

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 28/03/2024.



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



Iolanda Augusta Fernandes de Matos

Efeito biológicos da Chalcona T4 na osteoclastogênese: estudo in vitro

Araraquara

2022



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



Iolanda Augusta Fernandes de Matos

Efeito biológicos da Chalcona T4 na osteoclastogênese: estudo in vitro

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

Orientador: Prof. ^a, Dr. ^a Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

Araraquara

2022

M433e Matos, Iolanda Augusta Fernandes de
Efeitos biológicos da Chalcona T4 na osteoclastogênese :
estudo in vitro / Iolanda Augusta Fernandes de Matos. --
Araraquara, 2022
48 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
(Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara
Orientadora: Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

1. Chalcona. 2. Osteoclastos. 3. Células RAW 264.7. 4.
Peptídeos e proteínas de sinalização intracelular. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

Iolanda Augusta Fernandes de Matos

Efeitos biológicos da Chalcona T4 na osteoclastogênese: estudo in vitro.

Comissão julgadora

Dissertação para obtenção do grau de mestre em odontologia

Presidente e orientadora: Prof.^a Dr.^a Morgana Rodrigues Guimarães Stabili

2º Examinador: Prof.^a Dr.^a Sabrina Garcia de Aquino

3º Examinador: Prof.^a Dr.^a Gisele Faria

Araraquara, 28 de março de 2022

DADOS CURRICULARES

Iolanda Augusta Fernandes de Matos

NASCIMENTO: 20 de agosto de 1987– Uberaba – Minas Gerais

FILIAÇÃO: José Fernando de Matos
Sueli Fernandes da Silva

2014/2019 Graduação em Odontologia
Departamento de Odontologia – UFRN

2020/2022 Pós-Graduação em Periodontia
Nível de Mestrado
Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP

O mestrado é uma curta viagem em que agregamos o maior número de informações e conhecimentos. Apesar de mergulharmos individualmente no processo, percebemos que cada braçada só é possível ou mais rápida, por termos pessoas e instituições colaborando para que todo conhecimento seja conquistado, por isso dedico.

Aos meu pais **José Fernando** e **Sueli Fernandes**, obrigada por me insentivarem e colaborarem para que eu pudesse chegar até aqui, mostrando o real valor da vida.

A minhas irmãs **Lorena Augusta** e **Maria Eduarda**, por serem minhas companheiras de vida, me entenderem e tornarem meus dias mais suaves e divertidos.

Aos meus **Tios Fábio Lúcio** e **Maria da Conceição**, por me acompanharem em todo esse caminho que é a vida

Às amigas **Mariely Godoy** e **Vitória Bonan**, por serem meu apoio, técnico científico, e o ombro amigo,

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Araraquara, nas pessoas de sua Diretora, **Prof. Dr. Edson Alves de Campos** e Vice-Diretora, **Profa Dra Patrícia P. Nordi Sasso Garcia**.

À minha orientadora, **Profa Dra Morgana Rodrigues Guimarães Stabili**, por ter me acolhido sem ao menos saber meus defeitos e qualidades. Obrigada por acreditar em mim, pelos incentivos, pelos conhecimentos técnicos e de vida. Referência para todos nós em dedicação, competência, esforço e sorrisos fáceis. Agradeço por me estigar e acreditar que sempre posso ser melhor.

A todos docentes do curso de Pós-Graduação e aos docentes da Disciplina de Periodontia: **Profa Dra Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, Prof. Dr. Elcio Marcantonio Junior, Prof. Dr. Carlos Rossa Junior, Profa. Dra. Daniela Leal Zandim-Barcelos, Prof. Dr. Joni Augusto Cirelli, Profa Dra Rosemary Adriana Chierici Marcantonio, Profa Dra Silvana Regina Perez Orrico**, pela formação e orientação.

A todos os funcionários e amigos da Disciplina de Periodontia: **Isabella e Suleima**, pelo agradável convívio, atenção e dedicação sempre presentes.

