



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 osteoclastos⁶.

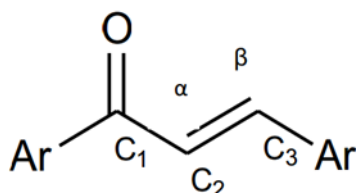
Um aumento desproporcional na diferenciação e atividade destas células é um dos fatores chaves na patogênese de diversas doenças ósseo metabólicas, como artrite reumatoide, osteoporose, Doença de Paget, e as doenças periodontais; e a redução destes eventos celulares através da modulação de citocinas, 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 estrógeno⁷, 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- κ B 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- κ B, como uma alternativa terapêutica para as doenças ósseas inflamatórias.

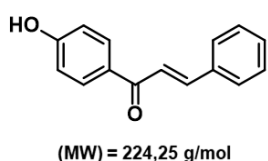
A habilidade das chalconas de modularem a via de sinalização MAPK (p38, ERK, JNK) também parece contribuir com seus efeitos inibitórios sobre a inflamação. As MAPK são um grupo de enzimas responsáveis pela transdução de diversos sinais extracelulares, e promovem a fosforilação dos aminoácidos treonina 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.

2 PROPOSIÇÃO

Investigar os efeitos da chalcona sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos, bem como sua influência sobre mediadores biológicos envolvidos na osteoclastogênese in vitro.

2.1 Objetivos específicos

Determinar os efeitos da chalcona sobre a diferenciação e atividade de células pré-osteoclásticas (RAW 264.7) induzidas por RANKL, através respectivamente, da identificação dos osteoclastos, pela visualização dos núcleos e anel de actina por microscopia de fluorescência, e determinação da área de reabsorção óssea em placas revestidas com fosfato de cálcio inorgânico. E analisados em diferentes períodos (antes e após) em relação ao estímulo com RANKL.

Determinar o efeito da chalcona sobre a expressão gênica de marcadores de reabsorção óssea (Oscar, Trap, Nfatc1, Mmp-9 e Ctsk), e seu impacto sobre a ativação das vias de sinalização (NF- κ B, p38 MAPK, ERK e AKT), por Western Blot.

Investigar o efeito osteogênico da chalcona T4 em células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), através do potencial de formação de nódulos de mineralização óssea.

3 PUBLICAÇÃO*

Chalcona T4 inibe a osteoclastogênese induzida por RANKL modulando ativação de ERK e AKT.

Iolanda Augusta Fernandes de Matos¹, Natalie Ap. Rodrigues Fernandes¹, Giovani Cirelli¹, Mariely Araújo de Godoi¹, Luis Octavio Regasini², Letícia Ribeiro de Assis², Carlos Rossa Junior¹, Morgana Rodrigues Guimarães-Stabili¹

1. Departamento de Diagnóstico e Cirurgia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Araraquara, SP, Brazil.

2. Departamento de Química e Ciências Ambientais, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brazil.

Autora correspondente:

Morgana Rodrigues Guimarães Stabili, DDS, PhD
Department of Diagnosis and Surgery
School of Dentistry at Araraquara – Univ. Estadual Paulista (UNESP)
Rua Humaitá, 1680 – Centro 14801-903 Araraquara – SP BRAZIL
e-mail: morgana.guimaraes@unesp.br
phone: +55 (16) 3301-6374 Fax: +55 (16) 3301-6433

* O artigo segue as normas do periódico *Journal of Periodontal Research* para o qual pretende-se submeter.

Resumo

Justificativa e objetivo: Doenças osteolíticas inflamatórias são causadas pela formação anormal de osteoclastos e reabsorção óssea. Chalconas são compostos fenólicos formados durante a biossíntese dos flavonoides, com atividade anti-inflamatória e antirreabsortiva. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de uma nova chalcona sintética, chalcona T4, sobre a diferenciação e atividade de osteoclastos e os mecanismos moleculares subjacentes.

Material e métodos: A diferenciação e atividade de células pré-osteoclásticas (RAW 264.7) foi estimulada por RANKL, e as células tratadas com diferentes concentrações não citotóxicas da chalcona T4, em diferentes períodos durante a osteoclastogênese. Os efeitos do composto sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos foram avaliados pela coloração do anel de actina e ensaio de atividade, respectivamente. A expressão de marcadores gênicos relacionados a osteoclastogênese (Nfatc1, Oscar, Trap, Mmp-9 e Catepsina k,) foi avaliada por RT-qPCR, e o status de ativação das vias (MAPK, AKT e NF-kB) por western blot. O potencial do composto sobre a diferenciação osteogênica foi investigado utilizando células pré-osteoblásticas (MC3T3-E1), por da análise de formação de nódulos de mineralização (alizarin red).

