



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



**Gláucia Coletto Nunes**

**Oncostatina M controla a diferenciação de osteoblastos através do eixo OSMR-  
Shc1-STAT3: um novo caminho para a formação óssea**

**Araraquara**

**2021**



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



**Gláucia Coletto Nunes**

**Oncostatina M controla a diferenciação de osteoblastos através do eixo OSMR-Shc1-STAT3: um novo caminho para a formação óssea**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Doutora em Ciências, na Área de Biociências e Biomateriais aplicados à Odontologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Pedro Paulo Chaves de Souza

**Coorientador:** Prof. Dr. Ulf Holger Lerner

**Coorientadora:** Dra. Petra Henning

**Araraquara**

**2021**

C694o

Coletto-Nunes, Gláucia

Oncostatina M controla a diferenciação de osteoblastos através do eixo  
OSMR-Shc1-STAT3: um novo caminho para a formação óssea / Gláucia

Coletto-Nunes. -- Araraquara, 2021

71 p.: il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de  
Odontologia, Araraquara

Orientador: Pedro Paulo Chaves de Souza

Coorientador: Ulf Holger Lerner Petra Henning

1. Oncostatina M. 2. Receptores Tipo II de Oncostatina M. 3. Proteína 1 de  
Transformação que Contém Domínio 2 de Homologia de Src. 4. Fator de  
transcrição STAT3. 5. Osteoblastos. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Odontologia,  
Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

**Gláucia Coletto Nunes**

**Oncostatina M controla a diferenciação de osteoblastos através do eixo OSMR-Shc1-STAT3: um novo caminho para a formação óssea**

**Comissão Julgadora**

**Tese para obtenção do grau de Doutora em Ciências**

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

2º Examinador: Prof. Dr. Guilherme José Pimentel Lopes de Oliveira

3º Examinador: Dr. Marcell Costa de Medeiros

4º Examinador: Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara, 22 de setembro de 2021

## **DADOS CURRICULARES**

**Gláucia Coletto Nunes**

NASCIMENTO: 12/12/1993 – Assis - São Paulo.

FILIAÇÃO: Odair dos Santos Nunes  
Angela Maria Coletto

2012-2016: Graduação em Odontologia  
Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

2017-2021: Pós-Graduação em Odontologia, Área de Concentração: Biociências  
Nível: Doutorado  
Faculdade de Odontologia de Araraquara  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Aos meus amados e inesquecíveis avós:

Áurea, Cláudio e Ovídia.

## **AGRADECIMENTOS**

À todas as pessoas que permaneceram ou cruzaram meu caminho, às histórias que acumulei e às experiências, inesquecíveis, que pude viver ao longo dos últimos anos, peço licença para agradecer de maneira talvez longa, mas necessária, àquilo que o significado é tão grande, que mesmo que em muitas linhas, não poderia ser traduzido.

À mamãe, Angela Coletto, por sempre demonstrar seu amor incondicional por nós e por tudo àquilo que nos propusermos a fazer. Por através do colo pronto para o aconchego, nos permitir errar e aprender; ir, mas saber que podemos sempre voltar para àquilo que chamamos de casa, mas que na verdade é mais do que um lugar físico, é uma conexão que eu minha irmã, sempre tivemos a sorte de carregar conosco. Saiba que todas as vezes que eu me senti cansada demais para continuar, seu cuidado me mostrou que quando se está cansado, se descansa, mas nunca, nunca se desiste daquilo que, porventura, trouxe significado. E falando nele, obrigada por constantemente nos ensinar que o significado das coisas nunca esteve no produto, no que se obteve, mas sim no caminho, e é por isso que fica tão difícil agradecer às inúmeras pessoas que fizeram parte desse caminho até aqui.

Ao meu pai, Odair, por todos os ensinamentos, cuidado e amor inestimáveis.

À minha amada irmã, Ana Carolina, por ser desde que eu consiga me lembrar, minha melhor amiga, minha maior incentivadora e minha melhor companhia e, ainda que por muito tempo distantes, nunca deixar que me sentisse sozinha.

A toda minha família, em especial à Aparecida Nunes, João Otávio Nunes e Carlos Eduardo Oliveira por todo apoio, inspiração e por representarem, antes de tudo, força e resiliência.

Aos amigos que permaneceram comigo nessa trajetória, por vezes a longas distâncias, e continuaram me incentivando e compreendendo quando precisei estar ausente: Carla Dias, Bruna Vallerini, Camila Jabr, Mariana Citta, Laís Alberti, Débora Miyazaki, Mailton Leite, Iara Fetter, Amanda Rocha e Luís Felipe Assumpção: obrigada por permanecerem.

Ao Vladimir Galhardo, por toda competência e paciência para me guiar na incansável e nunca completa busca pelo autoconhecimento. Sem o seu auxílio não seria possível chegar até aqui.

Aos membros do Grupo de Pesquisa em Biologia Óssea (GPBO): Leticia, Thaís, Jorge, Aline, Fernando, Guilherme e todos os alunos de Iniciação Científica que estiveram conosco, em especial à Alícia Picanço, com quem eu tive a honra de aprender que eu poderia, de alguma forma, ensinar. Vocês, que mais do que, pessoas que dividiram comigo de alguma maneira a vida acadêmica, se tornaram amigos tão queridos e por vezes transformaram àquele laboratório em um lugar tão aconchegante e bom de se estar, mesmo que em horários não comerciais. Jorge, a você que eu tive a felicidade de dividir tantos momentos nessa caminhada, sua importância na minha história é imensurável.

Ao Professor Carlos Alberto de Souza Costa, e a todos os colegas Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais, que abriram as portas para mim quando necessário, fornecendo todo apoio e auxílio que puderam. Às queridas Taisa Pansani, Laís Cardoso e Fernanda Basso pelo apoio, risadas e ombro amigo durante esses anos.

A toda equipe da seção de Pós-Graduação da FOAr, em especial ao José Alexandre Garcia por toda competência, gentileza e dedicação. Obrigada por todo auxílio prestado de maneira impecável. Ao Professor Joni Cirelli, por todo apoio, competência e acessibilidade frente à coordenação do Programa.

À Andrea Espósito, por ter sido uma chefe brilhante e com a qual eu tive a felicidade de aprender tanto, mas ainda mais por ter se tornado uma amiga tão especial, obrigada por todo incentivo e apoio!

Aos inesquecíveis amigos que fiz Goiânia. Estar com vocês me lembrou como a vida sempre pode ter algo maravilhoso a oferecer mesmo que em meio ao caos que envolve finalizar um ciclo. Victor, Mari, Isabela, Matheus, Artur, Thaís, Ana Clara, Lara, Bruna, Jordana, Tácio, Mariana, Neto, Sebastião, Emílio, Marcília e Marize: vocês fizeram de um momento que tinha tudo para ser muito desgastante, uma das melhores experiências pessoais que eu já tive. Adiciono ao meu querido amigo, Victor Hugo

Vasconcelos, meu muito obrigada por todas as risadas que demos juntos e por tudo que eu pude aprender com você, sua determinação me inspira. Obrigada por todo o incentivo e apoio que não me deixaram desanimar.

To Morten Foss, for playing an important part of my history in Research. Thank you for the unforgettable moments of my first international experience. Your encouragement made me believe more in myself.

To my dear Swedish Co-supervisors, Ulf Lerner and Petra Henning, for being inspiring researchers for whom I have immense admiration. Thank you for giving me one of the most amazing experiences I could ever have, and for teaching me so much. Your valuable contribution to my work and my learning is immeasurable. Tack!

Petra, I will always be immensely grateful to life for having given me you and your family as dear wonderful friends. So, here's also my thank you to the lovely Hennings!

To members of the Center for Research on Bones and Arthritis (CBAR) whom I had the honor to meet, especially sweet Mirela Ribic for all her kindness and affection.

Por fim, ao meu orientador Pedro, razão pela qual eu pude fazer todos esses agradecimentos acima. Fiz questão de escrever muito sobre a minha trajetória, porque eu jamais conseguiria colocar em palavras todas as coisas pelas quais eu sou grata a você, então eu tentei fazer com que você soubesse e sentisse o quanto você me deu. Ser sua aluna foi um grande presente e eu sempre serei muito grata. Grata por você sempre me mostrar que eu sempre posso um pouco mais, mas principalmente, por me mostrar que, mesmo que se aprenda muito sobre algo que antes se sabia pouco, sempre se pode aprender um pouquinho mais. Isso é Ciência. E você me faz acreditar nela de uma maneira muito genuína.

#### **À CAPES:**

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

“Eu sou uma pessoa curiosa do abismo. Embora tenha a consciência de que o abismo é tão profundo, que eu apenas passo nas bordas...”

Nise da Silveira\*

---

\* Silveira N. Posfácio: Imagens do Inconsciente. Documentário de Leon Hirszman, 1986 – 2014, entrevista feita em 15 e 19 de abril de 1986.

Coletto-Nunes G. Oncostatina M controla a diferenciação de osteoblastos através do eixo OSMR-Shc1-STAT3: um novo caminho para a formação óssea. [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

## RESUMO

Processos inflamatórios próximos ao tecido ósseo levam, clinicamente, à reabsorção desse tecido. Porém, a noção corrente de que a inflamação inibe a formação de osso vem sendo questionada por estudos que comprovam o papel de citocinas pró-inflamatórias também na formação óssea. Dentre essas, as citocinas da família gp130, são potenciais candidatas a exercerem esse papel anabólico. Essas citocinas sinalizam através da dimerização de receptores com a subunidade gp130 e caracteristicamente podem ativar as vias Janus Kinase/Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição (JAK/STAT), frequentemente ativando STAT3. Entre os membros dessa família, Oncostatina M (OSM) e Fator Inibidor de Leucemia (LIF) são estruturalmente e funcionalmente semelhantes. Entretanto, a Oncostatina M se destaca entre os membros por ser reconhecida atualmente como uma potente indutora da formação óssea *in vivo* e *in vitro*. Além disso, o protagonismo de OSM também pode ser evidenciado pelo fato de seu receptor específico (OSMR) recrutar uma proteína adaptadora, conhecida como Proteína 1 de Transformação que Contém Domínio 2 de Homologia de Src (Shc1), durante a sinalização. Para elucidar melhor o papel, tanto dessa proteína como de STAT3 sobre a formação óssea induzida por OSM, osteoblastos de calvária murinos foram cultivados e tratados com OSM de camundongo (mOSM) ou LIF de camundongo (mLIF) e submetidos a análises de expressão gênica, formação de nódulos de mineralização e atividade de fosfatase alcalina (ALPase). Nossos dados demonstram que mOSM, diferentemente de mLIF induz a diferenciação dessas células, a formação de nódulos de mineralização e atividade de ALPase. As análises de Western blot e expressão de mRNA de *Shc1*, determinaram que mOSM além de aumentar os níveis de expressão gênica de *Shc1*, também induz a fosforilação da proteína pShc, diferentemente de mLIF. Para determinar a via de sinalização induzida por mOSM, foram silenciados receptores envolvidos no início da sinalização (gp130/IL6st, OSMR e LIFR), SHC1 e STAT3. As células silenciadas foram submetidas a análise de atividade de ALPase, vermelho de alizarina e RT-qPCR para Alpl. Nossos dados demonstraram que gp130, OSMR, Shc1 e Stat3 são essenciais para a formação óssea induzida por OSM, já que o silenciamento dessas proteínas inibiram o aumento dos marcadores associados a formação óssea induzida por mOSM. Desta forma, demonstramos que além de Shc1 ser crucial nesse processo, o eixo OSMR-Shc1-Stat3 é caminho pelo qual OSM parece induzir a formação óssea em osteoblastos *in vitro*.

**Palavras – chave:** Oncostatina M. Receptores Tipo II de Oncostatina M. Proteína 1 de Transformação que Contém Domínio 2 de Homologia de Src. Fator de transcrição STAT3. Osteoblastos.

Coletto-Nunes G. Oncostatin M controls, through the OSMR-Shc1-STAT3 axis, the differentiation of osteoblasts: a new pathway for bone formation [tese de doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2021.

## ABSTRACT

Inflammatory processes close to bone tissue, clinically, can provide tissue resorption. However, the common view that inflammation inhibits bone formation has been questioned by studies that prove the role of pro-inflammatory cytokines also in bone formation. Among these, the gp130 family, composed of cytokines that share a gp130 receptor subunit for intracellular signaling, are potential candidates to play this anabolic role. These cytokines signal through receptor dimerization with the gp130 subunit and can characteristically activate JAK/STAT pathways, often activating STAT3. Among the members of this family, Oncostatin M (OSM) and Leukemia Inhibitory Factor (LIF) are structurally and functionally similar. However, Oncostatin M stands out among the remaining members because it is currently recognized as a potent inducer of bone formation in vivo and in vitro. Furthermore, OSM's protagonism can also be evidenced by the fact that its specific receptor (OSMR) recruits an adapter protein, known as Shc1, during signaling. To better elucidate the role of both this protein and STAT3 on OSM-induced bone formation, murine calvaria osteoblasts were first cultured and treated with mOSM or mLIF and later submitted to gene expression, mineralization nodule formation and activity of ALPase analysis. Proved that, unlike LIF, mOSM induces the differentiation of these cells, the formation of mineralization nodules and ALPase activity, a Western blot was performed and with the analysis of the expression of *Sch1* mRNA, determined that mOSM in addition to increasing the *Sch1* gene expression levels also induce pShc protein phosphorylation, unlike mLIF. Thus, the cells were silenced for the target genes of interest, starting by receptors involved in the beginning of signaling, and later treated with mOSM, also proving through RT-qPCR that the increase in *Alpl* mRNA expression induced by mOSM is through OSMR. Furthermore, cells silenced for Shc1 and STAT3 and later treated with mOSM, after submitted the same analyzes described above, demonstrated that both Shc1 and Stat3 are essential for bone formation induced by OSM, since the silencing of these proteins inhibited the increase in markers associated with bone formation caused by mOSM, thus confirming that, in addition to Shc1 being crucial in this process, the OSMR-Shc1-Stat3 axis is the way through which OSM seems to induce bone formation in osteoblasts.

**Keywords:** Oncostatin M. Receptors, Oncostatin M, Type II. Src Homology 2 Domain-Containing. STAT3 Transcription Factor. Osteoblasts.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>17</b>
2.1 Objetivos Específicos .....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
3.1 Metabolismo Ósseo .....	18
3.1.1 Interação entre as células ósseas .....	21
3.2 Família gp130.....	22
3.3 Oncostatina M (OSM).....	25
3.4 Oncostatina M Versus LIF .....	26
3.5 Complexos receptores: OSMR e LIFR.....	27
3.6 OSM Versus LIF no Metabolismo Ósseo.....	29
3.7 Vias de Sinalização Intracelular: JAK/STAT .....	30
3.8 Shc1.....	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1 Animais.....	36
4.2 Isolamento de Osteoblastos de Calvária e Cultura Celular .....	36
4.3 Silenciamento em Osteoblastos .....	38
4.4 Expressão Gênica .....	40
4.4.1 Extração de RNA .....	41
4.4.2 Síntese de cDNA.....	41
4.4.3 PCR em tempo real – RTq-PCR.....	42
4.5 Ensaio de Mineralização com Vermelho de Alizarina .....	43
4.6 Ensaio da Atividade de Fosfatase Alcalina.....	44
4.6.1 Coloração.....	44
4.6.2 Quantificação.....	44
4.7 Western Blot .....	45
4.7.1 Lisado celular .....	46
4.7.2 Eletroforese em gel .....	46
4.7.3 Transferência .....	46
4.7.4 Bloqueio.....	47

4.7.5 Detecção .....	47
4.7.6 Quimioluminescência .....	47
4.8 Análise Estatística.....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 mOSM, Mas Não mLIF, Induz a Diferenciação de Osteoblastos Através do Aumento da Mineralização In Vitro, Atividade de Fosfatase Alcalina e Expressão Gênica de <i>Alpl</i> .....	49
5.2 mOSM, Mas Não mLIF, Aumenta os Níveis da Expressão Gênica e Induz a Fosforilação de Shc1.....	51
5.3 O Silenciamento de Osmr Afeta a Expressão Gênica de <i>Alpl</i> induzida por mOSM .....	52
5.4 O silenciamento de Sch1 Inibe a Diferenciação de Osteoblastos Induzida por mOSM.....	54
5.5 O Silenciamento de Stat3 Inibe a Diferenciação de Osteoblastos induzida por mOSM.....	55
6 DISCUSSÃO .....	58
7 CONCLUSÃO .....	62
REFERÊNCIAS .....	63
APÊNDICE A – PUBLICAÇÕES RESULTANTES DO PERÍODO DO DOUTORADO .....	69
ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL - FOAr .....	70
ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL - UFG .....	71

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma entidade dinâmica e constantemente remodelada por meio de diversos fatores que estimulam ou inibem os processos de formação e reabsorção óssea. A massa óssea é mantida por um processo orquestrado conhecido como remodelação óssea. Nesse processo, os eventos de reabsorção e formação estão intimamente acoplados e acontecem de maneira fisiológica, garantindo a homeostase óssea<sup>1,2</sup>.