A todos os amigos do curso de Pós-Graduação que percorreram comigo esse caminho, em especial, **Laura, Natalie Fernandes e Camyla Nascimento** por serem três pessoas incríveis e dedicadas, sempre me ajudando e ensinando.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, José Alexandre e Cristiano por toda a atenção, gentileza, e extrema paciência para ajudar.

A todos os funcionários da Biblioteca, pela dedicação e colaboração.

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

Matos, IAF de. Efeitos biológicos da Chalcona T4 na osteoclastogênese: estudo in vitro [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

RESUMO

As chalconas são um grupo de compostos fenólicos com inúmeras atividades biológicas e potencial para o tratamento de diversas doenças. Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado a efetividade de derivados chalcônicos naturais e sintéticos no tratamento de doenças inflamatórias como câncer e artrite reumatoide, e em doenças osteolíticas como osteoporose e tumores ósseos. As chalconas podem modular a inflamação e o turnover ósseo através de diferentes mecanismos, incluindo inibição da produção de citocinas, regulação de vias de sinalização intracelular, e modulação da atividade de fatores de transcrição. Corroborando as evidências indicando as propriedades anti-osteolíticas das chalconas, recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou que a chalcona T4, uma novo derivado chalcônico sintético, inibiu a perda óssea inflamatória em um modelo experimental de periodontite em ratos. Apesar dos dados promissores demonstrando o potencial do composto na modulação da reabsorção óssea, informações sobre os mecanismos moleculares envolvidos na ação da chalcona T4 sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos não foram investigados. Considerando que o entendimento dos mecanismos biológicos de um composto pode não apenas aumentar sua segurança farmacológica, como também indicar sua utilização para diferentes doenças que envolvam a modulação de alvos biológicos comuns, o presente estudo avaliou os efeitos da chalcona sobre a osteoclastogênese, e os mecanismos moleculares subjacentes. A diferenciação e atividade de células pré-osteoclásticas (RAW 264.7) foi estimulada por RANKL, e as células tratadas com diferentes concentrações da chalcona T4, em diferentes períodos durante o processo de diferenciação. Os efeitos do composto sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos foram avaliados pela coloração do anel de actina e determinação das áreas de lacunas de reabsorção, respectivamente. A expressão de marcadores gênicos relacionados a osteoclastogênese (Nfatc1, Oscar, Trap, Mmp-9 e Cathepsina k,) foi avaliada por RT-qPCR, e o status de ativação das vias (MAPK, AKT e NF-κB) por western blot. O potencial do composto sobre a diferenciação osteogênica foi investigado utilizando células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), através da formação de nódulos de mineralização (alizarin red). Os resultados mostraram que a chalcona T4 reduziu a diferenciação e atividade dos osteoclastos induzida por RANKL, suprimiu a expressão de Oscar, Trap e Mmp-9, e reduziu a ativação de ERK e AKT, de maneira dose-dependente. A formação de matriz mineralizada também foi estimulada marcadamente pelo composto. Estes resultados nos permitem concluir que a chalcona T4 é capaz de reduzir a osteoclastogênese através de efeitos mediados pela modulação de vias de sinalização intracelular importantes na diferenciação e atividade dos osteoclastos, indicando o potencial do composto no tratamento de doenças osteolíticas.

Palavras – chave: Chalcona. Osteoclastos. Células RAW 264.7. Peptídeos e Proteínas de Sinalização Intracelular.

Matos, IAF de. Biological effect of Chalcone T4 on osteoclastogenesis: in vitro study. [dissertação de mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2022.