Resultados: 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.

Conclusão: Chalcona T4 reduziu significativamente a diferenciação e atividade osteoclástica induzida por RANKL modulando a ação de ERK e AKT, e favoreceu a diferenciação osteogênica in vitro, indicando o potencial do composto no tratamento de doenças osteolíticas.

Palavras-chave: Chalcona, Osteoclastogênese, RAW 264.7, vias de sinalização intracelular.

Introdução

A perda óssea está entre os principais problemas associados ao envelhecimento, artrite reumatoide, osteoporose, câncer, periodontite e outras doenças crônicas inflamatórias (1).

Diversos estudos, com objetivo de avançar na terapêutica da reabsorção óssea, têm focado sua atenção nos detalhes moleculares deste mecanismo. A ativação de osteoclastos, células multinucleadas derivadas de células hematopoiéticas, é regulado por vários sinais moleculares desencadeados a partir da ligação de RANK / RANKL. Ativação de TRAF6 induz, subsequentemente, a ativação de fatores de inscrição incluindo c-Fos e NFATc1, proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs), NF- κ B, c-Src, PI3K e Akt (2). NFATc1 ativado pode aumentar a expressão de marcadores específicos da osteoclastogênese, como fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K (CTSK), e metaloproteinase de matriz (MMP)-9, que atuam em vários estágios do desenvolvimento e ativação dos osteoclastos e são capazes de degradar componentes inorgânico e orgânicos do tecido ósseo (3).

Terapias medicamentosas têm sido desenvolvidas para as diversas doenças osteolíticas, e estão clinicamente disponíveis, incluindo drogas antirreabsortivas como os bifosfonatos (4), terapias de reposição hormonal (5), doxiciclina em doses subantimicrobiana (Periostat) (6).e uso de inibidores de genes alvos específicos (e.g. TNF- α , RANKL, esclerotina, catepsina K) (3), entretanto, o uso destes medicamentos em longo prazo tem sido associado ao aparecimento de efeitos adversos, e por isso tem se tornado necessário o desenvolvimento de terapias alternativas que minimizem tais efeitos.

O uso de compostos naturais ou compostos sintéticos baseados em seus protótipos naturais tem despertado grande interesse científico em virtude de suas atividades biológicas e baixa toxicidade. Entre estes compostos, as chalconas, um grupo de substâncias fenólicas precursoras da síntese de flavonóides, tem se destacado por sua capacidade de inibir a osteoclastogênese e a reabsorção óssea, *in vitro* e *in vivo* (7, 8).

As chalconas podem modular diversos alvos do processo inflamatório, incluindo fatores de transcrição, vias de sinalização intracelular e mediadores inflamatórios (9, 10), que são essenciais no processo de ativação e diferenciação dos osteoclastos, e por isso dessa forma têm-se mostrado uma opção terapêutica

interessante em doenças inflamatórias (e.g. doenças inflamatórias intestinais, artrite reumatoide, sepse) (11-15) e osteolíticas (câncer ósseo e osteoporose) (16-18).

Corroborando as evidências indicando as propriedades anti-osteolíticas das chalconas, recentemente nosso grupo de pesquisa demonstrou os efeitos anti-inflamatórios e antirreabsortivos de um nova chalcona sintética, chalcona T4, sobre a inflamação e reabsorção óssea em um modelo experimental de periodontite em ratos (7). A administração sistêmica do composto, utilizado pela primeira vez pelo nosso grupo, reduziu o infiltrado celular nos tecidos gengivais e inibiu a reabsorção óssea alveolar induzida pela ligadura, sem causar efeitos secundários (7). Quando aplicado topicamente no sulco gengival de ratos periodontalmente doentes, a chalcona T4 apresentou resultados semelhantes à aplicação sistêmica, redução do processo inflamatório e da degradação do tecido conjuntivo foram associados a inibição da reabsorção óssea (manuscrito em revisão).

Estes resultados indicam o potencial antirreabsortivo da Chalcona T4 e tem nos motivado a investigar os possíveis mecanismos de ação do composto, uma vez que a compreensão de suas atividades biológicas sobre a osteoclastogênese pode indicar um efeito promissor do composto em outras doenças osteolíticas inflamatórias.

