,01$; ### $p<0,001$ quando comparado ao grupo T (ANOVA com pós-teste de Tukey).



Fonte: Elaboração própria

A Figura 11 representa as fotomicrografias da cultura de osteoclastos corados por TRAP entre os diferentes grupos experimentais. Nas imagens, os osteoclastos são as células multinucleadas (contendo 3 ou mais núcleos) e com contorno bem definido. É possível observar a presença de osteoclastos gigantes. Porém, há presença de muitos osteoclastos pequenos que devido ao seu tamanho reduzido não são bem visualizados nestas imagens.

Figura 11 - Fotomicrografias em microscopia óptica (objetiva 4x, magnificação total 40x) demonstrando a cultura de osteoclastos corados com TRAP entre os diferentes grupos experimentais. Grupo controle (ET) - imagem **A**; Grupos Experimentais - Imagem **B** (T), Imagem **C** (DHT), Imagem **D** (ANA), Imagem **E** (T+ANA), Imagem **F** (FLU), Imagem **G** (T+FLU), Imagem **H** (FUL); Imagem **I** (T+FUL).



Fonte: Elaboração própria

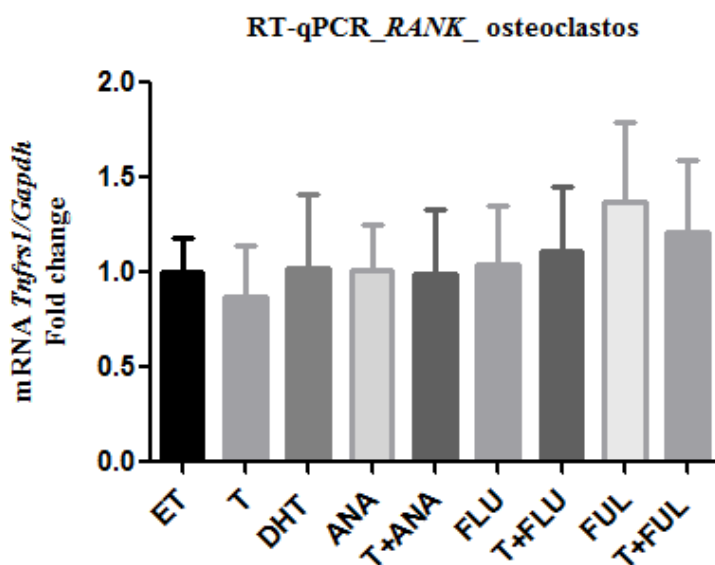
5.2 Avaliação do Estágio de Diferenciação Osteoclástica por RT-qPCR

Foi avaliado o estágio da diferenciação osteoclástica por RT-qPCR, usando como alvos RANK, Catepsina K, NFATc1 e $\beta 3$ integrina, nas células submetidas aos tratamentos com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por 05 dias, com o objetivo de analisar o efeito dos tratamentos sobre a expressão do mRNA de marcadores fenotípicos característicos de osteoclastos. Os resultados de cada amostra por grupo experimental foram normalizados em relação a expressão relativa do gene de referência (GAPDH). Os dados foram analisados com o teste paramétrico One-way ANOVA e pós teste de *Tukey* para comparações múltiplas entre os grupos de cada gene investigado, e representados graficamente de acordo com o número de vezes de aumento da expressão gênica em relação ao grupo controle (“fold change”).

5.2.1 RANK (*Tnfrs1*)

A Figura 12 apresenta os resultados da expressão do mRNA do RANK em cultura primária de osteoclastos, cultivados por 05 dias. Os tratamentos propostos não alteraram a expressão do gene alvo quando comparados ao controle ou entre si ($p>0,05$). No entanto, nas células tratadas com FUL e T+FUL, observou-se uma tendência ao aumento da expressão de RANK, quando comparado ao grupo controle ($p>0,05$). Além disso, o tratamento com T demonstrou tendência na redução da expressão gênica, comparado ao grupo controle ($p>0,05$).

Figura 12 - Avaliação da expressão gênica de RANK em cultura primária de osteoclastos de camundongos fêmeas, tratados com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por um período de 05 dias. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, $n=6$; ANOVA com pós-teste de Tukey).

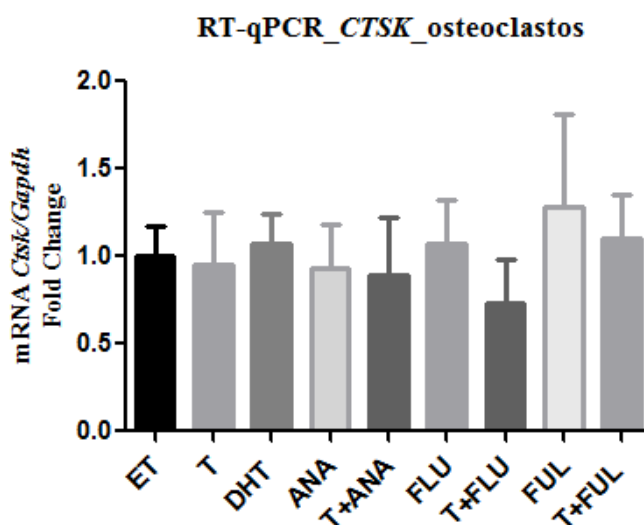


Fonte: Elaboração própria

5.2.2 Catepsina K

A Figura 13 apresenta os resultados da expressão gênica de *Ctsk* em cultura primária de osteoclastos, cultivados por 05 dias. Os tratamentos propostos não alteraram a expressão de mRNA para *Ctsk*, quando comparados ao controle ou entre si ($p>0,05$). O tratamento com T+FLU demonstrou tendência em reduzir a expressão de *Ctsk* ($p>0,05$).

Figura 13 - Avaliação da expressão gênica de *Ctsk* em cultura primária de osteoclastos de camundongos fêmeas, tratados com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por um período de 05 dias. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, $n=6$; ANOVA com pós-teste de Tukey).

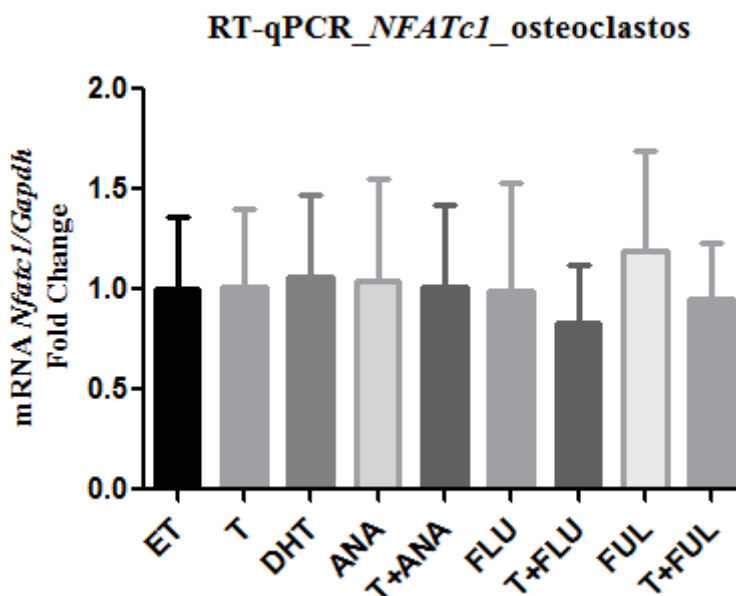


Fonte: Elaboração própria

5.2.3 *Nfatc1*

A Figura 14 apresenta os resultados da expressão gênica de *Nfatc1* em cultura primária de osteoclastos, cultivados por 05 dias. Os tratamentos propostos não alteraram a expressão de mRNA para *Nfatc1*, quando comparados ao controle ou entre si ($p>0,05$). Os tratamentos com T+FLU e T+FUL demonstraram uma tendência à diminuição da expressão gênica de *Nfatc1*, quando comparado os grupos FLU e FUL (Figura 12).

Figura 14 - Avaliação da expressão gênica de *Nfatc1* em cultura primária de osteoclastos de camundongos fêmeas, tratados com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por um período de 05 dias. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, $n=6$; ANOVA com pós-teste de Tukey).

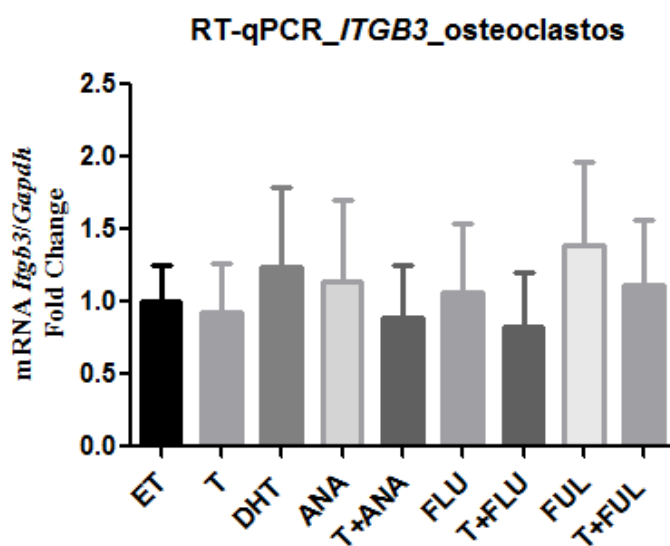


Fonte: Elaboração própria

5.2.4. $\beta 3$ Integrina (*Itgb3*)

A Figura 15 apresenta os resultados da expressão gênica de *Itgb3* em cultura primária de osteoclastos, cultivados por 05 dias. Assim como observado na avaliação dos outros marcadores, os tratamentos não alteraram a expressão gênica para a $\beta 3$ Integrina ($p > 0,05$). Os tratamentos com T+ANA, T+FLU e T+FUL demonstraram uma tendência em reduzir a expressão gênica de *Itgb3*, quando comparado aos respectivos fármacos não associados à T ($p > 0,05$).

Figura 15 - Avaliação da expressão gênica de *Itgb3* em cultura primária de osteoclastos de camundongos fêmeas, tratados com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por um período de 05 dias. As barras no gráfico indicam as médias e as linhas verticais os desvios-padrão. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, n=6; ANOVA com pós-teste de Tukey).