ABSTRACT

Chalcones are a group of phenolic compounds with numerous biological activities and potential for the treatment of various diseases. Clinical and preclinical studies have demonstrated the effectiveness of natural and synthetic chalconic derivatives in the treatment of inflammatory diseases such as cancer and rheumatoid arthritis, and in osteolytic diseases such as osteoporosis and bone tumors. Chalcones can modulate inflammation and bone turnover through different mechanisms, including inhibition of cytokine production, regulation of intracellular signaling pathways, and modulation of transcription factor activity. Corroborating evidence indicating the anti-osteolytic properties of chalcones, our research group recently demonstrated that chalcone T4, a novel synthetic chalcone derivative, inhibited inflammatory bone loss in an experimental model of periodontitis in rats. Despite promising data demonstrating the potential of the compound to modulate bone resorption, information on the molecular mechanisms involved in the action of chalcone T4 on osteoclast differentiation and activity has not been investigated. Considering that the understanding of the biological mechanisms of a compound can not only increase its pharmacological safety, but also indicate its use for different diseases that involve the modulation of common biological targets, the present study evaluated the effects of chalcone on osteoclastogenesis, and the mechanisms underlying molecules. The differentiation and activity of pre-osteoclastic cells (RAW 264.7) was stimulated by RANKL, and the cells treated with different concentrations of chalcone T4, at different times during the differentiation process. The effects of the compound on osteoclast differentiation and activity were evaluated by staining the actin ring and determining areas of resorption gaps, respectively. The expression of gene markers related to osteoclastogenesis (Nfatc1, Oscar, Trap, Mmp-9 and Cathepsin k,) was evaluated by RT-qPCR, and the activation status of the pathways (MAPK, AKT and NF-kB) by western blot. The potential of the compound on osteogenic differentiation was investigated using pre-osteoblastic cells (MC3T3-E1), through the formation of mineralization nodules (alizarin red). The results showed that chalcone T4 reduced RANKL-induced osteoclast differentiation and activity, suppressed Oscar, Trap and Mmp-9 expression, and reduced ERK and AKT activation in a dose-dependent manner. The formation of mineralized matrix was also markedly stimulated by the compound. These results allow to conclude that chalcone T4 can reduce osteoclastogenesis through effects mediated by the modulation of intracellular signaling pathways important in osteoclast differentiation and activity, indicating the potential of the compound in the treatment of osteolytic diseases.

Keywords: Chalcone. Osteoclasts. RAW 264.7 Cells. Intracellular Signaling Peptides and Proteins.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Proteína kinase B

AKT1 – Proteína Kinase B

Cfos – Regulador da chave macrófago - osteoclasto

ERK – Proteína kinase regulada por sinal extracelular

IL-6 – Interleucina 6

IKB α – Fator nuclear polipeptídeo Kappa α

JNK – Jun Kinase

LPS – Lipopolissacarídeo

MAPK – Map kinase

MMP-9 – Metalloproteinase 9

MMP-13 – Metalloproteinase 13

NFATC1 - Fator nuclear células T ativadas – citoplasmático 1

NF-K β – Fator nuclear Kappa B

OPG – Osteoprotegerina

OSCAR – Receptor ligado a osteoclasto, regulador da diferenciação de osteoclastos

PI3K – Fosfoinosítídeo 3-quinase

PI3K-AKT

RANK-L – Ligante RANK

RAW-267.4 – Macrófagos murinos

RNA – Ácido ribonucleico

TRAF6 – Receptor associado ao fator 6

TRAP – Fosfatase resistente ao tartarato

TNF- α – Fator de necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3 PUBLICAÇÃO	17
4 CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A	43
ANEXO A	48

1 INTRODUÇÃO

Doenças ósseas, causadas pela perda ou prejuízo na qualidade do tecido ósseo, tem se tornado uma dos maiores problemas de saúde da população adulta¹, e estão relacionadas principalmente com a formação e atividade aumentada de osteoclastos.

Os osteoclastos são células gigantes multinucleadas, originadas de precursores hematopoiéticos cujo processo de diferenciação envolve uma série de etapas, tais como a diferenciação de células fosfatase ácida tartarato-resistentes (TRAP), fusão para formação de células multinucleadas, ativação da reabsorção óssea e apoptose espontânea². Este processo de diferenciação é induzido fundamentalmente por RANKL, que media a osteoclastogênese através da sua ligação com o receptor RANK presente nas células precursoras. A ligação de RANKL ao seu receptor RANK induz uma cascata de sinalização que envolve o recrutamento de TRAF6 e de várias vias downstream, tais como NF- κ B, MAPKs (p38 MAPK, ERK e JNK)³, bem como ativação de AP-1 e o eixo Src/PI3K/Akt ^{4,5}. Estas vias de sinalização, por sua vez, levam a ativação de NFATc1 que induz então a expressão de diversos genes como MMP-9, catepsina K, TRAP, entre outros, que estão relacionados com a formação e atividade dos osteoclastos ⁶.