Neste presente estudo, nós investigamos a dinâmica de atuação da chalcona T4 sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos, e os mecanismos moleculares subjacentes, em uma linhagem de macrófagos murinos (RAW 264.7).

Materiais e Métodos

Chalcona T4

A chalcona foi sintetizada pelo Prof. Dr. Luis Octavio Regasini e equipe, no Laboratório de Química Verde e Medicinal, no Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp. A síntese da substância foi realizada por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt, com rendimentos satisfatórios (50–70%). Para a purificação das substâncias utilizou-se técnicas de recristalização e cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna de fase normal (gel de sílica), cromatografia em coluna de fase reversa (octadecilsilano) e cromatografia de permeação em gel (LH-20).

A estrutura do composto foi identificada por espectrometria de massas e técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) (figura 1 suplementar). A pureza da substância foi determinada por análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), exibindo valores iguais ou superiores a 95.0%.

Efeito da Chalcona T4 sobre a diferenciação de osteoclastos – (microscopia de fluorescência)

Foram utilizadas as células precursoras de osteoclastos RAW 264.7. As células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^3$ céls/poço), em placa de 96 poços, e cultivadas em α -MEM suplementado (10% FBS + 1% P/S), na presença de RANKL (100 ng/ml) para diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Diferentes concentrações não citotóxicas da chalcona (1, 2.5, 5 e $10\mu\text{M}$) (figura 2 suplementar), ou veículo (DMSO), foram acrescentados ao meio de cultura em diferentes tempos em relação ao estímulo de diferenciação (adição de RANKL): 30 minutos antes, 48h e 96h após. O meio de cultura contendo o composto e o RANKL foram substituídos em intervalos de 48h, retirando-se 100 μL com o auxílio de uma micropipeta e adicionando o mesmo volume de meio fresco com os tratamentos propostos. As culturas foram observadas diariamente em microscópio invertido até o término do experimento. Ao final do período experimental (6º dia), as células foram fixadas e permeabilizadas (BD Cytotfix/Cytoperm, BD Biosciences). Em seguida, as células foram coradas com $5\mu\text{g/ml}$ de Faloidina conjugada ao fluoróforo (AlexaFluor 488 Phalloidin, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific), por 40 min à temperatura ambiente, e subsequentemente com $2.5\mu\text{g/mL}$ de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 5 min à temperatura ambiente, e visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Evos fl, AMG Micro) na objetiva de 4x. O número de osteoclastos foi quantificado em toda a extensão do poço, sendo considerado osteoclastos células com 3 ou mais núcleos. O experimento foi realizado três vezes em triplicata de maneira independente.

Efeito da Chalcona T4 sobre a atividade de osteoclastos: ensaio de atividade

Para investigarmos o impacto da chalcona T4 sobre a atividade dos osteoclastos, RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços revestidas com fosfato de cálcio sintético (Osteologic Corning Plate, Corning), e o estímulo com

RANKL e tratamento com as diferentes concentrações da chalcona T4 foram realizadas conforme descrito no protocolo anterior, por um período de 6 dias, seguindo as instruções do fabricante. Após o término do período experimental, o sobrenadante foi descartado e adicionado 50 µl de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min. Em seguida, os poços foram lavados com água Milli-Q, e as placas foram deixadas sobre a bancada em temperatura ambiente por 24 horas para completa evaporação da água, e então fotografadas em microscópio invertido com câmera acoplada (Evos fl, AMG Micro) na objetiva de 10x. As áreas de reabsorção óssea foram quantificadas em toda a extensão do poço através do software Image J. Este experimento foi realizado três vezes em triplicata de forma independente.

Avaliação dos efeitos da chalcona T4 sobre a expressão gênica (RT-qPCR)

Células RAW 264.7 foram plaqueadas (3×10^5 cels/poço), em placa de 6 poços, e cultivadas em α -MEM suplementado na presença de RANKL (100 ng/ml) para diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Para investigarmos o efeito do composto sobre a expressão de marcadores relacionados a osteoclastogênese, diferentes concentrações da chalcona foram acrescentadas ao meio de cultura, 30 min previamente ao estímulo com RANKL (100 ng/ml). O meio de cultura contendo o composto e/ou RANKL foi substituído em intervalos de 48h. Ao final 3º e 5º dia foi realizada a extração do RNA total das células com o kit Total RNA Purification (Cellco Biotec), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e pureza das amostras de RNA foram realizadas em espectrofotômetro de nanovolumes (Nanoview Plus, GE Healthcare), e o cDNA sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (High capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystem). A detecção da expressão gênica na amostra foi realizada utilizando o sistema TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; Life Technologies- Califórnia - USA). Foi realizado o PCR para detecção dos genes-alvo de interesse (Nfatc1, Oscar, Trap, Mmp-9 e Ctsk) (figura 3 suplementar) e a expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados, que foram analisados pelo método delta (delta Ct). Este experimento foi realizado três vezes em duplicata de maneira independente. Os períodos de 3 e 5 dias foram selecionados a partir dos resultados de experimento de time course avaliando os períodos de maior expressão dos genes alvos após estímulo com RANKL (dados não apresentados).

