Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto

Instituto Politécnico do Porto

Joana Alves dos Santos Correia

Bioatividade de Líquidos Iónicos Derivados do Valproato na Osteoclastogénese Humana e Estudo do Efeito Antimicrobiano dos Catiões Utilizados

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica em Saúde, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor João Costa-Rodrigues, da Professora Doutora Maria Helena Fernandes da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto e de orientação institucional da Professora Doutora Cristina Prudêncio, Área Técnico-Científica das Ciências Químicas e das Biomoléculas na ESTSP do Instituto Politécnico do Porto.

Setembro de 2015

Agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer, de forma sincera, ao Professor Doutor Ricardo Ferraz por me ter, ajudado, e incentivado ao longo deste processo de aprendizagem e, pela compreensão revelada ao perceber que os planos traçados inicialmente teriam que ser alterados, tendo sempre conseguido encontrar a melhor solução para que eu fosse bem sucedida neste projeto, e pelos conhecimentos e experiência científica transmitidos que me ajudaram no Mestrado.

Ao Professor Doutor João Costa-Rodrigues pela prontidão com que aceitou ser meu orientador e por me ter recebido de forma entusiástica no Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea – Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto, e pelo apoio, transmissão de conhecimentos científicos, e disponibilidade que demonstrou para esclarecer as minhas questões ao longo dos meses de trabalho.

À Professora Doutora Maria Helena Fernandes, chefe do Laboratório de Metabolismo e Regeneração Óssea – Faculdade Medicina Dentária da Universidade do Porto, por me ter recebido tão bem.

À Professora Doutora Cristina Prudêncio, pela co-orientação e ajuda prestada ao longo do Mestrado, sem esquecer as suas palavras de incentivo e motivação.

Aos meus amigos e colegas do Mestrado por me terem apoiado e ajudado nos momentos de maior pressão (pelos quais todos passamos) e pela descontração e companheirismo que transmitiram.

Por fim, o meu maior e sincero obrigada à minha família (pais, irmã e avós) por me terem ajudado a alcançar mais um dos meus objetivos. Pela compreensão, paciência e incentivo demonstrados ao longo do Mestrado e no restante percurso académico e profissional, e pela preocupação e apoio constante que expressam diariamente. Sem eles não estaria onde estou hoje, nem me sentiria mais realizada.

A todos, o meu mais sincero,

Obrigada!

Resumo

Os Líquidos Iónicos (LIs) são compostos iónicos com pontos de fusão abaixo de 100°C, muitos deles são líquidos à temperatura ambiente. As numerosas combinações entre o catião e anião permitem modular as suas propriedades físico-químicas. A associação entre LIs e Ingredientes Farmacêuticos Ativos (IFAs) tem sido estudada e revelou que esta combinação reduz os efeitos secundários dos fármacos e aumenta a sua biodisponibilidade.

A resistência bacteriana é um problema na sociedade moderna. Por esse motivo, é crucial pesquisar novos alvos terapêuticos para superar esta situação. O Ácido Valpróico (VPA) é um fármaco anti-epiléptico muito utilizado no tratamento de doenças neurológicas, mas que possui vários efeitos secundários associados, afetando principalmente a remodelação óssea. A combinação de LIs e IFAs – LIs-IFAs – tem demostrado que estes compostos podem ser úteis para ultrapassar a resistência bacteriana, bem como os problemas que os pacientes sujeitos ao tratamento com VPA experienciam.

O objetivo deste estudo é determinar a bioatividade de LIs-IFAs, tanto em estirpes de bactérias, como em células do osso – osteoclastos (humanos). No estudo bacteriano, a Ampicilina de Sódio e vários catiões halogenados foram aplicados em estirpes bacterianas, nas quais estavam incluídas algumas estirpes resistentes, e foram determinadas as suas taxas de crescimento. No estudo osteoclastogénico, foram usados vários catiões associados com valproato que, posteriormente, foram aplicados em culturas de células osteoclásticas humanas para determinar o seu efeito nestas células.

Os LIs-IFAs mostraram efeitos inibitórios em ambos os estudos. No estudo antimicrobiano o [C_{16}Pyr] [Cl] associado à Ampicilina de Sódio revelou inibição das estirpes sensíveis e de bactérias resistentes. Na avaliação do processo osteoclastogénico, o [C_2OHDMIM] [Valproato] e [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato] demonstraram capacidade de modular negativamente este processo.

Os resultados obtidos no presente trabalho destacam o potencial destes compostos como novos fármacos, e a importância de outros estudos para compreender os mecanismos pelos quais eles atuam, tanto em células como em bactérias.

Palavras-chave: Líquidos Iónicos, Ingrediente Farmacêutico Ativo, Ácido Valpróico, Osteoclastogénese, Atividade Antimicrobiana Antimicrobiano, Toxicidade, Osso.

Abstract

Ionic Liquids are ionic compounds with melting points below 100°C, many of them are liquid at room temperature. The numerous arrangements between the cation and the anion allow the adjustment of their physicochemical properties. The association between Ionic Liquids and Active Pharmaceutical Ingredients is being studied and it revealed that this combination reduces side effects of drugs and increases their bioavailability.

The bacteria resistance is an issue in modern society. Therefore is crucial to find new therapeutic targets to overcome this situation. The Valproic Acid is an anti-epileptic drug very used to treat neurological diseases, but has several side effects associated, mainly affecting the bone turnover. The combination of Ionic Liquids and Active Pharmaceutical Ingredients showed that these compounds could be helpful to overcome the bacterial resistance, as well the issues that the patients subject to Valproic Acid treatment experience.

The aim of this study is determinate the bioactivity of Ionic Liquids associated with Active Pharmaceutical Ingredients, both in bacteria strains and in bone cells – osteoclasts. In the bacterial study, Sodium Ampicillin and several halogenated cations were applied to various bacteria strains that included some resistant strains, and their growth rate was determined. In the osteoclastogenic study were used several cations associated with valproate that were applied in human osteoclastic cell cultures in order to determine their effect in these cells.

The Ionic Liquids with the Active Pharmaceutical Ingredient showed inhibitory effects in both of the studies. For the bacterial resistance [C_{16}Pyr][Cl] associated with Sodium Ampicillin revealed inhibition of sensitive and resistant bacteria strain. In the assessment of the osteoclastogenesis process, [C_2OHDMIM] [Valproate] and [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproate] showed that they have the ability to negatively modulate this process.

The results obtained in the present work highlight the potential of these compounds as new pharmaceutical drugs, and the importance of further studies to understand the mechanisms by which they act, both in cells and bacteria.

Key Words: Ionic liquids, Active Pharmaceutical Ingredient, Valproic Acid, Osteoclastogenesis, Antimicrobial Activity Antimicrobial, Toxicity, Bone.

Índice

Agradecimentos I

Resumo III

Abstract IV

Índice de Figuras VII

Índice de Tabelas IX

Lista de Abreviaturas X

Introdução 1

1. Líquidos Iónicos 5
   1.1. Aplicações dos LIs 6
   1.2. LIs como Ingredientes Farmacêuticos Ativos 8
      1.2.1.1. Resistência Antimicrobiana 12
   1.3. Toxicidade e Ecotoxicidade dos LIs 13

2. Osso 17
   2.1. Células do osso 18
      2.1.1.1. Osteoblastos 18
      2.1.1.2. Osteoclastos 20
      2.1.1.3. Osteoclastogénese 22
      2.1.1.4. Osteócitos 23
   2.2. Remodelação Óssea 24

3. Ácido Valpróico 31

4. Introdução 35
   4.1. Objetivos 35
   4.2. Materiais e métodos 35
      4.2.1.1. Preparação dos compostos 35
      4.2.1.2. Método das diluições sucessivas 36
      4.2.1.3. Cultura de bactérias 37
      4.2.1.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) 37
      4.2.1.5. Determinação das Curvas de Crescimento 38
   4.3. Resultados 39
   4.3.1. Resultados obtidos para as MICs 39

4.3.2. Determinação das curvas de crescimento 40
4.4. Discussão 44
5. Introdução 49
5.1. Objetivo do estudo 49
5.2. Materiais e métodos 49
5.2.1.1. Isolamento de PBMC 49
5.2.1.2. Culturas de Osteoclastos 50
5.2.1.3. Atividade da TRAP 53
5.2.1.4. Quantificação de células multinucleadas TRAP-positivas 53
5.2.1.5. Quantificação do conteúdo proteico 53
5.2.1.6. Quantificação da apoptose 54
5.2.1.7. Presença de células com anéis de actina 54
5.3. Resultados 55
5.3.1.1. Atividade da TRAP 55
5.3.1.2. Número de células multinucleadas TRAP-Positivas 57
5.3.1.3. Apoptose 59
5.3.1.4. Presença de células com anéis de actina 60
5.3.1.5. Envolvimento de algumas vias de sinalização, relacionadas com a osteoclastogénese, na resposta celular 61
5.4. Discussão 62
6. Conclusão e Perspetivas Futuras 67

Índice de Figuras

Figura I: Potenciais aplicações dos LIs. Adaptado de 2014 Gupta, K.M., et al; *Chemical Engineering Science* (Gupta & Jiang, 2014) 7
Figura II: Evolução histórica dos Líquidos Iónicos. Adaptado de 2013 Frizzo et al.; *licensee InTech* (Frizzo et al., 2013)..... 8
Figura III: Representação esquemática das estruturas das formas sólidas de Ingredientes Farmacêuticos Ativos. Adaptado de 2009 LU, J. e Rohani, S.; *Current Medicinal Chemistry* (Lu & Rohani, 2009) 10
Figura IV: Diagrama esquemático do Ingrediente Farmacêutico Ativo – Líquidos Iónicos – Perspetivas. De 2014 Marrucho, I. M. et al; *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* (Marrucho et al., 2014) (Reprodução autorizada)..... 11
Figura V: Representação dos mecanismos de resistência das bactérias a antibióticos. De, 2014 Vranakis, et al; *Journal Proteomics*. (Vranakis et al., 2014) 13
Figura VI: Remodelação e modelação óssea. De 2014, Sims N. A., Vrahnas C.; *Archives of Biochemistry and Biophysics* (Sims & Vrahnas, 2014)..... 18
Figura VII: Unidade Básica Multicelular. De 2012, Kular J., et al.; *Clinical Biochemistry* (Kular et al., 2012)..... 25
Figura VIII: Remodelação óssea. De 2010, Raggatt L. J. , Partridge N. C.; *The Journal of Biological Chemistry* (Raggatt & Partridge, 2010) 27
Figura IX: Gráfico de dispersão comparando a taxa de crescimento do *Staphylococcus aureus* entre o controlo, e as concentrações acima de MIC, MIC e abaixo de MIC para o LI [TEA] [Br]. 40
Figura X: Isolamento de PBMC com Ficoll-Paque. Adaptado de Naung, N. Y., et all, 2014, J Oral Biol Craniofac Res (Naung, Suttapreyasri, Kamolmatyakul, & Nuntanaranont, 2014) 50
Figura XI: Esquema ilustrativo dos compostos utilizados nos ensaios derivados do Ácido Valpróico 51
Figura XII: Atividade da TRAP em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, na ausência (controlo negativo) ou suplementadas com os diferentes compostos em estudo, durante 21 dias de cultura..... 55

Figura XII: Número de células multinucleadas TRAP-positivas em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, na ausência (controlo negativo) ou suplementadas com os diferentes compostos em estudo, entre os dias 14 e 21 de cultura. 57
Figura XIV: Atividade da caspase-3 em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, suplementadas com os diferentes compostos em estudo, durante 21 dias de cultura. 59
Figura XV: Imagens representativas da cultura de PBMC visualizadas por microscopia ótica confocal. As células foram coradas de azul pela actina. As barras brancas representam 220 μm. 60
Figura XVI: Atividade da TRAP em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, e diferentes inibidores de vias de sinalização osteoclastogénica (U0126 inibidor da via MEK; PDTC inibidor da via NFκB; GO6983 inibidor da PKC; SP600125 inibidor da JNK), na ausência (controlo negativo) ou suplementadas com os diferentes compostos em estudo, durante 21 dias de cultura..... 61

Índice de Tabelas

Índice V

Tabela I: Compostos utilizados. 36

Tabela II: Resultados obtidos para as MIC's nas diferentes estirpes 39

Tabela III - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [TEA][Br] 40

Tabela IV - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o $[P_{6,6,6,14}][Cl]$ 41

Tabela V - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o $[C_{16}Pyr][Cl]$ 42

Tabela VI - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [Colina] [Cl] 42

Tabela VII- Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [EMIM] [Br] 43

Tabela VIII- Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o $[C_2OHMIM]$ [Br] 43

Tabela IX - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para [Na][Amp] 44

Tabela X: Catiões utilizados 51

Tabela XI: Inibidores avaliados com as concentrações utilizadas, e respectivas vias de sinalização em que interferem. 52

Lista de Abreviaturas

ALP	Fosfatase Alcalina
ATCC	*American Type Culture Collection*
BMD	*Bone Mineral Density*
BMP	*Bone Morphogenic Protein*
BMU	*Bone Multicellular Unit*
CATK	Catepsina-k
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidade Óptica
FGF	Fator de Crescimento Fribroblástico
HDAC	Histonas Desacetilases
IFAs	Ingredientes Farmacêuticos Ativos
IGF	*Insulin-like Growth Factor*
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
LI-IFA	Líquido Iónico-Ingrediente Farmacêutico Ativo
LEC	Fator Promotor de Linfócitos
LIs	Líquidos Iónicos
M-CSF	*Monocyte-Colony Stimulation Factor*
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MMPs	Metaloproteinases da Matriz
MSC	Células Estaminais Mesenquimais
MO	Medula Óssea
OBs	Osteoblastos
OCs	Osteoclastos
OPG	Osteoprogesterina
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
Pré-OBs	Precursores de Osteoblastos
Pré-OCs	Precursores de Osteoclastos
PTH	Hormona da Paratiróide
PYCC	*Portuguese Yeast Culture Collection*
RANK	*Receptor Activator of Nuclear Factor-κB*
RANKL	*Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand*
RB	*Ruffled Membrane*
SOST	Esclerostina

SP1	Esfingosina-1-Fosfato
TCF	Proteínas de Factores de Células T
TGF-β	Fator de Transformação de Crescimento Beta
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAP	Fosfatase Alcalina Tártaro-Resistente
VPA	Ácido Valpróico
WHO	World Health Organization

Introdução

O osso é um tecido conjuntivo especializado e muito dinâmico que se renova constantemente ao longo da vida, tendo mecanismos de adaptação que são ativados em resposta a estímulos internos e externos extremos aos quais está sujeito, como por exemplo ambientais, fisiológicos, stress, fraturas, idade, género, entre outros, que promovem o aumento da perda de osso e a redução da sua capacidade regenerativa. (Eeles et al., ; García-Martínez, De Luna-Bertos, Ramos-Torrecillas, Manzano-Moreno, & Ruiz, 2015; Hayashi et al., 2010; J. Huang et al., 2015; Johnson, Troupis, & Soucacos, 2011; H. Nakamura et al., 2014; O'Brien, Nakashima, & Takayanagi, 2013; Raggatt & Partridge, 2010; Sims & Gooi, 2008; Sims & Vrahnas, 2014)

Ao auto renovar-se o osso tem a capacidade de manter a sua funcionalidade por preservar a sua homeostasia mineral e integridade. (Johnson et al., 2011; Raggatt & Partridge, 2010) Outra característica importante deste tecido é que pode regenerar-se sem deixar cicatrizes. (Salgado, Coutinho, & Reis, 2004) Devido às características mencionadas, é possível afirmar que o osso é um tecido complexo com competência para se adaptar aos diversos impactos que pode sofrer ao longo da vida. (Raggatt & Partridge, 2010; Sims & Gooi, 2008) Esta característica dinâmica deve-se a um processo designado por remodelação óssea que é rigorosamente controlado para que ocorra sempre equilíbrio entre a destruição do osso e a sua regeneração. Quando este equilíbrio é interrompido várias condições patológicas podem surgir. (Beck et al., 2012; Hyeon, Lee, Yang, & Jeong, 2013; S. N. Kim, Kim, Min, & Kim, 2008; Masuda et al., 2014)

Várias células estão envolvidas neste processo. De entre as células mais relevantes destacam-se os osteoclastos (OCs), os osteoblastos (OBs), as "*bone lining cells*" e osteócitos, sendo que todas elas comunicam entre si para que este processo decorra de uma forma equilibrada. (Iñiguez-Ariza & Clarke, 2015; Kular, Tickner, Chim, & Xu, 2012)

Os Líquidos Iónicos (LIs) são compostos iónicos com pontos de fusão abaixo dos 100ºC, sendo que muitos deles são líquidos à temperatura ambiente. (Pollet, Davey, Ureña-Benavides, Eckert, & Liotta, 2014; Williams et al., 2014) As inúmeras

combinações que são possíveis de efetuar entre o catião e anião, que fazem parte da sua estrutura, permitem o ajuste das suas propriedades físico-químicas. (Frade, Simeonov, Rosatella, Siopa, & Afonso, 2013; Tateishi-Karimata & Sugimoto, 2014; S. Zhang, Sun, He, Lu, & Zhang, 2006) Os LIs são classificados em três gerações com diferentes características e propósitos. (Ferraz, Branco, Prudêncio, Noronha, & Petrovski, 2011; Frizzo et al., 2013; Sekhon, 2011) A 3ª geração engloba os LIs com atividade biológica e que estão relacionados com ingredientes farmacêuticos ativos (IFAs). (Frizzo et al., 2013)

As resistências bacterianas são um assunto de debate na sociedade atual, e a pesquisa de novos mecanismos de combate a estes microrganismos resistentes é fulcral para ultrapassar este problema. (Vranakis et al., 2014) Os LIs-IFA podem auxiliar no combate a resistência antimicrobiana, devido as propriedades que lhes são atribuídas, podendo facilitar a atuação do fármaco administrado. (Ferraz et al., 2014)

O Ácido Valpróico (VPA) é um fármaco anti-epilético bastante usado e, cuja eficácia na inibição do crescimento Tumoral, entre os quais se incluem tumores ósseos, tem vindo a ser demonstrada. (Kapoor, 2013; Nanau & Neuman, 2013; Wang, Yu, Li, Xie, & Teng, 2013; Weller, 2013)

CAPÍTULO I – State Of The Art

1. Líquidos Iónicos

Nos últimos anos (década), o tópico relativo aos LIs tem sido cada vez mais mencionado, incrementando o número de publicações sobre estes compostos, particularmente sobre as suas aplicações, propriedades e novos LIs. (Ferraz et al., 2011; Pollet et al., 2014)

Este grande interesse nos LIs deve-se não só às suas propriedades, como baixa pressão de vapor, que permitem o seu uso como solventes, em detrimento dos solventes orgânicos comummente utilizados, mas também ao facto de se poderem ajustar as suas propriedades variando o catião ou o anião. (Martyn & Seddon, 2000; Pollet et al., 2014; Sowmiah, Srinivasadesikan, Tseng, & Chu, 2009; Williams et al., 2014)

"A definição de LIs tem sido assunto de debate com o passar dos anos, principalmente na última década, havendo ainda definições contraditórias." (Neto & Spencer, 2012) No entanto, usualmente os LIs são definidos como sais compostos por iões (catiões orgânicos e aniões orgânicos ou inorgânicos), com pontos de fusão abaixo dos 100ºC. (Cagliero et al., 2012; Delcheva, Ralston, Beattie, & Krasowska, 2014; Hollóczki, Malberg, Welton, & Kirchner, 2014; Niedermeyer, Hallett, Villar-Garcia, Hunt, & Welton, 2012) Estes sais têm diversas propriedades que lhes conferem características únicas, de entre as quais se destacam: baixa pressão de vapor, elevada estabilidade térmica, baixa viscosidade, não inflamabilidade, condutividade iónica, e muitos são líquidos à temperatura ambiente. (Frade et al., 2013; Gao & McCarthy, 2007; Marsh, Boxall, & Lichtenthaler, 2004; Viboud et al., 2012; Wilkes, 2004) Estas propriedades, tornam estes compostos úteis para serem usados como solventes em muitos processos químicos, mas também permite que sejam utilizados em diversas áreas, sendo aplicados em materiais, células fotovoltaicas, materiais energéticos, lubrificantes, entre outros. (Frade et al., 2013; Gao & McCarthy, 2007; Marsh et al., 2004; Smiglak et al., 2014; Wilkes, 2004)

O primeiro Líquido Iónico a ser descrito foi o nitrato de etilamónio, em 1914 por Walden. (Angell, Ansari, & Zhao, 2012; Sekhon, 2011; M. P. Singh, Singh, & Chandra, 2014) No entanto, só após a década de 1980 é que os Líquidos Iónicos à temperatura ambiente começaram a suscitar interesse e, as suas propriedades e caracterização a serem estudadas. (S. Zhang et al., 2006)

Os LIs são compostos formados por catiões e aniões associados, de forma assimétrica. (Coleman & Gathergood, 2010; Sekhon, 2011) Quando o catião e anião são muito simétricos, ficam compactados, e originam uma estrutura cristalizável estável, com elevado ponto de fusão. (Coleman & Gathergood, 2010; Delcheva et al., 2014) Este fenómeno é o oposto do que ocorre nos LIs, razão pelo qual eles são tão singulares, isto é, os LIs têm baixos pontos de fusão devido à sua estrutura catião/anião ser assimétrica, não compactando eficazmente, o que torna a maioria dos LIs líquidos à temperatura ambiente. (Delcheva et al., 2014; Keskin, Kayrak-Talay, Akman, & Hortaçsu, 2007; Sekhon, 2011; Tateishi-Karimata & Sugimoto, 2014) Esta característica comprova que a estrutura dos LIs se deve à sua composição e, quando alterada, as suas propriedades físicas são também modificadas. (Coleman & Gathergood, 2010)

O facto de se poder fazer múltiplas combinações catião/anião levam a que estes compostos sejam designados por "*designer solvents*", pois é possível ajustar as suas propriedades físico-químicas, ao alterar a sua composição de iões, de forma a melhor se adaptarem a determinada reação em que possam ser aplicados. (Delcheva et al., 2014; Frade et al., 2013; Meloa, Bogel-Łukasikb, Pontea, & Bogel-Łukasika, 2013; Tateishi-Karimata & Sugimoto, 2014; S. Zhang et al., 2006) Este ajuste que é possível efetuar nos LIs tornam estes compostos na matéria-prima ideal para usar em diversas aplicações, ou seja, podem ser personalizados de acordo com a finalidade pretendida. (Keskin et al., 2007; Niedermeyer et al., 2012; Tateishi-Karimata & Sugimoto, 2014) Para o uso destes "*designer solvents*" é necessário ter conhecimentos sobre os mesmos, para que os seus efeitos em determinada reação sejam benéficos. (Tateishi-Karimata & Sugimoto, 2014; S. Zhang et al., 2006)

Os LIs também estão associados à química sustentável pois, são considerados "*green solvents*", o que se deve mais uma vez, às suas propriedades físicas, que ao contrário dos solventes comuns, têm a particularidade de não prejudicar o ambiente ao serem utilizados em determinados processos. (Keskin et al., 2007; S. Zhang et al., 2006)

1.1.Aplicações dos LIs

Os LIs não são apenas bons solventes para reações químicas. (Wilkes, 2004) As possíveis combinações que podem ser efetuadas tornam estes compostos relevantes em diversas áreas, nas mais variadas funções. (Sekhon, 2011; Wilkes, 2004) Assim, os LIs

têm sido usados na química analítica, biodiesel e biomassa, biotecnologia, biomedicina, engenharia química, química, conversão energética, entre outras, como se encontra representado na Figura I. (Fan, Li, & Chen, 2014; Gupta & Jiang, 2014; Kumar & Malhotra, 2010; Moniruzzaman & Goto, 2011; Sekhon, 2011)