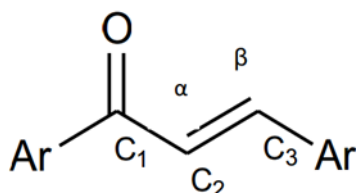
Um aumento desproporcional na diferenciação e atividade destas células é um dos fatores chaves na patogênese de diversas doenças ósseo metabólicas, como artrite reumatoide, osteoporose, Doença de Paget, e as doenças periodontais; e a redução destes eventos celulares através da modulação de citocinas, fatores de transcrição e vias de sinalização intracelular envolvidas na osteoclastogênese, parece ser crítico para o tratamento efetivo dessas patologias.

Nos últimos anos, grande avanço tem sido alcançado na terapêutica destas desordens, como a terapia de reposição do estrógeno ⁷, e o uso dos bifosfonatos e inibidores de citocinas específicas (RANKL, TNF- α , IL-6) ⁸; mas as opções ainda são escassas e estão relacionadas com o aparecimento de efeitos colaterais significantes^{9,10} e, portanto, não têm sido indicados para tratamentos em longo prazo.

Nesse contexto, produtos naturais ou compostos sintéticos baseados em seus análogos naturais têm despertado grande interesse em função de suas atividades biológicas e baixa toxicidade. Estudos têm mostrado que compostos ativos derivados de produtos naturais podem inibir a diferenciação e a função dos osteoclastos, e dessa forma podem representar uma opção terapêutica interessante no tratamento ou prevenção de doenças osteolíticas^{11,12}.

As chalconas, um grupo de substâncias fenólicas derivadas de plantas, estão entre os compostos naturais que têm demonstrado potencial anti-reabsortivo. As chalconas estão presentes abundantemente em plantas comestíveis, principalmente vegetais e frutas, e por possuírem um cromóforo em sua estrutura, apresentam baixo peso molecular e coloração amarelada. A maioria das chalconas naturais são compostos aromáticos polihidroxilados, de baixo molecular, e são considerados os bioprecursores de flavonóides e isoflavonóides de cadeia aberta¹³ (figura 1).

Figura 1 - Estrutura fundamental das Chalconas



Ar: Anel Aromático

Fonte: American Chemical Society

O crescente interesse do meio científico sobre as chalconas se justifica pelo fato destes compostos apresentarem uma ampla variedade de propriedades biológicas (anticancerígena, anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana e anti-reabsortiva)^{14,15} e por sua segurança farmacológica e ausência de toxicidade¹⁶.

Esses compostos possuem uma estrutura molecular simples, permitindo modificações estruturais que podem alterar suas propriedades físico-químicas e aumentar significativamente a potência e duração de seus efeitos biológicos

¹⁶. Com este objetivo, de potencializar as propriedades farmacológicas das chalconas, diversos pesquisadores têm trabalhado na síntese e análise biológica de chalconas sintéticas, que além de apresentarem eficácia muitas vezes superior às chalconas naturais ¹⁶, apresentam um baixo custo laboratorial e não têm sido associadas a efeitos secundários.

As chalconas podem atuar sobre uma série de alvos do processo inflamatório, incluindo fatores de transcrição, moléculas de adesão, de sinalização intracelular e mediadores inflamatórios ^{14,15} que são essenciais no processo de ativação e diferenciação dos osteoclastos, e dessa forma têm-se mostrado uma opção terapêutica interessante em doenças inflamatórias (e.g. doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, sepse) ^{17,18} e doenças osteolíticas (câncer ósseo e osteoporose) ^{19,20}.

Derivados chalcônicos como Xanthohumol, têm demonstrado inibir a formação de células multinucleadas TRAP-positivas e das lacunas de reabsorção óssea induzidas por RANKL em RAW 264.7, mostrando atuar tanto sobre a formação quanto sobre a atividade dos osteoclastos ²¹. Estes efeitos parecem ser mediados pela modulação da expressão gênica de TRAF6, ERK, PI3K, NFATc1 e c-Fos pelo composto, bem como de genes relacionados diretamente com os eventos reabsortivos (cathepsina K e MMP-9) ²².