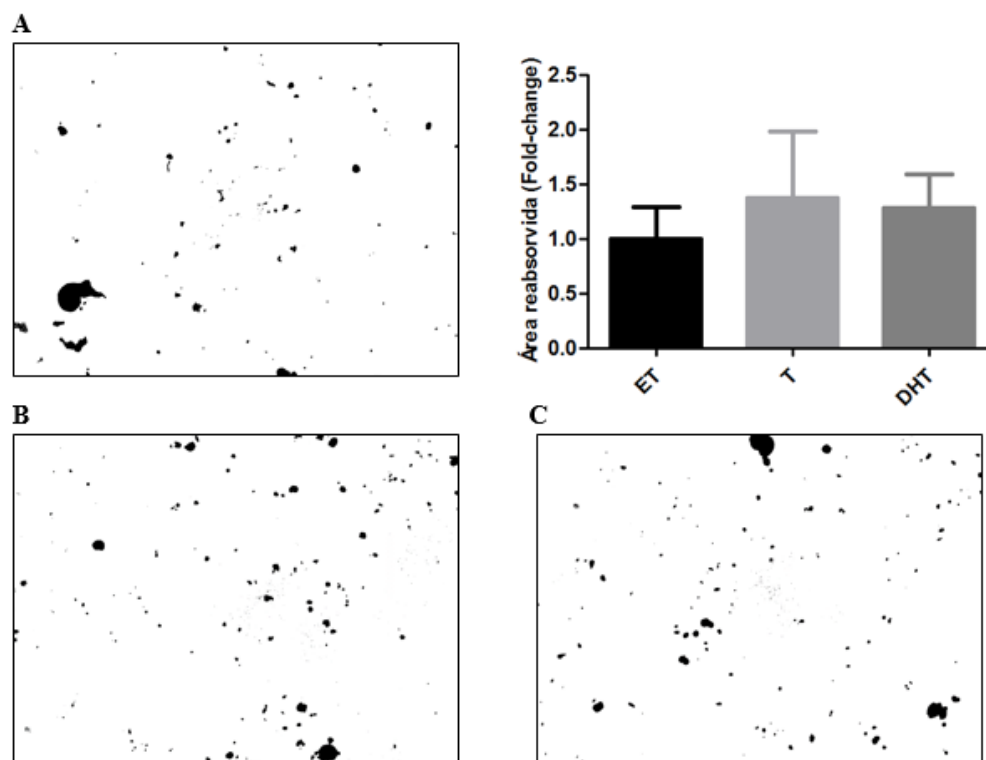
Fonte: Elaboração própria

5.3 Impacto de Andrógenos na Atividade de Osteoclastos: Ensaio de Atividade

O impacto dos andrógenos na atividade de osteoclastos em cultura estão representados em gráficos e ilustrados com as imagens binarizadas referentes aos poços de reabsorção (áreas pretas) (Figuras 16-19). De modo geral, os resultados mostraram um padrão semelhante ao observado no ensaio de diferenciação referente aos osteoclastos menores (ver Figura 10, página 45). Os tratamentos com T e DHT não exerceram efeito na atividade de osteoclastos ($p>0,05$) (Figura 16). Por outro lado, observou-se um significativo aumento dos poços de reabsorção no grupo T+ANA, quando comparado ao controle ($p<0,01$) e ao grupo T ($p<0,05$) (Figura 17).

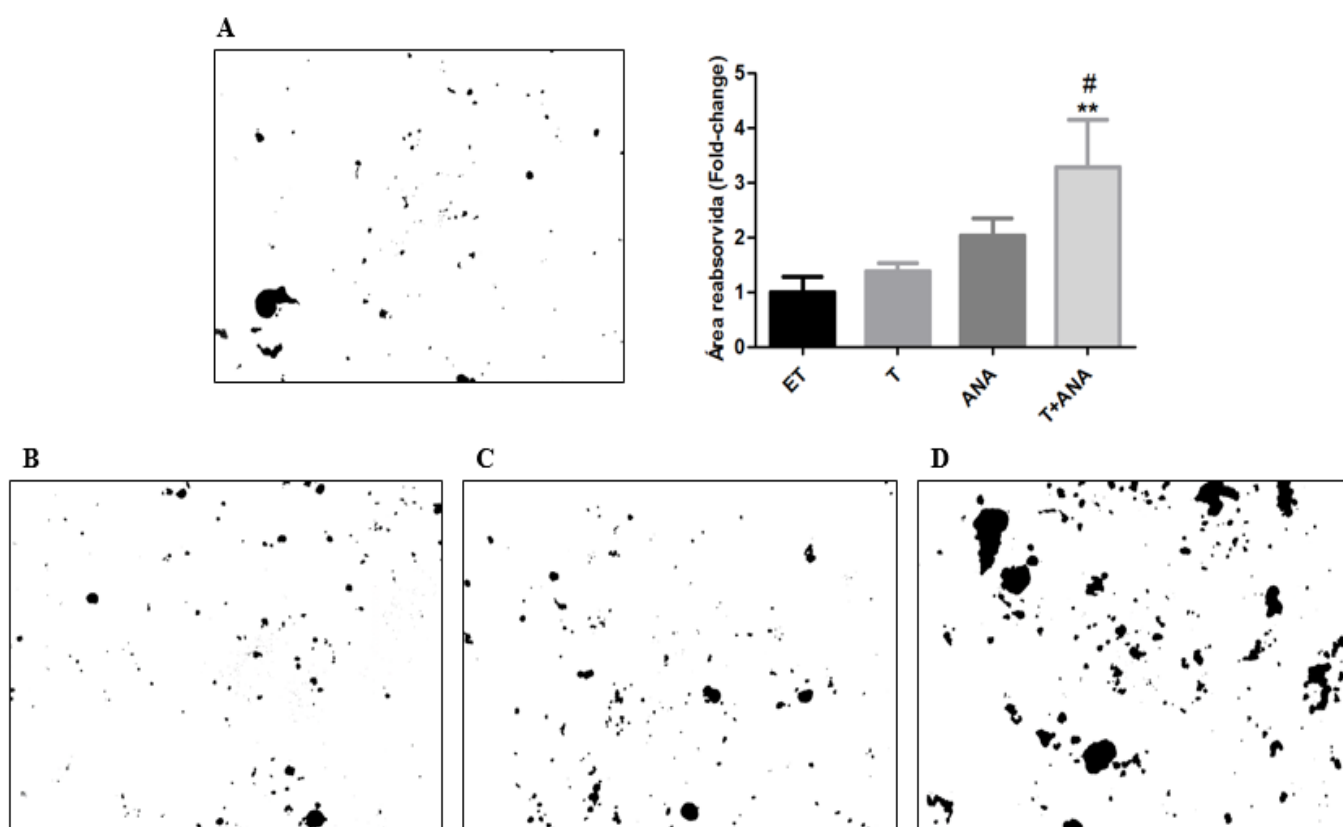
Os tratamentos com antagonistas de receptores de hormônios sexuais, associados ou não a T, exerceram um efeito significativo na atividade reabsortiva, exceto no grupo tratado com T+FLU ($p>0,05$). No entanto, o tratamento com FLU aumentou significativamente a atividade de osteoclastos em comparação ao controle ($p<0,001$), ao grupo T ($p<0,001$) e ao grupo T+FLU ($p<0,01$) (Figura 18). De modo semelhante, o tratamento com FUL aumentou significativamente os poços de reabsorção, quando comparado ao controle ($p<0,01$) e ao grupo T ($p<0,05$). Em associação com T, FUL demonstrou regular positivamente a atividade de osteoclastos, tanto em comparação ao grupo controle ($p<0,001$) quanto ao grupo T ($p<0,01$) (Figura 19).

Figura 16 (A, B, C e D) - Imagens binarizadas a partir de fotomicrografias em microscopia óptica (objetiva 4x, magnificação total- 40x) evidenciando os poços de reabsorção osteoclástica (áreas pretas). Grupo Controle: ET- Imagem A; Grupo T- Imagem B; Grupo DHT-Imagem C. Gráfico representativo da área reabsorvida do ensaio de atividade. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, n=5, triplicata; ANOVA com pós-teste de Tukey).



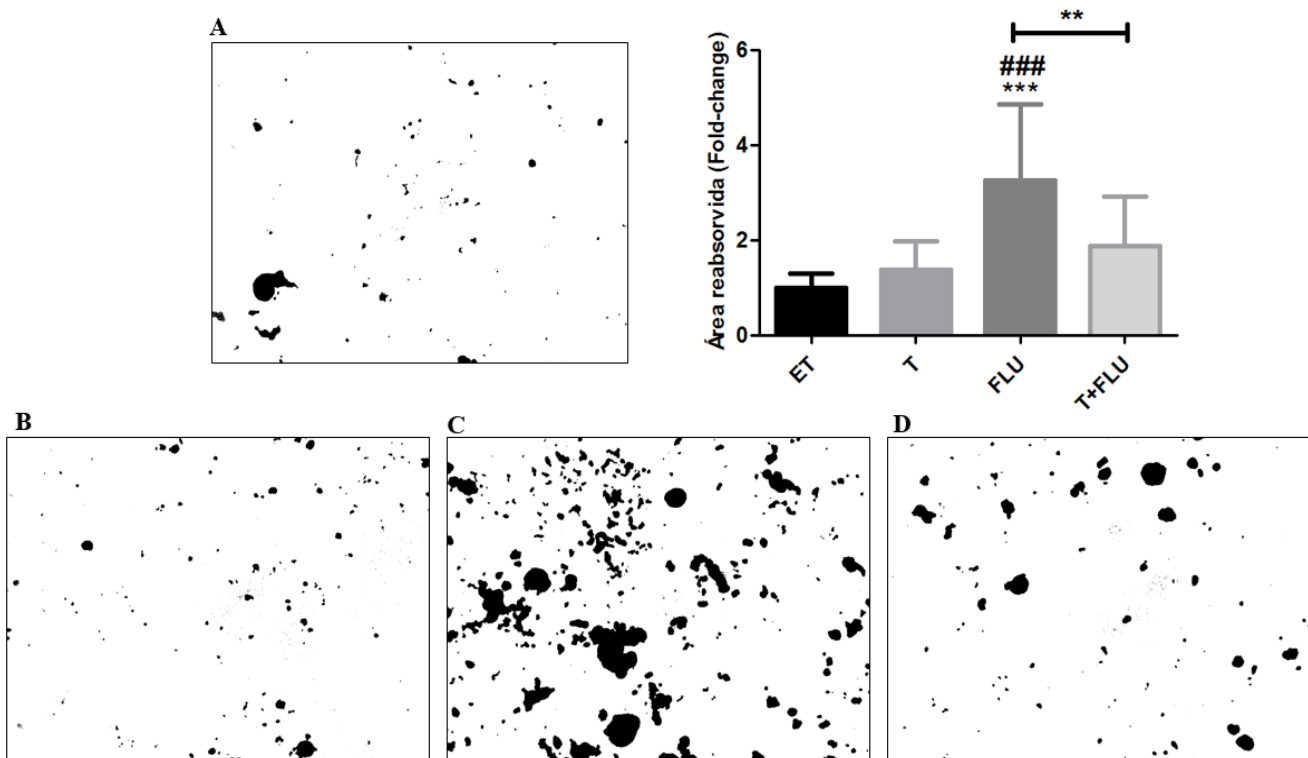
Fonte: Elaboração própria

Figura 17 (A, B, C e D) - Imagens binarizadas a partir de fotomicrografias em microscopia óptica (objetiva 4x, magnificação total- 40x) evidenciando os poços de reabsorção osteoclástica (áreas pretas). Grupo Controle: ET- Imagem **A**; Grupo T- Imagem **B**; Grupo ANA-Imagem **C**; Grupo T+ANA-Imagem **D**. Gráfico representativo da área reabsorvida do ensaio de atividade. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, n=5, triplicata; ANOVA com pós-teste de Tukey); (**p<0,01 quando comparado ao controle (ET); #p<0,05 quando comparado o grupo T).