Papel da Chalcona na ativação das vias de sinalização intracelular (Western Blot)

Com objetivo de investigar os efeitos da chalcona sobre a fosforilação das vias de sinalização intracelular NF- κ B, p38 e ERK MAPK, e Akt, macrófagos foram plaqueados na concentração de 3×10^5 células/poço com α -MEM suplementado, em placas de 35 mm, e após 24 horas desinduzidas com meio de cultura contendo 0,3% de soro fetal bovino por 6 horas, e então estimulados com RANKL por 10 e 40 minutos, com e sem pré-tratamento (30 min antes) com a chalcona T4 em diferentes concentrações (1, 2.5, 5 ou 10 μ M). Ao final do período experimental, o meio foi aspirado, as placas lavadas com PBS 1x e adicionado RIPA Buffer suplementado com inibidor de fosfatase e protease em cada placa. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad). Para realização do Western Blot foram utilizadas 20 μ g de proteína total por amostra. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários (p-p38 #9211 Cell Signaling, p38 #9212 Cell Signaling, p-Akt #9275 Cell Signaling, Akt #9272 Cell Signaling, p-NF- κ B #3033 Cell Signaling, NF- κ B #sc8008 Santa Cruz, p-ERK #4376 Cell Signaling e ERK #9102 Cell Signaling) overnight. Os resultados foram obtidos pela análise densitométrica das bandas e normalizados através da razão entre a forma fosforilada e não fosforilada da proteína alvo. O experimento foi realizado três vezes em duplicata de maneira independente.

Efeito da chalcona T4 sobre a diferenciação osteogênica

Células pré-osteoblásticas de camundongos (MC3T3-E1) foram plaqueadas em placa de 96 poços, com 3×10^3 células por poços, e cultivadas α -MEM suplementado (10% FBS + 1% P/S), com diferentes concentrações não citotóxicas da chalcona (determinadas em experimentos preliminares (figura 4 suplementar): 1, 2.5, 5 e 10 μ M), ou veículo, (DMSO), por 7, 14 e 21 dias. Após os períodos o meio foi aspirado, e os poços lavados com PBS. Em seguida as células foram fixadas com paraformol a 4% por 60 minutos à 4°C, lavadas com água destilada, e então adicionados 50 μ l da solução de vermelho de alizarin a 2% por 15 minutos. Após remoção do corante, adicionou-se cloreto de cetilpiridínio a 10% por 10 minutos para solubilizar os nódulo de cálcio corados com vermelho de alizarin, e a solução transferida para uma nova placa de 96 poços para realização da leitura em espectrofotômetro a 550nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas utilizando ANOVA com testes post hoc para comparar as diferenças entre os grupos experimentais e controles. A significância estatística foi definida em $p < 0,05$. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes.

Resultados

Chalcona T4 inibe a diferenciação e atividade celular de maneira dose-dependente, em todos os períodos analisados

Para avaliarmos o efeito cinético e uma possível ação dose-resposta da chalcona T4 sobre a diferenciação dos osteoclastos, o composto foi adicionado ao meio de cultura em diferentes momentos em relação ao estímulo com RANKL, e em diferentes concentrações não citotóxicas. Os resultados demonstraram que o estímulo com RANKL induziu a diferenciação dos macrófagos em osteoclastos, dentro do período experimental analisado (6 dias), e que a chalcona T4 inibiu a diferenciação celular de maneira dose-dependente, em todos os períodos analisados (figura 1). Quando adicionada nos períodos iniciais do processo de diferenciação (tempos I e II), a chalcona apresentou resultados mais potentes, sendo capaz de inibir marcadamente a osteoclastogênese mesmo quando utilizada na menor concentração ($1\mu\text{M}$) (figura 1, (I, II)), e suprimiu completamente a diferenciação quando utilizada nas concentrações maiores (5 e $10\mu\text{M}$, tempo I) (figura 1, (I)). Interessantemente, mesmo quando adicionada mais tardiamente (96h após o estímulo com RANKL, tempo III), a chalcona T4 foi capaz de bloquear a osteoclastogênese quando utilizada em concentrações maiores que $1\mu\text{M}$ ($p < 0.05$) (figura 1 (III)).