Outros estudos avaliando o impacto das chalconas sobre a osteoclastogênese têm demonstrado que a modulação de NF- κ B por estes compostos tem um papel crítico neste processo regulatório ²². A ativação da via NF- κ B pode induzir a produção de genes que estimulam a diferenciação dos osteoclastos, favorecem sua sobrevivência e a reabsorção óssea, além de ativar os fatores de transcrição NFATc1 e c-Fos, que são essenciais para a diferenciação de osteoclastos ²². Corroborando esses estudos, autores observaram que Cardamonin e Butein, compostos chalcônicos naturais, reduziram a osteoclastogênese em macrófagos (RAW 264.7) através da supressão de NF- κ B ^{23,24}. RANKL é capaz de estimular a fosforilação e degradação de I κ B α , que uma vez degradado permite a translocação nuclear e ativação de NF- κ B. De acordo com os resultados encontrados, as chalconas inibiram a degradação de I κ B α , inibindo desta forma a ativação de NF- κ B ^{23,24}.

Estudos avaliando a relevância de NF- κ B em doenças osteolíticas têm demonstrado que a ativação deste fator de transcrição não apenas aumenta a

atividade de osteoclastos e a perda óssea, como também atua diminuindo a atividade de osteoblastos e a formação óssea ^{22,25,25}. Embora haja ainda uma escassez de informações sobre os mecanismos de ação de NF-κB sobre os osteoblastos sabe-se que este fator de transcrição pode modular as principais células responsáveis pelo metabolismo ósseo (osteoblastos e osteoclastos), e este conhecimento tem incentivado a comunidade científica na busca por drogas que possam inibir a atividade de NF-κB, como uma alternativa terapêutica para as doenças ósseas inflamatórias.

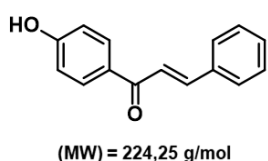
A habilidade das chalconas de modularem a via de sinalização MAPK (p38, ERK, JNK) também parece contribuir com seus efeitos inibitórios sobre a inflamação. As MAPK são um grupo de enzimas responsáveis pela transdução de diversos sinais extracelulares, e promovem a fosforilação dos aminoácidos treonina e serina em múltiplos substratos protéicos, incluindo outras enzimas, fatores de transcrição e proteínas ligantes ao RNA ³⁵. Citocinas e mediadores inflamatórios endógenos, LPS e outros antígenos microbianos e fatores de crescimento são capazes de ativar as MAPKs ³⁵. Além de exercerem papéis relevantes no desenvolvimento e homeostasia, um grande número de evidências pré-clínicas e clínicas confirmam seu papel crítico na inflamação e resposta imune e, conseqüentemente, no desenvolvimento de doenças inflamatórias ²⁷. Especificamente na osteoclastogênese, as MAPKs são capazes de modular a expressão de NFATc1 e c-Fos induzida por RANKL ^{28,29}, e sua inibição tem demonstrado reduzir a diferenciação e função dos osteoclastos ²⁹. Macrófagos (RAW 264.7) estimulados com RANKL e tratados com Panduratin-A, um derivado chalcônico, apresentaram uma redução na expressão dos fatores de transcrição NFATc1 e c-Fos, bem como da enzima osteoclástica catepsina K, em nível de mRNA e proteína, através da modulação de JNK, ERK e p-38 pela chalcona, indicando o envolvimento das MAPKs nos efeitos inibitórios do composto sobre a osteoclastogênese ³⁰.