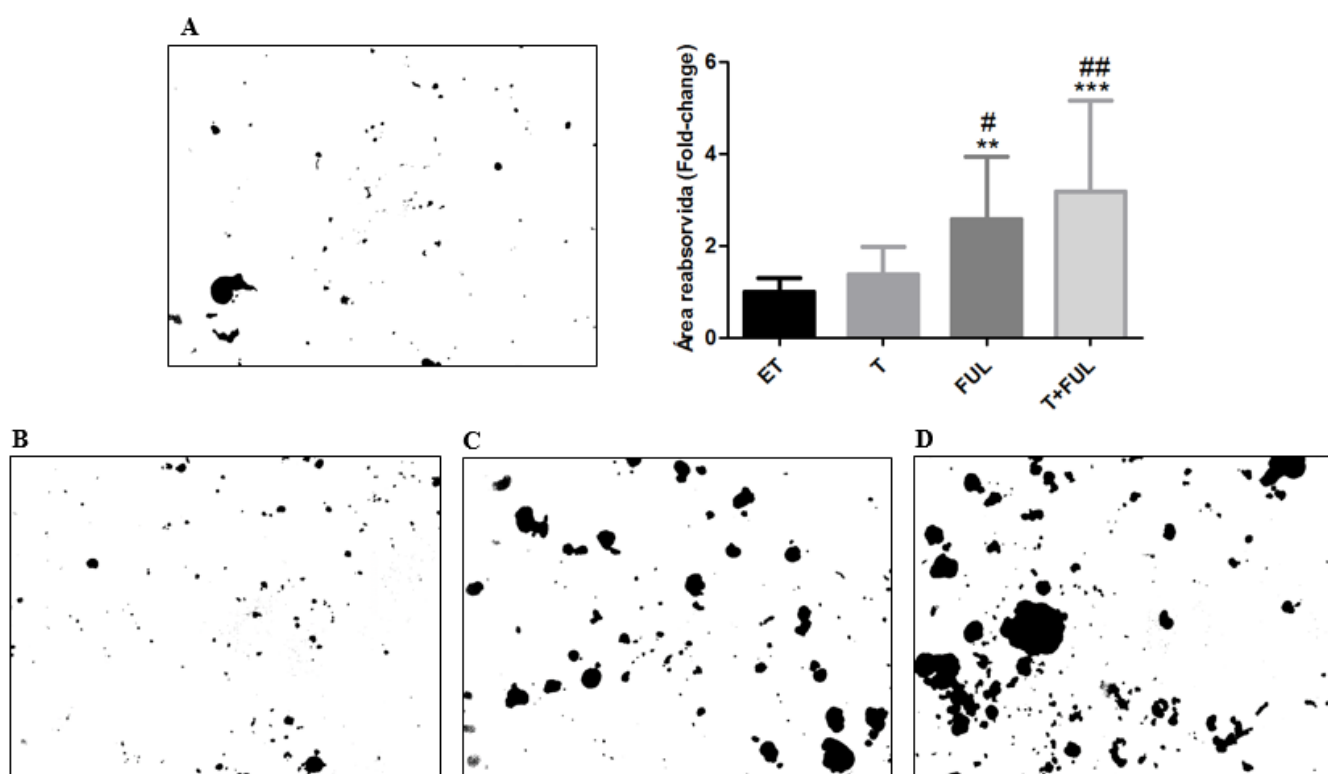
Fonte: Elaboração própria

Figura 18 (A, B, C e D) - Imagens binarizadas a partir de fotomicrografias em microscopia óptica (objetiva 4x, magnificação total- 40x) evidenciando os poços de reabsorção osteoclástica (áreas pretas). Grupo Controle ET- Imagem **A**; Grupo T- Imagem **B**; Grupo FLU-Imagem **C**; Grupo T+FLU-Imagem **D**. Gráfico representativo da área reabsorvida do ensaio de atividade. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, n=5, triplicata; ANOVA com pós-teste de Tukey); (**p<0,01 entre os grupos FLU e T+FLU; ***p<0,001 quando comparado ao controle (ET); ###p<0,01 quando comparado ao grupo T).



Fonte: Elaboração própria

Figura 19 (A, B, C e D) - Imagens binarizadas a partir de fotomicrografias em microscopia óptica (objetiva 4x, magnificação total- 40x) evidenciando os poços de reabsorção osteoclástica (áreas pretas). Grupo Controle ET- Imagem **A**; Grupo T- Imagem **B**; Grupo FLU-Imagem **C**; Grupo T+FLU-Imagem **D**. Gráfico representativo da área de reabsorção. Gráfico representativo da área reabsorvida do ensaio de atividade. Dados expressos em “fold change” (média $\pm$ DP, n=5, triplicata; ANOVA com pós-teste de Tukey); (**p<0,01 e ***p<0,001 quando comparados ao controle (ET); #p<0,05 e ##p<0,01 quando comparados ao grupo T).



Fonte: Elaboração própria

5.4 Western Blot

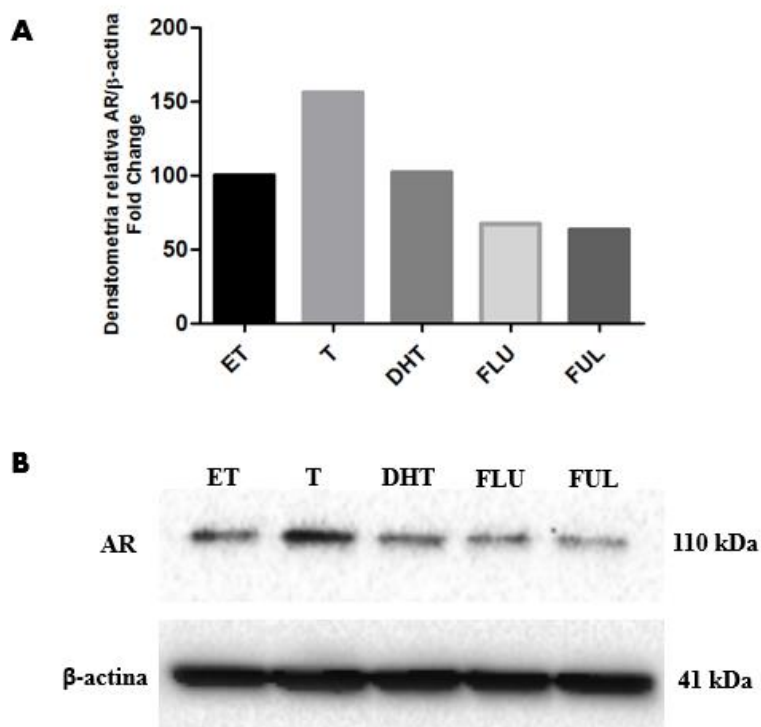
A expressão proteica dos receptores para andrógenos (AR) (SC-816 rabbit monoclonal, Santa Cruz Biotechnology) e estrógenos (ER) α (ab32063 rabbit monoclonal, Abcam) e β (ab3576 rabbit polyclonal, Abcam) pelos tratamentos propostos foi avaliada por Western Blot. O experimento foi realizado com 4 animais e repetido por duas vezes. A intensidade das bandas em cada grupo experimental foi analisada por densitometria computadorizada por meio do software ImageLab/Chemi-Doc MP e normalizadas utilizando a proteína β -actina.

Para a melhor compreensão, os resultados são mostrados de acordo com as imagens representativas da expressão de cada proteína alvo. Os gráficos apresentam as médias das densitometrias ópticas das bandas que acenderam nos dois experimentos, sendo expressos como percentuais relativos ao controle (ET) (considerado 100%).

5.4.1 Receptor de andrógeno (AR)

A Figura 20 (A e B) representa a expressão proteica do AR entre os diferentes grupos experimentais. Em ‘A’ é demonstrada a representação gráfica do “fold change” da densitometria das bandas detectadas. Observou-se que o tratamento com T aumentou em 56% a expressão do AR em comparação ao controle (ET), enquanto o tratamento com DHT não alterou a expressão proteica do receptor. No entanto, os tratamentos com FLU e FUL reduziram a expressão do AR em 33% e 37%, respectivamente. Em ‘B’ observa-se as bandas detectadas por Western Blot para o AR, visualizadas após 1 minuto de exposição e para a β -actina (controle endógeno).

Figura 20 (A e B) - Modulação da expressão do AR por Western blot nas células tratadas com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por 5 dias. Gráfico representativo da densitometria das bandas, em “fold change” (A) e expressão das bandas para o AR e β -actina (B).

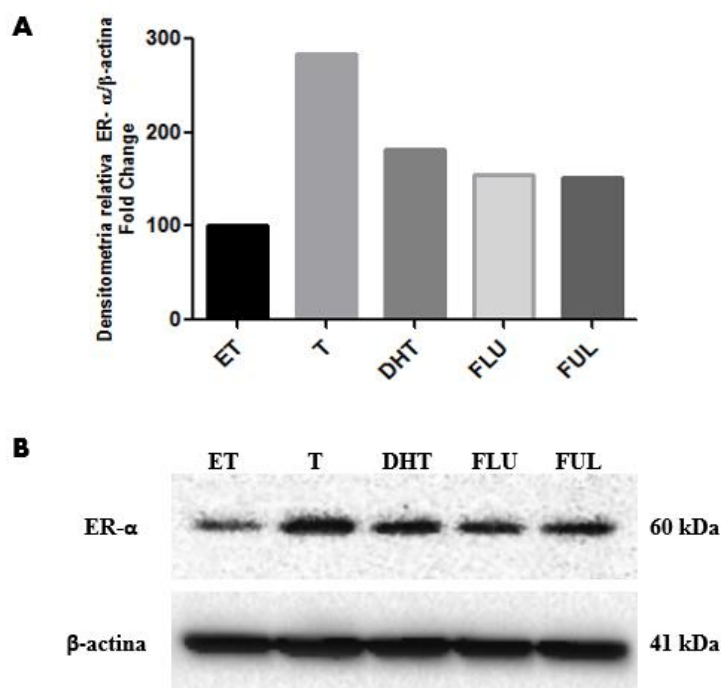


Fonte: Elaboração própria

5.4.2 Receptor de estrógeno alfa (ER- α)

A Figura 21 (A e B) representa a análise da expressão proteica do ER- α entre os diferentes grupos experimentais. Em ‘A’ é demonstrada a representação gráfica do “fold change” da densitometria das bandas detectadas. Observou-se que a expressão do ER- α praticamente triplicou com o tratamento com T. Além disso, foi notado um aumento na expressão proteica nos grupos DHT (82%), FLU (55%) e FUL (52%) quando comparado ao controle (ET). Em ‘B’ observa-se a imagem representativa das bandas detectadas por Western Blot para o ER- α , visualizadas após 25 segundos de exposição e para a β -actina (controle endógeno).

Figura 21 (A e B) - Modulação da expressão do ER- α por Western blot nas células tratadas com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por 5 dias. Gráfico representativo da densitometria das bandas, em “fold change” (A) e expressão das bandas para o ER- α e β -actina (B).