Paralelamente ao efeitos da chalcona sobre a diferenciação celular, nós avaliamos também a habilidade de chalcona em modular a atividade dos osteoclastos. As áreas de reabsorção óssea foram utilizadas para quantificar a atividade osteoclástica. De acordo com os resultados, o estímulo com RANKL induziu a atividade reabsortiva dos osteoclastos (controle vs. RANKL, $p < 0,05$), como pode ser

visto pelas lacunas de reabsorção nas células estimuladas com RANKL, as quais estavam ausentes no grupo controle (figura 2 (b, I, II, III)). Os dados também demonstraram que concentrações a partir de 2,5 μ M do composto, conseguiram reduzir significativamente a atividade celular quando adicionadas previamente ao estímulo (figura 2, (Ia, b)). Quando o composto foi adicionado após o estímulo indutor (tempos II e III), apenas a maior concentração (10 μ M) inibiu significativamente a atividade reabsortiva dos osteoclastos (figura 2, (II, III)).

Chalcona T4 inibe a expressão de genes pró-inflamatórios e de marcadores da osteoclastogênese, e modula ativação de ERK e AKT

Para elucidar os mecanismos moleculares da chalcona T4 sobre a osteoclastogênese, nós investigamos o efeito do composto sobre a expressão gênica dos marcadores (Nfatc1, Oscar, Trap, Mmp-9 e Catepsina k), e a ativação das vias de sinalização (MAPK, AKT e NF- κ B). De acordo com os resultados, o estímulo com RANKL aumentou a expressão de todos os genes avaliados, e o tratamento com o composto reduziu a expressão de Mmp-9, Catepsina K e Oscar (figura 3), de maneira dose-dependente, em ambos os períodos analisados. Os níveis transcritos de Trap foram modulados pelo composto apenas no 5º dia após estímulo inicial com RANKL, e a expressão de Nfatc1 não foi modulada pela chalcona em nenhum dos períodos analisados (figura 3).

Os resultados da análise densitométrica das bandas de western blot (figura 4), indicaram que o estímulo com RANKL ativou as vias de sinalização avaliadas. O tratamento das células com as maiores concentrações da chalcona T4, reduziu a ativação de ERK (10 μ M), e modulou negativamente a ativação de AKT (5 μ M e 10 μ M), 10 e 40 minutos, respectivamente, após o estímulo com RANKL (figura 4aI, 4bII).

Chalcona T4 estimula a formação de matriz mineralizada por osteoblastos

A manutenção da remodelação óssea requer um delicado equilíbrio entre a síntese óssea pelos osteoblastos e a reabsorção óssea pelos osteoclastos. Nós exploramos os efeitos anti-osteolíticos específicos da chalcona T4, avaliando também seu potencial na formação de nódulos mineralizados, utilizando a linhagem celular pré-osteoblástica MC3T3-E1. O ensaio mostrou que a chalcona T4 aumentou

a atividade de mineralização no 21º dia de diferenciação, em concentrações a partir de 2,5µM (figura 5).

Discussão

Chalconas naturais ou compostos chalcônicos sintéticos baseados em seus análogos naturais têm demonstrado inúmeras atividades biológicas, incluindo ação anti-inflamatória e anti-reabsortiva. Corroborando este dados, estudos recentes do nosso grupo demonstraram o efeito protetor da chalcona T4, uma nova chalcona sintética, sobre a reabsorção óssea inflamatória em um modelo de periodontite experimental em ratos (7), entretanto, os mecanismos moleculares envolvidos na ação do composto sobre a osteoclastogênese ainda não foi explorado. Considerando que este conhecimento pode indicar o potencial do composto na terapêutica de diversas doenças osteolíticas inflamatórias, no presente estudo, nós investigamos os efeitos da chalcona T4 sobre a diferenciação e atividades de osteoclastos, e seu efeito sobre a expressão de mediadores pró-inflamatórios e marcados da osteoclastogênese, bem como sobre a ativação de vias de sinalização fundamentais na reabsorção óssea.