Embora não haja evidências mostrando o envolvimento de outras vias de sinalização, como PI3K-AKT, no efeito das chalconas sobre a reabsorção inflamatória, é possível que o composto tenha alguma ação sobre a expressão destas proteínas intracelulares. Akt está diretamente envolvida na regulação da resposta inflamatória, atuando como inibidor da apoptose em neutrófilos ²⁶, macrófagos ³¹ e células dendríticas ²⁴, além de participar em outras funções

biológicas destas células como a migração/quimiotaxia e produção de mediadores inflamatórios. Além disso, existem evidências sugerindo um papel direto de Akt na diferenciação e função de osteoblastos e de um papel indireto na osteoclastogênese. A inibição da expressão gênica de Akt1 estimula a diferenciação de células estromais da medula óssea em osteoblastos, fenômeno associado ao aumento da expressão do fator de transição Runx2. Em animais geneticamente deficientes para Akt1, além da maior diferenciação osteoblástica, observa-se inibição de formação e atividade de osteoclastos, fenômeno correlacionado com a inibição da produção de citocinas RANKL e OPG, pelos osteoclastos ^{32,33}. Desta forma, a ativação de Akt1 pode estar relacionada a menor formação e maior reabsorção óssea, sugerindo que a inibição seletiva de Akt1 pode ser uma estratégia terapêutica para diminuir a perda óssea/favorecer o ganho ósseo.

Baseados nas informações do efeito inibitório das chalconas sobre a reabsorção óssea inflamatória, nosso grupo de pesquisa avaliou as possíveis atividades anti-osteoclásticas e anti-inflamatórias de novos derivados chalcônicos com potencial na modulação da periodontite. Estas substâncias foram sintetizadas pelo laboratório do colaborador deste trabalho, e suas propriedades biológicas foram analisadas pela primeira vez pelo nosso grupo. Entre as chalconas avaliadas nos experimentos piloto (dados não apresentados), a Chalcona T4 destacou-se por apresentar o melhor efeito dose-resposta sobre os genes avaliados in vitro (maior redução na expressão dos genes pró-inflamatórios, obtidos com a menor concentração do derivado chalcônico), e potencial em reduzir a diferenciação osteoclástica. A estrutura química da chalcona T4 está representada na figura 2.

Figura 2 - Estrutura química da Chalcona T4



Fonte: Arquivo pessoal do Prof. Dr. Luis Octavio.

Os resultados encontrados corroboram aqueles citados na literatura, demonstrando o potencial anti-inflamatório e o efeito inibitório das chalconas sobre a osteoclastogênese. A chalcona T4 foi capaz de reduzir significativamente a expressão dos genes inflamatórios, mesmo quando utilizada em concentrações tão baixas quanto 1 μ M; e quando utilizada em concentrações maiores (10 μ M) reduziu a expressão de IL-6 e MMP-13 a níveis inferiores ao controle. Dados de estudos in vivo do nosso grupo, demonstraram que a Chalcona T4 também reduziu a reabsorção in vivo, em modelo de doença periodontal experimental em ratos ³⁴. Além do efeito supressivo sobre a expressão dos genes pró-inflamatórios, a chalcona T4 destaca-se entre outros compostos chalcônicos pela potência dos seus efeitos, uma vez que mais de 50% dos níveis de mRNA dos genes avaliados foram reduzidos após tratamento das células com 1 μ M do composto. Esses dados são superiores a outros encontrados na literatura, em que diferentes derivados chalcônicos foram avaliados sobre a expressão gênica de mediadores inflamatórios ^{32,33}. Esses resultados indicam o potencial anti-reabsortivo da Chalcona T4 e tem nos motivado a investigar os possíveis mecanismos de ação do composto, uma vez que compreensão de sua atividade biológica sobre os diferentes mediadores inflamatórios e vias de sinalização intracelular, pode indicar um efeito promissor do composto sobre diversas doenças, especialmente àquelas relacionadas à osteólise inflamatória. Considerando os resultados obtidos até o momento com a chalcona T4, este estudo tem como objetivo investigar os possíveis mecanismos moleculares envolvidos em seus efeitos sobre a osteoclastogênese. A hipótese deste trabalho é que a chalcona T4 é capaz de inibir a diferenciação e atividade dos osteoclastos, através da modulação de mediadores biológicos relevantes no metabolismo ósseo, especialmente através da supressão das vias de sinalização intracelular NF- κ B, MAPKs e PI3K-AKT.