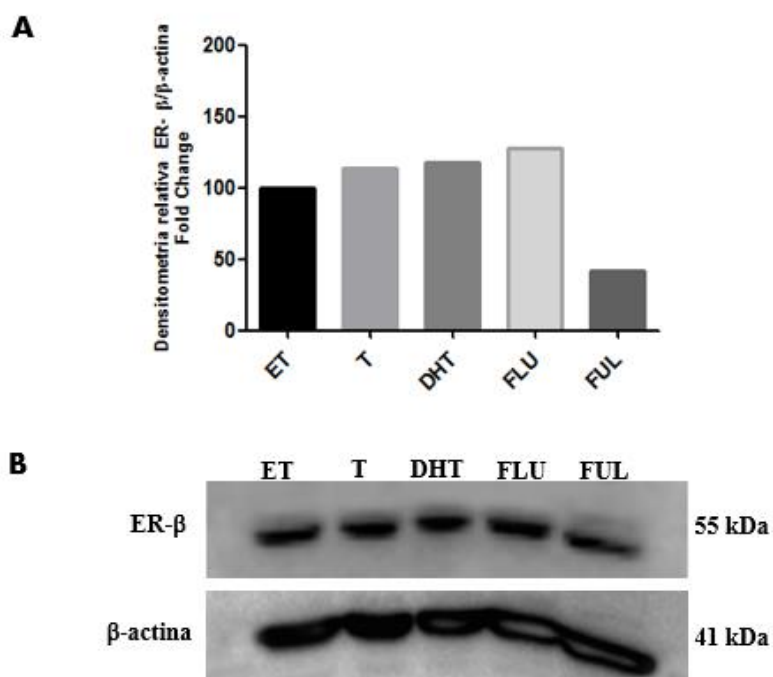


Fonte: Elaboração própria

5.4.3 Receptor de estrógeno beta (ER- β)

A Figura 22 (A e B) representa a análise da expressão proteica do ER- β entre os diferentes grupos experimentais. Em 'A' é demonstrada a representação gráfica do “fold change” da densitometria das bandas detectadas. Os tratamentos com T e DHT exerceram pouco efeito na expressão do ER- β . No entanto, FUL mostrou uma redução de 58% nos níveis proteicos do receptor quando comparado ao controle (ET). Em 'B' observa-se a imagem representativa das bandas detectadas por Western Blot para o ER- β , visualizadas após 7.1 segundos de exposição e para a β -actina (controle endógeno).

Figura 22 (A e B) - Modulação da expressão do ER- β por Western blot nas células tratadas com andrógenos e antagonistas de receptores de hormônios sexuais por 05 dias. Gráfico representativo da densitometria das bandas, em “fold change” (A) e expressão das bandas para ER- β e β -actina (B).



Fonte: Elaboração própria

6 DISCUSSÃO

Estudos em humanos e em animais experimentais tem sugerido que alterações dos níveis séricos dos andrógenos estão associados com um desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea (Vanderschueren et al.¹⁵⁴, 2014), contribuindo para o desenvolvimento de osteoporose (Tirabassi et al.¹⁴⁷, 2014) e exacerbação da perda óssea alveolar em doença periodontal instalada (Steffens et al.¹⁴⁰, 2015), sobretudo no gênero masculino. Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou a participação de andrógenos na regulação da resposta imunoinflamatória e metabolismo ósseo associados tanto em condição de doença quanto no reparo periodontal em fêmeas (dados ainda não publicados). Vários relatos mostram que andrógenos podem regular o metabolismo ósseo através de efeitos sobre osteoclastos e seus precursores (Bellido et al.⁹, 1995; Liu et al.⁸², 2007; Leblebicioglu et al.⁷⁶, 2013; Steffens et al.¹³⁸, 2015). Entretanto, o mecanismo de ação ainda permanece controverso, uma vez que diferentes modelos de osteoclastogênese são empregados, dificultando a interpretação desses achados. Sendo assim, este trabalho avaliou o impacto de andrógenos sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos de camundongos fêmeas.

No presente estudo, CMO foram isoladas através do procedimento de “flushing”, conforme previamente descrito por Arai et al.³ (1999) e estimuladas com RANKL e MCS-F em associação aos tratamentos propostos. Tais procedimentos foram realizados com o objetivo de que houvesse a presença dos fármacos em estágios precoces da diferenciação celular, incluindo a proliferação de progenitores mononucleares e formação de pré-osteoclastos. No entanto, a cultura celular obtida é mista, com a presença de outros tipos celulares, incluindo células estromais (Sinnesael et al.¹³⁴, 2015) e da linhagem de osteoblastos (Takahashi et al.¹⁴⁴, 1999). Nesse sentido, há evidências que culturas puras de osteoclastos podem responder de forma diferente ao RANKL e MCS-F quando comparado com culturas mistas (Sorensen et al.¹³⁵, 2006).

Com o objetivo de avaliar o impacto dos andrógenos sobre a diferenciação de osteoclastos, foi realizada a quantificação de células multinucleadas (≥ 3 núcleos) e TRAP⁺ (Yasuda et al.¹⁶⁵, 1999) formadas entre os diferentes grupos experimentais. Observamos que os tratamentos com T (1nM) e DHT (1nM) não alteraram o número de osteoclastos, corroborando resultados de Steffens et al.¹³⁸ (2015), que verificaram os efeitos inexpressíveis da T (1nM) sobre o número de osteoclastos derivados de macrófagos murinos RAW264.7. Além disso, os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de Turner et

al¹⁴⁹. (2008), que observaram a ausência de efeitos da DHT sobre o número de osteoclastos *in vitro*. Deste modo, nossos resultados indicam que os andrógenos não exercem impacto sobre a diferenciação de osteoclastos. Por outro lado, outros estudos evidenciam os efeitos inibitórios dos andrógenos sobre osteoclastos e seus precursores (Pederson et al.¹¹⁷, 1999; Huber et al.⁶⁰, 2001; Michael et al.⁹³, 2005; Chen et al.²³, 2001; Martin-Millan et al.⁹¹, 2010; Sun et al.¹⁴¹, 2013).

Sabe-se que T pode ser convertida em E2 através da enzima aromatase, a qual é expressa em osteoclastos (Van Der Eerden et al.¹⁵², 2004). Além disso, estudos demonstram que o E2 exerce efeitos inibitórios sobre a osteoclastogênese (Shevde et al.¹³⁰, 2000; Sorensen et al.¹³⁵, 2006; Almeida et al.², 2013, Wiren et al.¹⁵⁹, 2010). Neste sentido, justifica-se a utilização do inibidor não-esteroidal da aromatase (10 nM ANA) associado ou não a T, com o objetivo de avaliar os efeitos do bloqueio da interconversão hormonal. A princípio, observamos que o tratamento com ANA não afetou o número de osteoclastos. Não encontramos na literatura evidências do efeito isolado do ANA sobre osteoclastos *in vitro*, porém há relatos de efeitos inibitórios sobre a diferenciação e proliferação de osteoblastos (Zhou et al.¹⁷⁰, 2015). No presente estudo, o efeito da T sobre o número de osteoclastos foi similar àquele observado no grupo controle, porém sua associação ao ANA promoveu a osteoclastogênese, ao menos em parte, devido ao mecanismo de inibição da conversão de T em E2 por ANA (Yanase et al.¹⁶⁴, 2001). Sendo assim, sugere-se um efeito inibitório indireto da T sobre a diferenciação de osteoclastos. Por outro lado, Chen et al.²³ (2001) não observaram efeitos da associação de T com ANA, evidenciando que a ação da T ocorre independente da conversão em E2 e ativação de ERs.

Os efeitos da inibição farmacológica do AR foram avaliados utilizando um fármaco antagonista não esteroidal (FLU) que compete pelo sítio de ligação do receptor, bloqueando a ação endógena e exógena da T (Singh et al.¹³³, 2000). Observamos que o tratamento com FLU aumentou significativamente o número de osteoclastos. De modo semelhante, outros autores demonstraram um aumento da proliferação e diferenciação de células da calvária de roedores expostas à FLU (Cray et al.²⁸, 2011). No entanto, estudos em osteoclastos não demonstraram efeitos da FLU aplicada isoladamente (Chen et al.²³, 2001; Michael et al.⁹³, 2005).

No presente estudo, aventa-se a possibilidade da ação direta da FLU sobre a diferenciação de osteoclastos. Não obstante, o efeito observado nas células tratadas com FLU pode ser devido à presença de hormônios esteroides sexuais endógenos ao FBS (Miki et al.⁹⁴, 2007), incluindo os andrógenos, os quais competiriam com a FLU pelo sítio de ligação do AR, favorecendo assim a osteoclastogênese. Neste sentido, há relatos na literatura da

utilização do Charcoal-dextran associado ao soro fetal, com o objetivo de absorver hormônios livres e outras substâncias endógenas ao FBS (Lindquist, De Alarcon⁸⁰, 1987; Shevde et al.¹³⁰, 2000; Michael et al.⁹³, 2005; Sedelaar, Isaacs¹²⁶, 2009) e deste modo, evitar possíveis vieses no experimento. No presente estudo, a associação de T com FLU aumentou o número de osteoclastos, corroborando com os achados de Chen et al.²³ (2001). Deste modo, sugere-se que a inibição farmacológica do AR promove a diferenciação de osteoclastos *in vitro*. *In vivo*, o bloqueio do AR com FLU favorece a osteoclastogênese (Steffens et al.¹³⁸, 2015).

Ainda em relação ao ensaio de diferenciação, observamos que a inibição farmacológica do ER utilizando FUL (10nM) também aumentou o número de osteoclastos. Os mecanismos sugeridos para explicar estes achados são: 1) Ação direta do FUL sobre a diferenciação de osteoclastos 2) A presença de hormônios esteroides sexuais endógenos ao FBS, conforme sugerido anteriormente. Por outro lado, Michael et al.⁹³ (2005) não observaram efeitos do FUL aplicado isoladamente. *In vivo*, o tratamento com FUL em camundongos fêmeas aumentou o número de osteoclastos no fêmur quando comparado aos animais não tratados (Endo-Munoz et al.⁴¹, 2010). No presente estudo, observou-se que o tratamento com T+FUL também aumentou o número de osteoclastos, porém Chen et al.²³ (2001) não observaram efeitos dessa associação de fármacos. Aventamos a hipótese de que o bloqueio farmacológico do ER pode favorecer a osteoclastogênese, ao menos em parte, por inibir a ligação do E2 proveniente da aromatização da T (Manolagas et al.⁸⁸, 2013). De fato, os estrógenos promovem a apoptose de osteoclastos mediada pelo aumento da expressão de Fas-ligante e de TGF- β (Nakamura et al.¹⁰⁰, 2007). Nesta perspectiva, nossos resultados sugerem que a modulação do ER por FUL favorece a diferenciação de osteoclastos.

A regulação da transcrição gênica pelo complexo hormônio-receptor parece ser a principal ação biológica dos hormônios esteroides sexuais, promovendo a ativação e transcrição do mRNA por vias genômicas (Nemere et al.¹⁰², 2003; Mariotti, Mawhinney⁹⁰, 2013). Além disso, vias não genômicas podem indiretamente influenciar a transcrição gênica, através da ativação de vias de transdução de sinal que atuam sobre fatores de transcrição (Wang et al.¹⁵⁶, 2014). Desta forma, além da contagem celular sob microscopia de luz, avaliamos o impacto dos andrógenos na diferenciação de osteoclastos em nível molecular, por meio da quantificação da expressão de genes envolvidos com o estágio de diferenciação osteoclástica (RANK, NFATc1 ITGB3, CTSK).

Dentre os genes analisados no presente estudo, a expressão do mRNA de RANK não foi alterada pelos tratamentos propostos. Vale ressaltar que as células foram lisadas para a extração de RNA total transcorridos 5 dias do início do experimento, o que pode não ser o

período ideal para a avaliação da expressão gênica de RANK. Neste sentido, o trabalho de Park et al.¹¹⁶ (2015) demonstrou que a expressão do mRNA de RANK é regulada de forma tempo dependente (12-48h) após o estímulo com RANKL. A literatura é limitada em relação aos efeitos dos andrógenos sobre a expressão gênica de RANK em osteoclastos, porém, há evidências que T aumenta a expressão do mRNA de osteoprotegerina (OPG) em osteoblastos, exercendo um efeito protetor em relação a osteoclastogênese (Chen et al.²², 2004). Por outro lado, estudos demonstram o efeito dos estrógenos em regular negativamente a expressão gênica de RANK (Bashir et al.⁷, 2005). Verificamos que os tratamentos com FUL e T+FUL demonstraram uma tendência ao aumento do mRNA de RANK, indo ao encontro com o aumento significativo do número de osteoclastos observado no ensaio de diferenciação.