Em processos inflamatórios são liberados diversos fatores que podem afetar a relação harmônica entre formação e reabsorção. Nestes casos, observa-se frequentemente fenótipos osteolíticos, como o que acontece na doença periodontal e artrite reumatoide, ambas doenças de caráter inflamatório onde citocinas secretadas por diferentes tipos de células influenciam a atividade de osteoblastos e osteoclastos<sup>3</sup>. No entanto, a visão comum de que a inflamação favorece apenas a reabsorção tem sido questionada, visto que também se observa formação óssea associada a lesões inflamatórias (dados não publicados do nosso grupo). Estudos recentes têm demonstrado o papel de citocinas pró inflamatórias sobre a indução da formação óssea<sup>4,5</sup> esses achados abrem novos caminhos para a compreensão do mecanismo envolvido na remodelação óssea induzida por inflamação e o papel das citocinas na formação óssea. Compreender esses mecanismos seria útil para buscar intervenções para prevenir os efeitos deletérios causados por citocinas e usar as vias anabólicas para terapias regenerativas ósseas.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias, aquelas pertencentes à família gp130 são possíveis candidatas ao efeito anabólico causado pela inflamação. Um estudo recente demonstrou que a ativação de gp130, a subunidade receptora compartilhada por esta família de citocinas, parece ser mais importante para a formação óssea do que para a reabsorção óssea<sup>6</sup>.

Entres os membros da família gp130, conhecidos pelo seu potencial sobre o metabolismo ósseo, pode-se se destacar duas citocinas estruturalmente, geneticamente e funcionalmente semelhantes: OSM e LIF<sup>7,8</sup>. Tanto OSM quanto LIF podem sinalizar através da ligação com o complexo heterodímero tipo I -

LIFR/gp130 e provavelmente por esse motivo, podem apresentar redundância funcional, estando envolvidas em diversos processos biológicos que vão desde a proliferação celular e sobrevivência neural à hematopoiese e metabolismo ósseo<sup>9</sup>.

Quando se trata do metabolismo ósseo, essas citocinas demonstraram papel importante tanto na reabsorção quanto na formação óssea<sup>10</sup>. Embora LIF possua influência sobre a dinamicidade do tecido ósseo, estudos recentes têm demonstrado um papel majoritariamente anabólico de Oncostatina M sobre a formação óssea<sup>11</sup>. Essa diferença pode ser explicada tanto pelo complexo receptor pela qual essas citocinas iniciam a sinalização celular, como também pelas vias que são internamente acionadas após essa ligação.

Os membros da família gp130 sinalizam, mais frequentemente, através da ativação de uma cascata de sinalização JAK-STAT. A subunidade gp130 se associa a tirosinas quinases como Jak1, Jak2, e Tyk2 para que ocorra a fosforilação, já que o receptor gp130 não possui atividade tirosino-quinase intrínseca. A ativação da via JAK, por sua vez, possibilita a ancoragem de proteínas ligadas às vias de sinalização STAT1 e STAT3, SHP2 / RAS / MAPK e STAT5<sup>4,10,12</sup>. A importância do eixo gp130-STAT3 para a formação óssea já foi demonstrada *in vivo*<sup>13,14</sup> e indica um importante papel dessa via na diferenciação de osteoblastos induzida pelos membros da família gp130.

Embora o eixo gp130-STAT3 esteja estabelecido como via de sinalização para citocinas dessa família, no que diz respeito ao ambiente ósseo, ele pode e deve ser mais bem elucidado, já que a ativação de tirosinas-quinases depende de uma série de proteínas adaptadoras, que acabam por modular a sinalização.

Uma destas proteínas, envolvida na sinalização de Oncostatina M é a proteína adaptadora Shc1<sup>15,16</sup>. O papel de Shc1 sobre a regulação da fosforilação de STAT3 vem sendo investigado pelo nosso grupo de pesquisa em osteoblastos, sendo descrito pioneiramente o recrutamento dessa proteína adaptadora no aumento da expressão de RANKL, induzida por Oncostatina M<sup>17</sup>. Para destacar a importância desta via, Sabourin et al. demonstraram que a ativação desta proteína regula a fosforilação de STAT3 em células tumorais, promovendo a imunossupressão induzida por câncer de mama<sup>18</sup>.

Sendo assim, essa tese foi desenvolvida com o objetivo de analisar a hipótese de que a Oncostatina M sinaliza através do eixo OSMR-SHC1-STAT3 para induzir a diferenciação de osteoblastos e, conseqüentemente, acarretando o aumento da formação óssea.

## **2 PROPOSIÇÃO**

O objetivo geral desse estudo foi avaliar a participação da proteína adaptadora Shc1 na fosforilação de STAT3 e diferenciação de osteoblastos induzida por OSM.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- a. Confirmar o efeito indutor ósseo da Oncostatina M sobre osteoblastos de calvária.
- b. Avaliar os complexos receptores pelos quais Oncostatina M inicia a sinalização celular.
- c. Avaliar o papel da proteína adaptadora Shc1 na diferenciação induzida por Oncostatina M.
- d. Avaliar o papel de STAT3 na diferenciação de osteoblastos de calvária induzida por mOSM.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Metabolismo Ósseo

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo especializado que sofre alterações por toda a vida do indivíduo. A propriedade dinâmica atribuída ao metabolismo ósseo é proveniente da capacidade de adaptação como resposta aos diversos estímulos mecânicos, hormonais e moleculares pelos quais dois processos e fundamentais regulam a forma e a massa óssea, sendo, respectivamente, a modelação e remodelação óssea<sup>2,19</sup>. Durante o crescimento, mas não apenas durante esse estágio de desenvolvimento, a modelação é o processo fundamental pelo qual o metabolismo ósseo responde aos estímulos de carga mecânica e medicamentos, induzindo, assim, a formação óssea de maneira independente da reabsorção. A remodelação óssea, por sua vez, é o mecanismo fisiológico pelo qual a massa óssea é mantida e o tecido ósseo é substituído. Nesse processo, o equilíbrio estabelecido entre reabsorção e a formação, são interdependentes e acontecem no mesmo local, garantindo assim a homeostase óssea. Diferente da modelação, o processo de remodelação acontece com maior frequência nos ossos trabeculares e endocorticais, enquanto a modelação parece estar mais ligada ao perióstio<sup>1</sup>.

O desequilíbrio entre formação e a reabsorção óssea pode resultar no desenvolvimento de diversas patologias ósseas, como o que acontece na osteoporose, onde prevalece a reabsorção do tecido ósseo, comprometendo a saúde e manutenção da massa óssea<sup>20</sup>. A formação e a reabsorção ocorrem na remodelação através das Unidades Multicelulares Básicas (BMUs). As BMUs possuem cerca de 1–2 mm de comprimento e 0,2–0,4 mm de largura<sup>21</sup> e são compostas por osteoclastos e osteoblastos, que em conjunto com os osteócitos e osteomorfos, orquestram o metabolismo ósseo.

Os osteoblastos, são tipo celulares proveniente de linhagem mesenquimal, responsáveis por realizarem a aposição e mineralização óssea<sup>22</sup>. A matriz óssea, parte orgânica do tecido ósseo, é constituída por vários tipos de proteínas, como colágeno tipo I, osteocalcina, osteonectina, osteopontina e sialoproteína óssea<sup>1</sup>. Além da deposição da matriz extracelular, que quando não

mineralizada é chamada de osteóide, os osteoblastos também são responsáveis pela mineralização desse tecido pela formação de cristais de hidroxiapatita<sup>23</sup>.

Um gene em específico é considerado o mais antigo conhecido fator de transcrição osteoblástico: Cbfa/Runx2<sup>24</sup>. Além desse, as proteínas morfogenéticas ósseas (BMP's) são produzidas pelos osteoblastos em respostas a diversos estímulos moduladores do tecido ósseo. A expressão de um número de proteínas da matriz extracelular relacionadas ao osso, alta atividade enzimática da fosfatase alcalina (ALP), respostas a hormônios e citocinas são consideradas as principais características dos osteoblastos<sup>1,24,25</sup>.

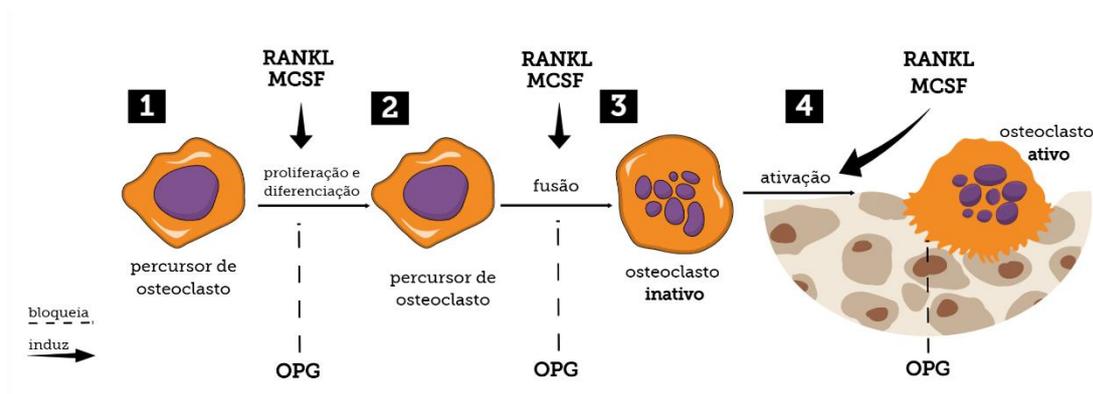
Após realizarem sua função podem originar dois tipos celulares, as células de revestimento ósseo, que ficam na superfície do tecido ou, ainda, as que ficam aprisionados durante a aposição de matriz óssea e dão origem ao segundo tipo celular fundamental para o metabolismo ósseo: os osteócitos<sup>23</sup>.

Apesar do osteócito se originar de um osteoblasto, difere-se da célula formadora óssea não só pelo local de ação, mas também pela morfologia e função, sendo essencial para manutenção óssea. A influência dessa célula pode orquestrar a interação celular que ocorre entre o osteoblasto e osteoclasto, ou seja, entre a formação e reabsorção. Isso acontece principalmente pelo fato de o osteócito utilizar a secreção ou inibição de uma proteína, conhecida como esclerostina para indução ou inibição de uma grande via de sinalização envolvida no metabolismo ósseo: a via Wnt. Como uma das mais importantes vias de formação óssea, essa via pode ser inibida ou estimulada pela esclerostina secretada pelos osteócitos<sup>26</sup>. Os osteócitos orquestram a reabsorção e a formação óssea controlando a atividade dos osteoblastos e osteoclastos<sup>27</sup>.

Os osteoclastos são células multinucleadas de origem hematopoiéticas e são as únicas células com capacidade de reabsorver tecido ósseo<sup>22</sup>. O principal sistema regulador da osteoclastogênese e conseqüentemente da reabsorção óssea, RANK/RANKL/OPG, é modulado através da comunicação entre osteoblastos e osteoclastos. A proteína ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), é uma proteína de membrana expressa pelas células precursoras de osteoblastos que quando acoplada ao receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), expresso na membrana das células previamente

expostas a M-CSF, dá início à diferenciação de osteoclastos<sup>28</sup>. A osteoprotegerina (OPG) por sua vez é também expressa por osteoblastos e diversos outros tipos celulares e atua inibindo a diferenciação de osteoclastos através da ligação com RANKL, impedindo a ligação RANK/RANKL de ocorrer e consequentemente a osteoclastogênese (Figura 1)<sup>29</sup>.

**Figura 1** – Diferenciação de osteoclastos orquestrada pelos fatores RANK/RANKL



Fonte: Elaboração própria.

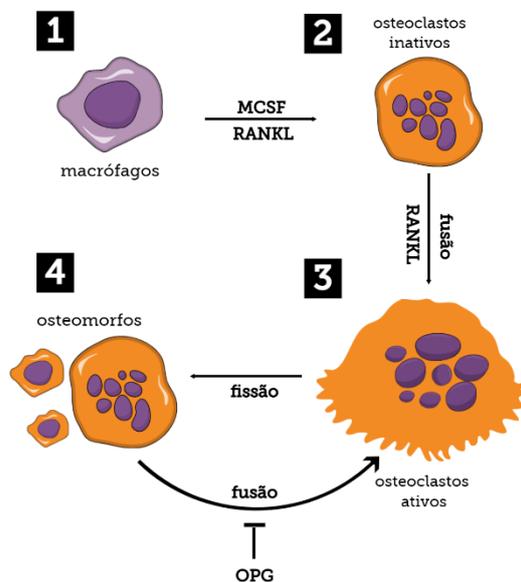
Embora o papel principal dos osteoclastos no processo de reabsorção, fisiológico ou patológico, seja bem estabelecido, características atribuídas ao tecido ósseo, como sua opacidade e seu alto índice de refração podem dificultar a visualização desse tipo celular in vivo, tornando complexa a obtenção de informações importantes sobre o ciclo de vida desse tipo celular ósseo, como sua formação e a localização no tecido. Com o objetivo de elucidar o ciclo celular do osteoclasto, um estudo recente, relatou a existência de um novo tipo de célula no ambiente ósseo antes não conhecido: os osteomorfos<sup>30</sup>.

Segundo Mc Donald<sup>30</sup>, os osteomorfos, embora transcricionalmente distinto tanto dos monócitos quanto dos osteoclastos são resultantes de um processo de fissão que pode ocorrer no osteoclasto ativo estimulado por RANKL, demonstrando que essas células participam de uma espécie de reciclagem celular e através da fusão (também induzida por RANKL ou bloqueada por OPG) podem retornar ao estado de osteoclasto ativo ao invés de sofrer apoptose como se acreditava anteriormente (Figura 2). A compreensão acerca desse

mecanismo abastece a base para estudos de desenvolvimento em medidas terapêuticas, já que essa célula e o subsequente processo de reciclagem a qual ela participa pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento e manutenção de diversas doenças de caráter osteolítico onde podem ocorrer ciclos desregulados de fissão/fusão, como osteoporose ou a Doença de Paget<sup>30</sup>.

Estudos que examinam as interações entre osteoclastos, osteomorfos, osteoblastos e osteócitos podem revelar mais informações sobre a dinâmica celular da renovação óssea.

**Figura 2** – Ciclo de reciclagem celular dos osteomorfos/osteoclastos



Fonte: Elaboração própria, adaptado de Mc Donald<sup>30</sup>.

### 3.1.1 Interação entre as células ósseas

A liberação de moléculas derivadas dos osteoblastos pode induzir a reabsorção óssea, assim como os osteoclastos podem produzir fatores de acoplamento que agem diretamente nos osteoblastos, regulando a formação óssea<sup>27</sup>. A interação entre essas células é um dos mecanismos pelos quais pode se regular a remodelação óssea<sup>1</sup>.

Além do sistema RANK/RANKL/OPG, os osteócitos também são responsáveis pela comunicação que controla a formação e reabsorção através da produção e liberação de esclerostina. A esclerostina regula negativamente a formação óssea devido a sua ação inibitória sobre a via de sinalização WNT, uma das principais vias pela qual os osteoblastos são induzidos a realizarem as funções de aposição e mineralização óssea. Atualmente, estudos avaliam a capacidade de moléculas de anticorpos inibirem a ação da esclerostina e se tornarem, assim, possível alvo terapêutico contra a osteoporose, por exemplo<sup>1, 31</sup>.

Estão ligados ainda a regulação desse processo, diversos fatores como: fatores de crescimento como IGF-1 e TGF- $\beta$ ; hormônios como o PTH, indutor de formação óssea; proteínas morfogenéticas, como as BMPs que regulam a diferenciação das células mesenquimais e, por fim, as citocinas, que podem ser potentes indutoras de formação ou reabsorção óssea através de seu efeito sobre as células do tecido ósseo<sup>1, 3</sup>.

Dentre as citocinas mais avaliadas pela sua ação no metabolismo ósseo, estão os membros da família gp130, uma família de citocinas pró-inflamatórias de origem hematopoiética e com conhecida capacidade de modular o metabolismo ósseo<sup>3</sup>.

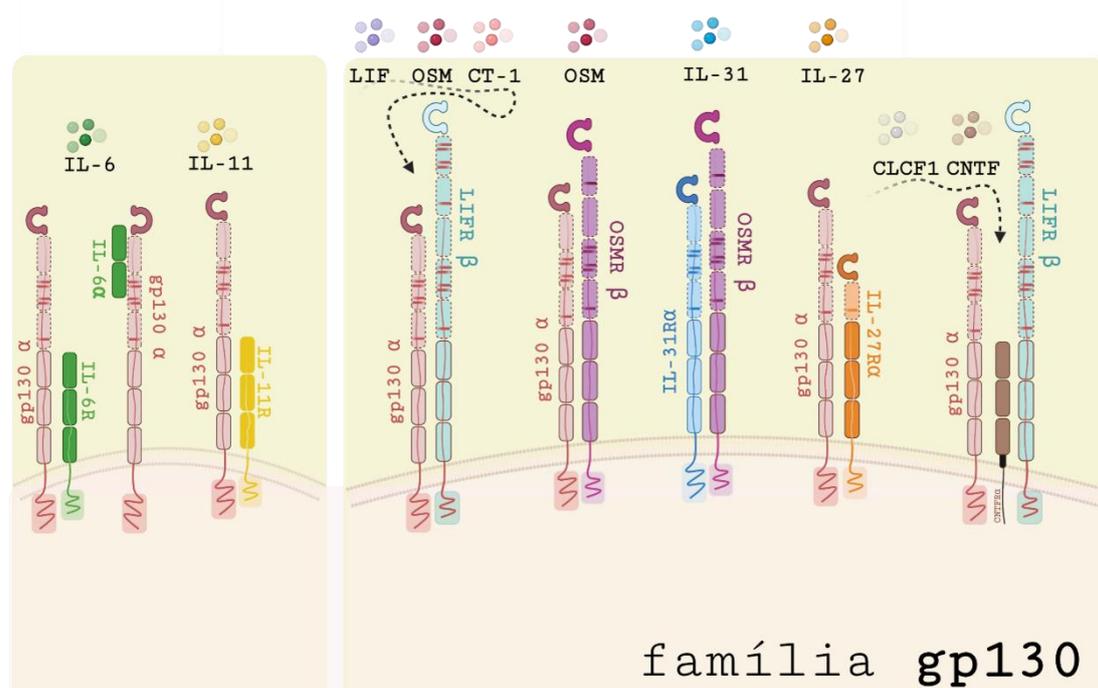
### **3.2 Família gp130**

A família gp130 é composta por citocinas pró inflamatórias e hematopoiéticas que utilizam para sinalização intracelular uma subunidade receptora comum: a glicoproteína 130 kDa (gp130). Os membros dessa família, IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF, CLC, CT-1, IL-27 e IL-31 são mediadores pleiotrópicos conhecidos pelo seu envolvimento na coordenação de diversos processos biológicos, que vão desde à modulação do sistema imunológico à capacidade de regular o metabolismo ósseo através de processos como proliferação e diferenciação celular<sup>9</sup>.