4 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nos permitem concluir que a chalcona T4 é capaz de inibir a diferenciação e atividade de osteoclastos de maneira dose-dependente, através de efeitos mediados pela modulação de vias de sinalização intracelular importantes na osteoclastogênese. Além disso, os resultados também demonstraram que o composto é capaz de favorecer a formação de matriz mineralizada por células pré-osteoblásticas, indicando um potencial osteogênico para a chalcona T4. Coletivamente, estes dados sugerem que a chalcona T4 pode ser uma alternativa terapêutica para doenças osteolíticas.

REFERÊNCIAS

1. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord*. 2010; 11(4): 219–27.
2. Tanaka S, Miyazaki T, Fukuda A, Akiyama T, Kadono Y, Wakeyama H, et al. Molecular mechanism of the life and death of the osteoclast. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Apr; 1068: 180-6.
3. Hotokezaka H, Sakai E, Ohara N, Hotokezaka Y, Gonzales C, Matsuo KI, et al. Molecular analysis of RANKL-independent cell fusion of osteoclast-like cells induced by TNF- α , lipopolysaccharide, or peptidoglycan. *J Cell Biochem*. 2007; 101(1): 122-134.
4. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003; 423(6937): 337-342.
5. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003; 4(8): 638-49.
6. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. *J Bone Miner Res*. 2000;15(8): 1477-1488.
7. Çetinkaya MB, Kökçü A, Yanik FF, Başoğlu T, Malatyalioglu E, Alper T. Comparison of the effects of transdermal estrogen, oral estrogen, and oral estrogen/progestogen therapy on bone mineral density in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab*. 2002; 20(1): 44-48.
8. Verron E, Bouler JM. Is bisphosphonate therapy compromised by the emergence of adverse bone disorders? *Drug Discov Today*. 2014; 19(3): 312-319.
9. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002; 288(3): 321-333.
10. Khosla S, Burr D, Cauley J, Dempster DW, Ebeling PR, Felsenberg D, et al. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: Report of a Task Force of the American Society for Bone and Mineral Research. *J Bone Miner Res*. 2007; 22(10): 1479-1491.
11. Curylofo-Zotti FA, Elburki MS, Oliveira PA, Cerri PS, Santos LA, Lee HM, et al. Differential effects of natural Curcumin and chemically modified curcumin on inflammation and bone resorption in model of experimental periodontitis. *Arch Oral Biol*. 2018; jul; 91: 42-50.

12. An J, Hao D, Zhang Q, Chen B, Zhang R, Wang Y, et al. Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption. *Int Immunopharmacol*. 2016; 36: 118-131.
13. Rudrapal M, Khan J, Dukhyil AAB, Alarousy RMII, Attah EI, Sharma T et al Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. *Molecules*. 2021; 26(23): 7177
14. Hsieh H-K, Tsao L-T, Wang J-P, Lin C-N. Synthesis and Anti-inflammatory Effect of Chalcones. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010;52(2): 163–71.
15. Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. The role of chalcones in suppression of NF- κ B-mediated inflammation and cancer. *International Immunopharmacology*. 2011; 11(3): 295–309.
16. Batovska DI, Todorova IT. Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. *Curr Clin Pharmacol*. 2010; 5(1): 1-29.
17. Chen X, Cai X, Le R, Zhang M, Gu X, Shen F, et al. Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and liver injury by reducing inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 496(2): 245-252
18. Zheng W, Zhang H, Jin Y, Wang Q, Chen L, Feng Z, et al. Butein inhibits IL-1 β induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and slows the progression of osteoarthritis in mice. *Int Immunopharmacol*. 2017; Jan; 42: 1-10
19. Maurya SW, Dev K, Singh KB, Rai R, Siddiqui IR, Singh D, et al. Synthesis and biological evaluation of heterocyclic analogues of pregnenolone as novel antiosteoporotic agents. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017; 15; 27(6): 1390-1396.
20. Silva G, Marins M, Fachin AL, Lee SH, Baek SJ. Anti-cancer activity of transchalcone in osteosarcoma: Involvement of Sp1 and p53. *Mol Carcinog*. 2016; 55(10): 1438-48.
21. Suh KS, Rhee SY, Kim YS, Lee YS, Choi EM. Xanthohumol modulates the expression of osteoclast-specific genes during osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Food Chem Toxicol*. 2013; Dec; 62: 99-106.
22. Ortolan XR, Fenner BP, Mezadri TJ, Tames DR, Corrêa R, de Campos Buzzi F. Osteogenic potential of a chalcone in a critical-size defect in rat calvaria bone. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2014; 42(5): 520–4.
23. Krum SA, Chang J, Miranda-Carboni G, Wang CY. Novel functions for NF κ B: Inhibition of bone formation. *Nat Rev Rheumatol*. 2010; 6(10): 607-11.
24. Sung B, Prasad S, Yadav VR, Gupta SC, Reuter S, Yamamoto N, et al. RANKL Signaling and Osteoclastogenesis Is Negatively Regulated by Cardamonin. *PLoS ONE*. 2013; 17; 8(5): e64118.