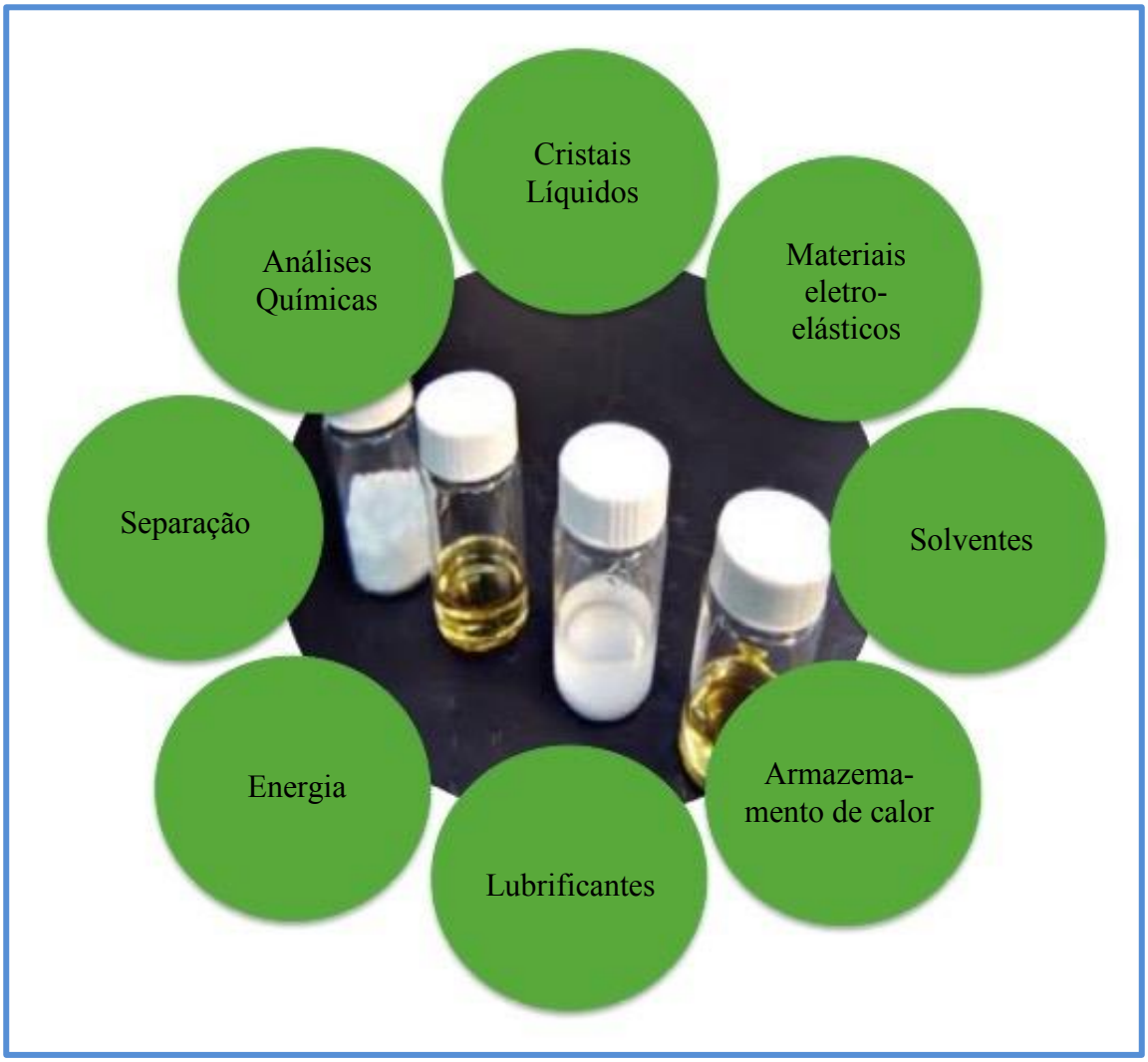


Figura I: Potenciais aplicações dos LIs. Adaptado de 2014 Gupta, K.M., et al; *Chemical Engineering Science* (Gupta & Jiang, 2014)

A pesquisa de novos LIs levou ao desenvolvimento de três gerações de LIs ao longo dos anos, que estão representadas na Figura II, de acordo com as suas propriedades e aplicações:

i. 1ª Geração: Mais direcionada para as propriedades físicas únicas do LIs, capazes de serem modificadas: baixa volatilidade, termicamente estáveis e grandes gamas de líquidos. Usados como solventes;

ii. 2ª Geração: LIs com propriedades químicas alvo, combinadas com propriedades físicas selecionadas - potencial de alterar algumas das propriedades dos LIs. Usados em diversas aplicações como: material energético, lubrificantes, entre outras;

iii. 3ª Geração: LIs com propriedades biológicas alvo, combinadas com propriedades físicas e químicas selecionadas - IFAs: LIs com propriedades biológicas, químicas e físicas. Aplicados na produção de LIs com atividade biológica. (Ferraz et al., 2011; Frizzo et al., 2013; Hough et al., 2007; Sekhon, 2011)

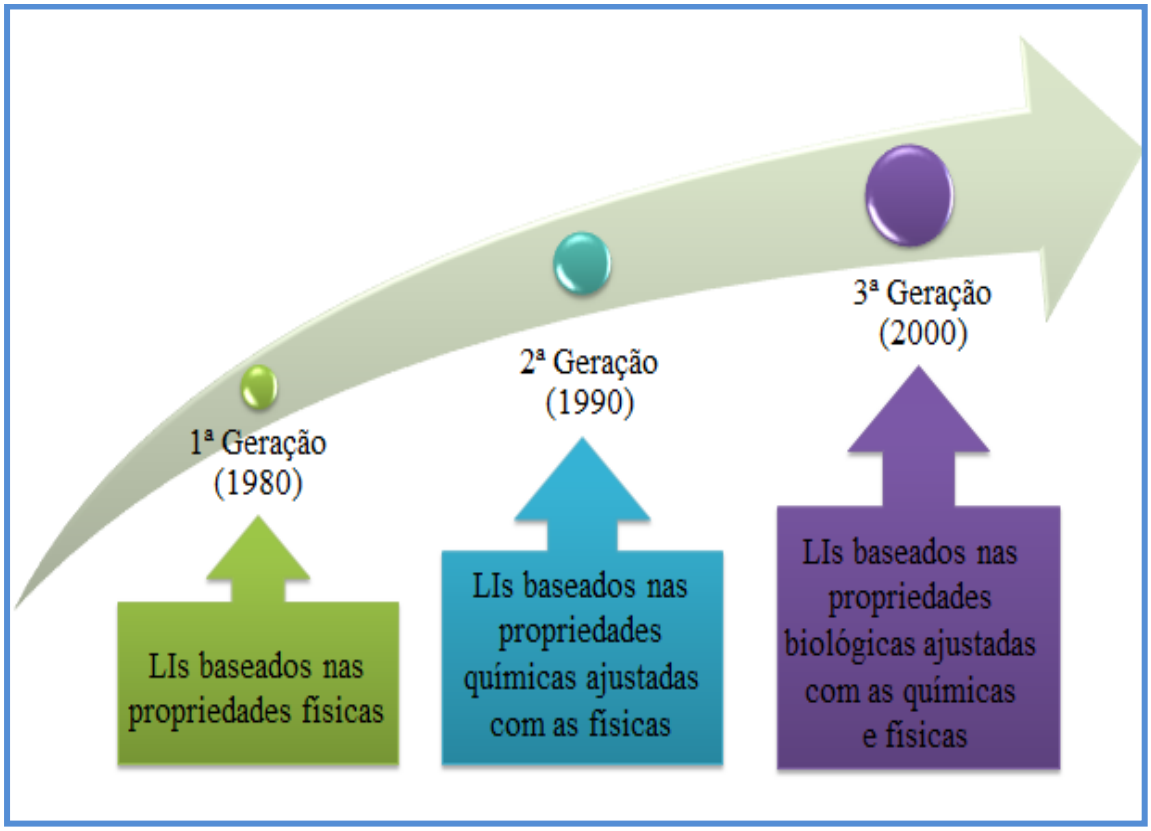


Figura II: Evolução histórica dos Líquidos Iónicos. Adaptado de 2013 Frizzo et al.; *licensee InTech* (Frizzo et al., 2013)

Tendo em conta estas inúmeras aplicações, torna-se imperativo avaliar o efeito do LIs no meio ambiente e na espécie humana (saúde). (Frade & Afonso, 2010)

1.2.LIs como Ingredientes Farmacêuticos Ativos

Atualmente, a indústria farmacêutica está a enfrentar dificuldades devido:

i. ao decréscimo da produtividade – menos fármacos novos a entrar no mercado; aos custos que abrangem o processo de síntese de um novo fármaco até à sua apresentação no mercado;
ii. ao facto de ser preciso reduzir os preços para o consumidor final. Desta forma, a indústria farmacêutica precisa de inovar e procurar novos recursos que auxiliem na síntese dos fármacos, para poder ultrapassar as preocupações acima referidas;
iii. ao aumento de resistência aos fármacos. (Federsel, 2006; Ferraz et al., 2011; Ferraz et al., 2014; Marrucho, Branco, & Rebelo, 2014)

Existem outros problemas que afetam a indústria farmacêutica, como é o caso da solubilidade e biodisponibilidade de um fármaco ou mesmo problemas relacionados com o polimorfismo (possibilidade de um fármaco com mais que uma forma cristalina). (Marrucho et al., 2014) Uma via que pode auxiliar na resolução das limitações referidas pode passar pelo uso de LIs acoplados a IFAs, visto que já existem diversos estudos que demonstram ser possível melhorar as suas propriedades (solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade, bem como o combate a bactérias resistentes). (Costa et al., 2014; Dobler, Schmidts, Klingenhöfer, & Runkel, 2013; Ferraz et al., 2012; Ferraz et al., 2014; Marrucho et al., 2014; Sekhon, 2011) Além disso, uma vez que a indústria farmacêutica procura cada vez mais seguir os princípios da química sustentável, os LIs surgem como substitutos dos solventes orgânicos normalmente usados. (Ferraz et al., 2012; Marrucho et al., 2014; Williams et al., 2014)

O IFA é uma substância usada num fármaco, para que este tenha atividade farmacológica. (WHO, 2011) Vários estudos indicam que combinações de LIs e IFAs podem promover um aumento de bioatividade dos IFAs usados. (Costa et al., 2014) No entanto, é necessário ter em conta a toxicidade dos compostos usados, e como atualmente existem escassos conhecimentos sobre toxicidade, pureza, biodegradação e "*regulament aproval*" dos LIs, a sua utilização neste ramo ainda está um pouco comedida, não sendo de todo excluída. (Ferraz et al., 2011; Kumar & Malhotra, 2010; Moniruzzaman & Goto, 2011; Stoimenovski, MacFarlane, Bica, & Rogers, 2010)

"Hoje em dia esta indústria tem como base de execução a síntese de fármacos na forma sólida, sendo consumidos pelos clientes neste mesmo estado". (Lu & Rohani, 2009; Shamshina & Rogers, 2014) No que diz respeito ao estado sólido em que se encontra o

fármaco, este pode variar em diversas formas, representadas na Figura III, que têm associadas distintas propriedades físico-químicas do mesmo. (Lu & Rohani, 2009) Os polimorfismos existem em vários fármacos e promovem uma estabilidade química diferente da esperada, afetando as suas propriedades. (Hough et al., 2007; Lu & Rohani, 2009; Singhal & Curatolo, 2004) Os LIs podem ajudar a ultrapassar este problema associado aos fármacos consumidos na forma sólida, podendo desta forma serem utilizados na indústria farmacêutica. (Shamshina & Rogers, 2014) Ao usar os LIs na síntese de fármacos, promove-se novas formas de toma dos fármacos. (Marrucho et al., 2014) Ainda, ao usar IFAs como catiões ou aniões combinados com contraiões de LIs, previamente selecionados, – Líquido Iónico-Ingrediente Farmacêutico Ativo (LI-IFA) –, pode ser possível minimizar os efeitos secundários do fármaco na forma sólida. (Ferraz et al., 2012; Kumar & Malhotra, 2010; Stoimenovski et al., 2010)

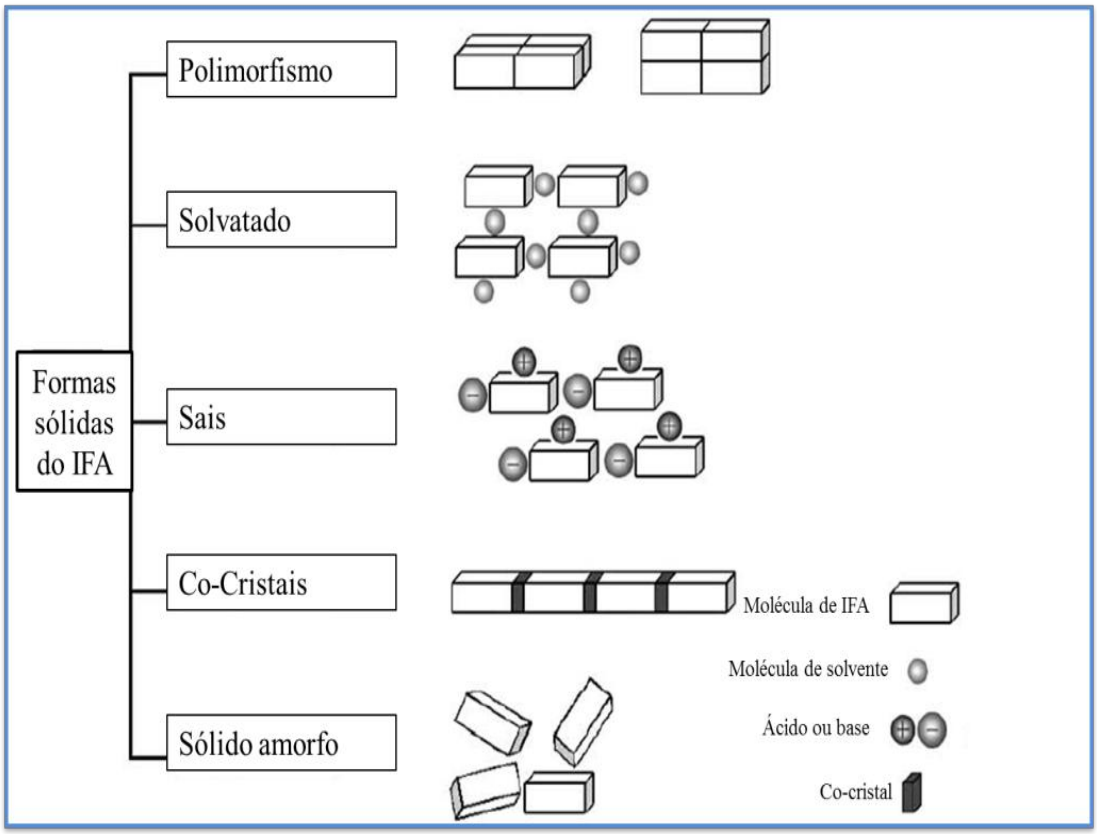


Figura III: Representação esquemática das estruturas das formas sólidas de Ingredientes Farmacêuticos Ativos. Adaptado de 2009 LU, J. e Rohani, S.; *Current Medicinal Chemistry* (Lu & Rohani, 2009)

Um LI-IFA é muito vantajoso para esta indústria pois, pode ser constituído por dois iões ativos associados o que o torna este composto num recurso impulsionador com

capacidade de promover progressão quando se pensa em novas terapêuticas para patologias. (Ferraz et al., 2012; Shamshina & Rogers, 2014) O design de IFAs sob forma de LIs é uma área de grande potencial, principalmente na medicina – tratamento de condições patológicas – LIs da 3ª geração. (Ferraz et al., 2012; Marrucho et al., 2014; Sekhon, 2011)

Vários estudos realizados sobre a toxicidade e atividade microbiana dos LIs comprovam as vantagens da sua aplicação na indústria farmacêutica. (Ferraz et al., 2014; Frizzo et al., 2013) Sendo que esta indústria procura cada vez mais inserir-se no contexto da química verde e sustentabilidade, os LIs podem ser o meio para conseguirem atingir esse objetivo, podendo também reduzir alguns problemas como a solubilidade, biodisponilidade e, como já foi referido, eliminar algumas dificuldades relacionadas com o polimorfismo dos fármacos (Figura IV). (Marrucho et al., 2014; Santos, Morais, C. Melo, Bogel-Lukasik, & Bogel-Lukasik, 2013; Schmeisser & van Eldik, 2014)

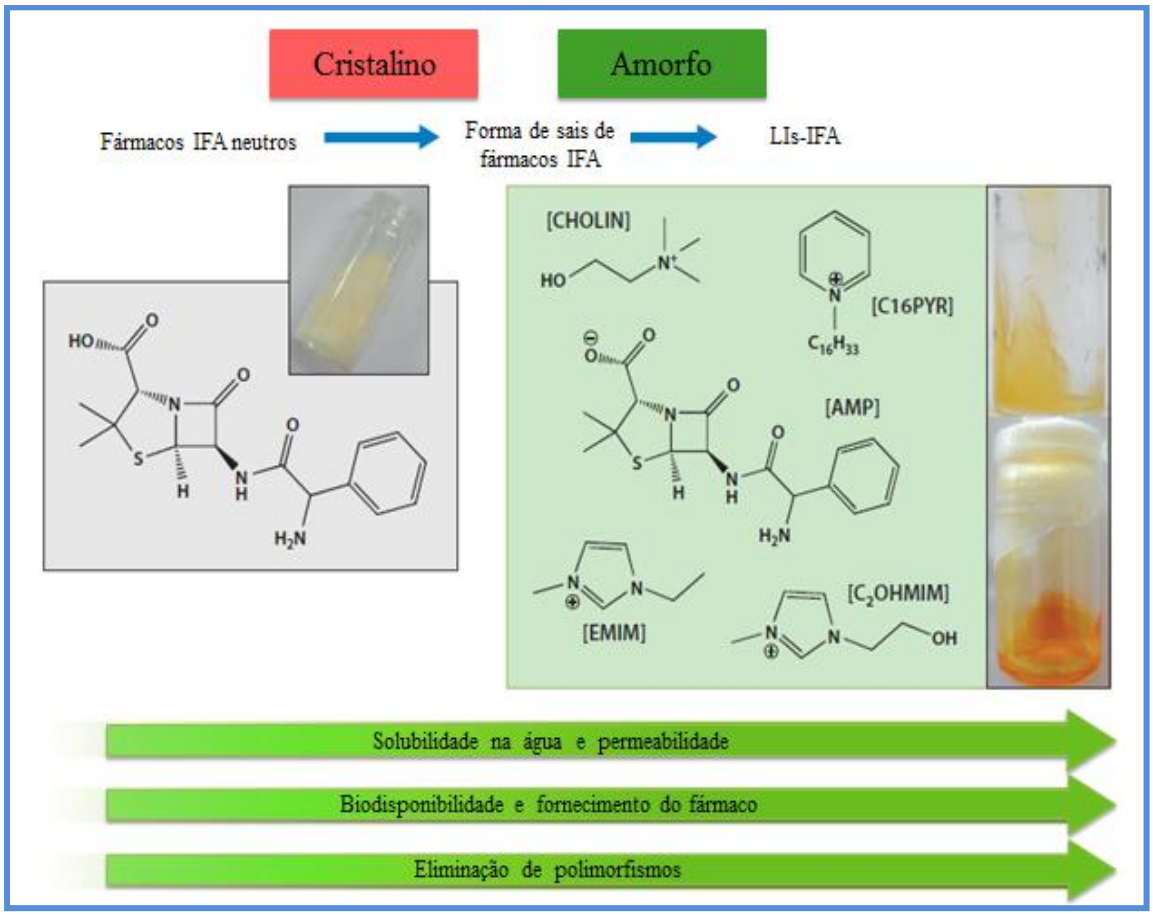


Figura IV: Diagrama esquemático do Ingrediente Farmacêutico Ativo – Líquidos Iónicos – Perspetivas. De 2014 Marrucho, I. M. et al; *The Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering* (Marrucho et al., 2014) (Reprodução autorizada).

1.2.1.1. Resistência Antimicrobiana

A resistência antimicrobiana a antibióticos revela-se atualmente como um dos maiores problemas de Saúde Pública que gera preocupação na sociedade. (Rönnerstrand & Andersson Sundell, 2015; Suzuki, Horinouchi, & Furusawa, 2015; Vranakis et al., 2014) O uso de forma intensiva e a prescrição inadequada deste agentes, sobretudo no tratamento de infeções, tem promovido ao longo dos anos, um crescente aumento de resistências de várias estirpes bacterianas a agentes aos quais eram susceptíveis anteriormente. (Mao et al., 2015; Rôças & Siqueira, 2013; Rönnerstrand & Andersson Sundell, 2015; Vranakis et al., 2014) Assim, estes agentes antimicrobianos que inicialmente eram usados devido à sua eficácia terapêutica, revelam-se atualmente ineficazes em vários microrganismos, que ao longo do tempo desenvolveram a capacidade de acionar mecanismos de resistência, não apenas a um fármaco, mas em alguns casos a vários fármacos – multirresistência. (Mao et al., 2015; Vranakis et al., 2014)

Na sociedade atual, este problema é elevado à escala mundial, pois limita as possibilidades de tratamento que se podem aplicar nos pacientes, desencadeando um incremento da morbilidade e mortalidade, uma vez que a gama de antibióticos eficazes se torna cada vez menor, para além de que a estes antibióticos está também associada uma elevada toxicidade. (Peña et al., 2008; Rönnerstrand & Andersson Sundell, 2015; Vranakis et al., 2014)

Os principais mecanismos pelos quais as bactérias apresentam resistência aos antibióticos estão representados na Figura V, destacando-se os seguintes: efluxo ativo dos antibióticos; modificação enzimática do antibiótico; resistência de permeabilidade da parece celular da bactéria. (Vranakis et al., 2014) Os β-lactâmicos são um grupo de antibióticos com atividade bactericida, aos quais as bactérias têm vindo a demostrar resistência, principalmente as bactérias Gram-Negativas, o que se deve à sua capacidade de produzir β-lactamases, que são enzimas que modificam os antibióticos inibindo a sua ação terapêutica. (Montagner et al., 2014; Vranakis et al., 2014)

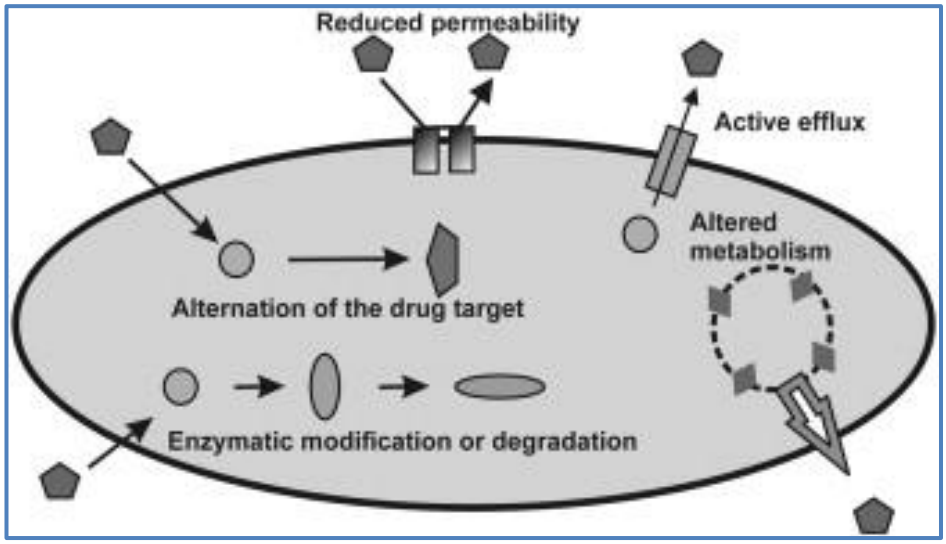


Figura V: Representação dos mecanismos de resistência das bactérias a antibióticos. De, 2014 Vranakis, et al; *Journal Proteomics*. (Vranakis et al., 2014)

Como já foi referido, a resistência aos antibióticos constitui um problema crítico, não só na área da medicina, na qual tem vindo a agravar-se, sendo agora notório através das múltiplas resistências bacterianas com que nos deparamos. (Montagner et al., 2014) Por este motivo, torna-se imperativo a pesquisa e formulação de novos fármacos que atuem em alvos diferentes nas bactérias, para que se possa superar as dificuldades atuais e, futuramente facilitar a escolha do fármaco a administrar. (Rôças & Siqueira, 2013; Vranakis et al., 2014) No entanto, para que isto aconteça é necessário entender os mecanismos metabólicos pelos quais as bactérias atuam, recorrendo a estudos *in vitro* e, posteriormente determinar o seu efeito através de estudos *in vivo*. (Vranakis et al., 2014) Neste contexto farmacológico, os LIs de 3ª geração – LIs-IFA – tornam-se uma opção viável de combate às resistências bacterianas, devido às suas propriedades únicas que foram referidas anteriormente, tendo já sido estudados neste âmbito. (Ferraz et al., 2014)

1.3.Toxicidade e Ecotoxicidade dos LIs

O termo "*green solvents*" aplicado aos LIs tem vindo a ficar em desuso. Este termo era aplicado aos LIs usados como solventes que tinham baixa volatilidade, o que promove uma diminuição do risco de poluição do ar quando comparados com outros solventes orgânicos. (Keskin et al., 2007; Pinto, Costa, Lima, & Saraiva, 2012; Quijano, Couvert, & Amrane, 2010; Roy, Das, & Popelier, 2014) No entanto, com o surgir de um número elevado de LIs e, com o estudo mais intensivo das suas propriedades, hoje sabe-se que

estes compostos têm uma elevada solubilidade na água, o que leva a que este seja o maior meio de libertação de LIs para o ambiente. (El-Harbawi, 2014; Frade et al., 2013; Keskin et al., 2007; Pham, Cho, & Yun, 2010; Pinto et al., 2012; Roy et al., 2014)

As inúmeras combinações dos LIs, entre catião e anião, permitem concretizar o que se designa por "*designer solvents*" específicos para serem utilizados em diversas aplicações. (Keskin et al., 2007; Moniruzzaman & Goto, 2011; Pham et al., 2010; Roy et al., 2014) A falta de conhecimento destes compostos modificados levanta a questão da sua toxicidade para humanos e da ecotoxicidade aquando o seu uso. (Keskin et al., 2007; Pham et al., 2010) O uso de LIs na indústria pode ser um problema, pois pode acarretar riscos ambientais devido à contaminação das águas, por exemplo por descargas de efluentes. (Keskin et al., 2007; Pham et al., 2010) Desta forma, há necessidade de investigar a toxicidade do LIs nos diferentes sistemas em que são expostos. (Keskin et al., 2007; Pinto et al., 2012; Quijano et al., 2010)

Tendo em consideração as preocupações referidas, têm sido efetuados ensaios de toxicidade em diferentes modelos, desde ambientais, aquáticos e terrestres, e em linhas celulares, realizados *in vitro* e *in vivo*, de forma a obter respostas sobre este problema. (El-Harbawi, 2014; Frade & Afonso, 2010; Frade et al., 2013; Keskin et al., 2007) É cada vez mais importante uma caracterização da bioatividade dos LIs, de modo que seja possível uma aplicação destes compostos nas diversas áreas de interesse, tirando o máximo partido das suas propriedades e benefícios em relação a outros produtos. (Pham et al., 2010) Uma conclusão destes estudos é que a toxicidade dos LIs varia com o seu catião e com o tamanho da cadeia hidrocarbonada, sendo que neste critério vários autores concordam com a teoria de que quanto maior esta cadeia, maior a toxicidade do composto. (Keskin et al., 2007)