Os membros da família gp130 frequentemente apresentam redundância funcional, o que pode ser facilmente explicada pelo fato dessas citocinas

compartilharem da presença de uma subunidade de gp130 em seus complexos receptores, sejam eles heterodiméricos ou homodiméricos para suas respectivas sinalizações celular<sup>3</sup>. Embora a maioria dessas citocinas utilizem um complexo receptor heterodimérico, composto por uma subunidade gp130 em conjunto a uma subunidade alternativa/específica de receptores, duas delas, IL-11 e IL-6 necessitam de duas subunidades de gp130 para sinalização em um complexo homodimérico, como a IL-11 ou, hexamérico no caso da IL-6<sup>32</sup>, no qual um receptor específico será associado. IL-31 é o único membro dessa família que não compartilha a subunidade de gp130 para sinalização, utilizando embora uma subunidade de receptor específico de Oncostatina M em conjunto com seu respectivo receptor (IL-31R $\alpha$ ), o que permite sua associação aos membros restantes (Figura 3).

**Figura 3** – Receptores da família gp130 conforme os membros



Fonte: Elaboração própria, criado com BioRender.com.

A influência dos membros dessa família no metabolismo ósseo pode ser explicada pela presença do receptor gp130, expresso ubiquamente, nas células ósseas, o que permite que essas citocinas regulem as atividades celulares através dessa ligação<sup>5</sup>. Como demonstrado na Tabela 1, os osteoblastos,

osteócitos e osteoblastos expressam receptores para determinadas citocinas dessa família. + indica a expressão reportada positiva no tipo celular e - indica a ausência confirmada de expressão do receptor nesse tipo celular. Como os osteomorfos são células descritas recentemente, não há informações sobre a expressão de receptores.

**Tabela 1-** Expressão de gp130 nas células ósseas

<b>Receptores</b>	<b>Osteoclastos</b>	<b>Osteoblastos</b>	<b>Osteócitos</b>
gp130	+	+	+
Il-6R	+	+	+
Il-11R	+	+	não reportado
LIFR	-	+	+
CNTFR	não reportado	+	não reportado
OSMR	-	+	+
WSX-1	não reportado	+	não reportado

Fonte: Adaptado de Sims e Walsh<sup>5</sup> (2010, p.514).

Embora os membros dessa família estejam constantemente ligados ao estímulo direto ou indireto da osteoclastogênese, sabe-se também que essas citocinas podem regular, de maneira diferente, a atividade dos osteoblastos no osso trabecular e no periosteal<sup>33</sup>. Ao contrário do que se imaginava anteriormente, ao invés de promover a formação de osteoclastos, a principal função da sinalização de gp130 nos osteoblastos é, na verdade, manter a formação e a força óssea através da ação dos osteócitos, que ao estimularem a diferenciação dos osteoblastos e a produção de colágeno garantem uma formação óssea trabecular ao mesmo tempo que mantêm a composição óssea cortical saudável<sup>6</sup>.

Apesar de não haver dúvidas em relação a participação na modulação do tecido ósseo pelas citocinas dessa família, algumas delas, mais do que outras podem apresentar papéis um tanto quanto curiosos sobre o turnover ósseo e, que, se mais bem elucidados e descritos podem oferecer alternativas

terapêuticas para doenças de caráter osteolítico. No tópico a seguir, apresenta-se um dos membros da família gp130 com grande potencial sobre o metabolismo ósseo: a Oncostatina M.

### 3.3 Oncostatina M (OSM)

A OSM foi inicialmente descrita como um polipeptídeo regulador de crescimento, produzido por células diferenciadas de linfoma histiocítico, com capacidade de inibir a proliferação de células de melanoma A375 e outras células tumorais ao mesmo tempo que aumentava proliferação de fibroblastos normais de humanos<sup>34</sup>. Entretanto, a supressão não parece ser o único papel tumoral de OSM já que tem sido sugerido que essa citocina suporte a metástase de câncer de mama<sup>35</sup> e estimule o sarcoma de Kaposi<sup>36</sup>. Ao longo dos anos, OSM foi identificada em vários outros processos biológicos além do tumoral, evidenciando sua multifuncionalidade<sup>37</sup>.

Essa citocina é produzida por vários tipos celulares no corpo humano, principalmente por monócitos, macrófagos, células T, células dendríticas, neutrófilos e osteoblastos<sup>38</sup>. Como uma citocina pleitrópica e pró-inflamatória, pode atuar em diversos tecidos e tipos celulares, estando envolvida na modulação de diversos processos biológicos como: regulação do sistema nervoso central; resposta inflamatória; indução de cardiomiócitos; manutenção da hematopoiese; estimulação da angiogênese e por fim; na regulação do metabolismo ósseo atuando tanto na reabsorção, quanto na formação óssea por meio da diferenciação de células mesenquimais e supressão de diferenciação de adipócitos<sup>11,37,39</sup>.

A Oncostatina M pode se ligar, com afinidade distinta, em dois tipos de complexos heterodiméricos, o tipo I que consiste em uma subunidade de LIFR e gp130 e o tipo II formado a partir de uma subunidade de gp130 associado a uma subunidade de receptor específico da OSM, o OSMR(7). E embora seja a única citocina da família que pode se ligar a dois complexos receptores, a possibilidade de sinalizar através de um complexo específico (tipo II) garante a essa citocina, propriedades exclusivas sobre os processos biológicos que modula<sup>15</sup>.

Entretanto, a capacidade bimodal para sinalização via receptor de LIFR, entre outros fatores, garante a OSM, além de multifuncionalidade, uma possível redundância funcional com outro membro da família gp130: LIF.

### 3.4 Oncostatina M Versus LIF

Entre os membros da família gp130, OSM e LIF são as duas citocinas que mais se assemelham<sup>8</sup>, seja estruturalmente, geneticamente e, por consequência, funcionalmente<sup>7</sup>. Estruturalmente, ambas citocinas são formadas por uma estrutura secundária contendo quatro feixes helicoidais ligados entre si, fato comum para os membros dessa família<sup>9</sup>. Geneticamente, pela localização do gene no cromossomo ser próxima, sugere-se que ambos os genes tenham sido originados por duplicação<sup>8,9,37</sup>. Além da localização cromossômica, outras semelhanças genéticas são encontradas entre OSM e LIF como mostra a Tabela 2. Propriedades como quantidade de aminoácidos na proteína madura, quantidade de éxons, resíduos de cisteína e peso da massa molecular foram comparadas, evidenciando suas semelhanças<sup>9,37</sup>.

**Tabela 2** -Comparação das propriedades genéticas de OSM e LIF

<b>Propriedades Genéticas</b>	<b>OSM</b>	<b>LIF</b>
Número de aminoácidos	196	180
Massa molecular (kDa)	28	45
Número de resíduos de cisteína	6	5
Número de Éxons	3	3
Localização no cromossomo	22q12	22q12

Fonte: Elaboração própria.

Funcionalmente, LIF foi descrita inicialmente pela sua capacidade de induzir diferenciação de células mieloides leucêmicas<sup>40</sup> e OSM por inibir a proliferação de mieloblastoma e outros tumores<sup>34</sup>. Tanto LIF quanto OSM,

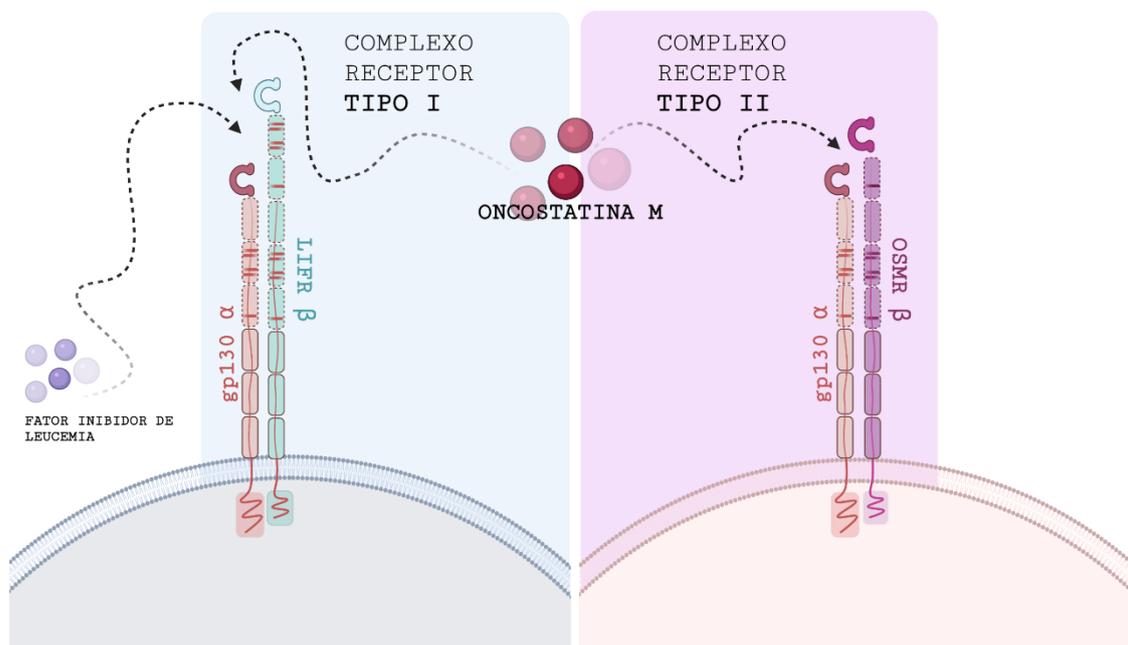
apresentam ações pleiotrópicas ligadas a proliferação, inibição celular, regulação das proteínas de fase aguda, sobrevivência neural, hematopoese e metabolismo ósseo entre outras atividades específicas de cada uma<sup>9</sup>.

As atividades biológicas sobrepostas entre OSM e LIF podem ser explicadas pelo fato de que o complexo receptor de sinalização utilizado por LIF, também pode ser acionado por OSM em células que expressam ambos os receptores e embora OSM possua funções biológicas em comum com LIF, essa citocina apresenta funções biológicas únicas, que provavelmente, que são sinalizadas através do seu receptor específico  $\beta$ , OSMR (gp130/OSMR)<sup>7</sup>.

### 3.5 Complexos receptores: OSMR e LIFR

Assim como os outros membros da família gp130, OSM compartilha gp130 como uma subunidade receptora  $\alpha$  e a interação OSM/gp130 recruta uma segunda subunidade receptora, chamada de  $\beta$ , podendo então sinalizar através de dois tipos de complexos heterodiméricos: o tipo I, formado por gp130 e LIFR, no qual LIF também sinaliza ou; o tipo II formado por gp130 e OSMR (Figura 4).

**Figura 4** – Sinalização de OSM e LIF através dos complexos receptores

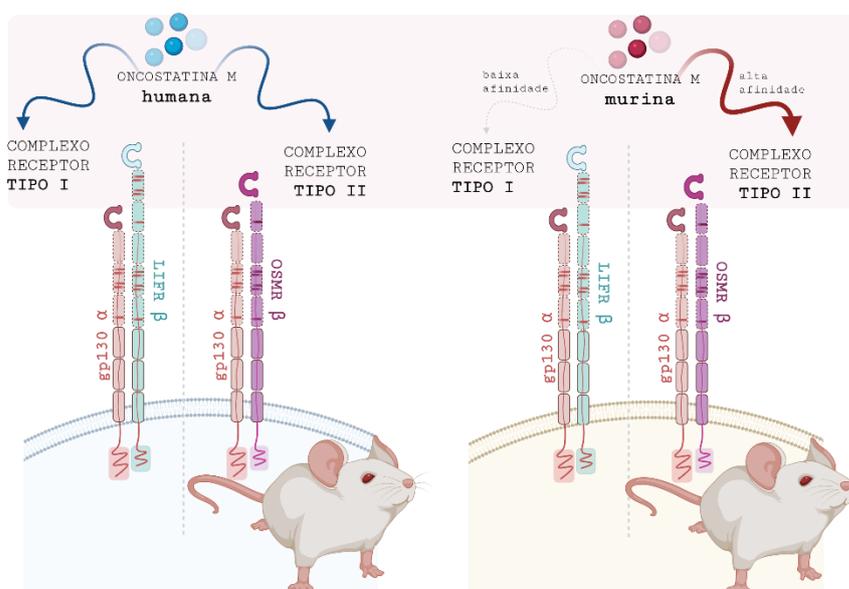


Fonte: Elaboração própria, criado com BioRender.com

Enquanto LIF humano (hLIF) apresenta 78% de identidade entre aminoácidos com a LIF murina, a OSM das duas espécies apresenta apenas 48% de similaridade entre si<sup>41</sup>, e, pelo fato de, em humanos, essa citocina se ligar primeiramente ao gp130 e, posteriormente, recrutar uma das unidades citadas anteriormente (LIFR ou OSMR) definir quais os efeitos exclusivos dessa citocina pode ser uma tarefa difícil e controversa utilizando células humanas. Sabendo que, a OSM murina (mOSM) e OSM humana (hOSM) interagem de maneira distinta dependendo do organismo que se encontra e conseqüentemente das diferentes cascatas de sinalização que podem desencadear<sup>8,15,16,37</sup> o uso do modelo animal pode fornecer dados menos conflitantes sobre o papel de OSM sobre o metabolismo.

Enquanto hOSM sinaliza primeiramente se ligando a subunidade receptora gp130 e, posteriormente, recruta, sem distinção de afinidade, OSMR ou LIFR ativando vias distintas *downstream* a essa ligação<sup>16, 42</sup>, a mOSM pode se ligar a ambos os receptores, porém com muito mais afinidade a OSMR do que com LIFR (Figura 5)<sup>8</sup>.

**Figura 5** - hOSM e mOSM interagem de maneiras distintas com os complexos receptores em células humanas e murinas



Fonte: Elaboração própria, criado com BioRender.com

### 3.6 OSM Versus LIF no Metabolismo Ósseo

Osteoblastos e osteócitos, células do tecido ósseo, expressam receptores OSMR e LIFR, o que possibilita que a sinalização dessa citocina sobre o metabolismo ósseo gere efeitos distintos que dependem do complexo receptor pelo qual ocorrerá a sinalização<sup>5</sup>.

Inicialmente, acreditava-se que OSM possuía papel indutor exclusivamente sobre a reabsorção óssea, do aumento da expressão de RANKL pelos osteoblastos<sup>11</sup>. Porém, propriedades indutoras de formação óssea começaram a ser atribuídas a essa citocina. OSM é capaz de estimular formação óssea através de mecanismos diretos sobre o osteoblasto, aumentando os níveis de produção óssea e/ou estimulando a diferenciação de células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos, ao mesmo tempo que diminui a adipogênese em células Kusab4b10<sup>11</sup>. Além disso, em osteócitos OSM é capaz de inibir a secreção de esclerostina, uma importante proteína envolvida na regulação da formação óssea, tanto em camundongos quanto em humanos, aumentando assim a formação óssea. Um estudo realizado em tíbias murinas fraturadas, possibilitou identificar também, uma função importante de OSM na fase inicial da cicatrização. Camundongos nocautes para essa citocina (*Osm* *-/-*) tiveram a cicatrização comprometida e a qualidade óssea prejudicada pela baixa deposição de matriz óssea pelos osteoblastos, enquanto, nos osteoclastos não foram observadas quaisquer alterações<sup>38</sup>.

Assim como OSM, LIF e LIFR são expressos por uma variedade de células ósseas que vão desde células de linhagem osteoblásticas a osteoblastos primários ou osteócitos<sup>11,43</sup>. Sendo assim, LIF também é conhecido pela dualidade das funções que pode desempenhar sobre o metabolismo ósseo, podendo agir tanto sobre a formação óssea, como na reabsorção. É conhecido que LIF é capaz de estimular a formação de osteoclastos por meio de RANKL *in vitro*<sup>44, 45</sup>, embora aconteça de maneira muito menos potente do que mOSM em osteoblastos de calvária<sup>17</sup>. Muito embora a injeção local de LIF ter sido relatada como a razão de uma discreta formação de osteoclastos<sup>46</sup>, a deleção de LIF ou LIFR pode ocasionar um aumento do número de osteoclastos gigantes<sup>47, 48</sup>.

Além e apesar da capacidade de estimular formação óssea, LIF também já foi reconhecido como um fator mitogênico para os osteoblastos<sup>46</sup> e altos níveis dessa citocina também podem estimular a formação óssea e a massa óssea in vivo<sup>49-51</sup>. A massa óssea também pode ser afetada pela deleção de LIF devido à diminuição do número e da atividade de osteoblastos<sup>52</sup>. Estudos in vitro, no entanto, relataram ação inibitória de LIF sobre ALP em osteoblastos murinos (E1)<sup>53, 54</sup>. Em dados contrastantes, LIF parece estimular ALP em células E1 e em osteoblastos primários<sup>43</sup>.