De modo semelhante, a expressão do mRNA de CTSK não foi alterada pelos tratamentos propostos. De acordo com o nosso conhecimento, não há evidências do impacto dos andrógenos sobre a expressão gênica de CTSK em osteoclastos. Por outro lado, estudos demonstram que os estrógenos reduzem a expressão do mRNA de CTSK in vitro (Mano et al.⁸⁵, 1996; Imai et al.⁶¹, 2009). Além disso, não observamos efeitos dos tratamentos sobre a expressão gênica de NFATc1 e ITGB3. In vivo, Chin e Ima-Nirwana.²⁴ (2015) demonstraram que o tratamento com T em ratos orquiectomizados não alterou a expressão dos referidos genes.

De modo geral, os tratamentos com FLU e FUL na presença ou ausência de T, mostraram uma tendência para a alteração da expressão gênica, seguindo um padrão semelhante ao observado no ensaio de diferenciação, porém com grande variabilidade e sem diferença estatística. Desta forma, sugere-se que o bloqueio farmacológico dos receptores de hormônios sexuais pode estar relacionado com a expressão de genes envolvidos na regulação da osteoclastogênese.

Os efeitos anti-reabsortivos dos estrógenos sobre osteoclastos são bem estabelecidos na literatura (Oursler et al.¹⁰⁹, 1991; Kameda et al.⁶⁴, 1997; Sarma et al.¹²⁵, 1998; Parikka et al.¹¹⁵, 2001; Faloni et al.⁴², 2007;), porém os efeitos dos andrógenos permanecem controversos. Deste modo, o impacto de andrógenos sobre a atividade de osteoclastos foi avaliado através da formação de poços de reabsorção em um substrato mineralizado. Para tanto, as células foram cultivadas em uma placa revestida com fosfato de cálcio sintético, conforme metodologia previamente descrita por Sun et al.¹⁴¹ (2015) e Sinnesael et al.¹³⁴ (2015).

Observamos que os tratamentos com T e DHT não exerceram impacto na atividade de osteoclastos, sugerindo um efeito limitado dos andrógenos na reabsorção do substrato

mineralizado. Por outro lado, estudos *in vitro* evidenciam os efeitos inibitórios da T e/ou DHT (Michael et al.⁹³, 2005; Pederson et al.¹¹⁷, 1999). É importante salientar que diferenças metodológicas podem explicar as divergências com os nossos achados. Vale ressaltar que os autores anteriormente citados utilizaram uma cultura praticamente pura de osteoclastos, sem a presença de células estromais, as quais podem produzir OPG sob estímulo da T ou E2 (Saika et al.¹²³, 2001) e influenciar na resposta aos tratamentos. Além disso, células estromais da medula óssea podem produzir TGF- β sob estímulo do DHT, o qual está relacionado com a apoptose de osteoclastos (Olsen et al.¹⁰⁷, 2001). Ressalte-se também que os efeitos anti-reabsortivos dos andrógenos estão relacionados à inibição da produção de IL-6 por células da medula óssea e da linhagem osteoblástica (Bellido et al.⁹, 1995; et al.⁵⁶, 1999).

O tratamento com T+ANA aumentou significativamente a atividade de osteoclastos, corroborando com os resultados do ensaio de diferenciação. É provável que a inibição da aromatização de andrógenos em estrógenos promovida pelo ANA (Yanase et al.¹⁶⁴, 2001) seja um importante componente desta resposta. Deste modo, sugere-se um efeito indireto da T em inibir a atividade de osteoclastos, mediante sua conversão em E2 e modulação de ERs. Tal afirmativa é apoiada na observação de que a deficiência da aromatase em modelo experimental *in vivo* favorece a perda óssea em fêmeas (Oz et al.¹¹⁰, 2007). Neste sentido, um estudo clínico em humanos demonstrou que a terapia com inibidores da aromatase promove a perda de densidade mineral óssea, favorecendo o risco de fraturas (Knobf et al.⁶⁷, 2016). Tomados em conjunto, esses resultados sugerem que a inibição da interconversão hormonal está associada com o desequilíbrio entre formação e reabsorção óssea.

Além disso, o tratamento com FLU promoveu um aumento significativo da atividade de osteoclastos, assim como observado no ensaio de diferenciação. No entanto, Michael et al.⁹³. (2005) não observaram efeitos da FLU isoladamente. *In vivo*, efeitos semelhantes ao bloqueio farmacológico com FLU são observados em animais machos knockout para o AR, ocorrendo um aumento do turnover ósseo e redução do volume de osso trabecular e cortical (Callewaert et al.¹⁹, 2009; Callewaert et al.¹⁸, 2010). De modo semelhante, camundongos fêmeas knockout para o AR apresentam redução do volume de osso esponjoso (Yeh et al.¹⁶⁸, 2002), assim como a deleção do AR em células progenitoras mesenquimais de fêmeas promove a redução da densidade mineral óssea e do número de trabéculas no fêmur (Maatta et al.⁸³, 2013). A análise conjunta desses achados sugerem que a modulação do AR por fármacos antagonistas favorece a reabsorção óssea.

No presente estudo, o tratamento com T+FLU não alterou a atividade de osteoclastos, contrariamente ao relatado por Michael et al.⁹³ (2005). Por outro lado, o tratamento com FUL

associado ou não a T, aumentou significativamente a formação de poços de reabsorção, semelhante ao observado no ensaio de diferenciação. Evidências indicam que grande parte dos efeitos dos andrógenos no osso é mediada por sua aromatização em estrógenos (Riggs et al.¹²¹, 2002; Rochira et al.¹²², 2015). Nesta perspectiva, há evidências dos efeitos diretos do E2 em inibir a atividade de osteoclastos in vitro (Oursler et al.¹⁰⁹, 1991). Por outro lado, estudos recentes sugerem que os efeitos anti-reabsortivos dos andrógenos não são devido a ação hormonal direta via AR em osteoclastos (Kawano et al.⁶⁵, 2003; Ucer et al.¹⁵⁰, 2015; Sinnesael et al.¹³⁴, 2015), corroborando com as evidências do presente estudo de que os andrógenos não atuam diretamente sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos de camundongos fêmeas.

Os efeitos biológicos dos hormônios esteroides sexuais são mediados através de receptores proteicos, os quais são expressos em células ósseas (Bellido et al.⁹, 1995; Ucer et al.¹⁵¹, 2015). Estudos in vitro tem sugerido a presença do AR em osteoclastos de diferentes espécies, o qual pode mediar ações diretas dos andrógenos (Mizuno et al.⁹⁶, 1994; Pederson et al.¹¹⁷, 1999; Huber et al.⁶⁰, 2001; Van Der Eerden et al.¹⁵², 2004; Ucer et al.¹⁵⁰, 2015). Além disso, osteoclastos e seus precursores expressam ER α e/ou ER β (Riggs et al.¹²¹, 2002) mediando ações indiretas da T através da aromatização em E2.

Sendo assim, o presente estudo analisou a modulação da expressão proteica do AR, ER α e ER β pelos tratamentos propostos, utilizando a técnica de western blot. Os resultados do western blot demonstraram que células de camundongos fêmeas expressam os receptores hormonais estudados, validando os experimentos realizados. Deve-se atentar, entretanto, para o fato de não termos utilizado uma cultura pura de osteoclastos, havendo a presença de células estromais, as quais expressam receptores de hormônios sexuais (Olsen et al.¹⁰⁷, 2001; Sanyal et al.¹²⁴, 2005; Sinnesael et al.¹³⁴, 2015), constituindo uma limitação do nosso estudo. Inicialmente, confirmamos as evidências de que células de fêmeas expressam o AR (Yeh et al.¹⁶⁸, 2002; Manolagas et al.⁸⁸, 2013). Por outro lado, um estudo recente sugere que a presença do AR em osteoclastos é duvidosa e não está relacionado com inibição da osteoclastogênese (Sinnesael et al.¹³⁴, 2015). No presente estudo, o tratamento com T aumentou a expressão do AR, corroborando com as evidências de que os andrógenos regulam positivamente a expressão do referido receptor (Wiren et al.¹⁶², 1997). Sabe-se que a DHT possui maior afinidade de ligação ao receptor hormonal em comparação a T (Aggarwal et al.¹, 2010), porém o tratamento com DHT não alterou a expressão do AR.

Verificamos ainda que os tratamentos com FLU e FUL (ICI 182,780) reduziram a expressão do AR. A redução na expressão do AR promovida pelo FUL pode ser

fundamentada no estudo de Fernandes et al.⁴⁴ (2011), no qual observou-se que o tratamento com FUL reduziu a expressão do AR na próstata ventral de ratos. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores em células tumorais prostáticas expostas ao FUL (Bhattacharyya et al.¹², 2006).

Em relação aos ERs, observou-se que a expressão proteica do ER α praticamente triplicou nas células tratadas com T, sugerindo que a ativação do receptor ocorreu, ao menos em parte, devido à aromatização de T em E2 (Yanase et al.¹⁶⁴, 2001), confirmando as evidências do presente estudo sobre os efeitos indiretos dos andrógenos em osteoclastos e seus precursores. Além disso, os tratamentos com DHT, FLU e FUL também aumentaram a expressão do ER α . Nesta perspectiva, estudos in vivo sugerem que o ER α está relacionado com a inibição da reabsorção óssea através de efeitos diretos em osteoclastos de fêmeas (Nakamura et al.¹⁰⁰, 2007; Martin-Millan et al.⁹¹, 2010). In vivo, o ER α regula a remodelação óssea em machos, enquanto em fêmeas tanto o ER α quanto o ER β estão relacionados com a regulação do metabolismo ósseo (Syed, Khosla¹⁴³, 2005). Além disso, observamos que o tratamento com FUL reduziu a expressão do ER β , sugerindo que o bloqueio farmacológico do receptor de estrógeno pode exercer efeitos sobre osteoclastos maduros, e consequentemente, favorecer a reabsorção óssea (Sorensen et al.¹³⁵, 2006).

Embora existam evidências sobre os efeitos dos andrógenos na regulação do metabolismo ósseo no gênero feminino (Shifren et al.¹³¹, 2000; Bachmann et al.⁵, 2002), as funções fisiológicas do AR podem não ser significantes devido aos altos níveis de estrógenos presentes em fêmeas (Kawano et al.⁶⁵, 2003). No entanto, em situações de baixos níveis de estrógeno como ocorre em mulheres pós-menopausadas, o AR pode mediar ações fisiológicas significantes contra a perda óssea (Davis, Wahlin-Jacobsen³³, 2015).

De modo geral, os resultados demonstram que os andrógenos exercem limitada participação na diferenciação e atividade de osteoclastos de camundongos fêmeas e que este processo é mediado, pelo menos em parte, por efeitos indiretos da T e ativação de ERs. Observamos também que a modulação de receptores de hormônios sexuais favorece a diferenciação e atividade de osteoclastos. No entanto, mais estudos são necessários para investigar os efeitos diretos dos antagonistas de receptores não esteroidais, utilizando um modelo de osteoclastogênese que empregue uma cultura pura de osteoclastos.