Diversos estudos têm mostrado que RANKL tem um papel indispensável na indução da proliferação e diferenciação de células precursoras de osteoclastos em osteoclastos maduros (19). A ligação de RANKL ao seu receptor RANK induz uma cascata de sinalização que envolve o recrutamento do fator 6 associado ao receptor TNF (TRAF6) e de várias vias *downstream*, tais como do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-κB), proteína-quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (incluindo p38 MAPK, quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e quinase c-Jun N-terminal (JNK) (10), bem como ativação da proteína ativadora-1 (AP-1) e o eixo Src/PI3K/Akt (4, 5). Estas vias de sinalização, por sua vez, levam a ativação do fator nuclear das células T ativadas (NFATc1) que induz então a expressão de diversos genes como MMP-9, CTSK, TRAP, OSCAR, entre outros, que estão relacionados com a formação e atividade dos osteoclastos (11).

Nossos resultados demonstraram que a chalcona T4 inibiu a diferenciação das células precursoras em osteoclastos, e reduziu marcadamente a atividade reabsortiva destas células, mesmo quando adicionada nos estágios mais tardios da osteoclastogênese. Estes resultados foram associados a redução da expressão de marcadores relacionados à diferenciação e atividade dos osteoclastos.

Para termos um *insight* sobre as vias moleculares responsáveis pelo efeito anti-osteoclastogênico da chalcona T4, nós investigamos a ação do composto sobre a ativação das vias MAPK, NF- κ B e AKT. Diversas evidências têm demonstrado a implicação de membros da família MAPK na diferenciação de osteoclastos induzida por RANKL. Com o estímulo de RANKL, ERK e p38 são ativados. Estudos têm indicado que ERK é crucial para sobrevivência de osteoclastos, mantendo a polaridade celular durante o processo de diferenciação, e p38 está envolvido no processo de diferenciação destas células (20, 21). Além das MAPK, a via de sinalização AKT parece ter um papel indireto na osteoclastogênese, além de estimular diretamente a diferenciação e função de osteoblastos. Animais geneticamente deficientes para Akt1 apresentaram uma inibição na formação e atividade de osteoclastos, fenômeno correlacionado com a inibição da produção de citocinas RANKL e OPG, pelos osteoclastos (22, 23). Nossos resultados demonstraram que a chalcona T4 reduziu a ativação de ERK e AKT, o que pode estar associado aos efeitos inibitórios do composto sobre a diferenciação e atividade dos osteoclastos.

Diversos estudos têm demonstrado que 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 fatores de transcrição que são essenciais para a diferenciação de osteoclastos (23). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstrando inibição da osteoclastogênese pelas chalconas, têm demonstrado que a modulação de NF- κ B por estes compostos tem um papel crítico neste processo regulatório (24). Entretanto, a despeito da importância de NF- κ B para a diferenciação de osteoclastos, chalcona T4 não inibiu a ativação de NF- κ B induzida por RANKL nos períodos analisados.

Interessantemente, a redução da diferenciação e atividade dos osteoclastos pela chalcona T4 não foi associada com a redução significativa na expressão gênica de NFATc1 pelo composto. Isso sugere que outros mediadores e/ou mecanismos independentes de NFATc1 podem estar envolvidos nesse efeito antiosteolítico. Comparando aos resultados que mostraram MYC, um fator de transcrição upstream NFATc1, funciona como uma importante molécula mediando a sinalização RANKL/RANK em osteoclastos através de mecanismos que são dependentes e independentes de NFATc1, indicando que NFATc1 não é o único regulador crítico da osteoclastogênese (27). Além disso, é importante considerar as limitações da

abordagem experimental, uma vez que avaliamos apenas os níveis transcricionais (mRNA) de NFATc1, é possível que a chalcona T4 tenha modulado os níveis proteicos deste fator de transcrição.

Com base nos efeitos inibitórios da chalcona T4 sobre os osteoclastos, este estudo avaliou ainda seu efeito na diferenciação osteoblástica, que é outro aspecto necessário da remodelação óssea. A formação de nódulos mineralizados por osteoblastos é um método característico para avaliar a eficácia de compostos durante a osteogênese. Nossos dados mostraram que a chalcona T4 estimulou a formação de nódulos mineralizados, indicando seu potencial não apenas na inibição da osteoclastogênese, mas também na indução da osteogênese.