CAPÍTULO II – Osso

2. Osso

O esqueleto ósseo é continuamente renovado em resposta a estímulos que sofre diariamente, que exercem tensões sobre o osso, para que este possa suportar as exigências diárias a que é submetido. (Lynch & Fischbach, 2014) O osso funciona como suporte mecânico e proteção do corpo, sendo igualmente um reservatório de minerais fundamentais para manter as atividades celulares, neurológicas e vasculares normais. (Shen, Yeh, Cao, Chyu, & Wang, 2011)

O tratamento de fraturas ósseas é um processo instantâneo, dinâmico e complexo que este órgão tem a capacidade de executar, e que envolve a ação conjunta e equilibrada de várias células, vias de sinalização, citocinas e fatores sistémicos e locais, de forma a sintetizar o novo osso. (Gómez-Barrena et al., 2015; Lynch & Fischbach, 2014; Makhdom, Nayef, Tabrizian, & Hamdy, 2015; Sun et al., 2012) Sendo o osso um tecido complexo e altamente especializado, é composto por vários tipos de células com diferentes origens. (Jansen et al., 2015; Saunders & Lee, 2008; Shen et al., 2011)

O tecido ósseo é composto por uma matriz óssea que pode ser subdividida em duas fases: fase orgânica, que lhe dá resistência (constituída predominantemente por colagénio) e uma fase inorgânica, a matriz mineralizada, (constituída por cristais inorgânicos de fosfato de cálcio – hidroxipatite), sendo este o constituinte maioritário do tecido. (J. Y. Kim et al., 2014; Saunders & Lee, 2008; Walmsley et al., 2015)

O osso pode ser caracterizado de acordo com a sua porosidade em cortical, que envolve a medula óssea, e trabecular (com uma porosidade elevada), que é essencial para que ocorra transmissão do stress a que o osso cortical é sujeito. (Milovanovic et al., 2014; Saunders & Lee, 2008)

A síntese e a reabsorção óssea são mecanismos de adaptação biológicos que ocorrem ao longo da vida humana mantendo a homeostasia do osso, e que são efectuados pelos processos de remodelação e modelação óssea. (Maxhimer, Bradley, & Lee, 2015; Sims & Vrahnas, 2014) Apesar de concretizarem o mesmo objetivo, os dois processos são distintos, como se pode verificar na representação apresentada na Figura VI. (Maxhimer et al., 2015; Saunders & Lee, 2008) A modelação ocorre ao longo da vida, no entanto é mais comum na fase de crescimento, sendo responsável pela expansão do osso cortical,

e neste processo ocorre formação e reabsorção do osso em momentos e locais distintos. (Saunders & Lee, 2008; Sims & Vrahnas, 2014) Na remodelação óssea a osteogénese é realizada como consequência da reabsorção do osso, sendo mais comum na vida adulta, e ocorre constantemente, de forma controlada, no osso trabecular. (Saunders & Lee, 2008; Sims & Vrahnas, 2014; Sun et al., 2012)

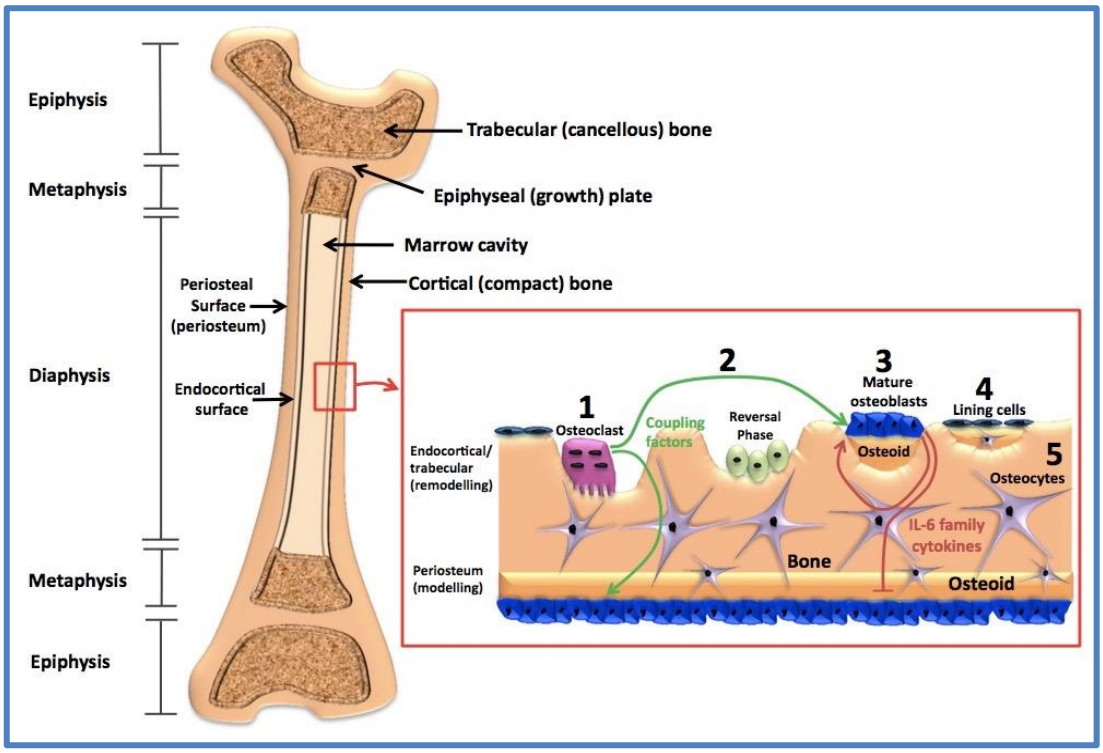


Figura VI: Remodelação e modelação óssea. De 2014, Sims N. A., Vrahnas C.; ***Archives of Biochemistry and Biophysics*** **(Sims & Vrahnas, 2014)**

Como já foi referido, a remodelação óssea ocorre regularmente ao longo da vida, como resposta a alterações que ocorrem neste tecido, substituindo o osso existente por novo osso mais forte. (Q. Huang et al., 2014; Saunders & Lee, 2008; Sims & Vrahnas, 2014)

2.1.Células do osso

2.1.1.1. Osteoblastos

Os OBs são células especializadas cuja principal função é a síntese do osso, sendo também responsáveis pelo controlo da diferenciação e ativação dos OCs. (Sims & Gooi, 2008) São células mononucleares, não totalmente diferenciadas, pois o processo de diferenciação dos OBs decorre em várias fases. (Capulli, Paone, & Rucci, 2014) Derivam da linhagem mesenquimal, via células pluripotentes do estroma da Medula

Óssea (MO) que se vão comprometendo com a linhagem dos OBs, pela ativação de vias de sinalização específicas como a Wnt/β-catenina e BMP-Runx2. (Caetano-Lopes, Canhão, & Fonseca, 2007; García-Martínez et al., 2015; Ha, Jang, Nam, & Beck, 2015; HaDuong et al., 2015; Katagiri & Takahashi, 2002; Komori, 2006; Sims & Vrahnas, 2014; Sinnesael et al., 2015; Y. Zhang, Shao, et al., 2015)

No processo de diferenciação dos OBs, as células estaminais mesenquimais (MSCs) diferenciam em precursores de OBs (pré-OBs), que devido à ação de fatores de transcrição como o Runx2 e *osterix*, e de β-catenina, expressam BMP. (Aisha et al., 2014; Baek et al., 2009; J. Chen & Long, 2013; Day, Guo, Garrett-Beal, & Yang, 2005; R. Zhang et al., 2013) Pré-OBs expressam altos níveis de osteopontina e, diferenciam-se em OBs maduros que promovem a síntese da matriz óssea e expressam altos níveis de osteocalcina. (Aisha et al., 2014; Ono et al., 2007) A diferenciação terminal dos OBs maduros ocorre na matriz óssea recém formada, onde passam a osteócitos. (García-Martínez et al., 2015; Ha et al., 2015; Komori, 2006) Os OBs ativados são células em forma de cubo, que possuem a capacidade de sintetizar matriz óssea e responder a sinais biológicos regulatórios. (Gay, Gilman, & Sugiyama, 2000; Iñiguez-Ariza & Clarke, 2015) A síntese da matriz óssea ocorre em duas fases principais:

i) deposição da matriz orgânica, constituída essencialmente por colagénio tipo I, proteínas não colagenosas e proteoglicanos – osteóide;
ii) mineralização do osteóide, cujo processo não está bem esclarecido, mas no qual se sabe que ocorre formação de cristais de hidroxipatite que são libertados para a matriz, preenchendo os espaços entre as fibrilas de colagénio existentes. (Capulli et al., 2014; Gay et al., 2000)

A diferenciação destas células é regulada de forma parácrina, endócrina e autócrina, e envolve vários genes e vias de sinalização. (Liou et al., 2015) Os OBs secretam factores autócrinos e parácrinos que regulam a osteoclastogénese e a osteogénese, entre esses encontram-se: M-CSF (*monocyte-colony stimulation factor*), RANKL (*receptor activator of nuclear factor-κB ligand),* OPG (osteoprotegerina), IGF (*insuline-like growth factor*), TGF-β (fator de transformação de crescimento beta), PDGF (*platelet derived growht factor*), BMP (*bone morphogenic protein*). (Capulli et al., 2014; Gay et al., 2000; Marquez-Curtis, Janowska-Wieczorek, McGann, & Elliott, 2015)

Vários estudos apontam que a via de sinalização mais relevante para a diferenciação dos OBs e síntese de matriz óssea pelos mesmos é a via Wnt/β-catenina, que culmina com a transcrição do gene Runx2/Cbfa1. (Swales & Sabokbar, 2014) Runx2 é considerado o principal fator de transcrição específico dos OBs, importante para a regulação da expressão de genes que caracterizam o fenótipo destas células, como a osteocalcina, osteopontina, colagénio tipo I, fosfatase alcalina (ALP) e sialoproteína óssea. (Caetano-Lopes et al., 2007; J. Y. Kim et al., 2014; Rahman, Akhtar, Jamil, Banik, & Asaduzzaman, 2015; Swales & Sabokbar, 2014; Thirunavukkarasu et al., 2000; Walsh et al., 2009)

A via Wnt/β-catenina estimula a diferenciação e sobrevivência da linhagem osteoblástica a partir de osteoprogenitores mesenquimais, a formação óssea por OB maduros ativados, e ainda regula a comunicação entre OBs e OCs. (Monroe, McGee-Lawrence, Oursler, & Westendorf, 2012) A interação entre β-catenina e proteínas de factores de células T (TCF)/ fator promotor de linfócitos (LEC), induzida pela ativação desta via, regula a transcrição de OPG e outros genes, que inibem a osteoclastogénese. (Matsuo & Irie, 2008)

O controlo da reabsorção óssea que é exercido nos OCs deve-se maioritariamente à expressão de RANKL pelos OBs que liga ao seu receptor RANK expresso na superfície dos percursores osteoclásticos (pré-OCs), promovendo a osteoclastogénese. No entanto, a expressão da citocina OPG pelos OBs também atua inibindo a osteoclastogénese, por ligar a RANKL nos OBs, impedindo a sua ligação a RANK (*receptor activator of nuclear factor-κB*) nos pré-OCs. (Capulli et al., 2014; Sims & Vrahnas, 2014) Ambas as citocinas, produzidas por células da linhagem osteoblástica regulam a diferenciação de pré-OCs, em resposta a estímulos parácrinos e endócrinos, hormona da paratiróide (PTH), 1,25 vitamina D3. (Sims & Vrahnas, 2014)

2.1.1.2. Osteoclastos

Os OCs derivam de percursores hematopoiéticos da MO, e são as únicas células especializadas no corpo humano com capacidade de promover a reabsorção óssea. (Eeles et al., 2015; Guan et al., 2015; Li et al., 2014; Søe, Hobolt-Pedersen, & Delaisse, 2015; Thummuri et al., 2015; Yavropoulou & Yovos, 2008)

Os OCs maduros, com atividade de reabsorção óssea, são células multinucleadas

formadas pela fusão de percursores mononucleares da linhagem monócito-macrófago, que ocorre na fase terminal de diferenciação dos seus percursores durante a osteoclastogénese. (Hayashi et al., 2010; Ishii & Kikuta, 2013; Kleinhans, Schmid, Schmid, & Kluger, 2015; H. Nakamura et al., 2014; Yavropoulou & Yovos, 2008) Por serem células multinucleadas, foi proposto que o número de núcleos presentes num OC e a sua atividade estão relacionados. (J. Huang et al., 2015; Søe et al., 2015)

Para que ocorra diferenciação de pré-OCs em OCs maduros são essenciais duas citocinas, M-CSF e RANKL, entre outras moléculas como por exemplo, IL-1 (interleucina-1) e TNF-α (fator de necrose tumoral alfa). (Charles & Aliprantis, 2014; Ishii & Kikuta, 2013; S. Y. Park et al., 2015; Swales & Sabokbar, 2014) Após a diferenciação, os OCs maduros adquirem uma configuração estrutural característica designada por *"ruffled membrane"* (RB) que é formada por invaginações da membrana plasmática da célula, e que está em contacto direto com a matriz óssea. A zona onde o OC exerce a reabsorção óssea encontra-se isolada pela "*sealing zone*", que corresponde ao local onde o OC liga à superfície do osso através de integrinas, originando um compartimento fechado onde ocorre a reabsorção óssea, designado por lacuna de reabsorção. (Charles & Aliprantis, 2014; Hadjidakis & Androulakis, 2006; Shen et al., 2011). Através das projeções membranares da RB, os OCs polarizados secretam iões de hidrogénio e enzimas proteolíticas, como a catepsina-K (CATK), fosfatase alcalina tártaro-resistente (TRAP) e metaloproteinases da matriz (MMPs), que atuam promovendo a reabsorção da matriz, que se torna desmineralizada como consequência da acidificação e proteólise dos seus componentes orgânicos e inorgânicos. (Charles & Aliprantis, 2014; Choe et al., 2015; García-Martínez et al., 2015; Hadjidakis & Androulakis, 2006; Ishii & Kikuta, 2013; Kleinhans et al., 2015; Y. Lee et al., 2013; C. K. Park et al., 2014)

Uma vez que os OCs são as únicas células que promovem a degradação do osso, estão envolvidos em várias condições patológicas ósseas, nas quais ocorrem alterações na composição e estrutura óssea, sendo o principal desequilíbrio causado por uma desregulação da osteoclastogénese. (Charles & Aliprantis, 2014; Choe et al., 2015; Guan et al., 2015; Omata et al., 2015; Shen et al., 2011)

2.1.1.3. Osteoclastogénese

Os pré-OCs diferenciam-se em OCs maduros na presença de RANKL e M-CSF, que são duas citocinas fundamentais cujo papel é regular a osteoclastogénese, controlando a formação de OCs. (Eeles et al., 2015; Gu et al., 2015; Guan et al., 2015; Hayashi et al., 2010; H. Nakamura et al., 2014; C. K. Park et al., 2014; A. Singh, Mehdi, Srivastava, & Verma, 2012; Sánchez-Duffhues, Hiepen, Knaus, & Ten Dijke, 2015) O processo de formação de células osteoclásticas é designado por osteoclastogénese e é controlado de forma rigorosa por células mesenquimais, como OBs, pré-OBs, osteócitos, e células do estroma da MO, que produzem as citocinas que regulam o processo. (Hayashi et al., 2010; Ishii & Kikuta, 2013; J. Y. Kim et al., 2014; Lynch & Fischbach, 2014; Shen et al., 2011) M-CSF é produzido como resposta a níveis elevados da PTH e de moléculas inflamatórias como TNF- α e IL-1, que ligam aos seus receptores presentes nos OBs e células do estroma, estimulando a sua expressão, e é uma molécula essencial para a sobrevivência e proliferação dos OCs. (Chung et al., 2014; Hayashi et al., 2010; J. Y. Kim et al., 2014; Maxhimer et al., 2015) RANKL é uma citocina, membro da família TNF (fatores de necrose tumoral), que é expressa pelos OBs e os seus percursores, sendo crucial para a diferenciação de pré-OC em OC mononucleares TRAP-positivos com consequente fusão citoplasmática, e ainda para sobrevivência das células multinucleadas resultantes. (Deng et al., 2015; J. Y. Kim et al., 2014; Maxhimer et al., 2015; O'Brien et al., 2013; S. Y. Park et al., 2015) Assim, a formação de OCs é regulada por células da linhagem osteoblástica, ainda que outros tipos celulares também possam modular o processo. (Kotake & Nanke, 2014)

A interação entre RANKL e RANK promove a ativação do factor 6 associado ao receptor TNF (TRAF6), que por sua vez induz várias vias de sinalização, entre as quais estão: a via do factor nuclear-κB (NF-κB) e as vias MAPK: p38, ERK e JNK. (Callaway et al., 2015; Kobayashi et al., 2015; C. C. Lee et al., 2015; Valerio et al., 2014) Foi descoberto que a sinalização RANKL está associada à expressão de genes associados a OCs como *NFATc1*, *c-fos*, TRAP, CATK, MMP-9, entre outros, estabelecendo que esta ligação é fundamental para o processo de osteoclastogénese. (Gu et al., 2015; C. C. Lee et al., 2015; Thummuri et al., 2015; Valerio et al., 2014; Yuan et al., 2015)

Está descrito que os factores que estimulam a reabsorção óssea (hormonas, citocinas, e factores de crescimento como PTH, estrogénio, 1,25-dihidroxivitamina D3, e

interleucina-6 (IL-6)) também controlam a diferenciação dos percursores de OCs a células maduras, muitas vezes através da regulação da expressão de M-CSF, RANKL e OPG por células da linhagem osteoblástica. (Ishii & Kikuta, 2013; Kobayashi et al., 2015)

OPG é um inibidor da atuação de RANKL, pertencente à família TNF, que se liga a RANKL, prevenindo a ativação de RANK expresso nos OCs, bloqueando desta forma a diferenciação e atividade destas células. (Choe et al., 2015; Maxhimer et al., 2015) Esta ligação entre a OPG e RANKL já demonstrou, *in vivo* e *in vitro*, suprimir a reabsorção óssea por impedir a formação de OCs. (Choe et al., 2015; Maxhimer et al., 2015) Assim, o sistema RANK/RANKL/OPG tem grande importância na manutenção da homeostasia do osso. (Guan et al., 2015; O'Brien et al., 2013; Vrtačnik, Marc, & Ostanek, 2014)

2.1.1.4. Osteócitos

São células que se diferenciam dos OBs, correspondendo à maioria da população das células ósseas. (Rachner, Khosla, & Hofbauer, 2011) Durante a síntese do osso, alguns OBs maduros atingem a sua diferenciação terminal ao ficarem absorvidos na matriz recém formada – osteóide. Após a mineralização da matriz essas células são denominadas de osteócitos, e formam uma rede de comunicações celulares interligada, por processos dendríticos, que se estende até às células que estão à superfície do osso tornando possível a comunicação destas células com outros osteócitos, OBs e "*bone lining cells*", e ainda com os capilares sanguíneos. (Jahani, Genever, Patton, Ahwal, & Fagan, 2012; Maxhimer et al., 2015; Rachner et al., 2011; Raggatt & Partridge, 2010; Sapir-Koren & Livshits, 2014)

Estudos suportam a informação de que os osteócitos dão início e coordenam o processo de remodelação óssea e, consequente reparo do osso danificado, por serem células capazes de sentir os estímulos criados pelo stress mecânico e lesão dos ossos. (Maxhimer et al., 2015; Raggatt & Partridge, 2010) Para além disso, estas células são fonte de RANKL e esclerostina (SOST) – antagonista da via Wnt –, o que sugere que podem ser responsáveis pelo equilíbrio necessário entre a reabsorção e a síntese do osso, no processo de remodelação óssea. (Maxhimer et al., 2015)

2.2.Remodelação Óssea

O processo de remodelação óssea visa manter a integridade do osso (forma, tamanho, estrutura) e a homeostasia mineral deste tecido. (Belinha, Jorge, & Dinis, 2013; Chim et al., 2013; Iñiguez-Ariza & Clarke, 2015; Kular et al., 2012)

É um processo que decorre de forma contínua ao longo da vida do organismo humano, sendo estritamente controlado para que não ocorram desequilíbrios que afetem a integridade do tecido ósseo e a sua homeostasia mineral, de forma a manter este órgão saudável. (Kular et al., 2012)

O processo é desencadeado por vários estímulos, que podem ser mecânicos (tensões exercidas no osso) e endócrinos (como o aumento dos níveis de PTH devido à diminuição dos níveis de cálcio no plasma, o que induz o aumento da ativação do OCs). (Kular et al., 2012)

A remodelação óssea dá-se pela ação conjunta de várias células, que comunicam entre si e se encontram numa estrutura temporária, designada por Unidade Básica Multicelular (BMU, "*Basic Multicellular Unit*"), representada na Figura VII, que lhes proporciona o microambiente ideal para atuarem, e que se localiza à superfície do osso, no local de remodelação. (Belinha et al., 2013; Jerez & Chen, 2015; Kular et al., 2012; Lynch & Fischbach, 2014; Raggatt & Partridge, 2010)

Na BMU os tipos de células mais relevantes que estão presentes são os OCs, OBs, osteócitos e "*bone lining cells*", sendo que os capilares sanguíneos também são parte integrante desta estrutura e facilitam o processo de remodelação ao fornecer ao local de regeneração óssea as células percursoras de OCs e OBs, nutrientes, fatores de transcrição e diferenciação, e hormonas. (Chim et al., 2013; Kular et al., 2012; Lynch & Fischbach, 2014; Raggatt & Partridge, 2010)

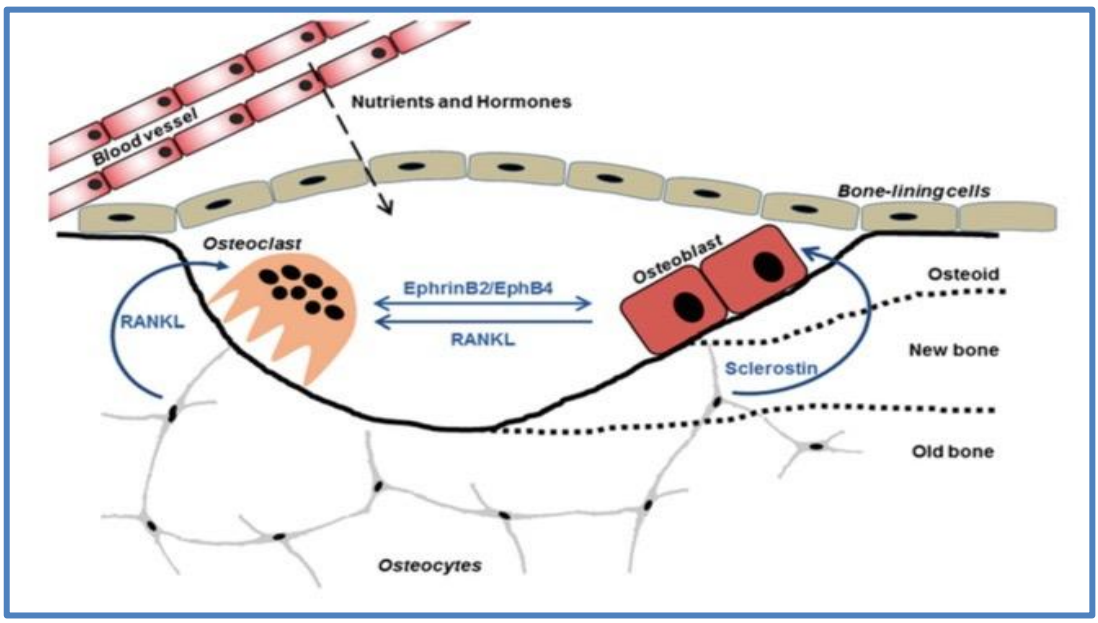


Figura VII: Unidade Básica Multicelular. De 2012, Kular J., et al.; *Clinical Biochemistry* (Kular et al., 2012)

O processo metabólico de remodelação do osso é bastante complexo dada a ação multicelular que ocorre e, consequentemente, todas as moléculas e vias de sinalização envolvidas. O objectivo principal centra-se em manter a função normal do osso, regenerando o osso já existente através da síntese de nova matriz óssea, sendo imprescindível manter o equilíbrio entre a reabsorção e formação do osso. (Belinha et al., 2013; Iñiguez-Ariza & Clarke, 2015; Kular et al., 2012; Pollock, 2015)

De forma sintetizada, pode-se descrever o ciclo de remodelação óssea em cinco fases distintas que são equilibradas através do controlo e comunicação entre as células envolvidas (Figura VIII). Essas fases são as seguintes:

1. Fase de ativação: nesta fase de iniciação há detecção de um sinal fisiológico de remodelação (mecânico ou endócrino, como referido anteriormente). Assume-se que os osteócitos têm capacidade de "sentir" as alterações que o osso sofre, e desencadear sinais biológicos que induzem a remodelação óssea, por recrutamento de células da linhagem hematopoiética macrófago/monócito da circulação sanguínea para o local de reabsorção. Quando a matriz óssea é danificada (estímulo mecânico) os osteócitos sofrem apoptose, levando a uma diminuição dos níveis de TGF-β, pois estas células já não o podem secretar, estimulando a osteoclastogénese. Quando os níveis de cálcio plasmático estão diminuídos, ocorre secreção de PTH pela glândula da tiroide (estímulo

endócrino), que vai atuar nos rins e osso de forma a aumentar os níveis de cálcio. No osso, a PTH liga-se aos seus receptores expressos na superfície dos OBs induzindo respostas celulares que modulam a secreção de moléculas que recrutam percursores osteoclásticos, promovendo assim a osteoclastogénese.