7 CONCLUSÃO

- ✓ Os andrógenos (T e DHT) exercem limitada participação na diferenciação e atividade de osteoclastos de camundongos fêmeas.
- ✓ Os efeitos da T sobre osteoclastos de camundongos fêmeas foram relacionados, ao menos em parte, a ações indiretas mediadas pela interconversão hormonal em E2.
- ✓ A modulação dos receptores de hormônios sexuais e o bloqueio da enzima aromatase, regulam positivamente a diferenciação e atividade de osteoclastos.
- ✓ Os andrógenos não alteraram a expressão de genes relacionados ao estágio da diferenciação osteoclástica (RANK, NFATC1, β 3 integrina e Catepsina K).
- ✓ Este estudo confirmou as evidências de que células de camundongos fêmeas expressam o AR, ER α e ER β e que os tratamentos com andrógenos e fármacos antagonistas modulam a expressão de receptores para hormônios sexuais.

REFERÊNCIAS*

1. Aggarwal S, Thareja S, Verma A, Bhardwaj TR, Kumar M. An overview on 5alpha-reductase inhibitors. *Steroids*. 2010; 75(2): 109-53.
2. Almeida M, Iyer S, Martin-Millan M, Bartell SM, Han L, Ambrogini E, et al. Estrogen receptor-alpha signaling in osteoblast progenitors stimulates cortical bone accrual. *J Clin Invest*. 2013; 123(1): 394-404.
3. Arai F, Miyamoto T, Ohneda O, Inada T, Sudo T, Brasel K, et al. Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) receptors. *J Exp Med*. 1999; 190(12): 1741-54.
4. Arpino G, Wiechmann L, Osborne CK, Schiff R. Crosstalk between the estrogen receptor and the HER tyrosine kinase receptor family: molecular mechanism and clinical implications for endocrine therapy resistance. *Endocr Rev*. 2008; 29(2): 217-33.
5. Bachmann G, Bancroft J, Braunstein G, Burger H, Davis S, Dennerstein L, et al. Female androgen insufficiency: the Princeton consensus statement on definition, classification, and assessment. *Fertil Steril*. 2002; 77(4): 660-5.
6. Bai L, Beckers L, Wijnands E, Lutgens SP, Herias MV, Saftig P, et al. Cathepsin K gene disruption does not affect murine aneurysm formation. *Atherosclerosis*. 2010; 209(1): 96-103.
7. Bashir A, Mak YT, Sankaralingam S, Cheung J, McGowan NW, Grigoriadis AE, et al. Changes in RANKL/OPG/RANK gene expression in peripheral mononuclear cells following treatment with estrogen or raloxifene. *Steroids*. 2005; 70(13): 847-55.
8. Baulieu EE, Wallace E, Lieberman S. The conversion in vitro of delta5-androstene-3beta, 17beta-diol-17alpha-H3 to testosterone-17alpha-H3 by human adrenal and placental tissue. *J Biol Chem*. 1963; 238 (4): 1316-9.
9. Bellido T, Jilka RL, Boyce BF, Girasole G, Broxmeyer H, Dalrymple SA, et al. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest*. 1995; 95(6): 2886-95.
10. Berry J. Are all aromatase inhibitors the same? A review of controlled clinical trials in breast cancer. *Clin Ther*. 2005; 27(11): 1671-84.
11. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010; 95(6): 2536-59.

* De acordo com o manual da FOAr/UNESP, adaptadas das normas Vancouver. Disponível no site: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/manualfoar.pdf>

12. Bhattacharyya RS, Krishnan AV, Swami S, Feldman D. Fulvestrant (ICI 182,780) down-regulates androgen receptor expression and diminishes androgenic responses in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(6):1539-49.
13. Bjornstrom L, Sjoberg M. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 2005; 19(4): 833-42.
14. Bourette RP, Rohrschneider LR. Early events in M-CSF receptor signaling. *Growth factors.* 2000; 17(3): 155-66.
15. Boyce BF, Xing L. The RANKL/RANK/OPG pathway. *Curr Osteoporos Rep.* 2007; 5(3): 98-104.
16. Brechter AB. Kinins-Important regulators in inflammation induced bone resorption [tese de doutorado]. Umeå: Umeå University; 2006.
17. Callewaert F, Boonen S, Vanderschueren D. Sex steroids and the male skeleton: a tale of two hormones. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; 21(2): 89-95.
18. Callewaert F, Sinnesael M, Gielen E, Boonen S, Vanderschueren D. Skeletal sexual dimorphism: relative contribution of sex steroids, GH-IGF1, and mechanical loading. *J Endocrinol.* 2010; 207(2): 127-34.
19. Callewaert F, Venken K, Ophoff J, De Gendt K, Torcasio A, van Lenthe GH, et al. Differential regulation of bone and body composition in male mice with combined inactivation of androgen and estrogen receptor- α . *FASEB J.* 2009; 23(1): 232-40.
20. Chang CS, Kokontis J, Liao ST. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988; 85(19): 7211-5.
21. Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin $\alpha(v)\beta(3)$ and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int.* 2003; 72(3): 197-205.
22. Chen Q, Kaji H, Kanatani M, Sugimoto T, Chihara K. Testosterone increases osteoprotegerin mRNA expression in mouse osteoblast cells. *Horm Metab Res.* 2004; 36(10): 674-8.
23. Chen Q, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K. Testosterone inhibits osteoclast formation stimulated by parathyroid hormone through androgen receptor. *FEBS Lett.* 2001; 491(1-2): 91-3.
24. Chin KY, Ima-Nirwana S. The effects of orchidectomy and supraphysiological testosterone administration on trabecular bone structure and gene expression in rats. *Aging Male.* 2015; 18(1): 60-6.
25. Ciruelos E, Pascual T, Arroyo Vozmediano ML, Blanco M, Manso L, Parrilla L, et al. The therapeutic role of fulvestrant in the management of patients with hormone receptor-positive breast cancer. *Breast.* 2014; 23(3): 201-8.

26. Cohen S. Role of RANK ligand in normal and pathologic bone remodeling and the therapeutic potential of novel inhibitory molecules in musculoskeletal diseases. *Arthritis Rheum.* 2006; 55(1): 15-8.
27. Colvard DS, Eriksen EF, Keeting PE, Wilson EM, Lubahn DB, French FS, et al. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86(3): 854-7.
28. Cray JJ, Jr., Durham EL, Smalley MA, Finegold DN, Siegel MI, Losee JE, et al. The effects of testosterone on craniosynostotic calvarial cells: a test of the gene/environmental model of craniofacial anomalies. *Orthod Craniofac Res.* 2011; 14(3): 149-55.
29. Cutolo M, Capellino S, Montagna P, Ghiorzo P, Sulli A, Villaggio B. Sex hormone modulation of cell growth and apoptosis of the human monocytic/macrophage cell line. *Arthritis Res Ther.* 2005; 7(5): R1124-32.
30. Dai XM, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, et al. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood.* 2002; 99(1): 111-20.
31. Davey DA. Androgens in women before and after the menopause and post bilateral oophorectomy: clinical effects and indications for testosterone therapy. *Womens Health (Lond Engl).* 2012; 8(4): 437-46.
32. Davis S. Syndromes of hyperandrogenism in women. *Aust Fam Physician.* 1999; 28(5): 447-51.
33. Davis SR, Wahlin-Jacobsen S. Testosterone in women-the clinical significance. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2015; 3(12): 980-92.
34. Davison SL, Bell R, Donath S, Montalto JG, Davis SR. Androgen levels in adult females: changes with age, menopause, and oophorectomy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(7): 3847-53.
35. Davison SL, Davis SR. Androgens in women. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 85(2-5): 363-6.
36. De Gendt K, Swinnen JV, Saunders PT, Schoonjans L, Dewerchin M, Devos A, et al. A Sertoli cell-selective knockout of the androgen receptor causes spermatogenic arrest in meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(5): 1327-32.
37. Delgado-Calle J, Bellido T. Osteocytes and Skeletal Pathophysiology. *Curr Mol Biol Rep.* 2015; 1(4): 157-67.
38. Dou C, Zhang C, Kang F, Yang X, Jiang H, Bai Y, et al. MiR-7b directly targets DC-STAMP causing suppression of NFATc1 and c-Fos signaling during osteoclast fusion and differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2014; 1839(11): 1084-96.

39. Duarte JH. Rheumatoid arthritis: osteoclasts and ACPAs - the joint link. *Nat Rev Rheumatol*. 2016; 12(2):69.
40. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1981; 53(1): 58-68.
41. Endo-Munoz L, Cumming A, Rickwood D, Wilson D, Cueva C, Ng C, et al. Loss of osteoclasts contributes to development of osteosarcoma pulmonary metastases. *Cancer Res*. 2010; 70(18): 7063-72.
42. Faloni AP, Sasso-Cerri E, Katchburian E, Cerri PS. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. *J Periodontal Res*. 2007; 42(3): 193-201.
43. Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, et al. Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(2): 589-98.
44. Fernandes SA, Gomes GR, Siu ER, Damas-Souza DM, Bruni-Cardoso A, Augusto TM, et al. The anti-oestrogen fulvestrant (ICI 182,780) reduces the androgen receptor expression, ERK1/2 phosphorylation and cell proliferation in the rat ventral prostate. *Int J Androl*. 2011; 34(5 Pt 1): 486-500.
45. Ferrucci L, Corsi A, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Taub DD, et al. The origins of age-related proinflammatory state. *Blood*. 2005; 105(6): 2294-9.
46. Forbes JF, Sestak I, Howell A, Bonanni B, Bundred N, Levy C, et al. Anastrozole versus tamoxifen for the prevention of locoregional and contralateral breast cancer in postmenopausal women with locally excised ductal carcinoma in situ (IBIS-II DCIS): a double-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2016; 387 (10021):866-73.
47. Franklin M, Bu SY, Lerner MR, Lancaster EA, Bellmer D, Marlow D, et al. Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone*. 2006; 39(6): 1331-42.
48. Franquni JV, do Nascimento AM, de Lima EM, Brasil GA, Heringer OA, Cassaro KO, et al. Nandrolone decanoate determines cardiac remodelling and injury by an imbalance in cardiac inflammatory cytokines and ACE activity, blunting of the Bezold-Jarisch reflex, resulting in the development of hypertension. *Steroids*. 2013; 78(3): 379-85.
49. Gambacciani M, Levancini M. Hormone replacement therapy and the prevention of postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny*. 2014; 13(4): 213-20.
50. Gielen E, Vanderschueren D, Callewaert F, Boonen S. Osteoporosis in men. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011; 25(2): 321-35.
51. Gimpl G, Wiegand V, Burger K, Fahrenholz F. Cholesterol and steroid hormones: modulators of oxytocin receptor function. *Prog Brain Res*. 2002; 139: 43-55.