Coletivamente, nossos resultados demonstraram que a chalcona T4 suprimiu significativamente a diferenciação e atividade osteoclástica induzida por RANKL, e favoreceu a formação de matriz mineralizada em osteoblastos *in vitro*. Estes efeitos sobre a osteoclastogênese foram mediados, pelo menos em parte, pela inativação de ERK e AKT pela chalcona T4. Considerando a facilidade e baixo custo da síntese do composto, e ausência de toxicidade, a chalcona T4 pode ser uma alternativa terapêutica promissora em diversas doenças osteolíticas. Estudos adicionais, explorando o papel da chalcona T4 sobre outros fatores de transcrição e mediadores envolvidos na diferenciação e atividade de osteoclastos deveriam ser conduzidos, assim como estudos que avaliem os efeitos da chalcona T4 sobre a atividade e diferenciação de osteoblastos e sobre a formação óssea, tanto em ensaios *in vitro* como em experimentos *in vivo*.

Agradecimentos

O apoio financeiro foi fornecido pela FAPESP (2018/17047-3), e concedido a Guimarães-Stabili, MR. Os autores declaram que não há conflitos de interesse relacionados a este estudo.

Referências

1. E.F. Eriksen, Cellular mechanisms of bone remodeling, Rev.Vol 11, Endocr. Metab. Disord. 11 (2010) 219–227.
2. Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis | Enhanced Reader. (n.d.).

3. Boyle. (2003). www.nature.com/nature

4. Verron E, Bouler JM. Is bisphosphonate therapy compromised by the emergence of adverse bone disorders? Vol. 19, Drug Discovery Today. Elsevier Ltd; 2014. p. 312–9.
5. 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. Vol. 20, J Bone Miner Metab. 2002.
6. Golub, L. M., & Lee, H.-M. (2000). 186 | Periodontology. 82, 186–204. <https://doi.org/10.1111/prd.12315>
7. Aparecida Rodrigues Fernandes, N., Constantino Camilli, A., Andrea Gonzalez Maldonado, L., Grace Pérez Pacheco, C., Favoreto Silva, A., Scaf Molon, R., Carlos Spolidorio, L., Ribeiro de Assis, L., Octavio Regasini, L., Rossa Junior, C., Rodrigues Guimarães-Stabili, M., & Rodrigues Guimarães Stabili, M. (2021). Chalcone T4, a novel chalconic compound, inhibits inflammatory bone resorption in vivo and suppresses osteoclastogenesis in vitro. J Periodont Res, 56, 569–578. <https://doi.org/10.1111/jre.12857>
8. Rudrapal, M., Khan, J., Aziz Bin Dukhyil, A., Mohammed Ibrahim Ismail Alarousy, R., Ifeanyi Attah, E., Sharma, T., Jagdish Khairnar, S., Rupchand Bendale, A., Barraja, P., Montalbano, A., & Spanò, V. (2021). molecules Chalcone Scaffolds, Bioprecursors of Flavonoids: Chemistry, Bioactivities, and Pharmacokinetics. <https://doi.org/10.3390/molecules26237177>
9. 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 Feb 18;52(2):163–71.
10. Batovska DI, Todorova IT. Trends in Utilization of the Pharmacological Potential of Chalcones. Vol. 5, Current Clinical Pharmacology. 2010
11. Takeshita S, Kaji K, Kudo A. Identification and Characterization of the New Osteoclast Progenitor with Macrophage Phenotypes Being Able to Differentiate into Mature Osteoclasts. 2000
12. X Chen, X Cai, R Le, M Zhang, X Gu, F Shen et al., Isoliquiritigenin protects against sepsis-induced lung and liver injury by reducing inflammatory responses, Biochem Biophys Res Commun. 496 (2018) 245-252.
13. S Nakamura, T Watanabe, T Tanigawa, S Shimada, Y Nadatani, T Miyazaki et al., Isoliquiritigenin Ameliorates Indomethacin-Induced Small Intestinal Damage by Inhibiting NOD-Like Receptor Family, Pyrin Domain-Containing 3 Inflammasome Activation, Pharmacology. 101 (2018) 236-245.