Por fim, em uma ação oposta à de OSM em um mesmo estudo, LIF aparece inibindo a formação de nódulos mineralizados em células primárias de osteoblastos de calvária de ratos<sup>55,56</sup>.

Claramente, ambas as citocinas podem modular o metabolismo ósseo, porém, quando se trata de osteoblastogênese a OSM parece ter um papel muito mais estabelecido e potente ao induzir a diferenciação de osteoblastos e aumentar a formação óssea via inibição de esclerostina nos osteócitos do que LIF, que embora apresente resultados, quando em alto níveis, sobre a formação óssea, tem seu papel estabelecido sobre a inibição da formação óssea.

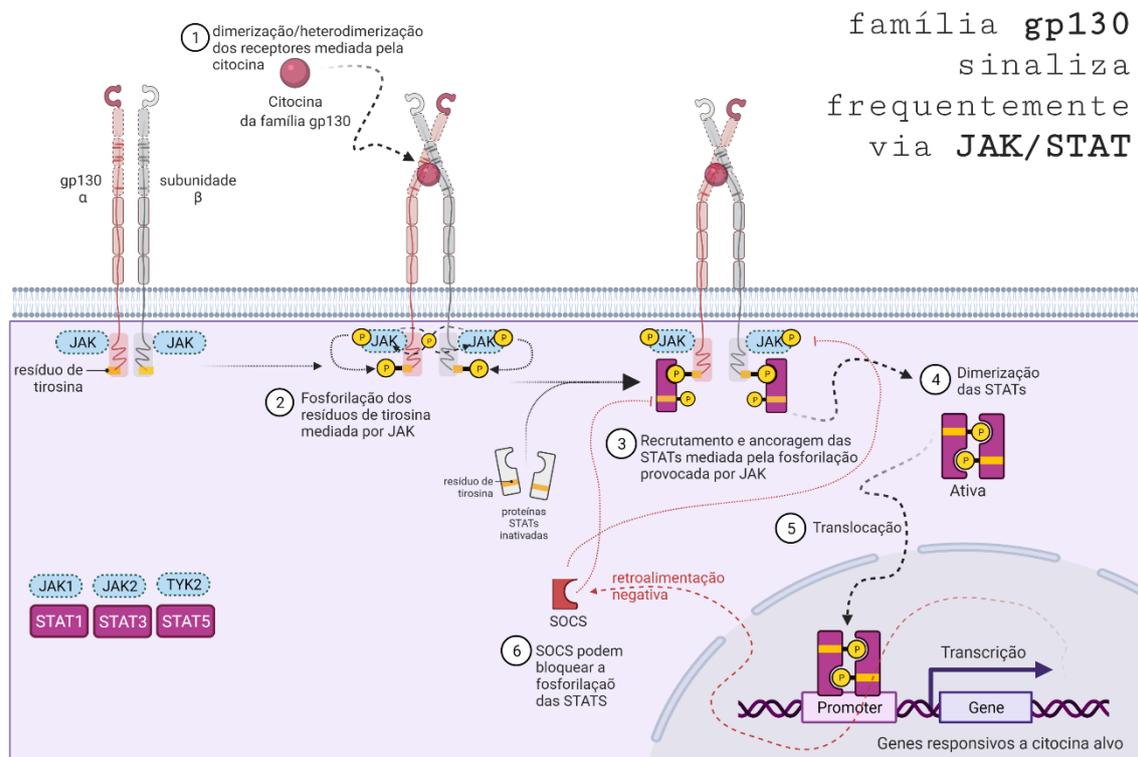
Esses dados corroboram para o fato que de, embora LIF também possua atividade sobre o metabolismo ósseo, a Oncostatina M, ao atuar via seu receptor exclusivo, OSMR, apresenta também uma propriedade independente de LIF e maior capacidade de indução da formação óssea. Isso pode ser explicado tanto pelo complexo receptor pelo qual OSM atua nas células ósseas, como também pela via de sinalização que é desencadeada a partir dessa ligação.

### **3.7 Vias de Sinalização Intracelular: JAK/STAT**

Entre as diversas cascatas de sinalização que podem ser desencadeadas, intracelularmente após a ativação dos receptores da família gp130, destaca-se a via JAK- STAT<sup>9</sup>. Embora gp130 seja um receptor tirosina quinase (TRK, do inglês Tyrosine Kinase Receptor) sem a capacidade de autofosforilação, as citocinas dessa família ativam a cascata de sinalização

STAT via recrutamento de proteínas tirosina-quinases da família JAK. Como descrito na Figura 6 abaixo, a ligação da citocina com seu respectivo complexo receptor ativa uma cascata de sinalização intracelular que se inicia após a homo/heterodimerização dos receptores que após provocarem a fosforilação cruzada entre as proteínas JAKS ancoradas na porção citoplasmática, tem seus resíduos de tirosina fosforilados por essas proteínas (Jak1, Jak2 ou Tyk2). A atividade dessas proteínas, possibilita então que as proteínas STAT (antes inativas no citoplasma) se ancoram nos resíduos fosforilados do receptor para posteriormente serem fosforiladas por JAK. Fosforiladas, essas proteínas se soltam dos receptores, dimerizam com outra unidade para pôr fim, ativadas, translocarem para o núcleo, onde vão exercer seu papel de fator de transcrição de genes responsivos a citocina ligante em questão. As respostas mediadas pela STATs são reguladas por retroalimentação negativa. Além da ativação de genes que codificam proteínas que medeiam a resposta induzida pelas citocinas, os dímeros de STAT também ativam genes que codificam proteínas inibidoras que atuam na inibição da resposta. Algumas dessas proteínas se ligam as JAKS fosforiladas, inativando-as, bem como seus receptores associados; outras se ligam aos dímeros de STAT fosforilados e os impedem de se ligar aos seus DNA-alvo(57) As PIAS (Inibidor de proteína STAT ativada) e as SOCS (Supressor de fatores de sinalização de citocinas) regulam negativamente a ativação da via STAT. Entre os membros da família SOCS, SOCS3 desempenha o papel regulador negativo predominante por inibir a ativação de JAK-STAT3, alvejando complexos receptores de citocinas para degradação no proteassoma<sup>58</sup>.

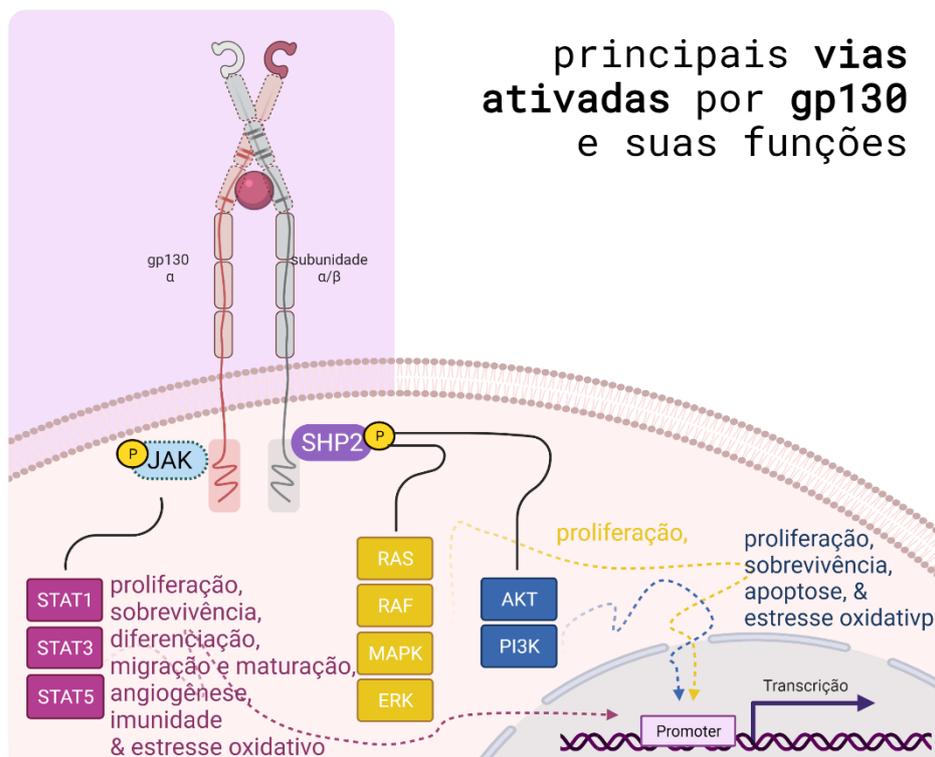
**Figura 6** – Ativação da via JAK-STAT downstream a ligação das citocinas gp130 com seus receptores



Fonte: Elaboração própria, criado com BioRender.com.

Entre as diversas combinações que podem ocorrer entre as proteínas JAK (gp130 pode ativar Jak1, Jak2 e Tyk2) e STAT, as vias mais frequentemente ativas por essas citocinas são STAT1, STAT3 e STAT5, que atuam na transcrição de fatores específicos e essenciais para diversos processos biológicos. Ainda, como esquematizado na Figura 7, além de JAK/STAT outras vias podem ser ativas por gp130. As vias SHP2 / RAS / MAPK, conhecidas pelo seu papel sobre a proliferação celular e as cascatas de sinalização, AKT, PI3K também podem responder a ligação dessas citocinas, exercendo funções distintas e essenciais para o corpo humano através da regulação de processos como a proliferação, sobrevivência celular, apoptose, metabolismo e estresse oxidativo<sup>9, 59</sup>.

**Figura 7 - Ativação das principais vias e funções pelos membros da gp130**



Fonte: Adaptado de Jones<sup>59</sup>, criado com BioRender.

No que se refere ao seu papel sobre o metabolismo ósseo, as três principais vias de sinalização para interação de gp130 com as células ósseas são: STAT1, responsável pela estimulação de proliferação de condrócitos; SHP2/Ras/MAPK responsável pela inibição da osteoclastogênese e por fim, gp130/STAT1/3, conhecida por, através da ligação de IL-6, estimular células de linhagem osteoblástica<sup>4, 6, 10</sup>.

A Oncostatina M, preferencialmente sinaliza através de vias como STAT3 e MAPK, sendo STAT3 a principal via utilizada por OSM para induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos<sup>13</sup>, essa via é ativada na fase inicial da inflamação e foi encontrada fosforilada em células de linhagem osteoblástica, um dia após a fratura óssea. Além disso, a ligação de OSM com seu receptor tipo II (gp130/OSMR) ativa STAT3 em células mesenquimais humanas, desencadeando a osteogênese, fato corroborado pela redução de STAT3 em camundongos nocauteados para OSM e OSMR, concluindo então

que OSM murina induz fosforilação da via de sinalização STAT 3, mas não de STAT1, estimulando um subconjunto de genes responsivos a STAT3, *downstream* a LIFR:gp130<sup>13</sup>.

Entre as proteínas envolvidas no processo de fosforilação de Stat3, a proteína adaptadora Shc1 (proteína contendo domínio homólogo a SRC), é uma forte candidata, visto que é recrutada exclusivamente para a subunidade OSMR<sup>16, 60</sup>.

### 3.8 Shc1

Shc1 (ou ainda ShcA) é um dos quatro membros de uma família de proteínas adaptadoras fosfotirosina. Essas proteínas, chamadas assim pela sua similaridade entre domínios com SCR (Proto-oncogene tirosina-proteína Cinase Scr), são conhecidas pela regulação de diversos processos em mamíferos, sendo importantes para a regulação de estresse oxidativo, sobrevivência celular e indução de apoptose<sup>61</sup>. Três isoformas de Sch1 podem ser identificadas a partir do seu peso molecular: p46, p52 e p66 que podem ativar vias de sinalização distintas<sup>62</sup>.

Enquanto as isoformas p46Shc e p52Shc, após serem fosforiladas, acoplam receptores tirosina quinases ativados a Ras, através do recrutamento do complexo Grb2/Sos e estão envolvidas na propagação citoplasmática de sinais mitogênicos<sup>63,64</sup>, p66Shc não regula a ativação de Ras, mas está ligada a vias de transdução de sinais que regulam a resposta celular ao estresse oxidativo e expectativa de vida em mamíferos<sup>65</sup>. Assim como fibroblastos embrionários proveniente de camundongos nocaute para p66Shc são mais resistentes a apoptose induzida por estresse oxidativo<sup>65</sup> animais nocautes para essa isoforma e submetidos a uma dieta rica em gordura a longa prazo, tiveram um aumento de 30% na expectativa de vida, e uma diminuição no desenvolvimento da aterosclerose: formação de ateromas nas paredes internas das artérias<sup>66</sup>. Em condições basais, células p66Shc -/- demonstram uma menor taxa de formação de oxidação intracelular concomitantemente com uma diminuição da alteração de DNA mitocondrial, evidenciando o papel dessa

isoforma sobre a regulação das vias que convertem sinais oxidativos em apoptose<sup>67</sup>.

Um estudo recente verificou que o p66Shc balanceia a ativação da via de sinalização STAT1 e STAT3 promovendo a supressão imunológica por meio da ativação do STAT3 e simultaneamente, afetando a vigilância imunológica impedindo a ativação do STAT1 em células de câncer de mama<sup>18</sup>. Há ainda, associação da expressão de p66 no comportamento maligno, recorrência e prognóstico em pacientes com carcinoma hepatocelular, evidenciado a partir da superexpressão encontrada dessa isoforma nos tecidos desse carcinoma, indicando um papel significativo na progressão tumoral através da ativação via de STAT3, pela fosforilação de S727 (fosforilação de STAT3 em Serina 727)<sup>68</sup>.

Além disso, STAT3 e o fator de transcrição Sp1 parecem formar um complexo que aumenta a resposta inflamatória. O aumento da fosforilação de S727 recruta Sp1 em células endoteliais estimuladas com citocinas da família IL-6<sup>69</sup>.

Embora esses estudos promovam uma associação direta entre o recrutamento de Shc1 e a ativação de STAT3 induzida por citocinas inflamatórias, esse mecanismo não estava bem elucidado para osteoblastos. O primeiro relato do recrutamento de Shc1 por células ósseas estimuladas com citocinas da família gp130, publicado pelo nosso grupo de pesquisa demonstrou, pioneiramente, que o papel de Shc1 para ativação da via STAT3, resultante da ligação de mOSM com o complexo tipo II (gp130/OSMR) é essencial na reabsorção óssea induzida por OSM<sup>17</sup>.

Sabendo que, exercendo um papel de caráter anabólico, a OSM induz, majoritariamente, a formação óssea ao invés da reabsorção<sup>11</sup>, o objetivo principal dessa tese foi avaliar, através da técnica de silenciamento gênico em osteoblastos murinos de calvária, qual o papel de SHC1 e subsequentemente de STAT3 sobre o efeito indutor de mOSM sobre a formação óssea.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Camundongos recém-nascidos da espécie *Mus musculus* e linhagem Swiss foram obtidos entre 2 e 3 dias após o nascimento do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP (Araraquara, Brasil) ou do Biotério Central da Universidade Federal de Goiás. Todos os experimentos com animais foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentos com Animais e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual de São Paulo (Anexo A) e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Goiás (CEUA UFG - 011/21, Anexo B).

### **4.2 Isolamento de Osteoblastos de Calvária e Cultura Celular**

Para obtenção de células de cultura primária, os animais, camundongos entre 2 e 3 dias de idade, foram submetidos a decapitação e posteriormente tiveram as calvárias retiradas e dissecadas com o auxílio de um bisturi, de maneira que descolassem totalmente da base do crânio e estivessem suficientemente limpas para serem submetidas a digestão enzimática, descrita a seguir.

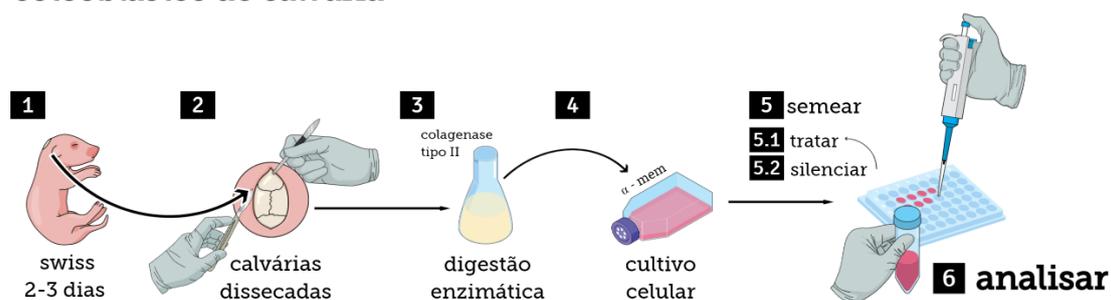
Após serem depositadas em um Erlenmeyer, imersas em 5 mL de solução A (8g NaCl + 200 mg KCl + 350 mg NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) foram expostas a agitação orbital a 150 rpm durante 10 minutos enquanto incubadas a 37°C. A solução A foi então descartada dando continuidade a uma sequência de lavagens (10 ciclos) sob as mesmas condições de agitação e incubação citadas acima. Para as três próximas lavagens subsequentes foi utilizada uma nova solução (Solução B) com os mesmos componentes da solução A com adição de 1,489 g de EDTA. Posteriormente, as lavagens de 5-10 foram realizadas com a solução C (Solução A + Collagenase type 2 a 180 U/mL - Worthington Biochemical Corp, Lakewood, NJ, EUA). Embora sobre as mesmas condições de incubação e agitação, diferentemente das lavagens anteriores, apenas a primeira lavagem com essa

solução foi descartada e o conteúdo foi então coletado a partir da 6<sup>o</sup> lavagem (6/10) para um tubo falcon e acumulado durante as lavagens subsequentes para ser posteriormente centrifugado por 5 min a 1000 rpm.