2. Fase de reabsorção: em resposta aos sinais produzidos pelos osteócitos e PTH, ocorre recrutamento de percursores osteoclásticos para o local de remodelação com posterior diferenciação e ativação – osteoclastogénese. Os OBs expressam citocinas como M-CSF e RANKL para estimular a osteoclastogénese e reabsorção óssea. Também secretam MMPs que degradam a matriz mineralizada, expondo integrinas à sua superfície para que os OCs adiram e, por sua vez, criem a "*sealing zone*" para a qual libertam iões de hidrogénio acidificando o microambiente gerado, promovendo a dissolução da matriz mineralizada, sendo que a restante matriz orgânica é degradada por enzimas líticas, como a CATK, e por ação do baixo pH.
3. Fase reversa: há produção de sinais que permitem a transição da fase de reabsorção para a fase de formação óssea, entre estes destacam-se: TGF-β, IGFs, BMPs, PDGFs, e FGFs (*fibroblast growth factor*). Esta transição não está bem esclarecida e continua a ser estudada.
4. Fase de formação: propõe-se que a esfingosina-1-fosfato (SP-1) expressa pelos OCs induz o recrutamento e sobrevivência dos OBs maduros. A sinalização EphrinB4/EphrinB2 promove a diferenciação osteogénica ao inibir a cascata osteoclastogénica c-Fos/NFATc1. Ainda, os estímulos mecânicos e endócrinos exercidos no osso podem promover a formação óssea através de osteócitos, que expressam SOST (molécula que liga a LRP5/6 prevenindo a ativação da via Wnt, inibindo formação óssea). Danos nos osteócitos ativam esta via e ocorre a diferenciação das células mesenquimais no local de reabsorção, com secreção de moléculas que promovem a síntese óssea.
5. Fase de terminação: no momento em que a quantidade de osso destruído é equivalente à quantidade de osso regenerado o ciclo de remodelação cessa. Pensa-se que, mais uma vez, os osteócitos são as células responsáveis pela sinalização que leva à finalização deste ciclo, pois alguns OBs que ficam retidos na matriz recém formada diferenciam-se em osteócitos, que vão aumentar os níveis de SOST e assim inibir a osteoclastogénese, e consequentemente a osteogénese. Após a mineralização da matriz, grande parte dos OBs sofre

apoptose, outros ficam envolvidos na matriz – osteócitos –, e alguns revertem o seu fenótipo para "*bone lining cells*", que são OBs inativos presentes na superfície do osso e têm capacidade de se diferenciar novamente em OBs após detetarem algum tipo de sinal para iniciar a remodelação óssea. (Charles & Aliprantis, 2014; J. Chen & Long, 2013; Iñiguez-Ariza & Clarke, 2015; Kular et al., 2012; Lynch & Fischbach, 2014; Raggatt & Partridge, 2010; Swales & Sabokbar, 2014; Wongdee, Riengrojpitak, Krishnamra, & Charoenphandhu, 2010)

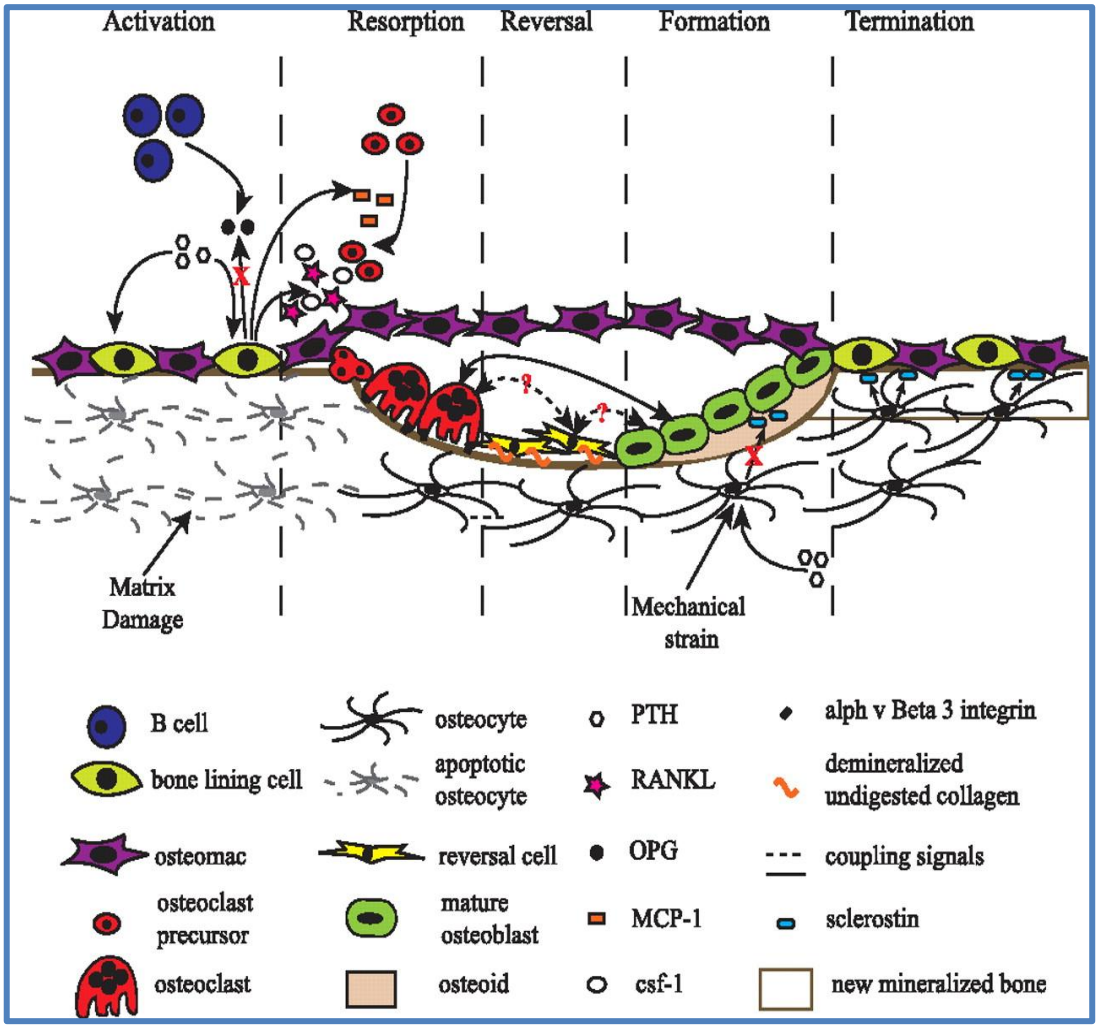


Figura VIII: Remodelação óssea. De 2010, Raggatt L. J. , Partridge N. C.; *The Journal of Biological Chemistry* (Raggatt & Partridge, 2010)

CAPÍTULO III – Ácido Valpróico

3. Ácido Valpróico

O VPA é um fármaco muito usado em patologias neurológicas. (Grote & Chen, 2014; Jeong, Ohn, Kim, & Cho, 2013) A sua principal aplicação como fármaco, relaciona-se com o facto de ser classificado como um anti-epilético e anti-convulsionante. (Duenas-Gonzalez et al., 2008; Grote & Chen, 2014; Kumamaru, Egashira, Takenaka, & Takamori, 2014; Nanau & Neuman, 2013; Weller, 2013) Tem algumas contraindicações e vários efeitos secundários identificados, com diferentes graus de gravidade, tais como: aumento de peso, perda de cabelo, fadiga, tremores, náuseas, entre outros, que resultam da toxicidade deste fármaco em vários órgãos. (Belcastro, D'Egidio, Striano, & Verrotti, 2013; Kumamaru et al., 2014; Nanau & Neuman, 2013) Alguns estudos indicam que o VPA pode ter efeito inibitório na diferenciação dos OBs no osso, reduzindo a densidade mineral e massa óssea, causando destruição do osso. (Markoula et al., 2015; Mazziotti, Canalis, & Giustina, 2010; Nanau & Neuman, 2013; Y. Zhang, Zheng, Zhu, Zhang, & Zheng, 2015) Através de estudos realizados *in vivo* e *in vitro*, pensa-se que a redução da densidade mineral óssea (BMD, "*bone mineral density*") verificada em grupos tratados com VPA comparados com grupos controlo (que não recebem tratamento), se deve ao facto deste fármaco sobre-regular a ativação de OCs, levando a um desequilíbrio entre a formação e reabsorção óssea, contribuindo assim para uma maior perda de osso. (Elwakkad, El Elshamy, & Sibaii, 2008; Nanau & Neuman, 2013; Serin, Koç, Temelli, & Esen, 2015)

Este fármaco foi sintetizado pela primeira vez em 1882 por Burton, mas só em 1963, Pierre Eymard descobriu o potencial anti-epilético do VPA. (Belcastro et al., 2013; Duenas-Gonzalez et al., 2008; Zheng et al., 2014) No intervalo de tempo entre a sua síntese e a descoberta do seu potencial como fármaco, o VPA era utilizado como solvente. (Belcastro et al., 2013)

O VPA é um fármaco anti-convulsionante e tem sido muito estudado devido ao papel neuroprotetor que tem demostrado. (S. Chen, Wu, Klebe, Hong, & Zhang, 2014; Kumamaru et al., 2014) Este efeito protetor deve-se às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-apoptóticas e neurotróficas. (Arbez, Lamarthée, Gaugler, & Saas, 2014; S. Chen et al., 2014; Jin et al., 2014) A sua eficácia já foi demonstrada em estudos *in vivo* e *in vitro*. (Chang, Walker, & Williams, 2014; S. Chen et al., 2014) O

VPA também está identificado por inibir histonas desacetilases (HDAC). (Jeong et al., 2013; Jin et al., 2014; Nanau & Neuman, 2013; Paradis & Hales, 2013; Wang et al., 2013; Ximenes et al., 2013)

Estudos realizados em modelos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que o VPA tem efeito anti-tumoral por exercer efeitos em várias vias de sinalização envolvidas nos processos de apoptose, diferenciação celular, angiogénese, entre outros. (S. Chen et al., 2014; Duenas-Gonzalez et al., 2008; Frikeche et al., 2012) Devido às suas propriedades, este fármaco tem capacidade de atenuar o desenvolvimento do tumor, como já foi demonstrado em vários tipos de cancro, incluído tumores no osso, melhorando o prognóstico dos pacientes. (Kapoor, 2013; Kerkhof et al., 2013; Wang et al., 2013; Weller, 2013)

Como o VPA é pouco solúvel em água, mas é altamente solúvel em solventes orgânicos, e é líquido à temperatura ambiente, torna-se um bom composto para ser utilizado como um IFA, pois estas propriedades fornecem-lhe capacidade de ser facilmente fornecido às células e organismo. (Kostrouchová & Kostrouch, 2007) Ainda, possibilita várias alternativas de alterações da sua estrutura química tornando-o um composto ótimo para usar como LI-IFA e assim ser testado como potencial ferramenta farmacológica em diferentes contextos. (Kapoor, 2013; Kostrouchová & Kostrouch, 2007; Wang et al., 2013)

CAPÍTULO IV – Estudo antimicrobiano

4. Introdução

Como já foi referido, LIs são sais orgânicos. Os catiões acoplados com o anião valproato têm vindo a ser estudados. Estes catiões têm vindo a ser acoplados com antibióticos β-lactâmicos e testados em bactérias Gram-Negativas e Gram-Positivas, incluído algumas resistentes. (Ferraz et al., 2012; Ferraz et al., 2014) Com este trabalho pretende-se comparar se os resultados obtidos para os catiões (com o anião halogeneto) e bactérias é o mesmo que o obtido usando os catiões associados ao anião como IFA. Este estudo em bactérias também permite avaliar a sua toxicidade para posterior aplicação a nível comercial e industrial.

4.1.Objetivos

O presente trabalho de investigação foi elaborado com a finalidade de avaliar o efeito antimicrobiano, em estirpes bacterianas, dos catiões mais comuns em LIs acoplados com aniões farmacêuticos.

Neste estudo antimicrobiano avaliou-se uma série de catiões halogenados (vendidos comercialmente) usando um IFA como anião.

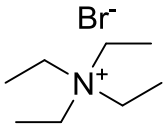
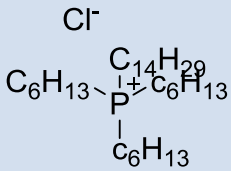
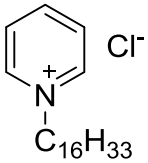
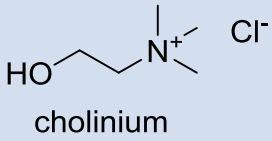
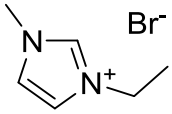
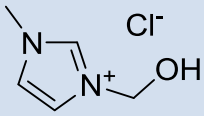
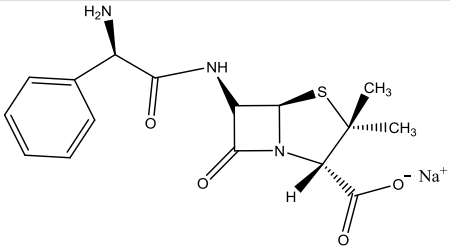
4.2.Materiais e métodos

4.2.1.1. Preparação dos compostos

Todos os reagentes químicos utilizados no decorrer do trabalho laboratorial foram obtidos comercialmente, com exceção dos LI's analisados. Os LI's foram produzidos e purificados por Ricardo Ferraz no Departamento de Química, Requimte – Centro de Química Fina e Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, segundo o método descrito em Ferraz *et al*.. (Ferraz et al., 2012)

Os LI's utilizados são compostos por aniões de bromo e cloreto, e uma série de catiões halogenados. Os compostos analisados neste estudo estão descritos na Tabela I.

Tabela I: Compostos utilizados.

[TEA][Br]		Brometo de Tetraetil-amónio
[$P_{6,6,6,14}$][Cl]		Cloreto de Triexil-tetradecil-fosfónio
[C_{16}Pyr][Cl]		Cloreto de Cetilpiridínio
[Colina][Cl]		Cloreto de Colina
[EMIM][Br]		Brometo de Etil-metil-imidazólio
[C_2OHMIM][Cl]		Cloreto de Hidroxietil-metil-imidazólio
[Na][Amp]		Ampicilina de Sódio

4.2.1.2. Método das diluições sucessivas

Todos os compostos, no intervalo de concentrações preparadas, foram filtrados previamente à sua utilização nos ensaios. O volume das diluições preparadas foi de 1mL. Para perfazer o volume de cada diluição usou-se água destilada (autoclavada) pois, todos os compostos são solúveis em água, excepto o composto [$P_{6,6,6,14}$][Cl] cujo volume se perfez com Dimetil Sulfóxido (DMSO). (Ferraz et al., 2012)

No decorrer do estudo antimicrobiano com os compostos referidos, a concentração mais

elevada usada para os mesmos foi de 5mM, sendo que a menor concentração corresponde a 0,0005mM.

4.2.1.3. Cultura de bactérias

As estirpes bacterianas usadas foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Staphylococus aureus MRSA* (ATCC 43300) – bactérias Gram-Positivas –, *Escherichia coli* (ATCC 25933), *Escherichia coli* (TEM 209), *Escherichia coli* (TEM 180), *Escherichia coli* (ART B 192) – bactérias Gram-Negativas. Todas as estirpes em estudo foram armazenadas à temperatura de -80°C, sendo cultivadas no meio de cultura "*Tryptone Soy Agar*" (TSA) – HIMEDIA, e incubadas a 37°C durante 24h, antes de se efetuar cada teste, obtendo-se culturas puras das bactérias em meio TSA. As colónias no meio de cultura foram usadas para preparar a suspensão microbiana a usar nos ensaios, que foi preparada em meio de cultura líquido, o "*Tryptone Soy Broth*" (TSB) - Cultimed. Ambos os meios de cultura foram utilizados para manutenção e desenvolvimento de bactérias. A sua preparação é idêntica, adicionando-se determinada massa do meio (em pó) a determinado volume de água destilada, consoante o volume final que se pretende preparar de meio de cultura. Depois do meio estar preparado, este é autoclavado a 121°C durante 15 minutos. De seguida, o meio TSB foi distribuído em tubos de teste (± 5 mL/tubo) para crescimento, ou distribuído em microplacas de 96 poços para as microdiluições dos testes de susceptibilidade (Dymond, 2013). O meio TSA foi distribuído por placas para posteriormente se cultivarem as estirpes.

4.2.1.4. Determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

Os valores MIC foram determinados em triplicado (n=3) pelo Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana – método de microdiluição, de acordo com as orientações do "*Clinical Laboratory Standard Institute*", em microplacas de 96 poços, uma microplaca para cada estirpe estudada. Antes da determinação das MIC, as bactérias foram incubadas durante 24h, em meio TSA. Cada poço da microplaca foi inoculado com o meio de cultura TSB, o composto a avaliar, a ampicilina sódio e a suspensão bacteriana, para um volume final por poço de 200µL. Por cada placa usada fez-se um controlo negativo apenas com o meio de cultura TSB. Para preparar a suspensão microbiana ajustou-se a densidade do inóculo em TSB para o valor de 0,08 – 0,1 na escala de McFarland, por leituras espectrofotométricas a 640nm, o que corresponde ao padrão 0,5 da escala de

McFarland. Cada poço continha entre 5000 a 25000 UFC/mL, que são expostas aos diversos compostos numa gama de concentrações de 0,005mM a 5mM. A MIC para cada composto corresponde à menor concentração que não apresenta turbidez, após 24 horas de incubação das placas inoculadas, a 37ºC. No caso de não se obter MIC's nos compostos com as concentrações avaliadas, é necessário aumentar a concentração dos mesmos. (Ferraz et al., 2014)

4.2.1.5. Determinação das Curvas de Crescimento

As curvas de crescimento dos microrganismos na presença dos LIs-IFA que manifestaram atividade biológica foram obtidas, através de leituras sucessivas (a tempos determinados) da absorvância a 625nm no leitor de microplacas (Thermo Scientific Multiskan FC). (Ferraz et al., 2014) O método utilizado foi o mesmo que para a determinação das MIC, mas foram efetuadas 6 réplicas para cada teste (n=6).

4.3.Resultados

4.3.1. Resultados obtidos para as MICs

Na Tabela II estão representados os resultados obtidos após a determinação das MICs nas diferentes estirpes bacterianas estudadas. Em algumas bactérias não foi possível determinar a MIC para os compostos utilizados na cultura.

Tabela II: Resultados obtidos para as MIC's nas diferentes estirpes

	[TEA][Br]	[$P_{6,6,6,14}$][Cl]	[C_{16}Pyr][Cl]	[Colina][Cl]	[EMIM][Br]	[C_2OHMIM][Cl]	[Na][Amp]
***Staphylococcus aureus* (ATCC 25923)**	0,05mM	0,05mM	0,05mM	0,05mM	0,5mM	0,05mM	0,5mM
***Staphylococcus aureus* MRSA (ATCC 43300)**	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM	0,5mM
***Escherichia coli* (ATCC 25922)**	0,05mM	0,05mM	0,05mM	0,05mM	0,05mM	0,05mM	**>5mM**
***Escherichia coli* TEM 209**	**>5mM**	**>5mM**	0,05mM	**>5mM**	**>5mM**	**>5mM**	**>5mM**
***Escherichia coli* TEM 180**	**>5mM**	**>5mM**	0,05mM	**>5mM**	**>5mM**	**>5mM**	**>5mM**
***Escherichia coli* ART B 192**	1mM	0,5mM	0,5mM	**>5mM**	**>5mM**	**>5mM**	**>5mM**

4.3.2. Determinação das curvas de crescimento

Na segunda fase do estudo foi determinado as taxas de crescimento das bactérias na presença de composto com uma concentração abaixo de MIC. Estes valores permitem avaliar se o composto afeta o crescimento bacteriano

A título de exemplo apenas apresentamos o gráfico de crescimento para a bactéria *S. aureus* na presença do composto [TEA][Br] – Figura IX. Todos os outros compostos foram obtidos de maneira semelhante.

Tabela III - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [TEA][Br]

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,05	0,0062 ±0,0073	0,0033 ±0,0083
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,0012 ±0,0017
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0003	0,0046 ±0,005
***Escherichia coli* ART B 192**	1	0,0001 ±0,0003	0,0002 ±0,0005

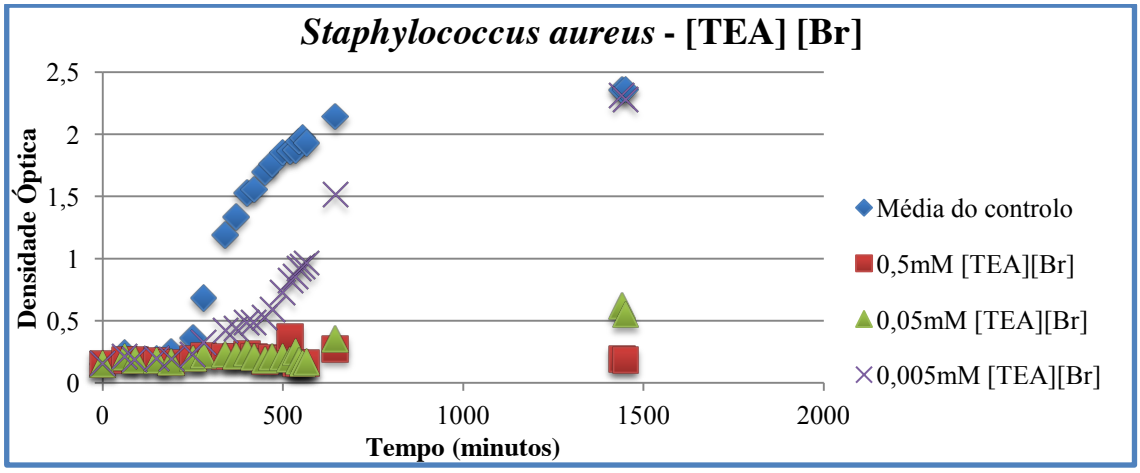


Figura IX: Gráfico de dispersão comparando a taxa de crescimento do *Staphylococcus aureus* entre o controlo, e as concentrações acima de MIC, MIC e abaixo de MIC para o LI [TEA] [Br].

Através das curvas de crescimento bacteriano para o LI [TEA][Br] associado ao IFA Ampicilina de Sódio, é possível verificar em todas as bactérias, excepto no *S. aureus* MRSA, o comportamento verificado é o esperado, isto é, o controlo tem um crescimento exponencial, assim como a bactéria exposta à concentração do LI abaixo de MIC (0,5mM), sendo que o efeito inibitório do crescimento bacteriano na concentração acima de MIC é maior que na MIC. Através da análise das curvas de crescimento pode-se afirmar que a estirpe resistente estudada, *E. Coli* ART B 192 é a que apresenta valores de Densidade Óptica (DO) mais elevados, devido ao facto de necessitar de concentrações mais elevadas dos compostos para o seu comportamento ser inibido.

Tabela IV - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o $[P_{6,6,6,14}][Cl]$

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,05	0,0062 ±0,0073	0,0005 ±0,0001
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,0011 ±0,0017
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0053	0,0048 ±0,0058
***Escherichia coli* ART B 192**	0,5	0,0001 ±0,0003	0,0001 ±0,0005

Através das curvas de crescimento bacteriano para o LI $[P_{6,6,6,14}][Cl]$ associado ao IFA Ampicilina de Sódio, é possível verificar em todas as bactérias ocorre inibição do crescimento bacteriano por parte do LI-IFA testado quando comparado com o controlo de cada cultura, apesar das taxas de crescimento variarem entre as estirpes que apresentaram MIC para este composto. No caso particular da estirpe multiresistente avaliada, a *E. Coli* ART B 192, verifica-se que no controlo esta bactéria não cresceu exponencialmente durante o período de teste, sendo que no final do período de incubação é que ela começa a crescer. Isto indica que esta estirpe deveria ter um período de incubação mais longo, para que se pudessem fazer as comparações necessárias.

Tabela V - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [C_{16}Pyr][Cl]

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,05	0,0062 ±0,0073	0,0004 ±0,0008
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,001 ±0,0019
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0053	0,0045 ±0,005
***Escherichia coli* TEM 180**	0,05	0,0102 ±0,9974	0,0064 ±0,0082
***Escherichia coli* TEM 209**	0,05	0,0032 ±0,0036	0,003 ±0,0037
***Escherichia coli* ART B 192**	0,5	0,0001 ±0,0003	0,0001 ±0,0005

O LI [C_{16}Pyr][Cl] associado à Ampicilina de Sódio, foi o único composto que apresentou atividade biológica para todas as estirpes bacterianas avaliadas. Todas as bactérias apresentam um crescimento bacteriano exponencial para o controlo, a taxas de crescimento diferentes, expecto a estirpe multirresistente *E. coli* ART B 192.

Tabela VI - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [Colina] [Cl]

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,05	0,0062 ±0,0073	0,0042 ±0,0062
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,0031 ±0,0044
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0053	0,0051 ±0,0058

O LI [Colina] [Cl] associado à Ampicilina de Sódio em cultura bacteriana, no intervalo de concentrações testado no trabalho, apresenta efeito biológico em três estirpes bacterianas. Sendo que o efeito inibidor do crescimento bacteriano é mais significativo para a *S. auerus* e *E. Coli*, pois apresentam uma menor taxa de crescimento ao longo do período de incubação.

Tabela VII- Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [EMIM] [Br]

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,05	0,0062 ±0,0073	0,0004 ±0,0005
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,0003 ±0,0029
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0053	0,0005 ±0,0009

O LI [EMIM] [Br] associado à Ampicilina de Sódio em cultura bacteriana, no intervalo de concentrações testado no trabalho, demonstra efeito biológico em três estirpes bacterianas. Pela análise dos respectivos gráficos, verifica-se que para *S. aureus* o comportamento da bactéria para concentração abaixo de MIC (0,05mM) não é o esperado, uma vez que a nesta concentração não deveria ocorrer inibição da bactérias.