25. Sung B, Cho SG, Liu M, Aggarwal BB. Butein, a tetrahydroxychalcone, suppresses cancer-induced osteoclastogenesis through inhibition of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand signaling *Int J Cancer*. 2011; 129(9): 2062–72.
26. Chang J, Wang Z, Tang E, Fan Z, McCauley L, Franceschi R, et al. Inhibition of osteoblastic bone formation by nuclear factor-B. *Nat Med*. 2009; 15(6): 682-9.
27. Ban HS, Suzuki K, Lim SS, Jung SH, Lee S, Ji J, et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced expression of inducible nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- α by 2'-hydroxychalcone derivatives in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2004; 67(8): 1549-57.
28. Karimi-Sales E, Jeddi S, Ghaffari-Nasab A, Salimi M, Alipour MR. Effect of transchalcone on hepatic IL-8 through the regulation of miR-451 in male rats. *Endocr Regul*. 2018; 52(1): 1-5..
29. Mus LM, Denecker G, Speleman F, Roman BI. Vehicle development, pharmacokinetics and toxicity of the anti-invasive agent 4-fluoro-3',4',5'-trimethoxychalcone in rodents. *PLoS One*. 2018; 13(2): e0192548.
30. Elburki MS, Rossa C, Guimarães-Stabili MR, Lee HM, Curylofo-Zotti FA, Johnson F, et al. A Chemically Modified Curcumin (CMC 2.24) Inhibits Nuclear Factor κ B Activation and Inflammatory Bone Loss in Murine Models of LPS-Induced Experimental Periodontitis and Diabetes-Associated Natural Periodontitis. *Inflammation*. 2017; 40(4): 1436–49.
31. Kaneki H, Guo R, Chen D, Yao Z, Schwarz EM, Zhang YE, et al. Tumor necrosis factor promotes Runx2 degradation through up-regulation of Smurf1 and Smurf2 in osteoblasts. *J Biol Chem*. 2006; 281(7): 4326-33.
32. van de Laar L, van den Bosch A, Boonstra A, Binda RS, Buitenhuis M, Janssen HLA, et al. PI3K-PKB hyperactivation augments human plasmacytoid dendritic cell development and function. *Blood*. 2012; 120(25): 4982-91.
33. Yang FC, Chen S, Robling AG, Yu X, Nebesio TD, Yan J, et al. Hyperactivation of p21ras and PI3K cooperate to alter murine and human neurofibromatosis type 1- haploinsufficient osteoclast functions. *Journal of Clinical Investigation*. *J Clin Invest*. 2006; 116(11): 2880-91.
34. Fernandes NAR, Camilli AC, Maldonado LAG, Pacheco CGP, Silva AF, Molon RS, et al. Chalcone T4, a novel chalconic compound, inhibits inflammatory bone resorption in vivo and suppresses osteoclastogenesis in vitro. *J Periodontal Res*. 202; 56(3): 569-578.
35. Kim EK, Choi E-J. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol*. 2015; 89(6): 867-82.