Após centrifugação, o sobrenadante da solução foi descartado e o sedimentado celular no fundo do tubo (pellet) ressuspendido em meio  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina (100  $\mu$ g/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). O conteúdo ressuspendido contendo as células foi alocado em garrafas de cultivo celular de 75cm<sup>2</sup> que foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de ar atmosférico durante o período necessário para proliferação/diferenciação (aproximadamente entre 3 e 4 dias). Após atingir o nível de confluência desejável para realização dos experimentos, as células foram tripsinizadas com Tripsina 0,25% (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA), contadas e semeadas nas respectivas quantidades e placas específicas para cada análise. A figura 8, abaixo, descreve as etapas para obtenção dos osteoblastos de calvária.

**Figura 8** – Sequência de eventos para obtenção de osteoblastos de calvária

### isolamento de osteoblastos de calvária



Fonte: Elaboração própria.

Todas as soluções anteriormente citadas no processo de digestão enzimática das calvárias para obtenção dos osteoblastos foram previamente preparadas e filtradas, sendo a solução C preparada e filtrada minutos antes do uso, mantida em gelo durante o processo e com as quantidades de cada lavagem (5mL) colocadas em banho-maria (37°C) 3 minutos antes do seu

respectivo uso. Com exceção da incubação e agitação, todo processo pelo qual as calvárias foram submetidas foi realizado em fluxo laminar.

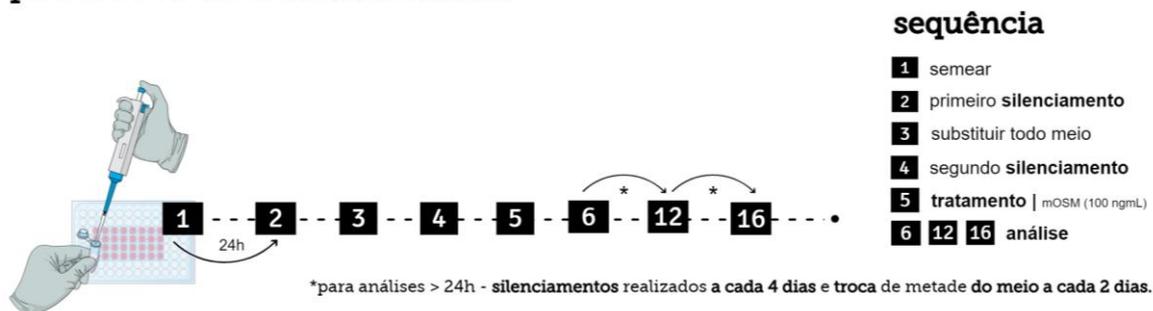
Depois de semeadas, as células foram submetidas ao tratamento com mOSM ou mLIF na concentração de 100 ng/mL (R&D Systems, Minnessota, USA), ou ainda, silenciadas e posteriormente tratadas com mOSM (100 ng/mL) antes das análises propostas descritas dos itens 4.4 ao 4.8

### 4.3 Silenciamento em Osteoblastos

Para os ensaios que foram realizados sob a condição de silenciamento gênico através do uso de pequenos fragmentos de RNA de interferência (siRNA, do inglês, small interfering RNA) as células foram submetidas a um protocolo, desenvolvido e padronizado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual o primeiro silenciamento é realizado vinte e quatro horas após as células serem semeadas, sendo repetido após quarenta e oito horas e antecedendo vinte quatro horas do tratamento, como se pode observar na Figura 9.

**Figura 9** – Sequência de eventos durante protocolo de silenciamento

#### protocolo de **silenciamento**



Fonte: Elaboração própria.

Para o silenciamento, cada RNA de interferência (siRNA) específico para o gene alvo (Tabela 3) foi preparado em meio OptiMEM (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA) em uma proporção em que: a concentração final em cada poço

fosse de 30 nM, sendo para isso, inicialmente preparado a 300nM por considerar a diluição pela quantidade de meio  $\alpha$ -MEM já presente no poço no momento da transfecção. Em uma segunda etapa, é adicionado, gentilmente, ao preparo contendo o siRNA, um preparo de OptiMEM com 2% lipofectamina RNAiMAX (Invitrogen, Gibco, Grand Island, NY, EUA) preparado anteriormente. Após 15 min em temperatura ambiente, a mistura contendo siRNA e a lipofectamina é adicionada ao well em quantidades que acompanham a quantidade de células e o volume de meio em cada poço da placa (Figura 10). Em ensaios como a análise de expressão gênica através de PCR, realizados em placas de 96 wells,  $2 \times 10^3$  células foram semeadas por well, enquanto em ensaios como Vermelho de Alizarina e Atividade de Fosfatase Alcalina, realizados nas placas de 24 e 48 poços foram necessários  $10 \times 10^3$  e  $5 \times 10^3$  células por poço, respectivamente. A figura 10 ilustra as etapas do silenciamento descritas anteriormente.

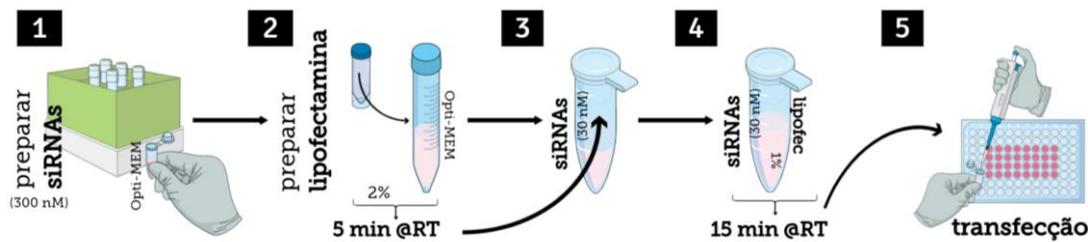
**Tabela 3** - Informações sobre os siRNAs (Applied Biosystems)

Gene Alvo	RefSeq	ID Assay
Controle Negativo	-----	AM4635
<i>Shc1</i>	NM_001113333 1.2 NM_011368.5	s73682
<i>Stat3</i>	NM_0011486.4 NM_213659.2 NM_213660.2	s74451
<i>IL6st</i>	NM_010560.3	s68298
<i>Lifr</i>	NM_001113386.1 NM_013584.2	s69223
<i>Osmr</i>	NM_011019.3	s/71149

Fonte: Elaboração própria.

**Figura 10** – Sequência de etapas a serem executadas para transfecção do siRNA

## silenciamento gênico



Fonte: Elaboração própria.

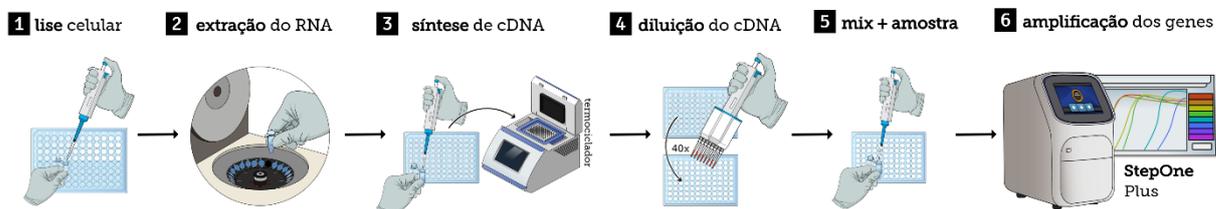
Por fim, as células silenciadas e as células submetidas a uma transfecção com sequência aleatória (Scramble (SCR) – Controle negativo) foram tratadas seguindo a designação em dois grupos pré-determinados: Grupo Controle, onde as células foram mantidas em meio osteogênico (meio  $\alpha$ -MEM suplementado com adição de beta-glicerofosfato (4mM) e ácido ascórbico (50 $\mu$ g/mL) ou; Grupo Experimental onde foram tratadas com mOSM (100 ng/mL) em meio osteogênico durante o período proposto para cada avaliação.

### 4.4 Expressão Gênica

Os osteoblastos de calvária foram semeados ( $2 \times 10^3$  células/poço) em placas de 96 poços quando silenciados para os gene alvo e posteriormente tratados com mOSM, ou de 48 poços quando somente tratados com as citocinas, mOSM ou mLIF (100 ng/mL) em meio osteogênico. A análise da expressão gênica foi realizada após 24 horas de tratamento em ambas as situações: células apenas tratadas ou células silenciadas para os genes alvo e tratadas. Para isso, o RNA foi extraído das células (4.4.1), o cDNA sintetizado (4.4.2) e posteriormente diluído para que a expressão dos genes de interesse fosse avaliada por PCR em tempo real – RTq-PCR (4.4.3).

**Figura 11** – Etapas envolvidas na análise da expressão gênica por RTq-PCR

## expressão gênica RTqPCR



Fonte: Elaboração própria.

### 4.4.1 Extração de RNA

Após o período experimental de 24 horas em seus respectivos modelos (silenciadas e tratadas ou apenas tratadas), as células foram lisadas com a adição de 100 µl de tampão de lise por poço. Posteriormente, o RNA total foi submetido a uma sequência de lavagens em colunas com microfiltros e diluídos, seguindo o protocolo dos fabricantes dos kits utilizados (Ambion, Qiagen).

O RNA foi quantificado em placa para microvolumes Take3 utilizando o espectrofotômetro de Microplacas Epoch e o software Gen5 (Biotek, Winooski, VT, EUA). A qualidade do RNA foi verificada através da razão  $260/280 \leq 2$ .

### 4.4.2 Síntese de cDNA

Após a quantificação, 100 - 150ng das amostras foram convertidos em DNA complementar sintetizado a partir de uma molécula de RNA (cDNA), utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) em um volume de reação final de 10 µl e termocicladas a 25°C por 10 min, 37°C por 120 min e 85°C por 5 min. Posteriormente à conversão, o cDNA foi diluído em 40x (2 µl de amostra + 78 µl de água ultrapura) antes da reação de amplificação promovida pelo ensaio de

PCR quantitativa em Tempo Real (RT-qPCR, do inglês, Real Time quantitative PCR).

#### 4.4.3 PCR em tempo real – RTq-PCR

O RTqPCR foi realizado no sistema de PCR em tempo real StepOnePlus™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) utilizando a Cinética TaqMan. Os primers para os genes descritos na tabela 4 foram utilizados em uma concentração final de 300 nmol/L utilizando Taqman Fast Advance Master Mix como sistema de detecção. A  $\beta$ -actina (*Actb*), sequência descrita na tabela 5, foi utilizado como calibrador para corrigir possíveis diferenças nas concentrações iniciais de mRNA. O volume final da reação foi de 10  $\mu$ L, consistindo em 2,5  $\mu$ l de cDNA diluído 40x e 7,5  $\mu$ l de master mix.

**Tabela 4** - Taqman Assays (Applied Biosystems) utilizados na detecção dos genes alvo

Gene	ID Assay
<i>Alpl</i>	Mm 00475834_m1
<i>Ilf6st</i>	Mm00439665_m1
<i>Lifr</i>	Mm00442942_m1
<i>Shc1</i>	Mm 00468942_g1
<i>Stat3</i>	Mm 01219775_m1
<i>Osmr</i>	Mm01307326_m1

Fonte: Elaboração própria.

**Tabela 5** – Sequência utilizada para detecção de gene calibrador (*Actb*)

<i>Actb</i>	Sequência
Sense Primer (F)	5'GGACCTGACGGACTACTCATG-3'
AntiSense Primer (R)	5' TCTTTGATGTACGCACGATTT-3'
Sonda (100nM)	VIC 5' 6CCTGACCGAGCGTGGCTACAGCTTC0-3' TAMRA

Fonte: Elaboração própria

#### 4.5 Ensaio de Mineralização com Vermelho de Alizarina

Para os ensaios de avaliação do efeito do tratamento com mOSM e mLIF, foram semeadas  $1 \times 10^3$  células por poço em placas de cultura de 48 poços ( $n=3$ ) em meio  $\alpha$ -MEM suplementado. Vinte e quatro horas após a semeadura, as células foram mantidas em meio osteogênico e tratadas ou não com mOSM (100 ng / mL) ou mLIF (100 ng / mL) por 7 e 14 dias. O meio foi trocado a cada dois dias. Após 7 e 14 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 2 minutos.

Nos ensaios em que as células foram submetidas a silenciamento gênico, quando em placas de 48 poços foram semeadas  $5 \times 10^3$ /poço ou  $10 \times 10^3$  células/poço em placas de 24 poços ( $n=4$ ). O protocolo de silenciamento, realizado que, conforme já descrito no item 4.3 dessa seção, se iniciou 24 horas após a semeadura, sendo o tratamento, na presença ou na ausência de mOSM (100 ng/mL), realizado 24 horas após o segundo silenciamento. O meio foi trocado a cada 2 dias e o silenciamento repetido a cada 4 dias. Após 7 e 11 dias, as células foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 2 minutos.

Tanto nos ensaios onde foram realizados silenciamento gênico como nos que foram realizados apenas tratamento com as citocinas, os poços foram lavados com água destilada duas vezes e 200  $\mu$ l da Solução de Vermelho de Alizarina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mi, EUA) 1% w / v (água destilada) foi adicionada por poço. Após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, a solução foi removida dos poços e as células foram lavadas três vezes com água destilada. Para a avaliação espectrofotométrica, os nódulos mineralizados foram eluídos com 200  $\mu$ l de cloreto de hexadecilpiridínio (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mi, EUA) solução a 10% p / v (água destilada) e por fim alíquotas de cada poço foram transferidas para uma placa de 96 poços e realizada leitura a 562 nm (Take3 BioTek Instruments, Vermont, EUA).

## 4.6 Ensaio da Atividade de Fosfatase Alcalina

O ensaio de atividade de fosfatase alcalina foi realizado por duas maneiras, sendo a primeira, através da coloração, em células tratadas com mOSM e mLIF (**item 4.6.1**) e a segunda por quantificação, para células que foram silenciadas para o gene *Shc1* e posteriormente tratadas com mOSM durante 7 dias (**item 4.6.2**).

### 4.6.1 Coloração

Vinte e quatro horas após a semeadura em meio  $\alpha$ -MEM suplementado, as células foram mantidas em meio osteogênico e tratadas com mOSM ou mLIF ambos a (100 ng / mL) por 7 e 14 dias. O meio foi trocado a cada dois dias. No final dos períodos experimentais, as células foram fixadas em paraformaldeído tamponado a 4% por 2 minutos e os poços foram então lavados com PBS 1X por duas vezes. O kit para coloração de Fosfatase Alcalina (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mi, EUA) foi utilizado de acordo com o protocolo do fabricante.

### 4.6.2 Quantificação

Após serem silenciadas para *Shc1*, as células foram tratadas durante 7 dias na presença ou ausência de mOSM (100 ng/mL). Após esse período, as células foram lisadas, com a adição de 200  $\mu$ l de água ultrapura/poço e submetidas a um protocolo de choque térmico (10 ciclos alternados de exposição a uma temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $37^{\circ}\text{C}$ ) para que a proteína total fosse extraída. A quantificação da proteína total foi realizada e quantificada seguindo o método modificado de LOWRY et al. (1951). A absorbância foi medida em espectrofotômetro utilizando comprimento de onda de 680 nm. Os valores obtidos, expressos em  $\mu\text{g/ml}$ , foram calculados com base em curva-padrão determinada a partir de albumina bovina. A quantificação de ALP foi realizada utilizando kit comercial de acordo com as instruções do fabricante (Labtest

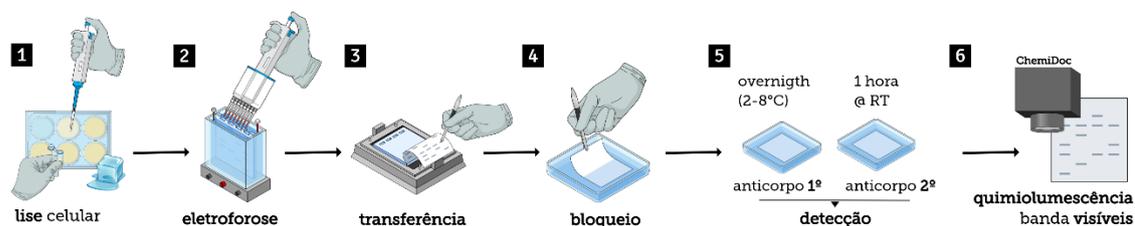
Diagnostica, Belo Horizonte, MG, Brasil). A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 590nm e atividade de ALP foi calculada a partir da medida do tubo padrão e então expressa em  $\mu\text{mol}$  de timolftaleína/h/ml. Os dados foram normalizados pelos valores de proteína total dos mesmos poços utilizados para o cálculo da atividade de ALP.

#### 4.7 Western Blot

Para detecção de proteínas através da técnica de Western Blot, as células, tratadas com mOSM ou mLIF (100 ng/mL), foram inicialmente submetidas a um protocolo para obtenção de um lisado celular, como descrito no item 4.7.1, e após as amostras terem a quantidade de proteína quantificada, foram submetidas a eletroforese em gel (4.7.2). Posteriormente, as proteínas foram transferidas do gel para uma membrana (4.7.3), que após ser bloqueada (4.7.4) para impedir ligações inespecíficas, foram submetidas ao processo de detecção de dois passos (4.7.5) sendo incubadas na presença de anticorpos específicos, primários e secundários, para serem posteriormente reveladas através da Quimioluminescência (4.7.6). A sequência de eventos para detecção pode ser observada na figura 12 abaixo.