Tabela VIII- Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para o [C_2OHMIM] [Br]

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,05	0,0062 ±0,0073	0,0036 ±0,0054
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,0004 ±0,0023
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0053	0,0055 ±0,0061

Os resultados para o LI [C_2OHMIM] [Br] associado à Ampicilina de Sódio em cultura bacteriana, no intervalo de concentrações testado é semelhante ao composto anterior, pois também apresenta efeito biológico em três estirpes bacterianas. Analisando os respectivos gráficos, verifica-se que para *E. coli* o comportamento da bactéria para concentração abaixo de MIC (0,05mM) não é o esperado.

Tabela IX - Taxas de crescimentos para cada estirpe bacteriana estudada para [Na][Amp]

Estirpe Bacteriana		**Taxa de Crescimento**	
Gram-Positivas	Concentração Testada (mM)	Sem composto	Com Composto
***Staphylococcus aureus* ATCC 25923**	0,5	0,0062 ±0,0073	0,0006 ±0,0009
***Staphylococcus aureus* MRSA ATCC 43300**	0,5	0,0032 ±0,0051	0,0002 ±0,0029
Gram-Negativas			
***Escherichia coli* ATCC 25922**	0,05	0,0046 ±0,0053	0,0003 ±0,0008
***Escherichia coli* ART B 19**	2	0,0001 ±0,0003	0,0002 ±0,0015

As culturas incubadas apenas com a Ampicilina de Sódio demonstraram atividade biológica em algumas estirpes, nomeadamente as duas estirpes Gram-Positivas, a *E. Coli*, e a estirpe multirresistente, para a qual se verifica a necessidade da bactéria requerer de mais tempo de incubação para se desenvolver e apresentar resultados para poderem ser comparados com as outras estirpes avaliadas.

Os dados obtidos para este composto seguem a mesma tendência dos LI-IFAs avaliados, uma vez que se verifica que ocorre inibição do crescimento bacteriano a uma taxa menor nas estirpes *S. aureus* e *E. Coli*, comparativamente à estirpe de *S. aureu*s MRSA.

4.4.Discussão

Neste estudo pretendia-se avaliar a atividade antimicrobiana do LIs-IFA, sendo que o anião usado foi a Ampicilina de Sódio, em estirpes Gram-Positivas e Gram-Negativas, sendo as últimas as que mais oferecem resistência aos agentes β-lactâmicos. (Vranakis et al., 2014) Após a determinação das MIC para os compostos testados, avaliou-se a taxa de crescimento das estirpes expostas a estes, e se ocorria a inibição do crescimento das bactérias.

De forma geral, todos os compostos testados apresentam atividade antimicrobiana nas estirpes selecionadas. No entanto, verifica-se que as bactérias Gram-Negativas, mais especificamente as estirpes resistentes, apresentam um maior grau de resistência ao LIs-IFA com que se suplementou o meio de cultura, o que está de acordo com os resultados obtidos por Ferraz et al., 2014. (Ferraz et al., 2014) De forma oposta, as bactérias Gram-Positivas são mais susceptíveis ao tratamento com os LIs-IFA usados, no intervalo de

concentrações entre 0,0005mM e 5mM. Sendo que o seu crescimento é inibido por todos os compostos testados, apesar da taxa de crescimento verificada nas culturas de *S. aureus* ser menor, comparando com a taxa de crescimento do *S. aureus* MRSA. Este facto pode ser devido aos mecanismos de resistência desenvolvidos por estas bactérias, mas também pode estar relacionado com a estrutura das bactérias Gram-Negativas ser diferente da das Gram-Positivas, ao apresentar peptidoglicano na constituição da sua parede celular, que ajuda no combate à ação de antibióticos.

O *S. aureus* MRSA está identificado como o principal agente causador de infeções associadas ao ambiente hospitalar, com resistência a agentes antimicrobianos, mas os agentes β-lactâmicos estão entre os recentes fármacos para combater esta estirpe. (Dive et al., 2013) Após análise dos resultados obtidos neste estudo, verifica-se que a estirpe usada é sensível a todos os compostos aos quais foi subtida, para um intervalo de concentrações entre 0,05mM e 0,5mM, e mesmo apresentando uma taxa de crescimento contínua ao longo do período de incubação, os valores de DO não sofrem alterações bruscas, o que indica que os LIs-IFA usados exercem efeito inibitório nesta estirpe.

As estirpes resistentes *E. coli* TEM 209 e *E. coli* TEM 180 demostraram susceptibilidade apenas para o [C_{16}Pyr][Cl], que já é aplicado na indústria farmacêutica, e cujo efeito verificado já foi descrito para várias estirpes no estudo de Ferraz et al., 2024. (Ferraz et al., 2014)

CAPÍTULO V – Estudo da Osteoclastogénese Humana

5. Introdução

Os OCs derivam da linhagem hematopoiética e, por este motivo, para o seu estudo *in vitro*, usou-se células mononucleares do sangue periférico (PBMC) como percursores de OCs.

Para o estudo *in vitro* realizado, avaliou-se a atividade da TRAP que é um marcador enzimático da osteoclastogénese, que é produzido por OCs ativos, ou seja, células multinucleadas. (Y. S. Lee et al., 2010; S. Y. Park et al., 2015) Os anéis de actina são uma estrutura que também está presente quando os OCs estão ativos, polarizados, sendo essenciais na adesão dos OCs à superfície do osso. (Chung et al., 2012)

Com este trabalho, pretende-se verificar de que forma a osteoclastogénese *in vitro* é afetada por diferentes LIs associados a um IFA – valproato. E por fim, avaliar o efeito dos mesmos compostos, usando a concentração mínima na qual se registou influência na resposta celular durante o processo de osteoclastogénese, em culturas de PBMC tratadas com vários inibidores das vias de sinalização que regulam este processo.

5.1.Objetivo do estudo

Este estudo experimental foi elaborado com a finalidade de investigar o efeito de uma série de catiões acoplados a um anião (IFA) – valproato – e, do Ácido Valpróico, na diferenciação e função dos OCs humanos e, também, avaliar a influência das vias de sinalização mais relevantes na osteoclastogénese humana, em resposta a células tratadas com os compostos em estudo.

5.2.Materiais e métodos

5.2.1.1. Isolamento de PBMC

O sangue total utilizado proveio de dadores saudáveis. As PBMC foram isoladas pelo método de gradiente de sedimentação, no qual o sangue foi diluído em Tampão Fosfato-Salino (PBS) (2 parte de PBS : 1 parte de sangue) e aplicado em Ficoll-Paque (GE Healthcare Bio-Sciences), sendo centrifugado a 400g por 30 minutos, obtendo-se as PBMC isoladas, como está representado na Figura X. Após centrifugação as PBMC foram recolhidas e lavadas duas vezes com PBS. Por fim, procedeu-se à sua contagem

no hematocitómetro e as PBMC foram ressuspendidas no meio de cultura a usar para os ensaios da osteoclastogénese. (Costa-Rodrigues, Fernandes, & Fernandes, 2011a, 2011b)

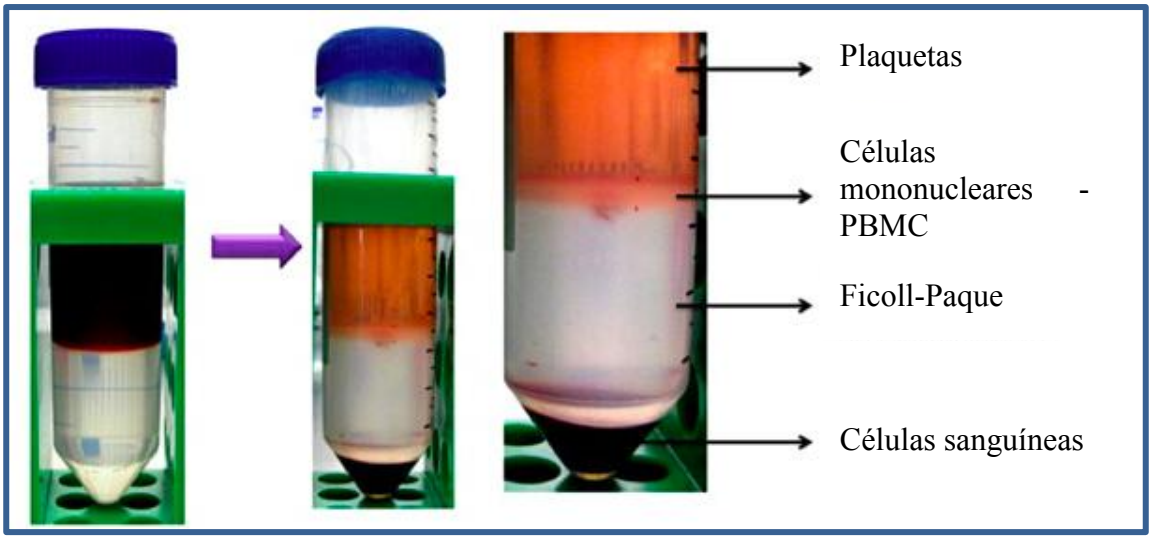


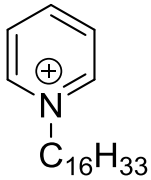
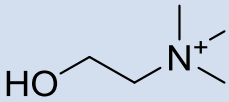
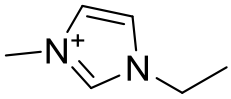
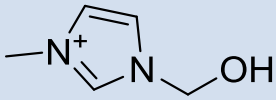
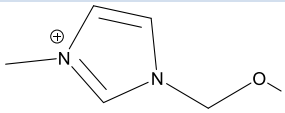
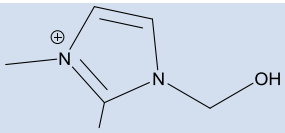
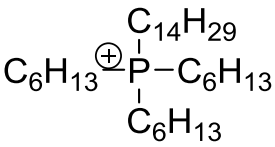
Figura X: Isolamento de PBMC com Ficoll-Paque. Adaptado de Naung, N. Y., et all, 2014, J Oral Biol Craniofac Res (Naung, Suttapreyasri, Kamolmatyakul, & Nuntanaranont, 2014)

5.2.1.2. Culturas de Osteoclastos

A composição do meio de cultura usado foi a seguinte: α-MEM (Gibco) suplementado com 30% soro humano autólogo, 100IU/mL penicilina (Gibco), 2.5ug/mL estreptomicina (Gibco), 2.5ug/mL Amfotericina B (Gibco) e 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich). O meio preparado foi distribuído em placas de cultura de 96 poços, nas quais as células foram semeadas. No dia seguinte, adicionou-se o meio de cultura descrito, sendo suplementado com M-CSF (25ng/mL) e RANKL (40ng/mL), e com os LIs.

Todos os reagentes químicos utilizados no decorrer do trabalho laboratorial foram obtidos comercialmente, com exceção dos LIs analisados. Os LIs foram produzidos e purificados por Ricardo Ferraz no Departamento de Química, Requimte – Centro de Química Fina e Biotecnologia da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, segundo o método descrito em Ferraz *et al*.. (Ferraz et al., 2012) Os catiões utilizados nos LIs-IFA testados nestes ensaios encontram-se descritos na Tabela X e, esquematizados na Figura XI.

Tabela X: Catiões utilizados

[$C_{16}H_{33}$]		Cetilpiridínio
[Colina]		Colina
[EMIM]		Etil-metil-imidazólio
[C_2OHMIM]		2-hidroxi-metil-imidazólio
[C_3OMIM]		2-metoxi-etil-metil-imidazólio
[C_2OHDMIM]		Etil-metil-imidazólio
[$C_{6,6,6,14}$P]		Tri-hexil-tetradecilfosfónio

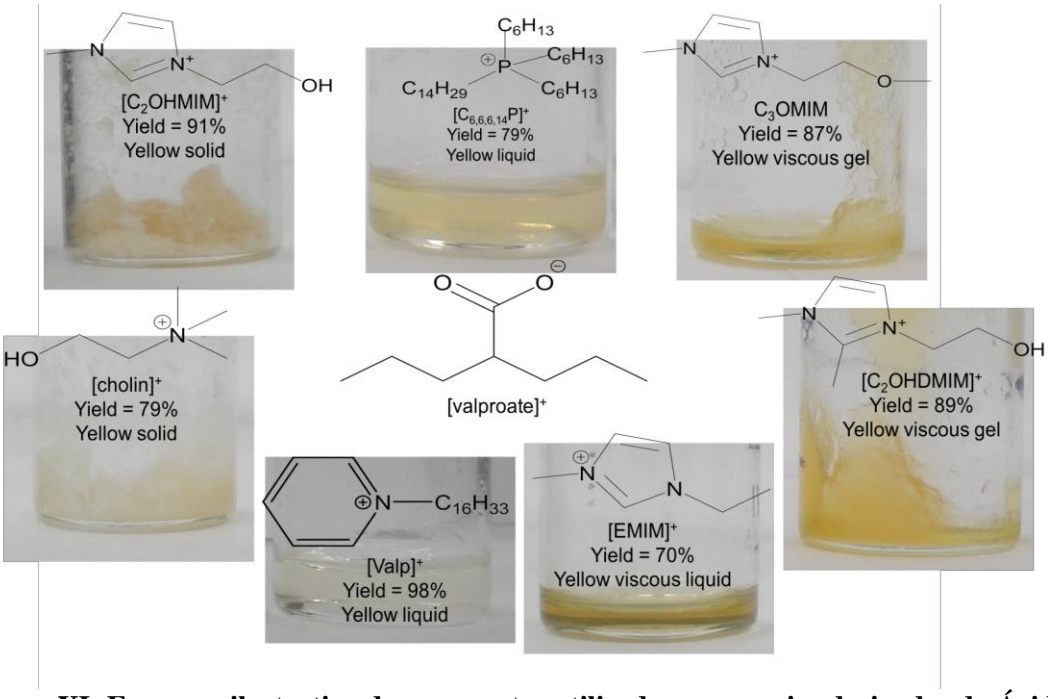


Figura XI: Esquema ilustrativo dos compostos utilizados nos ensaios derivados do Ácido Valpróico

As culturas celulares foram efetuadas com os compostos em diferentes concentrações num intervalo de 10^{-7}M a 10^{-2}M, e foram mantidas a 37°C numa incubadora com atmosfera humidificada com 5% CO_2 durante o período de 21 dias, sendo que o meio de cultura foi renovado uma vez por semana, assim como os compostos utilizados. A amostragem foi retirada aos dias 7, 14 e 21 do ensaio experimental de modo a se proceder à caracterização das culturas celulares através da determinação de vários parâmetros:

i. Quantificação da atividade da TRAP;
ii. Quantificação de células multinucleadas TRAP-positivas;
iii. Quantificação do conteúdo proteico total;
iv. Quantificação da taxa de apoptose;
v. Determinação da presença de anéis de actina.

Na segunda parte desta experiência, as culturas de PBMC foram tratadas com a concentração mínima de cada composto que mostrou interferir com o crescimento das culturas celulares, sendo caracterizadas para:

i. O envolvimento das vias de sinalização mais relevantes para a osteoclastogénese na resposta celular, usando diferentes inibidores, que se encontram descritos na Tabela XI.

As culturas celulares foram mantidas a 37°C numa incubadora com atmosfera humidificada com 5% CO_2 durante o período de 21 dias, sendo que o meio de cultura foi renovado uma vez por semana, assim como os compostos utilizados. As amostras foram tratadas nos dias 7, 14 e 21 da experiência.

Tabela XI: Inibidores avaliados com as concentrações utilizadas, e respectivas vias de sinalização em que interferem.

Inibidores	Via de sinalização inibida	Concentração do inibidor (µM)
U0126	MEK	1
PDTC	NFκB	10
GO6983	PKC	5
SP600125	JNK	10

5.2.1.3. Atividade da TRAP

A atividade da TRAP foi quantificada pelo método de hidrólise do para-nitrofenilfosfato (pNPP) aos dias 7, 14, e 21. As células foram lavadas duas vezes com PBS e solubilizadas com Triton X-100 a 0,1% (V/V), sendo incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos. Seguidamente as células foram incubadas com 22,5mM pNPP (solução preparada em 0,225M de Acetato de Sódio, 0,3375M de Cloreto de Potássio, 0,1% de Tx-100, 22,5mM de Tartarato de Sódio, 0,225mM de Cloreto de Ferro, a pH de 5,8) por 1 hora a 37°C. A reação foi parada ao adicionar NaOH 5M às células, sendo medidas as absorvâncias das amostras a 400nm num leitor de placas ELISA (Synergy HT, Bioteck). Os resultados foram normalizados tendo em conta o conteúdo total de proteína das culturas, sendo expresso como nmol / min / mg $_{proteína}$. (Costa-Rodrigues et al., 2011a, 2011b)

5.2.1.4. Quantificação de células multinucleadas TRAP-positivas

Esta caracterização foi efectuada aos dias 14 e 21 do ensaio. As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com formaldeído 3,7%. Seguidamente, foram lavadas com água desionizada por duas vezes. As células foram contadas recorrendo ao kit "Acid Phosphatase, Leukocyte" (TRAP) (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do fabricante. De forma breve, as células foram incubadas no escuro, com 0,12mg/mL de naftol AS-BI, na presença de 6,76mM de tartarato e 0,14mg/mL Fast Garnet GBC, durante 1 hora a 37°C. Após incubação, as amostras foram lavadas com água destilada e coradas com hematoxilina. Após nova lavagem com água, as células foram visualizadas ao microscópio ótico. As células multinucleadas (com mais de dois núcleos) e positivas para a TRAP presentes em cada condição experimental foram contadas. (Costa-Rodrigues et al., 2011a, 2011b; Eeles et al., 2015)

5.2.1.5. Quantificação do conteúdo proteico

A quantificação do conteúdo proteico total das culturas celulares foi efectuada aos dias 7, 14 e 21 do ensaio, através do método de Bradford. (Bradford, 1976) As células foram lavadas duas vezes com PBS, sendo seguidamente solubilizadas com Hidróxido de Sódio 0,1M e incubadas à temperatura ambiente durante 15 minutos. Após incubação adicionou-se água destilada para diluir as amostras e de seguida adicionou-se o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich), homogeneizando. Após este procedimento, mediu-se as absorvâncias das amostras a 595nm num leitor de placas ELISA (Synergy HT, Biotek).

Os resultados foram expressos em mg/mL. (Costa-Rodrigues et al., 2011a, 2011b)

5.2.1.6. Quantificação da apoptose

A taxa de apoptose foi quantificada através da determinação da atividade da caspase-3, nos dias 14 e 21 dos ensaios. As culturas celulares foram lavadas duas vezes com PBS e avaliadas para a caspase-3 através do kit EnzCheck® caspase-3 (Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante. A fluorescência foi analisada a 496/520nm (excitação/emissão) num leitor de placas de ELISA (Synergy HT, Biotek). Os resultados foram apresentados como uma % de atividade (normalizado ao valor total de conteúdo de proteína correspondente), em comparação com o controlo. (Costa-Rodrigues et al., 2011a, 2011b)

5.2.1.7. Presença de células com anéis de actina

No vigésimo primeiro dia do ensaio as culturas de PBMC foram lavadas duas vezes com PBS, e após serem fixadas com formaldeído 3,7%, foram permeabilizadas com 0,1% (V/V) Triton X-100 por 5 minutos. As células foram coradas para F-actina com 5U/mL Alexa Fluor 647-Phalloidin (Invitrogen) As culturas foram observadas por microscopia confocal óptica (JEOL JSM 6301F). (Costa-Rodrigues et al., 2011a, 2011b).

5.3.Resultados

5.3.1.1. Atividade da TRAP

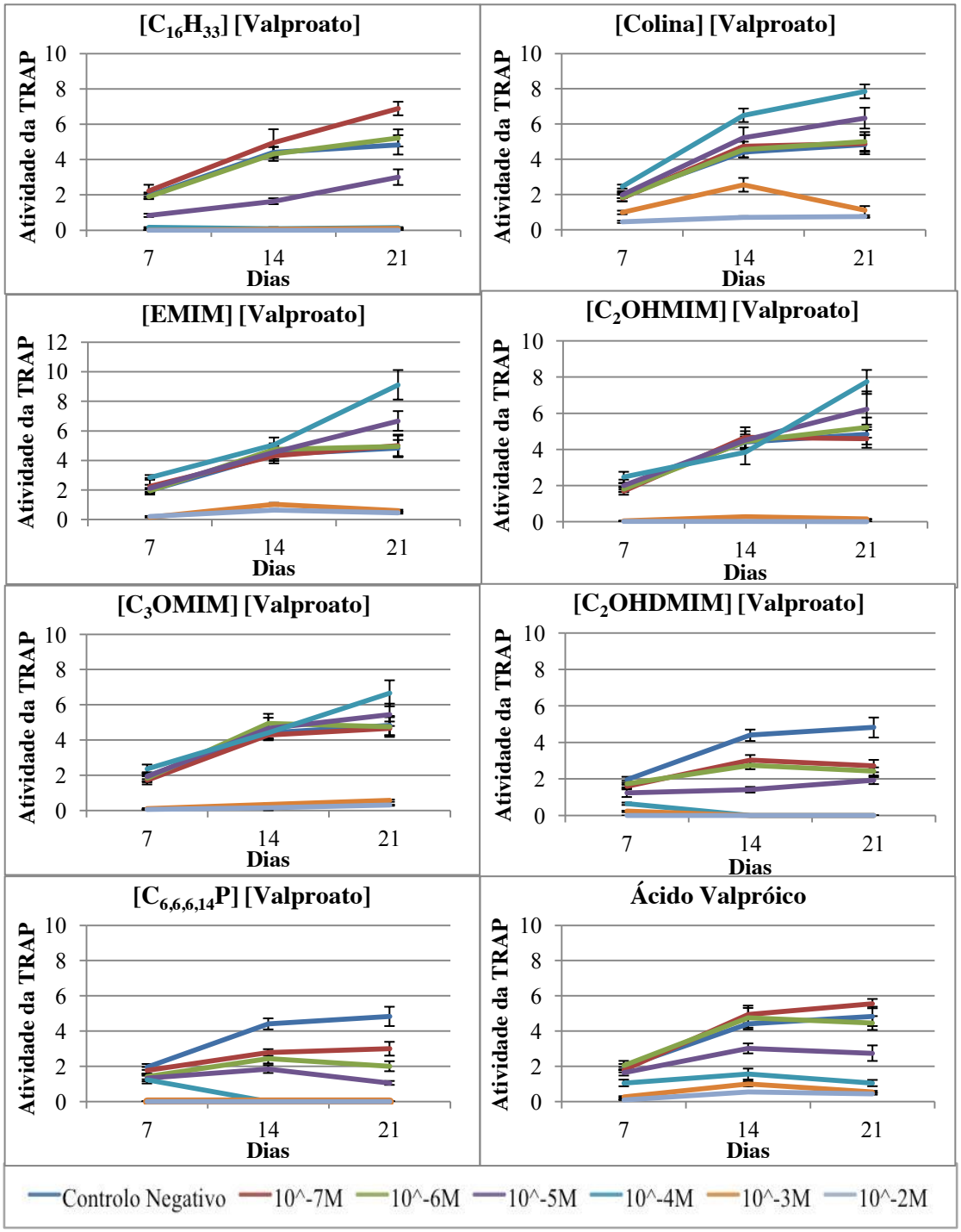


Figura XII: Atividade da TRAP em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, na ausência (controlo negativo) ou suplementadas com os diferentes compostos em estudo, durante 21 dias de cultura.

A Figura XII mostra que em todos os compostos, no controlo negativo, a atividade da TRAP aumenta entre os dias 7 e 14 da cultura, sendo que entre os dias 14 e 21 o aumento não é tão acentuado. Pela análise dos diferentes compostos, testados no intervalo de concentrações entre 10^{-7}M e 10^{-2}M, pode-se afirmar que eles têm capacidade de modular diferencialmente a atividade da TRAP.

Na presença das menores concentrações (10^{-7}M e 10^{-6}M) do LI [$C_{16}H_{33}$] [Valproato], e do VPA é possível verificar que ocorre estimulação da atividade da TRAP entre os dias 7 e 21 do estudo, relativamente aos controlos efetuados. Os LIs [Colina] [Valproato], [EMIM] [Valproato], [C_2OHMIM] [Valproato] e [C_3OMIM] [Valproato] demostram estimular a resposta celular quando presentes na cultura a concentrações de 10^{-4}M e 10^{-5}M, nas quais se verifica um aumento contínuo da atividade da TRAP no dia 21. Para estes LIs, nas concentrações mais baixas (10^{-7}M e 10^{-6}M) também se verifica o mesmo comportamento, mas de forma mais semelhante ao demonstrado pelo controlo. Após tratamento das culturas celulares com os LIs [C_2OHDMIM] [Valproato] e [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato], verifica-se que quando comparados com o controlo, estes compostos são os únicos que no intervalo de concentrações testado, promovem sempre diminuição da resposta celular, dependente da concentração, entre os dias 7 e 21 do estudo demonstrando que exercem efeito inibitório da atividade da TRAP, sendo que nas concentrações de 10^{-2}M e 10^{-3}M se verifica uma redução da atividade da TRAP para valores praticamente indetetáveis, situação que também ocorre no LI [$C_{16}H_{33}$] [Valproato]. A suplementação do meio de cultura com VPA, quando comparado com o controlo realizado, demonstra que ocorre uma diminuição da resposta celular nas concentrações de 10^{-5}M, 10^{-4}M, 10^{-3}M e 10^{-2}M, verificando-se que o efeito é dependente da concentração. Na presença do VPA e dos LIs [Colina] [Valproato] e [EMIM] [Valproato], as concentrações 10^{-2}M e 10^{-3}M, demonstram um aumento da resposta celular entre os dias 7 e 14, e uma redução da mesma entre os dias 14 e 21, sendo evidente o seu efeito inibitório ao comparar com o controlo.