52. Glintborg D, Altinok ML, Petersen KR, Ravn P. Total testosterone levels are often more than three times elevated in patients with androgen-secreting tumours. *BMJ Case Rep.* 2015; 2015.
53. Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, et al. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature.* 1986; 320(6058): 134-9.
54. Guay A, Davis SR. Testosterone insufficiency in women: fact or fiction? *World J Urol.* 2002; 20(2): 106-10.
55. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem.* 2001; 276(40): 36869-72.
56. Hofbauer LC, Schoppet M. Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases. *JAMA.* 2004; 292(4): 490-5.
57. Horowitz MC, Fretz JA, Lorenzo JA. How B cells influence bone biology in health and disease. *Bone.* 2010; 47(3): 472-9.
58. Horstman AM, Dillon EL, Urban RJ, Sheffield-Moore M. The role of androgens and estrogens on healthy aging and longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2012; 67(11): 1140-52.
59. Howell A. Pure oestrogen antagonists for the treatment of advanced breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006; 13(3): 689-706.
60. Huber DM, Bendixen AC, Pathrose P, Srivastava S, Dienger KM, Shevde NK, et al. Androgens suppress osteoclast formation induced by RANKL and macrophage-colony stimulating factor. *Endocrinology.* 2001; 142(9): 3800-8.
61. Imai Y, Youn MY, Kondoh S, Nakamura T, Kouzmenko A, Matsumoto T, et al. Estrogens maintain bone mass by regulating expression of genes controlling function and life span in mature osteoclasts. *Ann N Y Acad Sci.* 2009; 1173 Suppl 1: E31-9.
62. Jansen ID, Vermeer JA, Bloemen V, Stap J, Everts V. Osteoclast fusion and fission. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90(6): 515-22.
63. Jules J, Shi Z, Liu J, Xu D, Wang S, Feng X. Receptor activator of NF- κ B (RANK) cytoplasmic IVVY535-538 motif plays an essential role in tumor necrosis factor- α -mediated osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2010; 285(48): 37427-35.
64. Kameda T, Mano H, Yuasa T, Mori Y, Miyazawa K, Shiokawa M, et al. Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts. *J Exp Med.* 1997; 186(4): 489-95.
65. Kawano H, Sato T, Yamada T, Matsumoto T, Sekine K, Watanabe T, et al. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; 100(16): 9416-21.

66. Kimura S, Matsumoto T, Matsuyama R, Shiina H, Sato T, Takeyama K, et al. Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends Endocrinol Metab.* 2007; 18(5): 183-9.
67. Knopf MT, Jeon S, Smith B, Harris L, Kerstetter J, Thompson AS, et al. Effect of a randomized controlled exercise trial on bone outcomes: influence of adjuvant endocrine therapy. *Breast Cancer Res Treat.* 2016; 155(3):491-500.
68. Koh JM, Lee YS, Kim YS, Park SH, Lee SH, Kim HH, et al. Heat shock protein 60 causes osteoclastic bone resorption via toll-like receptor-2 in estrogen deficiency. *Bone.* 2009; 45(4): 650-60.
69. Kousteni S, Bellido T, Plotkin LI, O'Brien CA, Bodenner DL, Han L, et al. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell.* 2001; 104(5): 719-30.
70. Krysiak R, Drosdzol-Cop A, Skrzypulec-Plinta V, Okopien B. Sexual Function and Depressive Symptoms in Young Women With Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia. *J Sex Med.* 2016; 13(1): 34-9.
71. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology.* 1997; 138(3): 863-70.
72. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(12): 5925-30.
73. Lassemillante AC, Doi SA, Hooper JD, Prins JB, Wright OR. Prevalence of osteoporosis in prostate cancer survivors II: a meta-analysis of men not on androgen deprivation therapy. *Endocrine.* 2015; 50(2): 344-54.
74. Laurent M, Antonio L, Sinnesael M, Dubois V, Gielen E, Claessens F, et al. Androgens and estrogens in skeletal sexual dimorphism. *Asian J Androl.* 2014; 16(2): 213-22.
75. Laurent M, Gielen E, Claessens F, Boonen S, Vanderschueren D. Osteoporosis in older men: recent advances in pathophysiology and treatment. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013; 27(4): 527-39.
76. Leblebicioglu B, Connors J, Mariotti A. Principles of endocrinology. *Periodontol* 2000. 2013; 61(1): 54-68.
77. Lee DK, Chang C. Molecular communication between androgen receptor and general transcription machinery. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003; 84(1): 41-9.
78. Lerner UH. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 2000; 19(2): 107-20.
79. Li J, Al-Azzawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 2009; 63(2): 142-8.

80. Lindquist DL, de Alarcon PA. Charcoal-dextran treatment of fetal bovine serum removes an inhibitor of human CFU-megakaryocytes. *Exp Hematol*. 1987; 15(3): 234-8.
81. Liu L, Wang L, Zhao Y, Wang Y, Wang Z, Qiao Z. Testosterone attenuates p38 MAPK pathway during *Leishmania donovani* infection of macrophages. *Parasitol Res*. 2006; 99(2): 189-93.
82. Liu XH, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC. Androgens promote preosteoblast differentiation via activation of the canonical Wnt signaling pathway. *Ann N Y Acad Sci*. 2007; 1116: 423-31.
83. Maatta JA, Buki KG, Ivaska KK, Nieminen-Pihala V, Elo TD, Kahkonen T, et al. Inactivation of the androgen receptor in bone-forming cells leads to trabecular bone loss in adult female mice. *Bonekey Rep*. 2013; 2: 440.
84. Manna PR, Stetson CL, Slominski AT, Pruitt K. Role of the steroidogenic acute regulatory protein in health and disease. *Endocrine*. 2016; 51(1):7-21.
85. Mano H, Yuasa T, Kameda T, Miyazawa K, Nakamaru Y, Shiokawa M, et al. Mammalian mature osteoclasts as estrogen target cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996; 223(3): 637
86. Manolagas SC, Bellido T, Jilka RL. Sex steroids, cytokines and the bone marrow: new concepts on the pathogenesis of osteoporosis. *Ciba Found Symp*. 1995; 191:187-96; discussion 197-202.
87. Manolagas SC, Kousteni S, Jilka RL. Sex steroids and bone. *Recent Prog Horm Res*. 2002; 57: 385-409.
88. Manolagas SC, O'Brien CA, Almeida M. The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2013; 9(12): 699-712.
89. Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 2006; 7(8): 497-508.
90. Mariotti A, Mawhinney M. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Periodontol 2000*. 2013; 61(1): 69-88.
91. Martin-Millan M, Almeida M, Ambrogini E, Han L, Zhao H, Weinstein RS, et al. The estrogen receptor-alpha in osteoclasts mediates the protective effects of estrogens on cancellous but not cortical bone. *Mol Endocrinol*. 2010; 24(2): 323-34.
92. Matsuo K, Galson DL, Zhao C, Peng L, Laplace C, Wang KZ, et al. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos. *J Biol Chem*. 2004; 279(25): 26475-80.
93. Michael H, Harkonen PL, Vaananen HK, Hentunen TA. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2005; 20(12): 2224-32.

94. Miki Y, Suzuki T, Hatori M, Igarashi K, Aisaki KI, Kanno J, et al. Effects of aromatase inhibitors on human osteoblast and osteoblast-like cells: a possible androgenic bone protective effects induced by exemestane. *Bone*. 2007; 40(4): 876-87.
95. Miyamoto T. Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med*. 2011; 60(4): 101-5.
96. Mizuno Y, Hosoi T, Inoue S, Ikegami A, Kaneki M, Akedo Y, et al. Immunocytochemical identification of androgen receptor in mouse osteoclast-like multinucleated cells. *Calcif Tissue Int.* 1994; 54(4): 325-6.
97. Mooradian AD, Morley JE, Korenman SG. Biological actions of androgens. *Endocr Rev*. 1987; 8(1): 1-28.
98. Morgante G, Cappelli V, Di Sabatino A, Massaro M, De Leo V. Polycystic ovary syndrome (PCOS) and hyperandrogenism: the role of a new natural association. *Minerva Ginecol*. 2015; 67(5): 457-63.
99. Nakai Y, Tanaka N, Anai S, Miyake M, Tatsumi Y, Fujimoto K. A randomized control trial comparing the efficacy of antiandrogen monotherapy: Flutamide vs. Bicalutamide. *Horm Cancer*. 2015; 6(4): 161-7.
100. Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K, et al. Estrogen prevents bone loss via estrogen receptor alpha and induction of Fas ligand in osteoclasts. *Cell*. 2007; 130(5): 811-23.
101. Narducci P, Bareggi R, Nicolin V. Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology. *Acta Histochem*. 2011; 113(2): 73-81.
102. Nemere I, Pietras RJ, Blackmore PF. Membrane receptors for steroid hormones: signal transduction and physiological significance *J Cell Biochem*. 2003; 88(3): 438-45.
103. Nieschlag E, Vorona E. Mechanisms in endocrinology: medical consequences of doping with anabolic androgenic steroids: effects on reproductive functions *Eur J Endocrinol*. 2015; 173(2): R47-58.
104. Nijweide PJ, Burger EH, Feyen JH. Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev*. 1986; 66(4): 855-86.
105. Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, et al. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*. 2001; 81(4): 1535-65.
106. Oh JH, Lee JY, Joung SH, Oh YT, Kim HS, Lee NK. Insulin enhances RANKL-induced osteoclastogenesis via ERK1/2 activation and induction of NFATc1 and Atp6v0d2. *Cell Signal*. 2015; 27(12): 2325-31.
107. Olsen NJ, Gu X, Kovacs WJ. Bone marrow stromal cells mediate androgenic suppression of B lymphocyte development. *J Clin Invest*. 2001; 108(11): 1697-704.

108. Onakomaiya MM, Henderson LP. Mad men, women and steroid cocktails: a review of the impact of sex and other factors on anabolic androgenic steroids effects on affective behaviors. *Psychopharmacology*. 2016; 233(4):549-69.
109. Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC. Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88(15): 6613-7.
110. Oz OK, Hajibeigi A, Howard K, Cummins CL, van Abel M, Bindels RJ, et al. Aromatase deficiency causes altered expression of molecules critical for calcium reabsorption in the kidneys of female mice. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(12): 1893-902.
111. Oz OK, Zerwekh JE, Fisher C, Graves K, Nanu L, Millsaps R, et al. Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res*. 2000; 15(3): 507-14.
112. Pacifici R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss--revisited. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(2): 231-9.
113. Pandey DP, Lappano R, Albanito L, Madeo A, Maggiolini M, Picard D. Estrogenic GPR30 signalling induces proliferation and migration of breast cancer cells through CTGF. *EMBO J*. 2009; 28(5): 523-32.
114. Panwar P, Soe K, Guido RV, Bueno RV, Delaisse JM, Bromme D. A novel approach to inhibit bone resorption: exosite inhibitors against cathepsin K. *Br J Pharmacol*. 2016; 173(2): 396-410.
115. Parikka V, Lehenkari P, Sassi ML, Halleen J, Risteli J, Harkonen P, et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology*. 2001; 142(12): 5371-8.
116. Park SY, Lee SW, Kim HY, Lee SY, Lee WS, Hong KW, et al. Suppression of RANKL-induced osteoclast differentiation by cilostazol via SIRT1-induced RANK inhibition. *Biochim Biophys Acta*. 2015; 1852(10 Pt A): 2137-44.
117. Pederson L, Kremer M, Judd J, Pascoe D, Spelsberg TC, Riggs BL, et al. Androgens regulate bone resorption activity of isolated osteoclasts in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(2): 505-10.
118. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008; 70: 165-90.
119. Qi J, Hu KS, Yang HL. Roles of TNF-alpha, GSK-3beta and RANKL in the occurrence and development of diabetic osteoporosis. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(10): 11995-2004.
120. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science*. 2005; 307(5715): 1625-30.
121. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd. Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev*. 2002; 23(3): 279-302.