**Figura 12** – Sequência de etapas da análise por Western Blot

#### Western Blot



Fonte: Elaboração própria.

#### **4.7.1 Lisado celular**

Os osteoblastos da calvária foram semeados ( $n = 2$  poços por grupo) em densidade de  $50 \times 10^3$  células/poço em placas de 12 poços. Após 24 horas, as células foram incubadas na ausência ou presença das substâncias teste (mLIF ou mOSM; 100 ng/ml) por 15 minutos.

Para obtenção do lisado celular, as placas foram mantidas em gelo e os wells foram lavados pelo menos duas vezes com PBS pH7,4 Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Posteriormente, foi adicionado aos poços uma solução de tampão de lise (1% Igepal CA-630, 0,1% SDS 2 mM EDTA, 50 mM de NaF, 0,1 mg/mL de PMSF (Fluoreto de fenilmetilsulfonil), 10  $\mu$ g/mL de leupeptina, 10  $\mu$ g/mL de pepstatina A, em PBS pH 7,4) e após raspagem realizada no fundo do poço com o auxílio de um espalhador de células, o conteúdo foi recolhido para seus respectivos tubos e centrifugado. Para determinar a quantidade de proteínas em cada lisado, foi utilizado o método BCA com albumina bovina como padrão.

#### **4.7.2 Eletroforese em gel**

As proteínas da amostra foram separadas, em quantidades equivalentes, de acordo com o peso molecular por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) Bis-Tris a 4–12% (Bolt, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) em tampão Bolt MES SDS Running Buffer (1X).

#### **4.7.3 Transferência**

Para que as proteínas pudessem ser detectadas pelos anticorpos, foram transferidas, através da passagem de uma corrente elétrica, do gel para uma membrana de nitrocelulose segundo protocolo do iBlot Dry Blotting System (iBlot, Thermo Fisher Scientific, MA, USA), através da passagem de uma corrente elétrica.

#### **4.7.4 Bloqueio**

Para impedir que interações não desejáveis e inespecíficas acontecessem, a membrana foi submetida a um bloqueio, durante 1 hora, utilizando solução de BSA (Bovine Serum Albumin) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA) a 5% em tampão TBST (2,4 g de Tris base, 8,8 g de NaCl; 0,05% de Tween 20) pH 7,4.

#### **4.7.5 Detecção**

Em um método de dois passos, a membrana foi incubada overnight em geladeira (2-8°C) com seus respectivos anticorpos primários e uma série de 3 lavagens de 10 min em TBST pH 7,4 foi realizada (etapa1). Posteriormente, foram submetidas ao segundo período de incubação (etapa 2), dessa vez por 1 hora em temperatura, com os anticorpos secundários

#### **4.7.6 Quimioluminescência**

O substrato ECL Plus Western Blotting Substrate (Pierce, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) foi então adicionado às membranas após serem lavadas com TBST (3 lavagens de 10 min) no final do processo de detecção. Após 3 minutos, as bandas das proteínas foram reveladas por quimioluminescência no ChemiDoc MP+ System (Bio-Rad) através do software Image Lab (Bio-Rad, Hercules, CA).

As especificações dos anticorpos, primários e secundários, diluições e quantidade de proteínas utilizadas, bem como as bandas reveladas estão descritas na Tabela 6.

**Tabela 6** – Anticorpos, diluídos em BSA 1%, utilizados na análise por Western Blot

ANTICORPO	FORNECEDOR	CAT.	DILUIÇÃO	PROTEÍNA (GEL)	BANDA
Rabbit IgG	Santa Cruz	sc-2004	1:5000	-	-
Goat IgG	Santa Cruz	sc-2768	1:5000	-	-
pSHC (Y427)	Abcam	ab6816 6	1:1000	4 µg	66/52/46k Da
SHC (H-108)	Santa Cruz	sc-1695	1:100	4 µg	66/52/46 kDa
β-actina (I-19)	Santa Cruz	sc-1616	1:5000	3 µg	42kDa

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.8 Análise Estatística

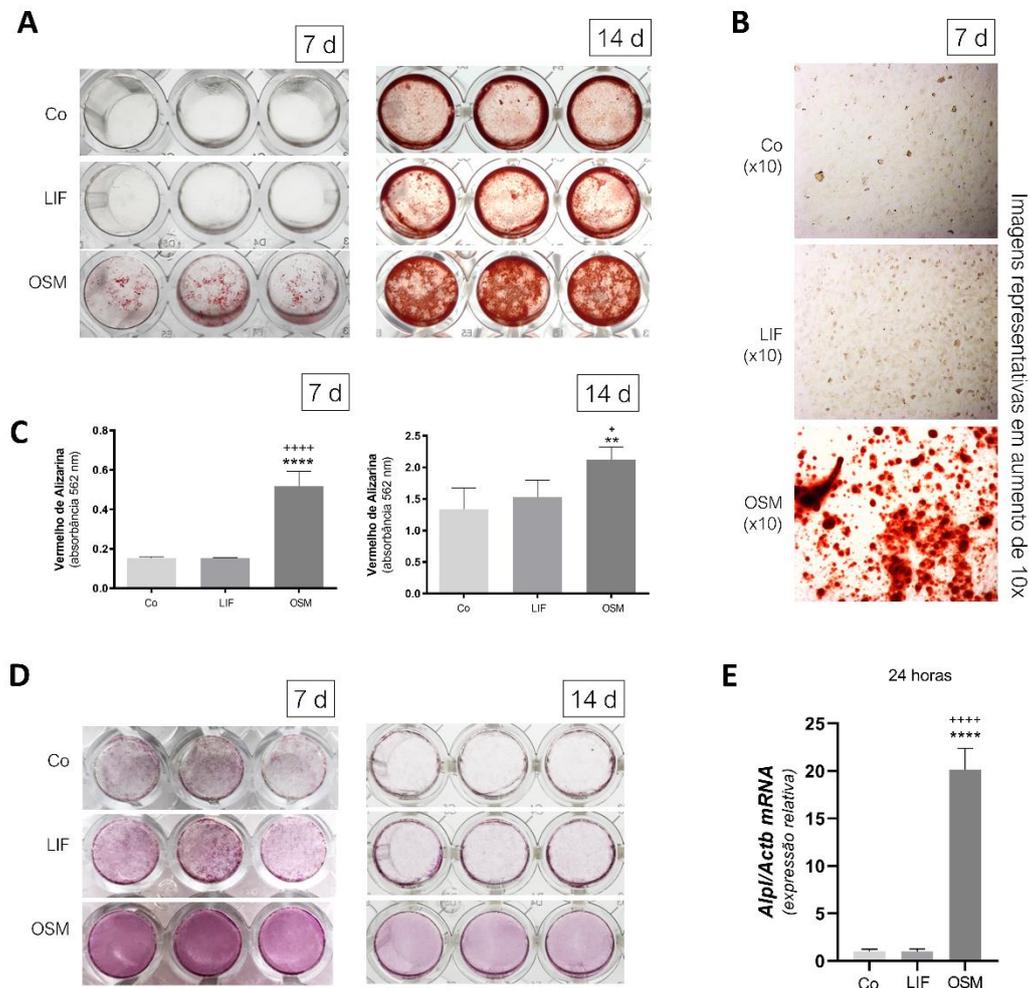
Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas determinadas a partir de análises realizadas com One- Way- ANOVA ou Two-way ANOVA, seguidas pelo teste post-hoc de Tukey. As análises foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. e foi considerado estatisticamente significativo um valor de  $P < 0,05$ . As diferenças estatísticas são apresentadas como: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 mOSM, Mas Não mLIF, Induz a Diferenciação de Osteoblastos Através do Aumento da Mineralização In Vitro, Atividade de Fosfatase Alcalina e Expressão Gênica de *Alpl*

O tratamento de osteoblastos da calvária com mOSM (100 ng/mL) provoca um aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) na formação de nódulos de mineralização, mais bem evidenciado com 7 dias (Fig.13 A, B, C), atividade de ALP (Fig.13D) e aumenta, de maneira considerável ( $p < 0.0001$ ) a expressão de mRNA de *Alpl* (Fig.13E). Em contraste, o tratamento com mLIF (100 ng/mL) não afetou os mesmos parâmetros (Fig.13A, B, C, D, E).

**Figura 13**– O tratamento com mOSM, mas não com mLIF (100 ng/ml) afeta a atividade dos osteoblastos de calvária



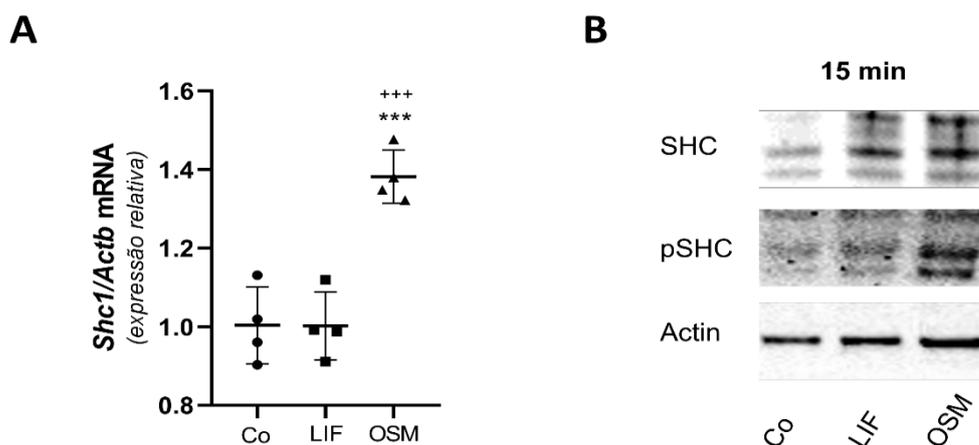
A indução de nódulos de mineralização (**A, B, C**) e a atividade de ALP (**D**) é maior quando as células são tratadas com mOSM do que com mLIF na mesma concentração e período. A expressão de mRNA de *Alpl* (**E**) também é afetada, sendo significativamente maior quando as células são tratadas com mOSM. Todos os valores analisados (**C e E**) representam a média entre quatro amostras/poços por grupo e o Desvio Padrão está representado pelas barras verticais sobre a coluna (SD, do inglês Standard deviation). As diferenças entre o Controle e o grupo de tratamento são representadas por \* e entre os grupos de tratamento (mOSM x mLIF) estão representadas por +. Por fim, as diferenças estatísticas foram consideradas \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  (**C**) e \*\*\*\*  $p < 0.0001$  (**E**) após serem analisadas por One-Way ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla Tukey (**C, E**).

Fonte: Elaboração própria.

## 5.2 mOSM, Mas Não mLIF, Aumenta os Níveis da Expressão Gênica e Induz a Fosforilação de Shc1

Uma vez que mOSM, mas não mLIF, induz a diferenciação de osteoblastos e a mineralização *in vitro*, possíveis diferentes vias de sinalização *downstream* a ligação de mOSM com seu complexo receptor foram consideradas como justificativas para esse efeito. Sendo Shc1, uma proteína adaptadora recrutada exclusivamente por mOSM em outros cenários biológicos<sup>16, 18</sup> sua expressão nas células tratadas com ambas as citocinas foi avaliada. Os osteoblastos de calvária tratados com mOSM (100 ng/ml) expressaram mRNA de *Shc1* em níveis maiores ( $p < 0.0001$ ) do que observado após o tratamento com mLIF (100 ng/ml) que se manteve ao nível do Controle (Fig.14A). Além disso, comprovando a presença final da proteína, o tratamento com mOSM, diferente do que observado com mLIF, induziu a fosforilação da proteína Shc1 (Fig. 15B).

**Figura 14** – Diferente de LIF, O tratamento com OSM induz tanto a expressão de RNAm de *Shc1* (A) quanto a fosforilação de pSHC (B) (One-Way ANOVA / Tukey, onde \*\*\*  $p < 0.001$ )



Fonte: Elaboração própria.

### 5.3 O Silenciamento de *Osmr* Afeta a Expressão Gênica de *Alpl* induzida por mOSM

Como nossos resultados confirmaram que, mOSM, ao contrário de mLIF, possui efeito indutor sobre a formação óssea em modelo de osteoblastos de calvária, e que apenas mOSM aumenta os níveis de expressão e induz fosforilação de *Shc1* nesse modelo, as vias de sinalização *downstream* a ligação de mOSM com seu receptor são fortes candidatas a serem responsáveis por esse efeito. Como mOSM é capaz de se ligar, mesmo que com afinidade distintas<sup>(7)</sup>, em OSMR ou LIFR, para complementar o complexo receptor heterodimérico contendo uma subunidade de gp130, o tipo de complexo receptor pelo qual essa citocina sinaliza, pode variar seu efeito no metabolismo ósseo. Na reabsorção óssea por exemplo, mOSM aumenta a diferenciação de osteoclastos, via aumento da produção de RANKL pelos osteoblastos em uma ação mediada por OSMR<sup>13, 17</sup>, enquanto, pode aumentar também a formação óssea via inibição de esclerostina via LIFR ou ainda via OSMR, ao induzir a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos, inibindo a adipogênese<sup>11</sup>. Entretanto, quando se trata do efeito direto dessa citocina sobre o osteoblastos maduros de calvária e seus marcadores de formação óssea, o complexo receptor pelo qual mOSM sinaliza, não parece estar bem estabelecido.

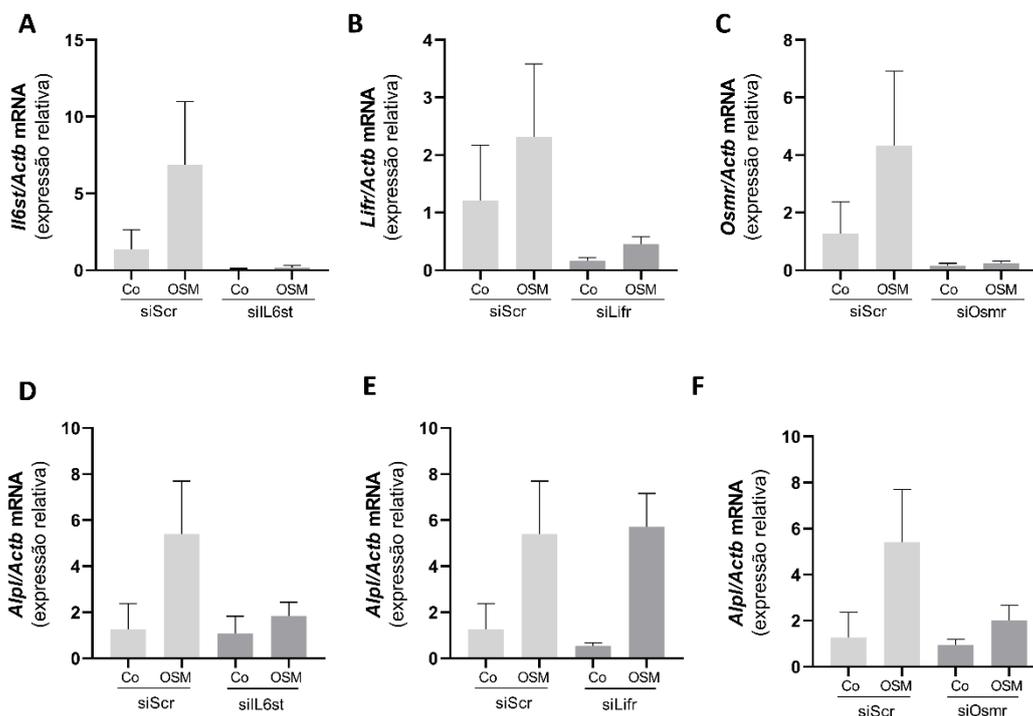
Considera-se que, esse efeito exclusivo sobre a formação óssea de maneira direta, seja obtido através da ligação com o receptor específico de OSM, o OSMR, o que explicaria a oposição do efeito de mLIF sobre as mesmas células. Além disso, a proteína adaptadora *Shc1*, já foi relatada em outros estudos em diferentes células, como uma molécula que é recrutada exclusivamente para o receptor OSMR<sup>16,18</sup> e visto que nossos dados (Fig. 15) demonstraram que, *Shc1* está altamente expresso nas células tratadas com mOSM, mas não com mLIF, a hipótese de que essa ação ocorra via OSMR é fortalecida.

Para testar essa hipótese, células foram silenciadas para os genes de três receptores que podem participar da sinalização de mOSM: *IL6st* (gene que codifica para o receptor gp130); *Lifr* ou *Osmr*. Para avaliar o efeito do silenciamento desses receptores na expressão gênica de *Alpl* induzida

anteriormente por mOSM, os osteoblastos de calvária foram semeados em placas de 96 poços em meio alfa-MEM completo e foram silenciados com siL6st, siOsmr e siLifr para posteriormente serem tratadas com mOSM (100 ng/mL) por 24 horas. Após esse período, o RNA foi extraído para realização do RTq-PCR para o gene *Alpl*, utilizando *Actb* como gene constitutivo.

Os níveis de expressão para cada gene que codificam os receptores foram avaliados a fim de confirmar que o silenciamento realmente foi efetivo para todos os genes (Fig.15 A-C). Os resultados demonstraram que o silenciamento de OSMR e IL6ST, diferente do silenciamento de LIFR inibiu a expressão gênica de *Alpl* anteriormente aumentada por mOSM, demonstrando que, o papel indutor de mOSM na formação óssea em osteoblastos de calvária, acontece via ligação de OSM com seu complexo receptor tipo II (gp130/OSMR) e que, de fato, que Shc1, parece ser recrutado via OSMR<sup>16,18</sup>.