5.3.1.2. Número de células multinucleadas TRAP-Positivas

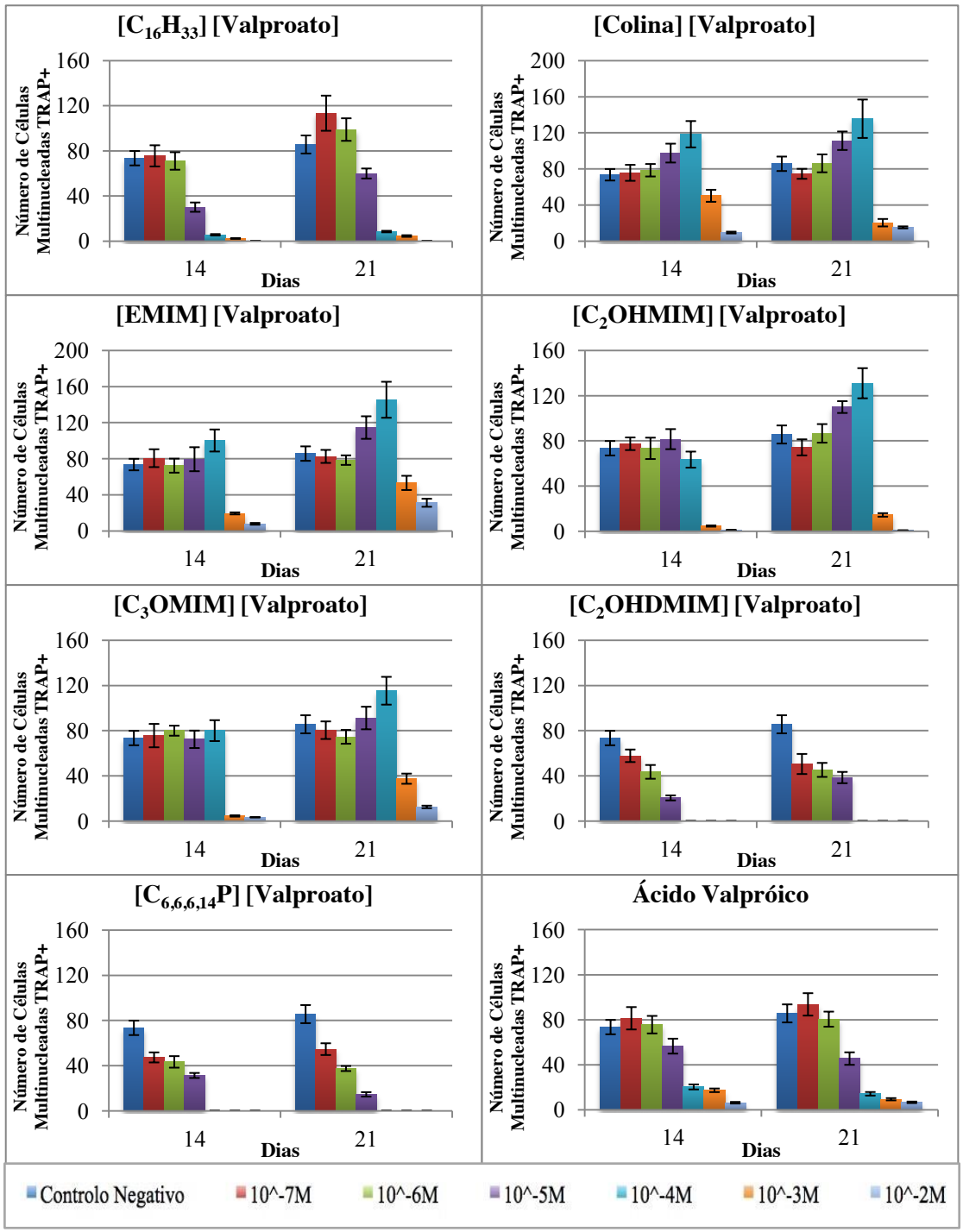


Figura XII: Número de células multinucleadas TRAP-positivas em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, na ausência (controlo negativo) ou suplementadas com os diferentes compostos em estudo, entre os dias 14 e 21 de cultura.

Na Figura XII, de forma generalizada, todos os compostos no intervalo de concentrações testado, parecem afetar a quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas entre os dias 14 e 21 do estudo. O tratamento com o [$C_{16}H_{33}$] [Valproato] presente nas concentrações 10^{-7}M e 10^{-6}M, quando comparado com o controlo, promove

o aumento da quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas entre os dias 14 e 21 do estudo, sendo que nas restantes concentrações, 10^{-3}M, 10^{-4}M e 10^{-5}M a quantidade destas células aumenta entre os dias 14 e 21, mas a quantidade é muito menor relativamente ao controlo. O LI [Colina] [Valproato] suplementado a 10^{-5}M e 10^{-4}M aumenta a quantidade de células multinucleadas comparativamente com o controlo, sendo que a concentração de 10^{-6}M tem um comportamento semelhante ao controlo. O tratamento com o [EMIM] [Valproato] promove um aumento destas células desde do início da cultura celular, nas concentrações 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M e 10^{-4}M, relativamente ao controlo. O [C_2OHMIM] [Valproato] tem um comportamento semelhante e [EMIM] [Valproato], no entanto, após tratamento com concentração de 10^{-2}M, a quantidade de células multinucleadas TRAP-positiva é quase indetetável ao dia 21 da cultura, o que não se verifica para o e [EMIM] [Valproato]. As culturas suplementadas com [C_3OMIM] [Valproato] demostram um aumento da quantidade de células multinucleadas para concentrações de 10^{-5}M e 10^{-4}M, durante o período de cultura celular. A suplementação da cultura com [C_2OHDMIM] [Valproato], ao comparar com os dados obtidos para o controlo, promove uma redução das células multinucleadas, de forma dependente da concentração. O tratamento da cultura com [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato], demostrou reduzir a quantidade das células multinucleadas relativamente ao controlo, entre os dias 14 e 21, sendo que este composto presente na concentração mais baixa, 10^{-7}M, promoveu um ligeiro aumento das mesmas entre o dia 14 e 21. O VPA nas culturas celulares promoveu um aumento da quantidade de células multinucleadas, quando presente nas concentrações de 10^{-7}M e 10^{-6}M, quando comparado com o controlo. No entanto, nas restantes concentrações testadas, verifica-se que o VPA reduz a quantidade destas células de forma dependente da dose. De forma geral, a concentração mais elevada que foi testada em todos os compostos, provocou uma diminuição total, ou quase total da quantidade de células multinucleadas TRAP-positivas. Estes resultados, seguem de certa forma, o mesmo perfil observado na determinação da atividade da TRAP, em que as menores concentrações testadas (10^{-7}M e 10^{-6}M) para o VPA e [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato] promovem um aumento da quantidade destas células, sendo que a doses mais elevadas dos compostos ocorre uma diminuição da sua expressão dependente da dose com que se suplementaram as culturas.

5.3.1.3. Apoptose

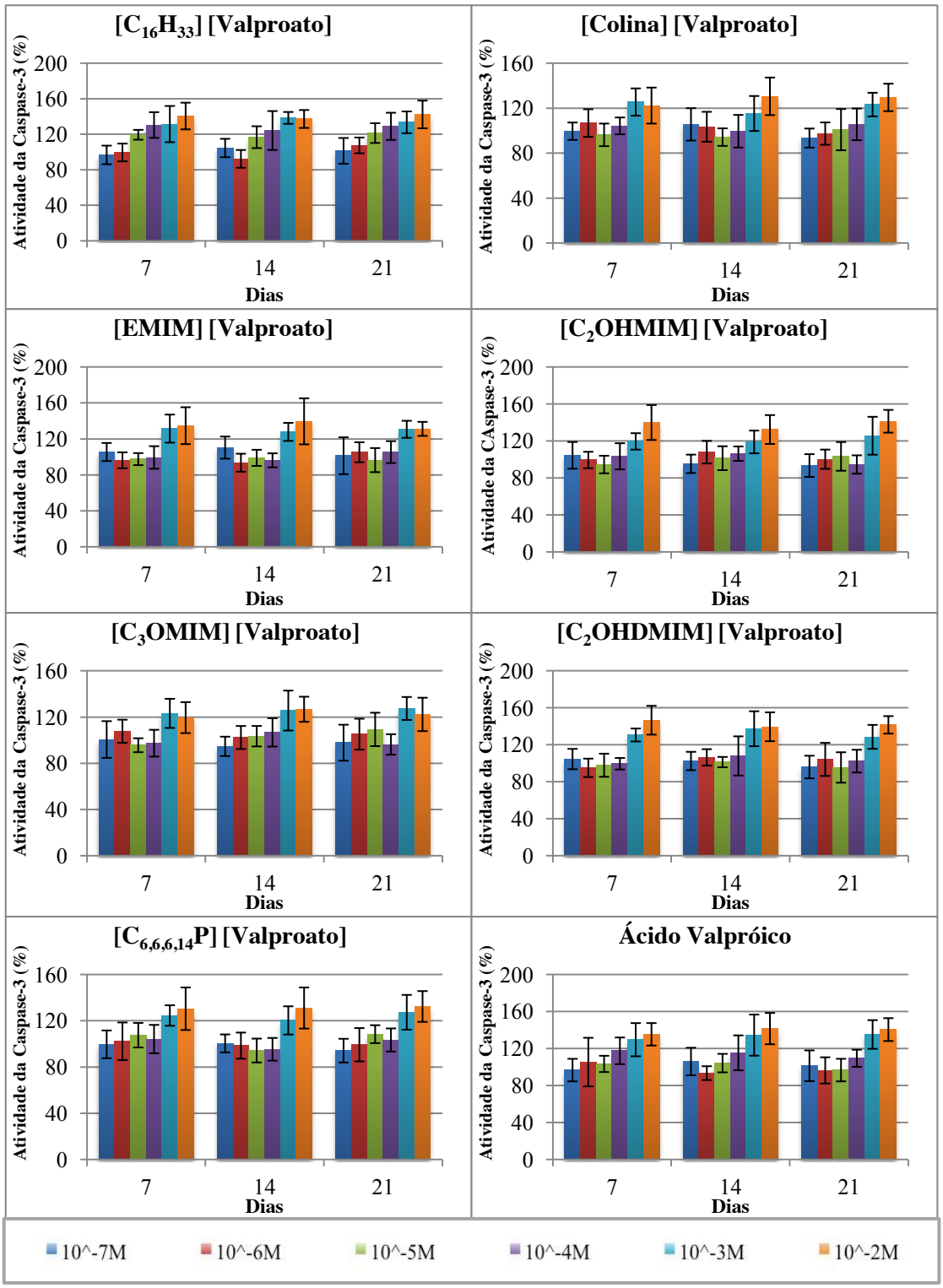


Figura XIV: Atividade da caspase-3 em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, suplementadas com os diferentes compostos em estudo, durante 21 dias de cultura.

Na Figura XIV verifica-se que a atividade da caspase-3 permanece semelhante nas três determinações efetuadas aos dias 7, 14 e 21 do estudo para todos os compostos testados.

A suplementação com VPA e [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato] parecem afetar ligeiramente a atividade da caspase-3 nas concentrações de 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M e 10^{-4}M, estimulando a sua redução. Enquanto que nas doses mais elevadas,10^{-2}M e 10^{-3}M, é visível um ligeiro aumento da atividade da caspase-3 no decorrer do estudo para todos os LIs testados e para o VPA. Assim, doses mais baixas de VPA e [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato] parecem promover a sobrevivência das células. No entanto, de forma generalizada, os compostos em estudo parecem não exercer efeito sobre caspase-3.

5.3.1.4. Presença de células com anéis de actina

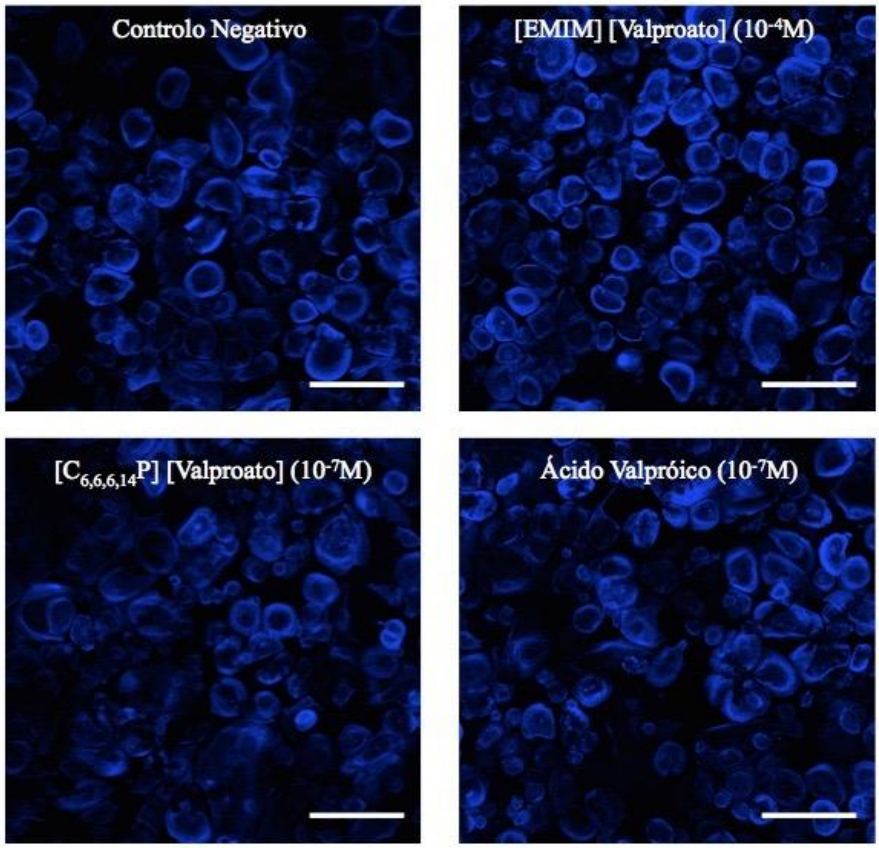


Figura XV: Imagens representativas da cultura de PBMC visualizadas por microscopia ótica confocal. As células foram coradas de azul pela actina. As barras brancas representam 220 µm.

Foi possível observar, em todas as condições testadas, a presença de células com anéis de actina. Na figura XV é possível observar imagens representativas de algumas dessas condições, nas quais se pode verificar células com características osteoclastogénicas. A quantidade das células osteoclásticas observadas aparentou estar em certa medida relacionada com o padrão de resposta observado para a atividade da TRAP.

5.3.1.5. Envolvimento de algumas vias de sinalização, relacionadas com a osteoclastogénese, na resposta celular

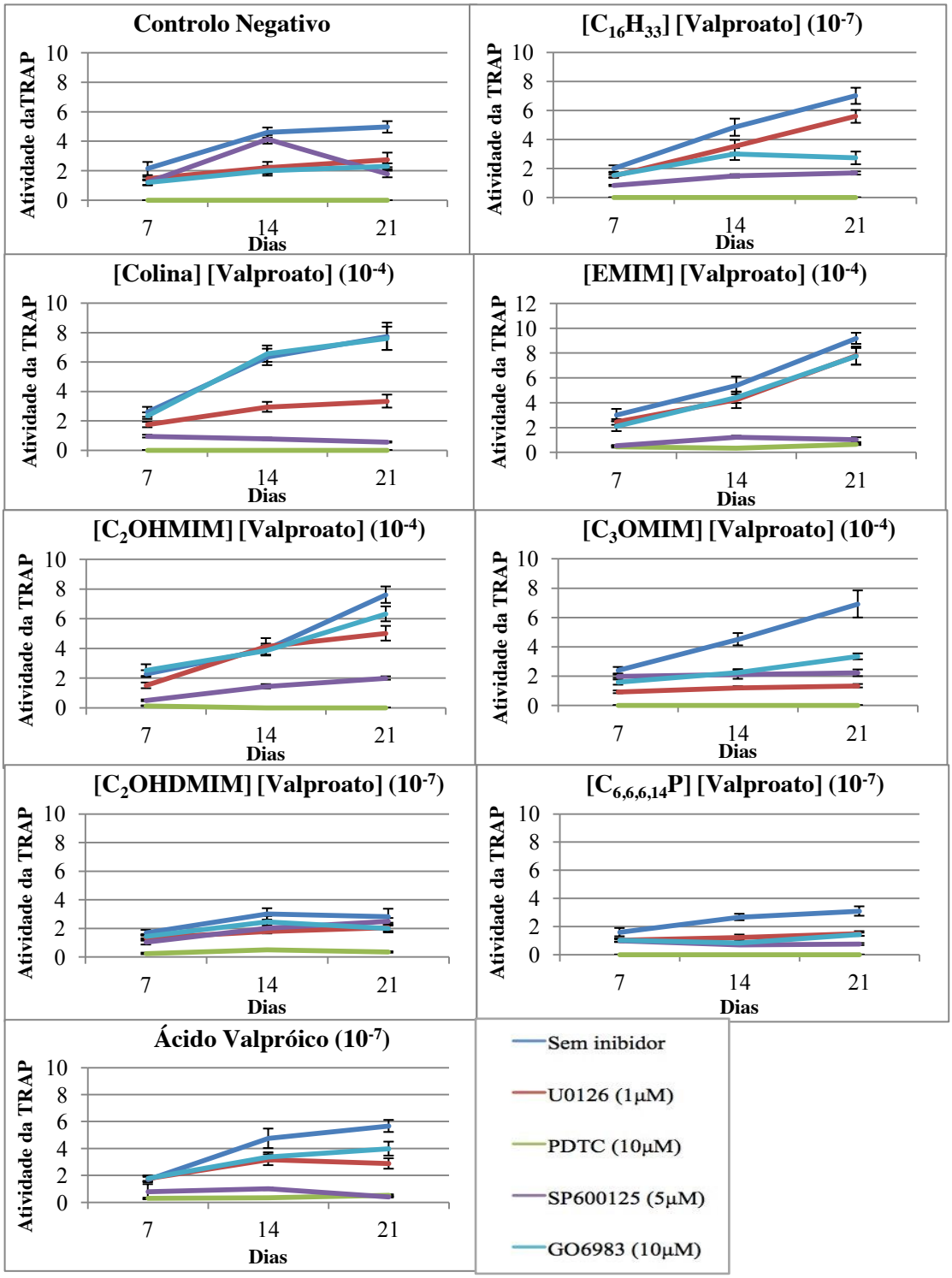


Figura XVI: Atividade da TRAP em culturas de PBMC com fatores recombinantes M-CSF e RANKL, e diferentes inibidores de vias de sinalização osteoclastogénica (U0126 inibidor da via MEK; PDTC inibidor da via NFκB; GO6983 inibidor da PKC; SP600125 inibidor da JNK), na ausência (controlo negativo) ou suplementadas com os diferentes compostos em estudo, durante 21 dias de cultura.

Na Figura XVI, no controlo negativo realizado, verifica-se que o inibidor SP600125 promove um aumento da atividade da TRAP entre o dia 7 e 14 da cultura, sendo que entre o dia 14 e 21 ocorre diminuição abrupta da mesma; em qualquer dos tempos analisados, a resposta celular é inferior ao controlo. Os inibidores U0126 e GO6983 promoveram um aumento contínuo da TRAP no decorrer do período de incubação da cultura, mas sempre em valores significativamente inferiores ao controlo. No caso do inibidor PDTC verifica-se que não promove a atividade da TRAP em todo o período do estudo. O inibidor SP600125 promove um aumento da inibição da atividade da TRAP nas culturas suplementadas com os LIs [Colina] [Valproato], [EMIM] [Valproato], [C_3OMIM] [Valproato], [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato], e VPA, comparativamente ao controlo. Nas culturas tratadas com [$C_{16}H_{33}$] [Valproato], [Colina] [Valproato], [EMIM] [Valproato], [C_2OHMIM] [Valproato], e VPA, o inibidor U0126 estimula a atividade da TRAP, que aumenta bastante em relação ao verificado no controlo negativo, sendo que nas culturas suplementadas com [C_3OMIM] [Valproato], [C_2OHDMIM] [Valproato] e [$C_{6,6,6,14}$P] [Valproato] promoveu inibição da atividade da TRAP. O inibidor GO6893 afecta as culturas tratadas com os LIs [Colina] [Valproato] (10^{-4}M), [EMIM] [Valproato], [C_2OHMIM] [Valproato] e VPA, estimulando a atividade da TRAP em relação ao controlo, o que não se verifica no LI [$C_{16}H_{33}$] [Valproato], no qual ocorre inibição da mesma. Relativamente ao inibidor PDTC, a maioria das culturas tratadas com os LIs apresentam o mesmo comportamento verificado no controlo, a exceção são os LIs [EMIM] [Valproato] e [C_2OHDMIM] [Valproato], e o VPA, nos quais se verifica uma diminuição do efeito inibitório.

5.4.Discussão

A homeostasia do osso é crucial para a saúde deste órgão. Assim, o controlo rigoroso que é exercido sobre a ação dos OBs e OCs no processo de remodelação óssea é essencial para que não ocorra desenvolvimento de patologias ósseas. No entanto, o equilíbrio entre formação do osso e a sua reabsorção não depende apenas de fatores internos/biológicos. Sabe-se que os fármacos anti-epiléticos afetam o metabolismo ósseo, sendo que vários estudos *in vivo* e *in vitro*, indicam que numa terapia prolongada (monoterapia ou politerapia) estes estão relacionados com a redução da BMD, que apresenta uma relação dose-efeito. (El-Hajj Fuleihan, Dib, Yamout, Sawaya, & Mikati,

2008; Gniatkowska-Nowakowska, 2010; Triantafyllou et al., 2010; Verrotti, Coppola, Parisi, Mohn, & Chiarelli, 2010) Assim, o tratamento de patologias com recurso a estes fármacos é considerado um fator de risco para o desenvolvimento de problemas associados ao metabolismo ósseo, tanto em crianças como em adultos, bem como características associadas ao paciente como a idade e duração da terapia. (Beerhorst, Huvers, & Renier, 2005; El-Hajj Fuleihan et al., 2008; Valsamis, Arora, Labban, & McFarlane, 2006; Verrotti, Agostinelli, Coppola, Parisi, & Chiarelli, 2010)

Neste estudo usaram-se culturas de OCs humanos como um modelo *in vitro*, de forma a avaliar os efeitos dos LIs – catiões – associados a um IFA (valproato) – anião –, e também do fármaco VPA, no metabolismo do osso. Os catiões utilizados apresentam baixa toxicidade, excepto o catião [$C_{6,6,6,14}P$]. Ao combinar o LIs com o IFA, isto pode promover alterações no IFA. As culturas de PBMC foram realizadas em meio suplementado com fatores recombinantes M-CSF e RANKL que, como está descrito em vários estudos, são citocinas essenciais para que ocorra a osteoclastogénese, induzindo a expressão de genes pelos OCs, como a TRAP, que é um marcador bioquímico específico da osteoclastogénese. (Y. S. Lee et al., 2010; S. Y. Park et al., 2015)

Os LIs associados ao valproato que foram testados no decorrer do estudo promoveram uma modulação diferencial da osteoclastogénese. Através da quantificação da atividade da TRAP e do número de células multinucleadas TRAP-positivas foi possível verificar que em concentrações elevadas (10^{-2}M e 10^{-3}M) os LIs-IFA modulam negativamente este processo do metabolismo ósseo, apresentando uma redução da resposta celular, que é dependente da dose. O VPA e o [$C_{16}H_{33}$] [Valproato] são a exceção, pois a doses menos concentradas (10^{-7}M e 10^{-6}M) induzem um incremento neste processo. Apesar de que quando presentes em concentrações mais elevadas (10^{-2}M e 10^{-3}M) estes compostos promovem um efeito inibitório do desenvolvimento do OCs, que também é dependente da dose. Estes resultados corroboram as conclusões de alguns estudos realizados *in vivo*, que demonstraram que o VPA tem efeito sobre a reabsorção óssea podendo estimular, ou até inibir este processo. (Beerhorst et al., 2005; Verrotti, Agostinelli, et al., 2010) No entanto, os poucos estudos na literatura apresentam resultados controversos, sendo que nenhum estudo esclarece o mecanismo pelo qual este fármaco atua nas células do osso. (Verrotti, Coppola, et al., 2010) O mesmo se verifica no presente estudo, no qual as menores concentrações testadas para o VPA atuam de forma contrária às concentrações mais elevadas, induzindo o efeito oposto. Os catiões [$C_{6,6,6,14}P$] e [C_2OHDMIM]

acoplados ao valproato mostram efeito inibitório dependente da dose, sendo que todas as concentrações testadas afetam negativamente a osteoclastogénese. Sendo o [$C_{6,6,6,14}P$] um catião baseado em fosfónio, é o que apresenta o efeito mais citotóxico, sendo portanto o resultado obtido o esperado, uma vez que acoplado ao valproato, afetou negativamente, e de forma muito acentuada a resposta celular. (Ferraz et al., 2014)

Os resultados obtidos para avaliação da atividade da caspase-3 estão em concordância com os restantes resultados analisados neste estudo, uma vez que no decorrer do período de cultura celular ocorre um aumento da atividade da caspase-3, dependente da dose, para todos os compostos testados. No entanto, mais uma vez, o VPA e o catião [$C_{6,6,6,14}P$] acoplado ao valproato demonstram uma ligeira inibição da atividade da caspase-3 para concentrações de 10^{-7}M, 10^{-6}M, 10^{-5}M e 10^{-4}M, entre os dias 14 e 21 do estudo, indicando que podem de alguma forma estimular a sobrevivência das células e, eventualmente, a sua atividade de reabsorção óssea.