122. Rochira V, Kara E, Carani C. The endocrine role of estrogens on human male skeleton. *Int J Endocrinol*. 2015; 2015: 165215.
123. Saika M, Inoue D, Kido S, Matsumoto T. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*. 2001; 142(6): 2205-12.
124. Sanyal A, Riggs BL, Spelsberg TC, Khosla S. Bone marrow stromal cells express two distinct splice variants of ER-alpha that are regulated by estrogen. *J Cell Biochem*. 2005; 94(1): 88-97.
125. Sarma U, Edwards M, Motoyoshi K, Flanagan AM. Inhibition of bone resorption by 17beta-estradiol in human bone marrow cultures. *J Cell Physiol*. 1998; 175(1): 99-108.
126. Sedelaar JP, Isaacs JT. Tissue culture media supplemented with 10% fetal calf serum contains a castrate level of testosterone. *Prostate*. 2009; 69(16): 1724-9.
127. Seven A, Yuksel B, Kabil Kucur S, Yavuz G, Polat M, Unlu BS, et al. The evaluation of hormonal and psychological parameters that affect bone mineral density in postmenopausal women. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2016; 20(1): 20-5.
128. Sharma G, Prossnitz ER. GPER/GPR30 knockout mice: effects of GPER on Metabolism. *Methods Mol Biol*. 2016; 1366: 489-502.
129. Shaw AT, Gravallesse EM. Mediators of inflammation and bone remodeling in rheumatic disease. *Semin Cell Dev Biol*. 2016; 49:2-10.
130. Shevde NK, Bendixen AC, Dienger KM, Pike JW. Estrogens suppress RANK ligand-induced osteoclast differentiation via a stromal cell independent mechanism involving c-Jun repression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(14): 7829-34.
131. Shifren JL, Braunstein GD, Simon JA, Casson PR, Buster JE, Redmond GP, et al. Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy. *N Engl J Med*. 2000; 343(10): 682-8.
132. Sims NA, Dupont S, Krust A, Clement-Lacroix P, Minet D, Resche-Rigon M, et al. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone*. 2002; 30(1): 18-25.
133. Singh SM, Gauthier S, Labrie F. Androgen receptor antagonists (antiandrogens): structure-activity relationships. *Curr Med Chem*. 2000; 7(2): 211-47.
134. Sinnesael M, Jardi F, Deboel L, Laurent MR, Dubois V, Zajac JD, et al. The androgen receptor has no direct antiresorptive actions in mouse osteoclasts. *Mol Cell Endocrinol*. 2015; 411: 198-206.
135. Sorensen MG, Henriksen K, Dziegiel MH, Tanko LB, Karsdal MA. Estrogen directly attenuates human osteoclastogenesis, but has no effect on resorption by mature osteoclasts. *DNA Cell Biol*. 2006; 25(8): 475-83.

136. Speirs V, Walker RA. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol.* 2007; 211(5): 499-506.
137. Steffens JP, Coimbra LS, Ramalho-Lucas PD, Rossa C, Jr., Spolidorio LC. The effect of supra- and subphysiologic testosterone levels on ligature-induced bone loss in rats--a radiographic and histologic pilot study. *J Periodontol.* 2012; 83(11): 1432-9.
138. Steffens JP, Coimbra LS, Rossa C, Jr., Kantarci A, Van Dyke TE, Spolidorio LC. Androgen receptors and experimental bone loss - an in vivo and in vitro study. *Bone.* 2015; 81: 683-90.
139. Steffens JP, Herrera BS, Coimbra LS, Stephens DN, Rossa C, Jr., Spolidorio LC, et al. Testosterone regulates bone response to inflammation. *Horm Metab Res.* 2014; 46(3): 193-200.
140. Steffens JP, Wang X, Starr JR, Spolidorio LC, Van Dyke TE, Kantarci A. Associations between sex hormone levels and periodontitis in men: results from NHANES III. *J Periodontol.* 2015; 86(10): 1116-25.
141. Sun L, Pan J, Peng Y, Wu Y, Li J, Liu X, et al. Anabolic steroids reduce spinal cord injury-related bone loss in rats associated with increased Wnt signaling. *J Spinal Cord Med.* 2013; 36(6): 616-22.
142. Sun Y, Chen X, Chen Z, Ma X, Li D, Shang P, et al. Neuropeptide FF attenuates RANKL-induced differentiation of macrophage-like cells into osteoclast-like cells. *Arch Oral Biol.* 2015; 60(2): 282-92.
143. Syed F, Khosla S. Mechanisms of sex steroid effects on bone. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 328 (3): 688-96.
144. Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999; 256(3): 449-55.
145. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015; 36(1): 3-23.
146. Teramachi J, Zhou H, Subler MA, Kitagawa Y, Galson DL, Dempster DW, et al. Increased IL-6 expression in osteoclasts is necessary but not sufficient for the development of Paget's disease of bone. *J Bone Miner Res.* 2014; 29(6): 1456-65.
147. Tirabassi G, Biagioli A, Balercia G. Bone benefits of testosterone replacement therapy in male hypogonadism. *Panminerva Med.* 2014; 56(2): 151-63.
148. Tobias JH, Chambers TJ. The effect of sex hormones on bone resorption by rat osteoclasts. *Acta Endocrinol (Copenh).* 1991; 124(1): 121-7.
149. Turner AG, Notini AJ, Chiu WSM, Hodge J, Nicholson G, Zajac JD, Davey RA. Androgen receptor expression and function in osteoclasts. *Open Physiol J.* 2008; 1: 28-33.

150. Ucer S, Iyer S, Bartell SM, Martin-Millan M, Han L, Kim HN, et al. The effects of androgens on murine cortical bone do not require AR or ERalpha signaling in osteoblasts and osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2015; 30(7): 1138-49.
151. Van Caenegem E, Wierckx K, Taes Y, Schreiner T, Vandewalle S, Toye K, et al. Body composition, bone turnover, and bone mass in trans men during testosterone treatment: 1-year follow-up data from a prospective case-controlled study (ENIGI). *Eur J Endocrinol.* 2015; 172(2): 163-71.
152. Van Der Eerden BC, Lowik CW, Wit JM, Karperien M. Expression of estrogen receptors and enzymes involved in sex steroid metabolism in the rat tibia during sexual maturation. *J Endocrinol.* 2004; 180(3): 457-67.
153. Vanderschueren D, Boonen S, Bouillon R. Action of androgens versus estrogens in male skeletal homeostasis. *Bone.* 1998; 23(5): 391-4.
154. Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, et al. Sex steroid actions in male bone. *Endocrinol Rev.* 2014; 35(6): 906-60.
155. Vanderschueren D, Vandenput L, Boonen S, Lindberg MK, Bouillon R, Ohlsson C. Androgens and bone. *Endocrinol Rev.* 2004; 25(3): 389-425.
156. Wang C, Liu Y, Cao JM. G protein-coupled receptors: extranuclear mediators for the non-genomic actions of steroids. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(9): 15412-25.
157. Wang J, Stern PH. Sex-specific effects of estrogen and androgen on gene expression in human monocyte-derived osteoclasts. *J Cell Biochem.* 2011; 112(12): 3714-21.
158. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC. The effects of androgen deficiency on murine bone remodeling and bone mineral density are mediated via cells of the osteoblastic lineage. *Endocrinology.* 1997; 138(9): 4013-21.
159. Wiren KM, Semirale AA, Hashimoto JG, Zhang XW. Signaling pathways implicated in androgen regulation of endocortical bone. *Bone.* 2010; 46(3): 710-23.
160. Wiren KM, Semirale AA, Zhang XW, Woo A, Tommasini SM, Price C, et al. Targeting of androgen receptor in bone reveals a lack of androgen anabolic action and inhibition of osteogenesis: a model for compartment-specific androgen action in the skeleton. *Bone.* 2008; 43(3): 440-51.
161. Wiren KM, Toombs AR, Zhang XW. Androgen inhibition of MAP kinase pathway and Elk-1 activation in proliferating osteoblasts. *J Mol Endocrinol.* 2004; 32(1): 209-26.
162. Wiren KM, Zhang X, Chang C, Keenan E, Orwoll ES. Transcriptional up-regulation of the human androgen receptor by androgen in bone cells. *Endocrinology.* 1997; 138(6): 2291-300.

163. Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, et al. DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med*. 2005; 202(3): 345-51.
164. Yanase T, Mu YM, Nishi Y, Goto K, Nomura M, Okabe T, et al. Regulation of aromatase by nuclear receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001; 79(1-5): 187-92.
165. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Goto M, et al. A novel molecular mechanism modulating osteoclast differentiation and function. *Bone*. 1999; 25(1): 109-13.
166. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; 95(7): 3597-602.
167. Yeap BB, Araujo AB, Wittert GA. Do low testosterone levels contribute to ill-health during male ageing? *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2012; 49(5-6): 168-82.
168. Yeh S, Tsai MY, Xu Q, Mu XM, Lardy H, Huang KE, et al. Generation and characterization of androgen receptor knockout (ARKO) mice: an in vivo model for the study of androgen functions in selective tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(21): 13498-503.
169. Zhang G, Li J, Purkayastha S, Tang Y, Zhang H, Yin Y, et al. Hypothalamic programming of systemic ageing involving IKK-beta, NF-kappaB and GnRH. *Nature*. 2013; 497(7448): 211-6.
170. Zhou F, Han S, Zhou N, Zheng W, Li P. Effects of modified Shu-Gan-Liang-Xue decoction combined with anastrozole on osteoblastic proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells. *Mol Med Rep*. 2015; 11(3): 1639-46.

ANEXO A

unesp  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araraquara



FACULDADE DE ODONTOLOGIA

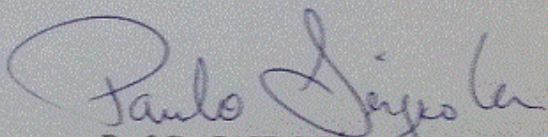
Proc. CEUA nº 19/2013

Araraquara, 26 de agosto de 2013.

Senhores Pesquisadores:

A Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA desta Faculdade, em reunião hoje realizada, após a avaliação do projeto de sua responsabilidade intitulado *"PARTICIPAÇÃO DE ANDRÓGENOS NA REGULAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOINFLAMATÓRIA E METABOLISMO ÓSSEO ASSOCIADOS À SAÚDE, DOENÇA E REPARO PERIODONTAL EM FÊMEAS"* (Proc. CEUA nº 19/2013) AUTORIZA a realização da pesquisa, ficando a apresentação do RELATÓRIO FINAL para OUTUBRO/2015.

Atenciosamente.


Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI
Coordenador da CEUA

Ao
Prof. Dr. LUIS CARLOS SPOLIDORIO
DD. Pesquisador Responsável
a/c – João Paulo Steffens
Departamento de Fisiologia e Patologia

Comissão de Ética no Uso de Animal - CEUA
Rua Humaitá nº 1.640 - Centro - CEP 13401-903 - Câmpus de Araraquara - SP

Autorizo a reprodução deste trabalho

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 21 de março de 2016.

JONLENO COUTINHO PAIVA PITOMBO