**Figura 15** – O silenciamento dos receptores



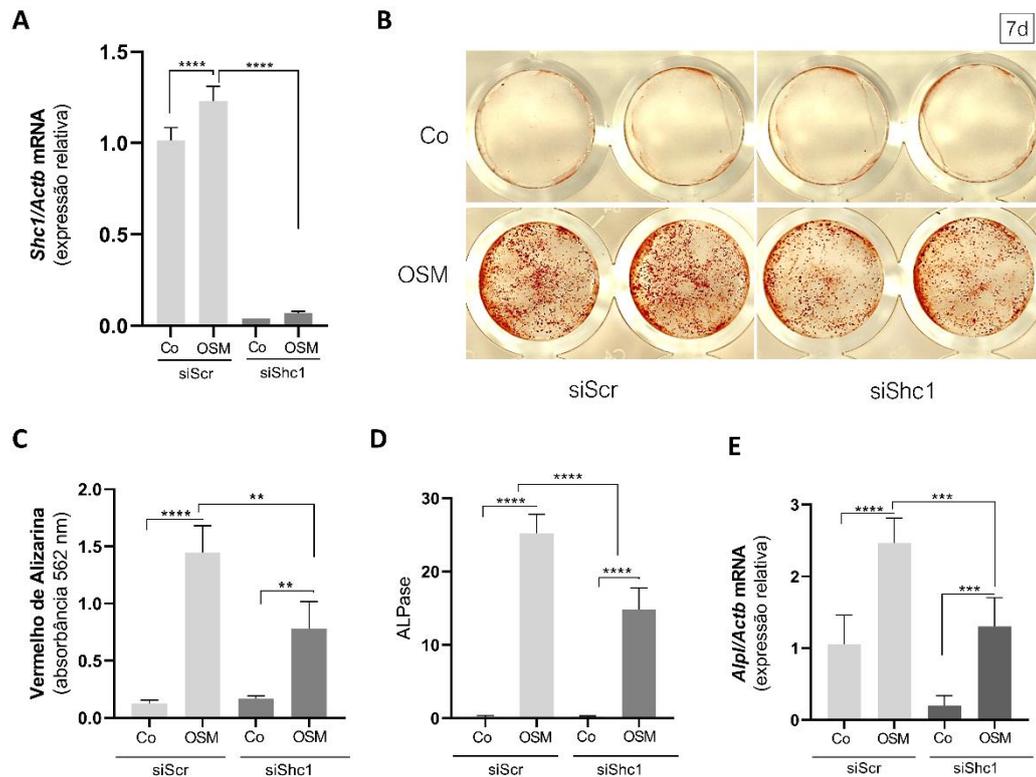
IL6st (gp130) (A), Osmr (B) e Lifr (C) afetam a expressão de *Alpl* mRNA (D-F). Os níveis de expressão de mRNA foram menores quando as células foram silenciadas para IL6st (D) e OSMR (F) mas não para LIFR (E).

Fonte: Elaboração própria.

#### 5.4 O silenciamento de *Shc1* Inibe a Diferenciação de Osteoblastos Induzida por mOSM

Para determinar se, o aumento induzido por mOSM nos parâmetros ligados a formação óssea é dependente do recrutamento de *Shc1* via OSMR, como foi observado em outros tipo celulares<sup>16, 18</sup>, a expressão de *Shc1* foi silenciada em osteoblastos usando siRNA específico para esse gene. As células foram silenciadas 1 e 3 dias após semeadura e tratadas na presença ou ausência de mOSM (100 ng/mL), começando 24 h após o segundo silenciamento. O ensaio de Vermelho de Alizarina e atividade de ALPase foi realizado 7 dias após o início do tratamento com mOSM e o silenciamento foi repetido a cada 4 dias. A expressão de mRNA de *Shc1* foi reduzida ( $p < 0.0001$ ) após o segundo silenciamento (Fig. 16A), comprovando a efetividade do silenciamento. As análises de ensaio de mineralização in vitro, através da coloração com Vermelho de Alizarina, mostraram que o silenciamento de *Shc1* resultou em uma diminuição da formação dos nódulos de mineralização pelos osteoblastos tratados mOSM, antes aumentadas, como pode se observar no grupo Scr (Fig. 16B, C). O aumento da expressão de mRNA de *Alpl*, induzida pelo tratamento com mOSM, foi inibido ( $p < 0.0001$ ) pelo silenciamento de *Shc1* nos osteoblastos de calvária (Fig. 16D).

**Figura 16 - O silenciamento de Shc1**



**(A)** afeta a atividade de osteoblastos induzida por mOSM. A formação de nódulos mineralizados **(B, C)**, atividade de ALPase **(D)** e a expressão de mRNA *Alpl* **(E)** induzida por mOSM diminuíram em células em que Shc1 foi silenciado. Os valores representam a média de quatro poços e o desvio padrão (SD) é indicado por barras verticais. Foram considerados significativamente diferentes valores \*\*  $p < 0,01$  **(C)** e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  **(A, C, D, E)** entre a resposta induzida por OSM com e sem silenciamento analisada por Two-Way ANOVA / Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

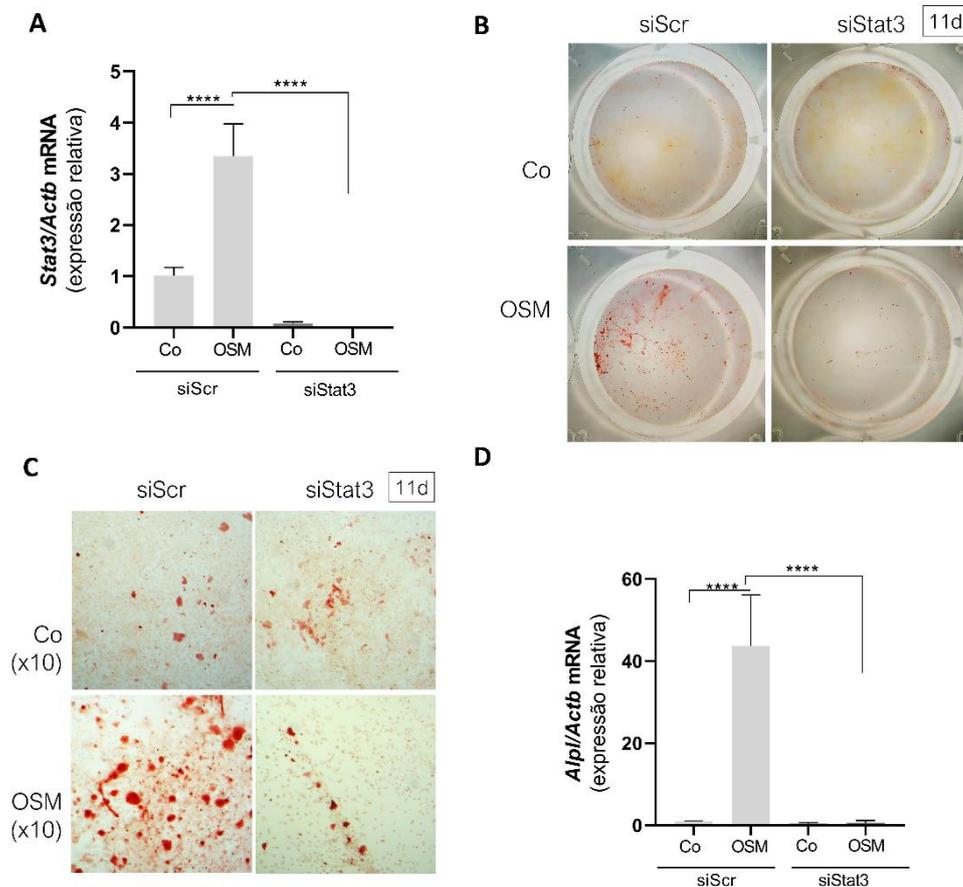
### 5.5 O Silenciamento de Stat3 Inibe a Diferenciação de Osteoblastos induzida por mOSM

A mOSM e outras citocinas da família gp130, sinalizam preferencialmente através da via JAK/STAT, sendo amplamente relatado a participação da via STAT3 na sinalização intracelular dessa citocina, seja atuando como modelador tumoral ou ainda no seu papel sobre a regulação do metabolismo ósseo, é conhecido que mOSM pode agir indiretamente sobre a formação óssea através da inibição da secreção de esclerostina pelos osteócitos em uma ação que

ocorre via LIFR, ativando a via STAT3 em razão de STAT1, em um efeito que parece proteger a massa óssea <sup>13</sup>.

Para determinar se Stat3 é a via responsável pelo efeito indutor de mOSM, via OSMR, sobre a diferenciação de osteoblastos e mineralização *in vitro*, a expressão de Stat3 foi silenciada em osteoblastos usando siRNA específico. As células foram silenciadas 1 e 3 dias após semeadura e tratadas na presença ou ausência de mOSM (100 ng/mL), começando 24 h após o segundo silenciamento. O ensaio de Vermelho de Alizarina e atividade de ALPase foi realizado 7 dias após o início do tratamento com mOSM e o silenciamento foi repetido a cada 4 dias. A expressão de mRNA de Stat3 foi reduzida ( $p < 0.0001$ ) após o segundo silenciamento (Fig. 17A), comprovando a efetividade do silenciamento. As análises de ensaio de mineralização *in vitro*, através da coloração com Vermelho de Alizarina, demonstraram que o silenciamento de Stat3 resultou em uma inibição do aumento da formação dos nódulos de mineralização pelos osteoblastos tratados mOSM (Fig. 17B, C). A expressão de mRNA de *Alpl*, também aumentada anteriormente pelo tratamento com mOSM, foi reduzida pelo silenciamento de *Stat3* ( $p < 0.0001$ ) nos osteoblastos de calvária (Fig. 17D).

**Figura 17 - O silenciamento de Stat3**



**(A)** afeta a indução de formação de nódulos de mineralização induzida por mOsm em osteoblastos de calvária **(B, C)**. O silenciamento de Stat3 também diminui significativamente a expressão de mRNA de Alpl **(D)** induzida por mOSM. Os valores representam a média de quatro poços e o desvio padrão (SD) é indicado por barras verticais. Foram considerados significativamente diferentes valores \*\*\*\*  $p < 0.0001$  **(A, D)** entre a resposta induzida por OSM com e sem silenciamento analisada por Two-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey.

Fonte: Elaboração própria.

## 6 DISCUSSÃO

OSM e LIF são citocinas pertencente à família gp130, sendo as citocinas mais similares tanto estruturalmente quanto funcionalmente dentro desta família. Embora LIF e OSM possuam a capacidade de atuar sobre o tecido ósseo, OSM parece ser mais potente, tanto na reabsorção óssea<sup>17</sup> quanto na formação óssea<sup>11,70</sup>. Isso por ser explicado pelo fato de OSM ter capacidade de sinalizar tanto através do complexo OSMR:gp130 quanto do complexo LIFR:gp130, enquanto LIF sinaliza apenas através do complexo LIFR:gp130<sup>8</sup>.

Como relatado por Walker et al.<sup>11</sup> e corroborado por Persson et al.<sup>17</sup>, mOSM promove a reabsorção óssea, de maneira indireta, através do aumento de RANKL pelos osteoblastos em uma ação que é mediada por OSMR/gp130. Em contraste, Walker também demonstrou que, atuando em um dos seus mecanismos para aumentar a formação óssea, OSM é uma potente indutora da secreção de esclerostina em uma ação que ocorre via LIFR nos osteócitos e de maneira muito mais potente do que mLIF. A capacidade de OSM induzir a formação de osteoblastos acontece em diferentes fases da diferenciação. OSM está envolvida nas fases iniciais da diferenciação osteoblástica como demonstrado pela sua capacidade de estimular um fenótipo osteoblástico tanto em células tronco derivadas do tecido adiposo quanto de células tronco mesenquimais derivadas da medula óssea<sup>11,71</sup>. OSM também participa da etapa final da diferenciação osteoblástica, induzindo um fenótipo osteolítico<sup>72</sup>. Como observado nos nossos resultados, a indução de formação por mOSM ocorreu de maneira muito robusta do que LIF, o que nos levou a investigar por qual receptor OSM alcançava esse efeito, já que, embora a maioria dos estudos relatem que a ação de mOSM sobre a formação óssea acontece via OSMR/gp130 a ação de OSM no osteócito por exemplo, acontece via LIFR.

Nossos resultados, demonstraram que, assim como o que acontece com OSM na reabsorção óssea, em uma ação indireta sobre osteoblastos<sup>17</sup>, o efeito de mOSM, distinto de mLIF sobre essas células, acontece via OSMR, como se pode confirmar a partir do efeito do silenciamento dos receptores IL6st (gp130), Lifr e Osmr nos osteoblastos tratados com OSM. Uma investigação mais aprofundada sobre a utilização dos complexos receptores para induzir a

diferenciação osteoblástica é necessária, visto que nossos achados estão em contraste com os dados reportados por Walker et al.<sup>11</sup> que demonstraram que a diferenciação osteoblástica induzida por OSM em camundongos acontece pela ativação do complexo LIFR:gp130.

O fato de diferentes complexos receptores ativarem distintas vias *downstream* a ligação de OSM com seu receptor nos levou a investigar qual a cascata de sinalização a ligação de OSM/OSMR/gp130 desencadeia nos osteoblastos de calvária para induzir a formação óssea. Em 2000, Hermanns et al.<sup>16</sup> reportaram, usando células de carcinoma hepatocelular, que essa proteína adaptadora é recrutada somente por OSM e justamente pelo seu receptor específico OSMR. Corroborando com Persson et al.<sup>17</sup>, nossos dados demonstram que o nível de expressão e a fosforilação de Shc1 são aumentados em osteoblastos estimulados com OSM, o que sugere também a utilização do complexo OSMR:gp130. Interessante ressaltar que a hipótese de que Shc1 é recrutada por gp130 não seria possível a já que o tratamento com LIF, que apenas pode sinalizar via LIFR/gp130, não aumentou os níveis dessa proteína ou sua fosforilação.

Para comprovar que de fato Shc1 possui um papel crucial sobre a indução da formação óssea por OSM, os resultados demonstraram também que o silenciamento gênico de Sch1 afeta todos os parâmetros antes aumentados pelo tratamento com OSM. Esse dado corrobora com o que foi demonstrado por Persson et al.<sup>17</sup> onde Shc1 se demonstrou essencial para o aumento da reabsorção óssea, via aumento de RANKL em osteoblastos. Outros estudos envolvendo Shc1, demonstraram que, nos modelos em que essa proteína foi recrutada por OSMR, a via de sinalização ativada era STAT3<sup>18</sup>.

Embora seja conhecido que os membros da família gp130 ativem vias da família JAK/STAT para sinalização intracelular, preferencialmente STAT1, STAT3 e STAT5, essas citocinas podem ativar também, mesmo que menos frequentemente, outras vias intracelulares como as MAPKS. Como consequência da ativação de STAT3, OSM aumenta a formação óssea via inibição da esclerostina<sup>11</sup>. O silenciamento de Stat3 demonstrou que a via pela qual OSM aumenta marcadores envolvidos na formação óssea acontece a partir da ancoragem, dimerização e posterior translocação da proteína STAT3 para o

núcleo, já que todos os parâmetros analisados anteriormente foram afetados pelo silenciamento. Porém, por ter sido reportado por Walker que esta ativação aconteça através do complexo LIFR:gp130, são necessárias análises complementares para definir se essa é a via exclusiva pela qual OSM aumenta a formação óssea em osteoblastos.

Por fim, a ordem pela qual essas moléculas estão distribuídas em seus eventos, embora não demonstrada experimentalmente nesse trabalho, parece corroborar com os dados de Persson et al.<sup>17</sup>, onde, a níveis proteicos, o silenciamento de *Stat3*, como esperado, resultou em uma menor fosforilação de STAT3 induzida por OSM, mas não afetou a fosforilação de *Shc1*. Por outro lado, o silenciamento de *Shc1* resultou na diminuição da fosforilação de STAT3 no estudo de Persson et al.<sup>17</sup>, indicando que a ativação de *Shc1* acontece anteriormente (*upstream*) a STAT3. Entende-se assim, que, o aumento dos parâmetros da formação óssea analisados causado por mOSM, é resultante da ativação da via STAT3 inicialmente por meio da ligação de OSM com seu receptor OSMR e gp130 (complexo receptor tipo II) e dependente do recrutamento de uma proteína adaptadora, *Shc1*. Sintetizando que OSM parece aumentar a formação óssea através do eixo OSMR-*Shc1*-STAT3. Esses dados corroboram ainda com os achados por Ahn, Sabourin et al.<sup>18</sup> que demonstrou que a fosforilação de STAT3 parecia ser dependente de *Shc1* em células de câncer de mama.

A proteína *Shc1* possui três isoformas distintas<sup>63</sup>. Desta forma, pode ser interessante definir qual das três é a envolvida no eixo OSMR-SHC1-STAT3, muito embora apenas uma delas, p66kDa se distingue em relação as funções, já que é a única que não parece estar envolvida na ativação de Ras, mas sim nas vias que convertem sinais oxidativos em apoptose. Análises complementares podem auxiliar na resolução dessa questão, salvo a letalidade embrionária resultante da deleção de *Shc1* em embriões<sup>73</sup> outros métodos podem ser aplicados para uma descrição ainda mais detalhada dessa que se propõe a ser uma nova via descrita para diferenciação de osteoblastos e formação óssea.