Relativamente ao inibidores testados, a via NFκB é relevante nas culturas tratadas com [EMIM] [Valproato] e [C_2OHDMIM] [Valproato], e VPA, pois inibe a atividade da TRAP, revelando um efeito que não se verifica no controlo negativo, no qual para este inibidor não se verifica nenhuma atividade da TRAP nas células em cultura. Assim, esta via parece ser a que mais influencia a sobrevivência das células, nas condições testadas referidas, promovendo uma menor atividade da TRAP, comparativamente aos outros inibidores utilizados nas mesmas culturas. Este resultado sugere que a via NFκB é um dos mecanismos intracelulares principais para desencadear o processo osteoclastogénico pelas células. Este resultado está em concordância com um estudo realizado *in vitro*, que testou o efeito do VPA como modulador de vias de sinalização osteoclastogénica. (T. Nakamura et al., 2005) A via PKC revela não ser muito significante, uma vez que na presença do seu inibidor, a atividade da TRAP das culturas tratadas com os diferentes LIs foi inibida de forma semelhante, ou mesmo inferior, ao controlo. A via JNK demonstrou ser regulada negativamente no controlo negativo, pelos catiões [C_3OMIM], [C_2OHDMIM], [$C_{6,6,6,14}P$] acoplados ao valproato, e pelo VPA, o que indica que se encontra bastante envolvida no processo da osteoclastogénese humana, portanto a presença dos LIs-IFA não afecta de forma significativa o envolvimento da via JNK no processo osteoclastogénico.

CAPÍTULO VI – Conclusão e perspetivas futuras

6. Conclusão e Perspetivas Futuras

Atualmente as resistências bacterianas ocupam lugar de destaque na nossa sociedade, sendo necessário encontrar soluções viáveis paras as combater. Nesta parte do trabalho o objectivo proposto era avaliar o efeito dos LIs-IFAs em bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas de forma a perceber o efeito tóxico exercido, determinado se os compostos atuam como bactericidas ou bacteriostáticos. Após análise dos resultados, conclui-se que são necessários mais estudos num intervalo de concentrações mais abrangente e por um período de incubação mais prolongado, para perceber se realmente ocorre efeito bactericida, pois muitas estirpes não responderam às concentrações usadas, impedindo a comparação entre o comportamento das diferentes bactérias utilizadas. O facto de a maioria das bactérias resistentes não ter apresentado MIC para os compostos com os quais foram tratadas, indica que em futuros estudos é necessário utilizar concentrações mais elevadas dos compostos para que ocorra inibição do crescimento bacteriano, para permitir avaliar a taxa de crescimento das estirpes e, consequentemente, com a realização de outros estudos, tentar perceber o mecanismo de ação dos LIs-IFA nas bactérias que lhes são susceptíveis. Os LIs-IFAs baseados na Ampicilina de Sódio parecem afectar a resistência das bactérias Gram-Negativas resistentes, o que é um bom indicador para futuros estudos.

Como já foi referido, as patologias ósseas associadas ao uso de fármacos anti-epiléticos está comprovada *in vivo*. Embora o resultado de estudos realizados *in vivo* e *in vitro* para o VPA seja controverso, sabe-se que este fármaco tem influência no processo de remodelação óssea, e que depende de vários fatores como: a dose administrada, o tempo de terapia a que o paciente esta sujeito, factores intrínsecos de cada organismo, idade, propensão para problemas ósseos, entre outros. No estudo realizado, verificou-se que os LIs-IFA [C_2OHDMIM] [Valproato] e [$C_{6,6,6,14}$] [Valproato] modulam a osteoclastogénese de forma negativa. Isto indica que estes compostos podem vir a ser úteis no tratamento de patologias ósseas.

Em ambos os estudos, bacteriano e celular, os resultados obtidos não são suficientes para tirar conclusões concretas sobre os LIs-IFA testados. No entanto, fornecem informações importantes que poderão ser úteis para futuros estudos mais detalhados, que envolvam uma amostra mais abrangente e mais fatores de avaliação das respostas

obtidas, para se tentar concluir quais os mecanismos de ação usados e também determinar se essas respostas ocorrem em doses que possam ser utilizadas terapeuticamente, sem serem tóxicas para os organismos. Sendo assim, realizar um estudo com OBs para determinar os mesmos parâmetros que foram determinados no presente estudo nos OCs, e também efetuar co-culturas de OBs e OCs de forma a tentar perceber os efeitos dos LIs-IFA utilizados. Seria também importante executar estudos *in vivo* e verificar as alterações ocorridas pelos compostos testados no tecido ósseo.

CAPÍTULO VII – Referências Bibliográficas

Aisha, M. D., Nor-Ashikin, M. N., Sharaniza, A. B., Nawawi, H. M., Kapitonova, M. Y., & Froemming, G. R. (2014). Short-term moderate hypothermia stimulates alkaline phosphatase activity and osteocalcin expression in osteoblasts by upregulating Runx2 and osterix in vitro. *Exp Cell Res, 326*(1), 46-56. doi:10.1016/j.yexcr.2014.06.003

Angell, C. A., Ansari, Y., & Zhao, Z. (2012). Ionic liquids: past, present and future. *Faraday Discuss, 154*, 9-27; discussion 81-96, 465-471.

Arbez, J., Lamarthée, B., Gaugler, B., & Saas, P. (2014). Histone deacetylase inhibitor valproic acid affects plasmacytoid dendritic cells phenotype and function. *Immunobiology, 219*(8), 637-643. doi:10.1016/j.imbio.2014.03.013

Baek, W. Y., Lee, M. A., Jung, J. W., Kim, S. Y., Akiyama, H., de Crombrugghe, B., & Kim, J. E. (2009). Positive regulation of adult bone formation by osteoblast-specific transcription factor osterix. *J Bone Miner Res, 24*(6), 1055-1065. doi:10.1359/jbmr.081248

Beck, G. R., Ha, S. W., Camalier, C. E., Yamaguchi, M., Li, Y., Lee, J. K., & Weitzmann, M. N. (2012). Bioactive silica-based nanoparticles stimulate bone-forming osteoblasts, suppress bone-resorbing osteoclasts, and enhance bone mineral density in vivo. *Nanomedicine, 8*(6), 793-803. doi:10.1016/j.nano.2011.11.003

Beerhorst, K., Huvers, F. C., & Renier, W. O. (2005). Severe early onset osteopenia and osteoporosis caused by antiepileptic drugs. *Neth J Med, 63*(6), 222-226.

Belcastro, V., D'Egidio, C., Striano, P., & Verrotti, A. (2013). Metabolic and endocrine effects of valproic acid chronic treatment. *Epilepsy Res, 107*(1-2), 1-8. doi:10.1016/j.eplepsyres.2013.08.016

Belinha, J., Jorge, R. M., & Dinis, L. M. (2013). A meshless microscale bone tissue trabecular remodelling analysis considering a new anisotropic bone tissue material law. *Comput Methods Biomech Biomed Engin, 16*(11), 1170-1184. doi:10.1080/10255842.2012.654783

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem, 72*, 248-254.

Caetano-Lopes, J., Canhão, H., & Fonseca, J. E. (2007). Osteoblasts and bone formation. *Acta Reumatol Port, 32*(2), 103-110.

Cagliero, C., Bicchi, C., Cordero, C., Liberto, E., Sgorbini, B., & Rubiolo, P. (2012). Room temperature ionic liquids: new GC stationary phases with a novel selectivity for flavor and fragrance analyses. *J Chromatogr A, 1268*, 130-138. doi:10.1016/j.chroma.2012.10.016

Callaway, D. A., Riquelme, M. A., Sharma, R., Lopez-Cruzan, M., Herman, B. A., & Jiang, J. X. (2015). Caspase-2 modulates osteoclastogenesis through down-regulating oxidative stress. *Bone, 76*, 40-48. doi:10.1016/j.bone.2015.03.006

Capulli, M., Paone, R., & Rucci, N. (2014). Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys, 561*, 3-12. doi:10.1016/j.abb.2014.05.003

Chang, P., Walker, M. C., & Williams, R. S. (2014). Seizure-induced reduction in PIP3 levels contributes to seizure-activity and is rescued by valproic acid. *Neurobiol Dis, 62*, 296-306. doi:10.1016/j.nbd.2013.10.017

Charles, J. F., & Aliprantis, A. O. (2014). Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med, 20*(8), 449-459. doi:10.1016/j.molmed.2014.06.001

Chen, J., & Long, F. (2013). β-catenin promotes bone formation and suppresses bone resorption in postnatal growing mice. *J Bone Miner Res, 28*(5), 1160-1169. doi:10.1002/jbmr.1834

Chen, S., Wu, H., Klebe, D., Hong, Y., & Zhang, J. (2014). Valproic Acid: a new candidate of therapeutic application for the acute central nervous system injuries. *Neurochem Res, 39*(9), 1621-1633. doi:10.1007/s11064-014-1241-2

Chim, S. M., Tickner, J., Chow, S. T., Kuek, V., Guo, B., Zhang, G., . . . Xu, J. (2013). Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev, 24*(3), 297-310. doi:10.1016/j.cytogfr.2013.03.008

Choe, C. H., Park, I. S., Park, J., Yu, K. Y., Jang, H., Kim, J., & Jang, Y. S. (2015). Transmembrane protein 173 inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation. *FEBS Lett, 589*(7), 836-841. doi:10.1016/j.febslet.2015.02.018

Chung, Y. H., Jang, Y., Choi, B., Song, D. H., Lee, E. J., Kim, S. M., . . . Chang, E. J. (2014). Beclin-1 is required for RANKL-induced osteoclast differentiation. *J Cell Physiol, 229*(12), 1963-1971. doi:10.1002/jcp.24646

Chung, Y. H., Yoon, S. Y., Choi, B., Sohn, D. H., Yoon, K. H., Kim, W. J., . . . Chang, E. J. (2012). Microtubule-associated protein light chain 3 regulates Cdc42-dependent actin ring formation in osteoclast. *Int J Biochem Cell Biol, 44*(6), 989-997. doi:10.1016/j.biocel.2012.03.007

Coleman, D., & Gathergood, N. (2010). Biodegradation studies of ionic liquids (Vol. 39, pp. 600-637): Chemical Society Reviews - The Royal Society of Chemistry.

Costa, S. P., Justina, V. D., Bica, K., Vasiloiu, M., Pinto, P. C., & Saraiva, M. L. (2014). Automated evaluation of pharmaceutically active ionic liquids' (eco)toxicity through the inhibition of human carboxylesterase and Vibrio fischeri. *J Hazard Mater, 265*, 133-141. doi:10.1016/j.jhazmat.2013.11.052

Costa-Rodrigues, J., Fernandes, A., & Fernandes, M. H. (2011a). Reciprocal osteoblastic and osteoclastic modulation in co-cultured MG63 osteosarcoma cells and human osteoclast precursors. *J Cell Biochem, 112*(12), 3704-3713. doi:10.1002/jcb.23295

Costa-Rodrigues, J., Fernandes, A., & Fernandes, M. H. (2011b). Spontaneous and induced osteoclastogenic behaviour of human peripheral blood mononuclear cells and their CD14(+) and CD14(-) cell fractions. *Cell Prolif, 44*(5), 410-419. doi:10.1111/j.1365-2184.2011.00768.x

Day, T. F., Guo, X., Garrett-Beal, L., & Yang, Y. (2005). Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell, 8*(5), 739-750. doi:10.1016/j.devcel.2005.03.016

Delcheva, I., Ralston, J., Beattie, D. A., & Krasowska, M. (2014). Static and dynamic wetting behaviour of ionic liquids. *Adv Colloid Interface Sci*. doi:10.1016/j.cis.2014.07.003

Deng, L., Wang, Y., Peng, Y., Wu, Y., Ding, Y., Jiang, Y., . . . Fu, Q. (2015). Osteoblast-derived microvesicles: A novel mechanism for communication between osteoblasts and osteoclasts. *Bone, 79*, 37-42. doi:10.1016/j.bone.2015.05.022

Dive, G., Bouillon, C., Sliwa, A., Valet, B., Verlaine, O., Sauvage, E., & Marchand-Brynaert, J. (2013). Macrocycle-embedded β-lactams as novel inhibitors of the Penicillin Binding Protein PBP2a from MRSA. *Eur J Med Chem, 64*, 365-376. doi:10.1016/j.ejmech.2013.03.052

Dobler, D., Schmidts, T., Klingenhöfer, I., & Runkel, F. (2013). Ionic liquids as ingredients in topical drug delivery systems. *Int J Pharm, 441*(1-2), 620-627. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.10.035

Duenas-Gonzalez, A., Candelaria, M., Perez-Plascencia, C., Perez-Cardenas, E., de la Cruz-Hernandez, E., & Herrera, L. A. (2008). Valproic acid as epigenetic cancer

drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev, 34*(3), 206-222. doi:10.1016/j.ctrv.2007.11.003

Dymond, J. S. (2013). Saccharomyces Cerevisiae Growth Media. *Laboratory Methods in Enzymology: Cell, Lipid and Carbohydrate, 533*, 191-204. doi:10.1016/b978-0-12-420067-8.00012-x

Eeles, D. G., Hodge, J. M., Singh, P. P., Schuijers, J. A., Grills, B. L., Gillespie, M. T., . . . Quinn, J. M. (2015). Osteoclast formation elicited by interleukin-33 stimulation is dependent upon the type of osteoclast progenitor. *Mol Cell Endocrinol, 399*, 259-266. doi:10.1016/j.mce.2014.10.014

El-Hajj Fuleihan, G., Dib, L., Yamout, B., Sawaya, R., & Mikati, M. A. (2008). Predictors of bone density in ambulatory patients on antiepileptic drugs. *Bone, 43*(1), 149-155. doi:10.1016/j.bone.2008.03.002

El-Harbawi, M. (2014). Toxicity Measurement of Imidazolium Ionic Liquids using Acute Toxicity Test (Vol. 9, pp. 40-52): Procedia Chemistry.

Elwakkad, A. S., El Elshamy, K. A., & Sibaii, H. (2008). Fish liver oil and propolis as protective natural products against the effect of the anti-epileptic drug valproate on immunological markers of bone formation in rats. *Epilepsy Res, 80*(1), 47-56. doi:10.1016/j.eplepsyres.2008.03.008

Fan, L. L., Li, H. J., & Chen, Q. H. (2014). Applications and mechanisms of ionic liquids in whole-cell biotransformation. *Int J Mol Sci, 15*(7), 12196-12216. doi:10.3390/ijms150712196

Federsel, H. (2006). In search of sustainability: process R&D in light of current pharmaceutical industry challenges (Vol. 11, pp. 966-974). Drug Discovery Today.

Ferraz, R., Branco, L. C., Marrucho, I. M., Rebelo, L. P. N., Ponte, M. N., Prudêncio, C., . . . Petrovski, Z. (2012). Development of novel ionic liquids based on ampicillin (Vol. 3, pp. 494-497): Med. Chem. Commun. - The Royal Society of Chemistry.

Ferraz, R., Branco, L. C., Prudêncio, C., Noronha, J. P., & Petrovski, Z. (2011). Ionic liquids as active pharmaceutical ingredients. *ChemMedChem, 6*(6), 975-985. doi:10.1002/cmdc.201100082

Ferraz, R., Teixeira, V., Rodrigues, D., Fernandes, R., Prudêncio, C., Noronha, J. P., . . . Branco, L. C. (2014). Antibacterial activity of Ionic Liquids based on ampicillin against resistant bacteria (Vol. 4, pp. 4301-4307): The Royal Society of Chemistry.

Frade, R. F., & Afonso, C. A. (2010). Impact of ionic liquids in environment and humans: an overview. *Hum Exp Toxicol, 29*(12), 1038-1054. doi:10.1177/0960327110371259

Frade, R. F., Simeonov, S., Rosatella, A. A., Siopa, F., & Afonso, C. A. (2013). Toxicological evaluation of magnetic ionic liquids in human cell lines. *Chemosphere, 92*(1), 100-105. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.02.047

Frikeche, J., Simon, T., Brissot, E., Grégoire, M., Gaugler, B., & Mohty, M. (2012). Impact of valproic acid on dendritic cells function. *Immunobiology, 217*(7), 704-710. doi:10.1016/j.imbio.2011.11.010

Frizzo, C. P., Gindri, I. M., Tier, A. Z., Buriol, L., Moreira, D. N., & Martins, M. A. P. (2013). Pharmaceutical Salts: Solids to Liquids by Using Ionic Liquid Design (pp. 557-580): InTech.

Gao, L., & McCarthy, T. J. (2007). Ionic liquids are useful contact angle probe fluids. *J Am Chem Soc, 129*(13), 3804-3805. doi:10.1021/ja070169d

García-Martínez, O., De Luna-Bertos, E., Ramos-Torrecillas, J., Manzano-Moreno, F. J., & Ruiz, C. (2015). Repercussions of NSAIDS drugs on bone tissue: the osteoblast. *Life Sci, 123*, 72-77. doi:10.1016/j.lfs.2015.01.009

Gay, C. V., Gilman, V. R., & Sugiyama, T. (2000). Perspectives on osteoblast and osteoclast function. *Poult Sci, 79*(7), 1005-1008.

Gniatkowska-Nowakowska, A. (2010). Fractures in epilepsy children. *Seizure, 19*(6), 324-325. doi:10.1016/j.seizure.2010.04.013

Grote, J., & Chen, Y. (2014). Methodology for the manufacturable synthesis of valproic acid conjugates (Vol. 55, pp. 676-678): Tetrahedron Letters.

Gu, R., Santos, L. L., Ngo, D., Fan, H., Singh, P. P., Fingerle-Rowson, G., . . . Morand, E. F. (2015). Macrophage migration inhibitory factor is essential for osteoclastogenic mechanisms in vitro and in vivo mouse model of arthritis. *Cytokine, 72*(2), 135-145. doi:10.1016/j.cyto.2014.11.015

Guan, H., Mi, B., Li, Y., Wu, W., Tan, P., Fang, Z., . . . Li, F. (2015). Decitabine represses osteoclastogenesis through inhibition of RANK and NF-κB. *Cell Signal, 27*(5), 969-977. doi:10.1016/j.cellsig.2015.02.006

Gupta, K. M., & Jiang, J. (2014). Cellulose dissolution and regeneration in ionic liquids: A computational perspective Chemical Engineering Science.

Gómez-Barrena, E., Rosset, P., Lozano, D., Stanovici, J., Ermthaller, C., & Gerbhard, F. (2015). Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone, 70*, 93-101. doi:10.1016/j.bone.2014.07.033

Ha, S. W., Jang, H. L., Nam, K. T., & Beck, G. R. (2015). Nano-hydroxyapatite modulates osteoblast lineage commitment by stimulation of DNA methylation and regulation of gene expression. *Biomaterials, 65*, 32-42. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.06.039

Hadjidakis, D. J., & Androulakis, I. I. (2006). Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci, 1092*, 385-396. doi:10.1196/annals.1365.035

HaDuong, J. H., Blavier, L., Baniwal, S. K., Frenkel, B., Malvar, J., Punj, V., . . . DeClerck, Y. A. (2015). Interaction between bone marrow stromal cells and neuroblastoma cells leads to a VEGFA-mediated osteoblastogenesis. *Int J Cancer, 137*(4), 797-809. doi:10.1002/ijc.29465

Hayashi, M., Nakashima, T., Kodama, T., Makrigiannis, A. P., Toyama-Sorimachi, N., & Takayanagi, H. (2010). Ly49Q, an ITIM-bearing NK receptor, positively regulates osteoclast differentiation. *Biochem Biophys Res Commun, 393*(3), 432-438. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.013

Hollóczki, O., Malberg, F., Welton, T., & Kirchner, B. (2014). On the origin of ionicity in ionic liquids. Ion pairing versus charge transfer. *Phys Chem Chem Phys, 16*(32), 16880-16890. doi:10.1039/c4cp01177e

Hough, W. L., Smiglak, M., Rodríguez, H., Swatloski, R. P., Spear, S. K., Daly, D. T., . . . Rogers, R. D. (2007). The third evolution of ionic liquids: active pharmaceutical ingredients (Vol. 31, pp. 1429-1436): The Royal Society of Chemistry - New Journal of Chemistry.

Huang, J., Zhou, L., Wu, H., Pavlos, N., Chim, S. M., Liu, Q., . . . Ding, Y. (2015). Triptolide inhibits osteoclast formation, bone resorption, RANKL-mediated NF-κB activation and titanium particle-induced osteolysis in a mouse model. *Mol Cell Endocrinol, 399*, 346-353. doi:10.1016/j.mce.2014.10.016

Huang, Q., Gao, B., Jie, Q., Wei, B. Y., Fan, J., Zhang, H. Y., . . . Liu, J. (2014). Ginsenoside-Rb2 displays anti-osteoporosis effects through reducing oxidative damage and bone-resorbing cytokines during osteogenesis. *Bone, 66*, 306-314. doi:10.1016/j.bone.2014.06.010

Hyeon, S., Lee, H., Yang, Y., & Jeong, W. (2013). Nrf2 deficiency induces oxidative stress and promotes RANKL-induced osteoclast differentiation. *Free Radic Biol Med, 65*, 789-799. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.005

Ishii, M., & Kikuta, J. (2013). Sphingosine-1-phosphate signaling controlling osteoclasts and bone homeostasis. *Biochim Biophys Acta, 1831*(1), 223-227. doi:10.1016/j.bbalip.2012.06.002

Iñiguez-Ariza, N. M., & Clarke, B. L. (2015). Bone biology, signaling pathways, and therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*. doi:10.1016/j.maturitas.2015.07.003

Jahani, M., Genever, P. G., Patton, R. J., Ahwal, F., & Fagan, M. J. (2012). The effect of osteocyte apoptosis on signalling in the osteocyte and bone lining cell network: a computer simulation. *J Biomech, 45*(16), 2876-2883. doi:10.1016/j.jbiomech.2012.08.005

Jansen, K. A., Donato, D. M., Balcioglu, H. E., Schmidt, T., Danen, E. H., & Koenderink, G. H. (2015). A guide to mechanobiology: Where biology and physics meet. *Biochim Biophys Acta*. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.007

Jeong, S. G., Ohn, T., Kim, S. H., & Cho, G. W. (2013). Valproic acid promotes neuronal differentiation by induction of neuroprogenitors in human bone-marrow mesenchymal stromal cells. *Neurosci Lett, 554*, 22-27. doi:10.1016/j.neulet.2013.08.059

Jerez, S., & Chen, B. (2015). Stability analysis of a Komarova type model for the interactions of osteoblast and osteoclast cells during bone remodeling. *Math Biosci, 264*, 29-37. doi:10.1016/j.mbs.2015.03.003

Jin, G., Liu, B., You, Z., Bambakidis, T., Dekker, S. E., Maxwell, J., . . . Alam, H. B. (2014). Development of a novel neuroprotective strategy: combined treatment with hypothermia and valproic acid improves survival in hypoxic hippocampal cells. *Surgery, 156*(2), 221-228. doi:10.1016/j.surg.2014.03.038

Johnson, E. O., Troupis, T., & Soucacos, P. N. (2011). Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery. *Microsurgery, 31*(3), 176-182. doi:10.1002/micr.20821

Kapoor, S. (2013). Valproic acid and its inhibition of tumor growth in systemic malignancies: beyond gliomas. *J Neurooncol, 113*(3), 531. doi:10.1007/s11060-013-1129-z

Katagiri, T., & Takahashi, N. (2002). Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis, 8*(3), 147-159.

Kerkhof, M., Dielemans, J. C., van Breemen, M. S., Zwinkels, H., Walchenbach, R., Taphoorn, M. J., & Vecht, C. J. (2013). Effect of valproic acid on seizure control and on survival in patients with glioblastoma multiforme. *Neuro Oncol, 15*(7), 961-967. doi:10.1093/neuonc/not057

Keskin, S., Kayrak-Talay, D., Akman, U., & Hortaçsu, O. (2007). A review of ionic liquids towards supercritical fluid applications (Vol. 43, pp. 150-180): Journal of Supercritical Fluids.

Kim, J. Y., Cheon, Y. H., Kwak, S. C., Baek, J. M., Yoon, K. H., Lee, M. S., & Oh, J. (2014). Emodin regulates bone remodeling by inhibiting osteoclastogenesis and stimulating osteoblast formation. *J Bone Miner Res, 29*(7), 1541-1553. doi:10.1002/jbmr.2183

Kim, S. N., Kim, M. H., Min, Y. K., & Kim, S. H. (2008). Licochalcone A inhibits the formation and bone resorptive activity of osteoclasts. *Cell Biol Int, 32*(9), 1064-1072. doi:10.1016/j.cellbi.2008.04.017

Kleinhans, C., Schmid, F. F., Schmid, F. V., & Kluger, P. J. (2015). Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D. *J Biotechnol, 205*, 101-110. doi:10.1016/j.jbiotec.2014.11.039

Kobayashi, Y., Thirukonda, G. J., Nakamura, Y., Koide, M., Yamashita, T., Uehara, S., . . . Takahashi, N. (2015). Wnt16 regulates osteoclast differentiation in conjunction with Wnt5a. *Biochem Biophys Res Commun, 463*(4), 1278-1283. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.102

Komori, T. (2006). Regulation of osteoblast differentiation by transcription factors. *J Cell Biochem, 99*(5), 1233-1239. doi:10.1002/jcb.20958

Kostrouchová, M., & Kostrouch, Z. (2007). Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol (Praha), 53*(2), 37-49.

Kotake, S., & Nanke, Y. (2014). Effect of TNFα on osteoblastogenesis from mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta, 1840*(3), 1209-1213. doi:10.1016/j.bbagen.2013.12.013

Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M., & Xu, J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clin Biochem, 45*(12), 863-873. doi:10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021

Kumamaru, E., Egashira, Y., Takenaka, R., & Takamori, S. (2014). Valproic acid selectively suppresses the formation of inhibitory synapses in cultured cortical neurons. *Neurosci Lett, 569*, 142-147. doi:10.1016/j.neulet.2014.03.066

Kumar, V., & Malhotra, S. V. (2010). Ionic Liquids as Pharmaceutical Salts: A Historical Perspective: American Chemical Society.

Lee, C. C., Liu, F. L., Chen, C. L., Chen, T. C., Liu, F. C., Ahmed Ali, A. A., . . . Huang, H. S. (2015). Novel inhibitors of RANKL-induced osteoclastogenesis: Design, synthesis, and biological evaluation of 6-(2,4-difluorophenyl)-3-phenyl-2H-benzo[e][1,3]oxazine-2,4(3H)-diones. *Bioorg Med Chem, 23*(15), 4522-4532. doi:10.1016/j.bmc.2015.06.007

Lee, Y., Kim, H. J., Park, C. K., Kim, Y. G., Lee, H. J., Kim, J. Y., & Kim, H. H. (2013). MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. *Bone, 56*(2), 383-389. doi:10.1016/j.bone.2013.07.007

Lee, Y. S., Kim, Y. S., Lee, S. Y., Kim, G. H., Kim, B. J., Lee, S. H., . . . Koh, J. M. (2010). AMP kinase acts as a negative regulator of RANKL in the differentiation of osteoclasts. *Bone, 47*(5), 926-937. doi:10.1016/j.bone.2010.08.001

Li, N., Lee, W. Y., Lin, S. E., Ni, M., Zhang, T., Huang, X. R., . . . Li, G. (2014). Partial loss of Smad7 function impairs bone remodeling, osteogenesis and enhances osteoclastogenesis in mice. *Bone, 67*, 46-55. doi:10.1016/j.bone.2014.06.033

Liou, S. F., Hsu, J. H., Chu, H. C., Lin, H. H., Chen, I. J., & Yeh, J. L. (2015). KMUP-1 Promotes Osteoblast Differentiation Through cAMP and cGMP Pathways and Signaling of BMP-2/Smad1/5/8 and Wnt/β-Catenin. *J Cell Physiol, 230*(9), 2038-2048. doi:10.1002/jcp.24904

Lu, J., & Rohani, S. (2009). Polymorphism and crystallization of active pharmaceutical ingredients (APIs). *Curr Med Chem, 16*(7), 884-905.

Lynch, M. E., & Fischbach, C. (2014). Biomechanical forces in the skeleton and their relevance to bone metastasis: biology and engineering considerations. *Adv Drug Deliv Rev, 79-80*, 119-134. doi:10.1016/j.addr.2014.08.009

Makhdom, A. M., Nayef, L., Tabrizian, M., & Hamdy, R. C. (2015). The potential roles of nanobiomaterials in distraction osteogenesis. *Nanomedicine, 11*(1), 1-18. doi:10.1016/j.nano.2014.05.009

Mao, D., Yu, S., Rysz, M., Luo, Y., Yang, F., Li, F., . . . Alvarez, P. J. (2015). Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in two municipal wastewater treatment plants. *Water Res, 85*, 458-466. doi:10.1016/j.watres.2015.09.010

Markoula, S., Sioka, C., Exarchopoulos, T., Chatzistefanidis, D., Kalef-Ezra, J., Fotopoulos, A., & Kyritsis, A. P. (2015). Gender specific association of decreased bone mineral density in patients with epilepsy. *Neurol Neurochir Pol, 49*(4), 267-271. doi:10.1016/j.pjnns.2015.06.007

Marquez-Curtis, L. A., Janowska-Wieczorek, A., McGann, L. E., & Elliott, J. A. (2015). Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. *Cryobiology*. doi:10.1016/j.cryobiol.2015.07.003

Marrucho, I. M., Branco, L. C., & Rebelo, L. P. (2014). Ionic liquids in pharmaceutical applications. *Annu Rev Chem Biomol Eng, 5*, 527-546. doi:10.1146/annurev-chembioeng-060713-040024

Marsh, K. N., Boxall, J. A., & Lichtenthaler, R. (2004). Room temperature ionic liquids and their mixtures - a review (Vol. 219, pp. 93-98): Fluid Phase Equilibria.

Martyn, J. E., & Seddon, K. R. (2000). Ionic liquids. Green solventes for the future (Vol. 72, pp. 1391-1398): Pure and Applied Chemistry.

Masuda, H., Hirose, J., Omata, Y., Tokuyama, N., Yasui, T., Kadono, Y., . . . Tanaka, S. (2014). Anti-apoptotic Bcl-2 family member Mcl-1 regulates cell viability and bone-resorbing activity of osteoclasts. *Bone, 58*, 1-10. doi:10.1016/j.bone.2013.09.020

Matsuo, K., & Irie, N. (2008). Osteoclast-osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys, 473*(2), 201-209. doi:10.1016/j.abb.2008.03.027

Maxhimer, J. B., Bradley, J. P., & Lee, J. C. (2015). Signaling pathways in osteogenesis and osteoclastogenesis: Lessons from cranial sutures and applications to regenerative medicine. *Genes Dis, 2*(1), 57-68.

Mazziotti, G., Canalis, E., & Giustina, A. (2010). Drug-induced osteoporosis: mechanisms and clinical implications. *Am J Med, 123*(10), 877-884. doi:10.1016/j.amjmed.2010.02.028

Meloa, C. I., Bogel-Łukasikb, R., Pontea, M. N., & Bogel-Łukasika, E. (2013). Ammonium ionic liquids as green solvents for drugs (Vol. 338, pp. 209-216): Fluid Phase Equilibria.

Milovanovic, P., Rakocevic, Z., Djonic, D., Zivkovic, V., Hahn, M., Nikolic, S., . . . Djuric, M. (2014). Nano-structural, compositional and micro-architectural signs of cortical bone fragility at the superolateral femoral neck in elderly hip fracture patients vs. healthy aged controls. *Exp Gerontol, 55*, 19-28. doi:10.1016/j.exger.2014.03.001

Moniruzzaman, M., & Goto, M. (2011). Ionic Liquids: Future Solvents and Reagents for Pharmaceuticals (Vol. 44, pp. 370-381): Journal of Chemical Engineering of Japan.

Monroe, D. G., McGee-Lawrence, M. E., Oursler, M. J., & Westendorf, J. J. (2012). Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. *Gene, 492*(1), 1-18. doi:10.1016/j.gene.2011.10.044

Montagner, F., Jacinto, R. C., Correa Signoretti, F. G., Scheffer de Mattos, V., Grecca, F. S., & Gomes, B. P. (2014). Beta-lactamic resistance profiles in Porphyromonas, Prevotella, and Parvimonas species isolated from acute endodontic infections. *J Endod, 40*(3), 339-344. doi:10.1016/j.joen.2013.10.037

Nakamura, H., Nakashima, T., Hayashi, M., Izawa, N., Yasui, T., Aburatani, H., . . . Takayanagi, H. (2014). Global epigenomic analysis indicates protocadherin-7 activates osteoclastogenesis by promoting cell-cell fusion. *Biochem Biophys Res Commun, 455*(3-4), 305-311. doi:10.1016/j.bbrc.2014.11.009

Nakamura, T., Kukita, T., Shobuike, T., Nagata, K., Wu, Z., Ogawa, K., . . . Kukita, A. (2005). Inhibition of histone deacetylase suppresses osteoclastogenesis and bone destruction by inducing IFN-beta production. *J Immunol, 175*(9), 5809-5816.

Nanau, R. M., & Neuman, M. G. (2013). Adverse drug reactions induced by valproic acid. *Clin Biochem, 46*(15), 1323-1338. doi:10.1016/j.clinbiochem.2013.06.012

Naung, N. Y., Suttapreyasri, S., Kamolmatyakul, S., & Nuntanaranont, T. (2014). Comparative study of different centrifugation protocols for a density gradient separation media in isolation of osteoprogenitors from bone marrow aspirate. *J Oral Biol Craniofac Res, 4*(3), 160-168. doi:10.1016/j.jobcr.2014.11.004

Neto, B. A. D., & Spencer, J. (2012). The impressive chemistry, applications and features of ionic liquids: properties, catalysis & catalysts and trends (Vol. 23, pp. 987-1007): Journal of the Brazilian Chemical Society

Niedermeyer, H., Hallett, J. P., Villar-Garcia, I. J., Hunt, P. A., & Welton, T. (2012). Mixtures of ionic liquids (Vol. 41, pp. 7780-7802): Chemical Society Reviews - The Royal Society of Chemistry.

O'Brien, C. A., Nakashima, T., & Takayanagi, H. (2013). Osteocyte control of osteoclastogenesis. *Bone, 54*(2), 258-263. doi:10.1016/j.bone.2012.08.121

Omata, Y., Yasui, T., Hirose, J., Izawa, N., Imai, Y., Matsumoto, T., . . . Tanaka, S. (2015). Genomewide comprehensive analysis reveals critical cooperation between Smad and c-Fos in RANKL-induced osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res, 30*(5), 869-877. doi:10.1002/jbmr.2418

Ono, A., Tsukamoto, G., Nagatsuka, H., Yoshihama, Y., Rivera, R. S., Katsurano, M., . . . Sasaki, A. (2007). An immunohistochemical evaluation of BMP-2, -4, osteopontin, osteocalcin and PCNA between ossifying fibromas of the jaws and peripheral cemento-ossifying fibromas on the gingiva. *Oral Oncol, 43*(4), 339-344. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.03.017

Paradis, F. H., & Hales, B. F. (2013). Exposure to valproic acid inhibits chondrogenesis and osteogenesis in mid-organogenesis mouse limbs. *Toxicol Sci, 131*(1), 234-241. doi:10.1093/toxsci/kfs292

Park, C. K., Lee, Y., Kim, K. H., Lee, Z. H., Joo, M., & Kim, H. H. (2014). Nrf2 is a novel regulator of bone acquisition. *Bone, 63*, 36-46. doi:10.1016/j.bone.2014.01.025

Park, S. Y., Lee, S. W., Kim, H. Y., Lee, S. Y., Lee, W. S., Hong, K. W., & Kim, C. D. (2015). Suppression of RANKL-induced osteoclast differentiation by cilostazol via SIRT1-induced RANK inhibition. *Biochim Biophys Acta, 1852*(10 Pt A), 2137-2144. doi:10.1016/j.bbadis.2015.07.007

Peña, C., Gudiol, C., Calatayud, L., Tubau, F., Domínguez, M. A., Pujol, M., . . . Gudiol, F. (2008). Infections due to Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamase among hospitalised patients: factors influencing mortality. *J Hosp Infect, 68*(2), 116-122. doi:10.1016/j.jhin.2007.11.012

Pham, T. P., Cho, C. W., & Yun, Y. S. (2010). Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. *Water Res, 44*(2), 352-372. doi:10.1016/j.watres.2009.09.030

Pinto, P. C., Costa, S. P., Lima, J. L., & Saraiva, M. L. (2012). Automated high-throughput Vibrio fischeri assay for (eco)toxicity screening: application to ionic liquids. *Ecotoxicol Environ Saf, 80*, 97-102. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.02.013

Pollet, P., Davey, E. A., Ureña-Benavides, E. E., Eckert, C. A., & Liotta, C. L. (2014). Solvents for sustainable chemical processes (pp. 1034-1055): The Royal Society of Chemistry - Green Chemistry.

Pollock, N. K. (2015). Childhood obesity, bone development, and cardiometabolic risk factors. *Mol Cell Endocrinol, 410*, 52-63. doi:10.1016/j.mce.2015.03.016

Quijano, G., Couvert, A., & Amrane, A. (2010). Ionic liquids: applications and future trends in bioreactor technology. *Bioresour Technol, 101*(23), 8923-8930. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.161

Rachner, T. D., Khosla, S., & Hofbauer, L. C. (2011). Osteoporosis: now and the future. *Lancet, 377*(9773), 1276-1287. doi:10.1016/S0140-6736(10)62349-5

Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *J Biol Chem, 285*(33), 25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087

Rahman, M. S., Akhtar, N., Jamil, H. M., Banik, R. S., & Asaduzzaman, S. M. (2015). TGF-β/BMP signaling and other molecular events: regulation of osteoblastogenesis and bone formation. *Bone Res, 3*, 15005. doi:10.1038/boneres.2015.5

Roy, K., Das, R. N., & Popelier, P. L. A. (2014). Quantitative structure–activity relationship for toxicity of ionic liquids to *Daphnia magna*: Aromaticity *vs*. lipophilicity (Vol. 112, pp. 120-127): Chemosphere.

Rôças, I. N., & Siqueira, J. F. (2013). Detection of antibiotic resistance genes in samples from acute and chronic endodontic infections and after treatment. *Arch Oral Biol, 58*(9), 1123-1128. doi:10.1016/j.archoralbio.2013.03.010

Rönnerstrand, B., & Andersson Sundell, K. (2015). Trust, reciprocity and collective action to fight antibiotic resistance. An experimental approach. *Soc Sci Med, 142*, 249-255. doi:10.1016/j.socscimed.2015.08.032

Salgado, A. J., Coutinho, O. P., & Reis, R. L. (2004). Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci, 4*(8), 743-765. doi:10.1002/mabi.200400026

Santos, A. D., Morais, A. R. C., C. Melo, C., Bogel-Lukasik, R., & Bogel-Lukasik, E. (2013). Solubility of pharmaceutical compounds in ionic liquids (Vol. 356, pp. 18-29). Fluid Phase Equilibria: Fluid Phase Equilibria.

Sapir-Koren, R., & Livshits, G. (2014). Bone mineralization is regulated by signaling cross talk between molecular factors of local and systemic origin: the role of fibroblast growth factor 23. *Biofactors, 40*(6), 555-568. doi:10.1002/biof.1186

Saunders, M. M., & Lee, J. S. (2008). The influence of mechanical environment on bone healing and distraction osteogenesis. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 16*(2), 147-158. doi:10.1016/j.cxom.2008.04.006

Schmeisser, M., & van Eldik, R. (2014). Elucidation of inorganic reaction mechanisms in ionic liquids: the important role of solvent donor and acceptor properties. *Dalton Trans*. doi:10.1039/c4dt01239a

Sekhon, B. (2011). Ionic liquids: Pharmaceutical and Biotechnological Applications - review (Vol. 1, pp. 395-411): Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research.

Serin, H. M., Koç, Z. P., Temelli, B., & Esen, İ. (2015). The bone mineral content alterations in pediatric patients medicated with levetiracetam, valproic acid, and carbamazepine. *Epilepsy Behav, 51*, 221-224. doi:10.1016/j.yebeh.2015.06.025

Shamshina, J. L., & Rogers, R. D. (2014). Overcoming the problems of solid state drug formulations with ionic liquids. *Ther Deliv, 5*(5), 489-491. doi:10.4155/tde.14.28

Shen, C. L., Yeh, J. K., Cao, J. J., Chyu, M. C., & Wang, J. S. (2011). Green tea and bone health: Evidence from laboratory studies. *Pharmacol Res, 64*(2), 155-161. doi:10.1016/j.phrs.2011.03.012

Sims, N. A., & Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol, 19*(5), 444-451. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.016

Sims, N. A., & Vrahnas, C. (2014). Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys, 561*, 22-28. doi:10.1016/j.abb.2014.05.015

Singh, A., Mehdi, A. A., Srivastava, R. N., & Verma, N. S. (2012). Immunoregulation of bone remodelling. *Int J Crit Illn Inj Sci, 2*(2), 75-81. doi:10.4103/2229-5151.97271

Singh, M. P., Singh, R. K., & Chandra, S. (2014). Ionic liquids confined in porous matrices: Physicochemical properties and applications (Vol. 64, pp. 73-120): Progress in Materials Science.

Singhal, D., & Curatolo, W. (2004). Drug polymorphism and dosage form design: a practical perspective. *Adv Drug Deliv Rev, 56*(3), 335-347. doi:10.1016/j.addr.2003.10.008

Sinnesael, M., Jardi, F., Deboel, L., Laurent, M. R., Dubois, V., Zajac, J. D., . . . Vanderschueren, D. (2015). The androgen receptor has no direct antiresorptive actions in mouse osteoclasts. *Mol Cell Endocrinol, 411*, 198-206. doi:10.1016/j.mce.2015.04.030

Smiglak, M., Pringle, J. M., Lu, X., Han, L., Zhang, S., Gao, H., . . . Rogers, R. D. (2014). Ionic liquids for energy, materials, and medicine. *Chem Commun (Camb), 50*(66), 9228-9250. doi:10.1039/c4cc02021a

Sowmiah, S., Srinivasadesikan, V., Tseng, M., & Chu, Y. (2009). On the Chemical Stabilities of Ionic Liquids (Vol. 14, pp. 3780-3813): Molecules.

Stoimenovski, J., MacFarlane, D. R., Bica, K., & Rogers, R. D. (2010). Crystalline vs. ionic liquid salt forms of active pharmaceutical ingredients: a position paper. *Pharm Res, 27*(4), 521-526. doi:10.1007/s11095-009-0030-0

Sun, X., Su, J., Bao, J., Peng, T., Zhang, L., Zhang, Y., . . . Zhou, X. (2012). Cytokine combination therapy prediction for bone remodeling in tissue engineering based on the intracellular signaling pathway. *Biomaterials, 33*(33), 8265-8276. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.041

Suzuki, S., Horinouchi, T., & Furusawa, C. (2015). Suppression of antibiotic resistance acquisition by combined use of antibiotics. *J Biosci Bioeng, 120*(4), 467-469. doi:10.1016/j.jbiosc.2015.02.003

Swales, C., & Sabokbar, A. (2014). Cellular and molecular mechanisms of bone damage and repair in inflammatory arthritis. *Drug Discov Today, 19*(8), 1178-1185. doi:10.1016/j.drudis.2014.06.025

Sánchez-Duffhues, G., Hiepen, C., Knaus, P., & Ten Dijke, P. (2015). Bone morphogenetic protein signaling in bone homeostasis. *Bone*. doi:10.1016/j.bone.2015.05.025

Søe, K., Hobolt-Pedersen, A. S., & Delaisse, J. M. (2015). The elementary fusion modalities of osteoclasts. *Bone, 73*, 181-189. doi:10.1016/j.bone.2014.12.010

Tateishi-Karimata, H., & Sugimoto, N. (2014). Structure, stability and behaviour of nucleic acids in ionic liquids. *Nucleic Acids Res, 42*(14), 8831-8844. doi:10.1093/nar/gku499

Thirunavukkarasu, K., Halladay, D. L., Miles, R. R., Yang, X., Galvin, R. J., Chandrasekhar, S., . . . Onyia, J. E. (2000). The osteoblast-specific transcription

factor Cbfa1 contributes to the expression of osteoprotegerin, a potent inhibitor of osteoclast differentiation and function. *J Biol Chem, 275*(33), 25163-25172. doi:10.1074/jbc.M000322200

Thummuri, D., Jeengar, M. K., Shrivastava, S., Nemani, H., Ramavat, R. N., Chaudhari, P., & Naidu, V. G. (2015). Thymoquinone prevents RANKL-induced osteoclastogenesis activation and osteolysis in an in vivo model of inflammation by suppressing NF-KB and MAPK Signalling. *Pharmacol Res, 99*, 63-73. doi:10.1016/j.phrs.2015.05.006

Triantafyllou, N., Lambrinoudaki, I., Armeni, E., Evangelopoulos, E. M., Boufidou, F., Antoniou, A., & Tsivgoulis, G. (2010). Effect of long-term valproate monotherapy on bone mineral density in adults with epilepsy. *J Neurol Sci, 290*(1-2), 131-134. doi:10.1016/j.jns.2009.12.015

Valerio, M. S., Herbert, B. A., Griffin, A. C., Wan, Z., Hill, E. G., & Kirkwood, K. L. (2014). MKP-1 signaling events are required for early osteoclastogenesis in lineage defined progenitor populations by disrupting RANKL-induced NFATc1 nuclear translocation. *Bone, 60*, 16-25. doi:10.1016/j.bone.2013.11.012

Valsamis, H. A., Arora, S. K., Labban, B., & McFarlane, S. I. (2006). Antiepileptic drugs and bone metabolism. *Nutr Metab (Lond), 3*, 36. doi:10.1186/1743-7075-3-36

Verrotti, A., Agostinelli, S., Coppola, G., Parisi, P., & Chiarelli, F. (2010). A 12-month longitudinal study of calcium metabolism and bone turnover during valproate monotherapy. *Eur J Neurol, 17*(2), 232-237. doi:10.1111/j.1468-1331.2009.02773.x

Verrotti, A., Coppola, G., Parisi, P., Mohn, A., & Chiarelli, F. (2010). Bone and calcium metabolism and antiepileptic drugs. *Clin Neurol Neurosurg, 112*(1), 1-10. doi:10.1016/j.clineuro.2009.10.011

Viboud, S., Papaiconomou, N., Cortesi, A., Chatel, G., Draye, M., & Fontvieille, D. (2012). Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on Vibrio fischeri: A systematic study. *J Hazard Mater, 215-216*, 40-48. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.02.019

Vranakis, I., Goniotakis, I., Psaroulaki, A., Sandalakis, V., Tselentis, Y., Gevaert, K., & Tsiotis, G. (2014). Proteome studies of bacterial antibiotic resistance mechanisms. *J Proteomics, 97*, 88-99. doi:10.1016/j.jprot.2013.10.027

Vrtačnik, P., Marc, J., & Ostanek, B. (2014). Epigenetic mechanisms in bone. *Clin Chem Lab Med, 52*(5), 589-608. doi:10.1515/cclm-2013-0770

Walmsley, G. G., McArdle, A., Tevlin, R., Momeni, A., Atashroo, D., Hu, M. S., . . . Wan, D. C. (2015). Nanotechnology in bone tissue engineering. *Nanomedicine, 11*(5), 1253-1263. doi:10.1016/j.nano.2015.02.013

Walsh, N. C., Reinwald, S., Manning, C. A., Condon, K. W., Iwata, K., Burr, D. B., & Gravallese, E. M. (2009). Osteoblast function is compromised at sites of focal bone erosion in inflammatory arthritis. *J Bone Miner Res, 24*(9), 1572-1585. doi:10.1359/jbmr.090320

Wang, C. K., Yu, X. D., Li, Q., Xie, G., & Teng, Y. (2013). Chloroquine and valproic acid combined treatment in vitro has enhanced cytotoxicity in an osteosarcoma cell line. *Asian Pac J Cancer Prev, 14*(8), 4651-4654.

Weller, M. (2013). Are we ready for a randomized trial of valproic acid in newly diagnosed glioblastoma? *Neuro Oncol, 15*(7), 809-810. doi:10.1093/neuonc/not095

WHO. (2011). DEFINITION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENT (pp. 1-4): World Health Organization.

Wilkes, J. S. (2004). Properties of ionic liquid solventes for catalysis (Vol. 214, pp. 11-17): Journal of Molecular Catalysis.

Williams, H. D., Sahbaz, Y., Ford, L., Nguyen, T. H., Scammells, P. J., & Porter, C. J. (2014). Ionic liquids provide unique opportunities for oral drug delivery: structure optimization and in vivo evidence of utility. *Chem Commun (Camb), 50*(14), 1688-1690. doi:10.1039/c3cc48650h

Wongdee, K., Riengrojpitak, S., Krishnamra, N., & Charoenphandhu, N. (2010). Claudin expression in the bone-lining cells of female rats exposed to long-standing acidemia. *Exp Mol Pathol, 88*(2), 305-310. doi:10.1016/j.yexmp.2009.12.005

Ximenes, J. C., de Oliveira Gonçalves, D., Siqueira, R. M., Neves, K. R., Santos Cerqueira, G., Correia, A. O., . . . Viana, G. S. (2013). Valproic acid: an anticonvulsant drug with potent antinociceptive and anti-inflammatory properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 386*(7), 575-587. doi:10.1007/s00210-013-0853-4

Yavropoulou, M. P., & Yovos, J. G. (2008). Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. *J Musculoskelet Neuronal Interact, 8*(3), 204-216.

Yuan, F. L., Xu, R. S., Jiang, D. L., He, X. L., Su, Q., Jin, C., & Li, X. (2015). Leonurine hydrochloride inhibits osteoclastogenesis and prevents osteoporosis associated with estrogen deficiency by inhibiting the NF-κB and PI3K/Akt signaling pathways. *Bone, 75*, 128-137. doi:10.1016/j.bone.2015.02.017

Zhang, R., Oyajobi, B. O., Harris, S. E., Chen, D., Tsao, C., Deng, H. W., & Zhao, M. (2013). Wnt/β-catenin signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone, 52*(1), 145-156. doi:10.1016/j.bone.2012.09.029

Zhang, S., Sun, N., He, X., Lu, X., & Zhang, X. (2006). Physical Properties of Ionic Liquids: Database and Evaluation (Vol. 35, pp. 1475-1517): The Journal of PhysicalChemistry.

Zhang, Y., Shao, J., Wang, Z., Yang, T., Liu, S., Liu, Y., . . . Ye, W. (2015). Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPARgamma. *Gene, 557*(2), 209-214. doi:10.1016/j.gene.2014.12.039

Zhang, Y., Zheng, Y. X., Zhu, J. M., Zhang, J. M., & Zheng, Z. (2015). Effects of antiepileptic drugs on bone mineral density and bone metabolism in children: a meta-analysis. *J Zhejiang Univ Sci B, 16*(7), 611-621. doi:10.1631/jzus.B1500021

Zheng, Q., Liu, W., Liu, Z., Zhao, H., Han, X., & Zhao, M. (2014). Valproic acid protects septic mice from renal injury by reducing the inflammatory response. *J Surg Res*. doi:10.1016/j.jss.2014.05.030