Os resultados envolvendo o estabelecimento do eixo OSMR-*Shc1*-STAT3 podem revelar o que acreditamos ser uma nova via pela qual o papel anabólico

de OSM pode estimular osteoblastos, induzindo a formação óssea. Esses dados podem acabar fornecendo novos insights sobre a sinalização e recrutamento de Shc1, que podem ser utilizados para o desenvolvimento de moléculas moduladoras desse eixo no ambiente ósseo e a instigação da investigação de seu papel sobre outras condições clínicas nas quais OSM está envolvida.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o momento demonstram que a OSM, uma potente citocina com capacidade de indução da formação óssea recruta, após sua ligação com o complexo gp130/Osmr a proteína adaptadora Shc1 para ativação de vias importantes para formação óssea como STAT3, definindo assim, o papel dessa proteína como essencial para a sinalização dessa citocina nos osteoblastos e, conseqüentemente, na indução da formação óssea.

O silenciamento de Shc1 e Stat3 em células tratadas com mOSM afeta a expressão gênica de um dos mais importantes genes envolvidos na formação óssea, *Alpl*, além de influenciar também a indução da formação de nódulos de mineralização e da atividade da enzima ALPase, sendo necessários ainda, outros ensaios, para que de fato esse caminho seja mais bem descrito.

## REFERÊNCIAS\*

1. Lerner UH, Kindstedt E, Lundberg P. The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells. *J Clin Periodontol*. 2019; 46 Suppl 21: 33-51.
2. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*. 2000; 21(2): 115-37.
3. Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest*. 2013; 42(7): 555-622.
4. Shin HI, Divieti P, Sims NA, Kobayashi T, Miao D, Karaplis AC, et al. Gp130-mediated signaling is necessary for normal osteoblastic function in vivo and in vitro. *Endocrinology*. 2004; 145(3): 1376-85.
5. Sims NA, Walsh NC. GP130 cytokines and bone remodelling in health and disease. *BMB Rep*. 2010; 43(8): 513-23.
6. Johnson RW, Brennan HJ, Vrahnas C, Poulton IJ, McGregor NE, Standal T et al. The primary function of gp130 signaling in osteoblasts is to maintain bone formation and strength, rather than promote osteoclast formation. *J Bone Miner Res*. 2014; 29(6): 1492-505.
7. Auguste P, Guillet C, Fourcin M, Olivier C, Veziere J, Pouplard-Barthelaix A et al. Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem*. 1997; 272(25): 15760-4.
8. Ichihara M, Hara T, Kim H, Murate T, Miyajima A. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice. *Blood*. 1997; 90(1): 165-73.
9. Heinrich PC, Behrmann I, Müller-Newen G, Schaper F, Graeve L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*. 1998; 334(Pt 2): 297-314.
10. Sims NA, Jenkins BJ, Quinn JM, Nakamura A, Glatt M, Gillespie MT et al. Glycoprotein 130 regulates bone turnover and bone size by distinct downstream signaling pathways. *J Clin Invest*. 2004;113(3): 379-89.
11. Walker EC, McGregor NE, Poulton IJ, Solano M, Pompolo S, Fernandes TJ et al. Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *J Clin Invest*. 2010; 120(2): 582-92.

---

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

12. Kuropatwinski KK, De Imus C, Gearing D, Baumann H, Mosley B. Influence of subunit combinations on signaling by receptors for oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin-6. *J Biol Chem.* 1997; 272(24): 15135-44.
13. Walker EC, Johnson RW, Hu Y, Brennan HJ, Poulton IJ, Zhang JG et al. Murine Oncostatin M acts via Leukemia Inhibitory Factor Receptor to phosphorylate STAT3 but not STAT1, an effect that protects bone mass. *J Biol Chem.* 2016; 291(41): 21703–16.
14. Itoh S, Udagawa N, Takahashi N, Yoshitake F, Narita H, Ebisu S et al. A critical role for interleukin-6 family-mediated Stat3 activation in osteoblast differentiation and bone formation. *Bone.* 2006; 39(3): 505-12.
15. Hermanns HM, Radtke S, Haan C, Schmitz-Van de Leur H, Tavernier J, Heinrich PC et al. Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130. *J Immunol.* 1999; 163(12): 6651-8.
16. Hermanns HM, Radtke S, Schaper F, Heinrich PC, Behrmann I. Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines: the adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275(52): 40742-8.
17. Persson E, Souza PPC, Floriano-Marcelino T, Conaway HH, Henning P, Lerner UH. Activation of Shc1 allows oncostatin m to induce RANKL and osteoclast formation more effectively than leukemia inhibitory factor. *Front Immunol.* 2019; 10: 1164.
18. Ahn R, Sabourin V, Bolt AM, Hébert S, Totten S, De Jay N et al. The Shc1 adaptor simultaneously balances Stat1 and Stat3 activity to promote breast cancer immune suppression. *Nat Commun.* 2017; 8: 14638.
19. Hattner R, Epker BN, Frost HM. Suggested sequential mode of control of changes in cell behaviour in adult bone remodelling. *Nature.* 1965; 206(983): 489-90.
20. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res.* 1982; 4(1): 1-6.
21. Parfitt AM. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone.* 2002; 30(1): 5-7.
22. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem.* 1994; 55(3): 273-86.
23. Katsimbri P. The biology of normal bone remodelling. *Eur J Cancer Care (Engl).* 2017; 26(6). doi: 10.1111/ecc.12740.

24. Karsenty G. The genetic transformation of bone biology. *Genes Dev.* 1999; 13(23): 3037-51.
25. Jimi E, Hirata S, Shin M, Yamazaki M, Fukushima H. Molecular mechanisms of BMP-induced bone formation: Cross-talk between BMP and NF- $\kappa$ B signaling pathways in osteoblastogenesis. *Jpn Dent Sci Rev Japanese Dental Science Review.*, 2010; 46(1): 33-42.
26. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2): 201-9.
27. Abdelgawad ME, Delaisse JM, Hinge M, Jensen PR, Alnaimi RW, Rolighed L et al. Early reversal cells in adult human bone remodeling: osteoblastic nature, catabolic functions and interactions with osteoclasts. *Histochem Cell Biol.* 2016; 145(6): 603-15.
28. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008; 473(2): 139-46.
29. Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(2): 131-9.
30. McDonald MM, Khoo WH, Ng PY, Xiao Y, Zamerli J, Thatcher P et al. Osteoclasts recycle via osteomorphs during RANKL-stimulated bone resorption. *Cell.* 2021; 184(7): 1940.
31. Standal T, Johnson RW, McGregor NE, Poulton IJ, Ho PW, Martin TJ et al. gp130 in late osteoblasts and osteocytes is required for PTH-induced osteoblast differentiation. *J Endocrinol.* 2014; 223(2): 181-90.
32. Lacroix M, Rousseau F, Guilhot F, Malinge P, Magistrelli G, Herren S et al. Novel insights into interleukin 6 (IL-6) Cis- and trans-signaling pathways by differentially manipulating the assembly of the IL-6 signaling complex. *J Biol Chem.* 2015; 290(45): 26943-53.
33. Johnson RW, McGregor NE, Brennan HJ, Crimeen-Irwin B, Poulton IJ, Martin TJ et al. Glycoprotein130 (Gp130)/interleukin-6 (IL-6) signalling in osteoclasts promotes bone formation in periosteal and trabecular bone. *Bone.* 2015; 81: 343-51.
34. Zarling JM, Shoyab M, Marquardt H, Hanson MB, Lioubin MN, Todaro GJ. Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(24): 9739-43.
35. Bolin C, Tawara K, Sutherland C, Redshaw J, Aranda P, Moselhy J et al. Oncostatin m promotes mammary tumor metastasis to bone and osteolytic bone degradation. *Genes Cancer.* 2012; 3(2): 117-30.
36. Nair BC, DeVico AL, Nakamura S, Copeland TD, Chen Y, Patel A et al. Identification of a major growth factor for AIDS-Kaposi's sarcoma cells as oncostatin M. *Science.* 1992; 255(5050): 1430-2.

37. Tanaka M, Miyajima A. Oncostatin M, a multifunctional cytokine. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149: 39-52.
38. Guihard P, Boutet MA, Brounais-Le Royer B, Gamblin AL, Amiaud J, Renaud A et al. Oncostatin m, an inflammatory cytokine produced by macrophages, supports intramembranous bone healing in a mouse model of tibia injury. *Am J Pathol.* 2015; 185(3): 765-75.
39. Richards CD. The enigmatic cytokine oncostatin m and roles in disease. *ISRN Inflamm.* 2013; 2013: 512103.
40. Gearing DP, Gough NM, King JA, Hilton DJ, Nicola NA, Simpson RJ et al. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *EMBO J.* 1987; 6(13): 3995-4002.
41. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ et al. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J.* 1996; 15(5): 1055-63.
42. Mosley B, De Imus C, Friend D, Boiani N, Thoma B, Park LS, et al. Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation. *J Biol Chem.* 1996; 271(51): 32635-43.
43. Bellido T, Borba VZ, Roberson P, Manolagas SC. Activation of the Janus kinase/STAT (signal transducer and activator of transcription) signal transduction pathway by interleukin-6-type cytokines promotes osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 1997; 138(9): 3666-76.
44. Reid LR, Lowe C, Cornish J, Skinner SJ, Hilton DJ, Willson TA et al. Leukemia inhibitory factor: a novel bone-active cytokine. *Endocrinology.* 1990; 126(3): 1416-20.
45. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *J Immunol.* 2002; 169(6): 3353-62.
46. Cornish J, Callon KE, Edgar SG, Reid IR. Leukemia inhibitory factor is mitogenic to osteoblasts. *Bone.* 1997; 21(3): 243-7.
47. Ware CB, Horowitz MC, Renshaw BR, Hunt JS, Liggitt D, Koblar SA et al. Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development.* 1995; 121(5): 1283-99.
48. Bozec A, Bakiri L, Hoebertz A, Eferl R, Schilling AF, Komnenovic V et al. Osteoclast size is controlled by Fra-2 through LIF/LIF-receptor signalling and hypoxia. *Nature.* 2008; 454(7201): 221-5.

49. Cornish J, Callon K, King A, Edgar S, Reid IR. The effect of leukemia inhibitory factor on bone in vivo. *Endocrinology*. 1993; 132(3): 1359-66.
50. Metcalf D, Gearing DP. A myelosclerotic syndrome in mice engrafted with cells producing high levels of leukemia inhibitory factor (LIF). *Leukemia*. 1989; 3(12): 847-52.
51. Dazai S, Akita S, Hirano A, Rashid MA, Naito S, Akino K et al. Leukemia inhibitory factor enhances bone formation in calvarial bone defect. *J Craniofac Surg*. 2000; 11(6): 513-20.
52. Poulton IJ, McGregor NE, Pompolo S, Walker EC, Sims NA. Contrasting roles of leukemia inhibitory factor in murine bone development and remodeling involve region-specific changes in vascularization. *J Bone Miner Res*. 2012; 27(3): 586-95.
53. Noda M, Vogel RL, Hasson DM, Rodan GA. Leukemia inhibitory factor suppresses proliferation, alkaline phosphatase activity, and type I collagen messenger ribonucleic acid level and enhances osteopontin mRNA level in murine osteoblast-like (MC3T3E1) cells. *Endocrinology*. 1990; 127(1): 185-90.
54. Hakeda Y, Sudo T, Ishizuka S, Tanaka K, Higashino K, Kusuda M et al. Murine recombinant leukemia inhibitory factor modulates inhibitory effect of 1,25 dihydroxyvitamin D3 on alkaline phosphatase activity in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 175(2): 577-82.
55. Malaval L, Gupta AK, Aubin JE. Leukemia inhibitory factor inhibits osteogenic differentiation in rat calvaria cell cultures. *Endocrinology*. 1995; 136(4): 1411-8.
56. Malaval L, Liu F, Vernallis AB, Aubin JE. GP130/OSMR is the only LIF/IL-6 family receptor complex to promote osteoblast differentiation of calvaria progenitors. *J Cell Physiol*. 2005; 204(2): 585-93.
57. LEHNINGER TM, NELSON, DL, COX, MM. *Princípios de bioquímica*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed; 2014.
58. Stark GR, Darnell JE. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity*. 2012; 36(4): 503-14.
59. Jones SA, Jenkins BJ. Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer. *Nat Rev Immunol*. 2018; 18(12): 773-89.
60. Wang Y, Robledo O, Kinzie E, Blanchard F, Richards C, Miyajima A et al. Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem*. 2000; 275(33): 25273-85.
61. Galimov ER. The Role of p66shc in Oxidative Stress and Apoptosis. *Acta Naturae*. 2010; 2(4): 44-51.

62. Bhat SS, Anand D, Khanday FA. p66Shc as a switch in bringing about contrasting responses in cell growth: implications on cell proliferation and apoptosis. *Mol Cancer*. 2015; 14: 76.
63. Migliaccio E, Mele S, Salcini AE, Pelicci G, Lai KM, Superti-Furga G et al. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *EMBO J*. 1997; 16(4): 706-16.
64. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A et al. Proteomics: tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015; 347(6220): 1260419.
65. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, Pelicci G, Reboldi P, Pandolfi PP et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature*. 1999; 402(6759): 309-13.
66. Napoli C, Martin-Padura I, de Nigris F, Giorgio M, Mansueto G, Somma P et al. Deletion of the p66Shc longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(4): 2112-6.
67. Trinei M, Migliaccio E, Bernardi P, Paolucci F, Pelicci P, Giorgio M. p66Shc, mitochondria, and the generation of reactive oxygen species. *Methods Enzymol*. 2013; 528: 99-110.
68. Huang P, Feng X, Zhao Z, Yang B, Fang T, Guo M et al. p66Shc promotes HCC progression in the tumor microenvironment via STAT3 signaling. *Exp Cell Res*. 2019; 383(2): 111550.
69. Kurdi M, Booz GW. Deciphering STAT3 signaling in the heart: plasticity and vascular inflammation. *Congest Heart Fail*. 2010; 16(5): 234-8.
70. Guihard P, Danger Y, Brounais B, David E, Brion R, Delecristin J et al. Induction of osteogenesis in mesenchymal stem cells by activated monocytes/macrophages depends on oncostatin M signaling. *Stem Cells*. 2012; 30(4): 762-72.
71. Song HY, Jeon ES, Kim JI, Jung JS, Kim JH. Oncostatin M promotes osteogenesis and suppresses adipogenic differentiation of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*. 2007; 101(5): 1238-51.
72. Brounais B, David E, Chipoy C, Trichet V, Ferré V, Charrier C et al. Long term oncostatin M treatment induces an osteocyte-like differentiation on osteosarcoma and calvaria cells. *Bone*. 2009; 44(5): 830-9.
73. Lai KM, Pawson T. The ShcA phosphotyrosine docking protein sensitizes cardiovascular signaling in the mouse embryo. *Genes Dev*. 2000; 14(9): 1132-45.

## APÊNDICE A – PUBLICAÇÕES RESULTANTES DO PERÍODO DO DOUTORADO

1. Movérare-Skrtic S, Nilsson KH, Henning P, Funck-Brentano T, Nethander M, Rivadeneira F et al. Osteoblast-derived NOTUM reduces cortical bone mass in mice and the. *FASEB J.* 2019; 33(10): 11163-79.
2. Da Ponte Leguizamón N, de Molon RS, Coletto-Nunes G, Nogueira AVB, Rocha SV, Neo-Justino DM et al. Phytocystatin CsinCPI-2 Reduces Osteoclastogenesis and Alveolar Bone Loss. *J Dent Res.* 2021: doi: 220345211027811.

## ANEXO A – COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL - FOAr



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**Faculdade de Odontologia**  
**Campus de Araraquara**  
**Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA**

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 11/2015 referente à pesquisa "**ENTENDENDO O PAPEL CATABÓLICO E ANABÓLICO DA INFLAMAÇÃO SOBRE O TECIDO ÓSSEO**" sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pela legislação brasileira atualmente em vigor, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

## CERTIFICATE

We certify that the protocol 11/2015 referring to the research "**UNDERSTANDING THE ANABOLIC AND CATABOLIC RULES OF INFLAMMATION OVER BONE TISSUE**" under responsibility of **Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli** in agreement with the nowadays specific Brazilian laws and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEUA).

Araraquara, 26 de março de 2021.

  
**Profa. Dra. CARINA APARECIDA FABRÍCIO DE ANDRADE**  
Coordenadora da CEUA/FOAr/UNESP

## ANEXO B – COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL - UFG



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E INOVAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Modulação da resposta de células ósseas por citocinas, componentes bacterianos, fármacos e biomateriais**”, registrada com o protocolo nº **011/21**, sob a responsabilidade de **Pedro Paulo Chaves de Souza** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG), em reunião de 26/04/2021.

- Finalidade: ( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
- Vigência da autorização (início e fim): 26/04/2021 a 10/05/2026
- Espécie/linhagem/raça: camundongos *Mus musculus* swiss
- Nº de animais autorizados: 149 camundongos no período experimental mais 6 para o projeto piloto = total = 155
- Peso/Idade: 3 dias/ 4 semanas/6 semanas dependendo do protocolo experimental, especificado na ficha de atendimento de pendência.
- Sexo: machos
- Origem (fornecedor): Biotério central /UFG

  
**Dra. Liliana Borges de Menezes Leite**  
Coordenadora da CEUA/PRPI/UFG

**Autorizo a reprodução deste trabalho.**

**(Direitos de publicação reservado ao autor)**

**Araraquara, 22 de setembro de 2021**

**Gláucia Coletto Nunes**