14. AA Ali, AL Abd, EN Haleem, SA Khaleel, AS Sallam, Protective effect of cardamonin against acetic acid-induced ulcerative colitis in rats, *Pharmacol Rep.* 69 (2017) 268-275.
15. EG Jung, KI Han, HJ Kwon, BB Patnaik, WJ Kim, GM Hur, et al., Anti-inflammatory activity of sappanchalcone isolated from *Caesalpinia sappan* L. in a collagen-induced arthritis mouse model, *Arch Pharm Res.* 38 (2015) 973-83.
16. W Zheng, H Zhang, Y Jin, Q Wang, L Chen, Z Feng et al., Butein inhibits IL-1 β -induced inflammatory response in human osteoarthritis chondrocytes and slows the progression of osteoarthritis in mice, *Int Immunopharmacol.* 42 (2017) 1-10.
17. SW Maurya, K De, KB Singh, R Rai, IR Siddiqui, D Singh, R Maurya, Synthesis and biological evaluation of heterocyclic analogues of pregnenolone as novel anti-osteoporotic agents, *Bioorg Med Chem Lett.* 27 (2017) 1390-1396.
18. E Almelah, DP Smith, A McGown, A Aziz, HJ Potgieter, P Ragazzon, Dibenzoyl-methane Derivatives as a Potential and Exciting New Therapy for the Treatment of Childhood Bone Cancer, *Anticancer Res.* 36 2(016) 6043-6050.
19. Song C, Yang X, Lei Y, Zhang Z, Smith W, Yan J, Kong L. Evaluation of efficacy on RANKL induced osteoclast from RAW264.7 cells. *J Cell Physiol.* 2019 Jul;234(7):11969-11975. doi: 10.1002/jcp.27852.
20. Mansky, K. C., Sankar, U., Han, J., & Ostrowski, M. C. (2002). Microphthalmia transcription factor is a target of the p38 MAPK pathway in response to receptor activator of NF- κ B ligand signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 277(13), 11077–11083. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111696200>
21. 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. 2012; 15
22. Gingery, A., Bradley, E., Shaw, A., & Oursler, M. J. (2003). Phosphatidylinositol 3-Kinase Coordinately Activates the MEK/ERK and AKT/NF κ B Pathways to Maintain Osteoclast Survival. *Journal of Cellular Biochemistry*, 89, 165–179. <https://doi.org/10.1002/jcb.10503>
23. 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.* 2006 Nov 1;116(11):2880–91.
24. Jimi, E., Takakura, N., Hiura, F., Nakamura, I., & Hirata-Tsuchiya, S. (n.d.). cells The Role of NF- κ B in Physiological Bone Development and Inflammatory Bone Diseases: Is NF- κ B Inhibition “Killing Two Birds with One Stone”? <https://doi.org/10.3390/cells8121636>
25. Ortolan XR, Fenner BP, Mezaadri 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.

26. Lorenzo J. The many ways of osteoclast activation. J Clin Invest. 2017 Jun 30;127(7):2530-2532. doi: 10.1172/JCI94606.

Figura 1 suplementar: Estrutura química da chalcona T4.

Figura 2 suplementar: Viabilidade das células RAW 264.7 em relação ao controle após tratamento com diferentes concentrações de chalcona T4. Células tratadas com camptotecina (CPT) (composto indutor de apoptose) foram usadas como controle positivo. Apenas a concentração de 20 μ M reduziu significativamente a viabilidade celular, avaliado através do ensaio de MTT. O experimento foi realizado três vezes em triplicata de maneira independente.

Figura 3 suplementar: Referências dos ensaios de expressão gênica (primers e sondas pré-desenhados) do sistema TaqMan utilizados.

Figura 4 suplementar: Viabilidade das células MC3T3-E1 após tratamento com a chalcona. As células foram semeadas e após adesão à placa foram tratadas com diferentes concentrações da chalcona, veículo (DMSO) ou camptotecina (CPT) durante 7 dias. Os resultados foram obtidos através da medição da absorbância a 490 nm em um leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices). O número de células viáveis nos poços tratados com a chalcona foi estimado em relação ao controle não tratado. De acordo com os resultados, nenhuma das concentrações reduziu o metabolismo celular, avaliado através do ensaio de MTT. O experimento foi realizado três vezes em triplicata de maneira independente.

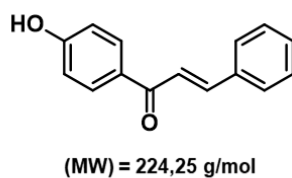
Figura 1: Chalcona T4 reduz a diferenciação de osteoclastos de maneira dose-dependente, mesmo quando adicionada até 96h após estímulo com RANKL. As células foram semeadas e estimuladas com RANKL (100ng/ml) e/ou tratadas com diferentes concentrações da chalcona T4. Em A) O gráfico de barra representa o número de osteoclastos por poço após estímulo com RANKL, e tratamento com a chalcona em diferentes tempos (I: 30 minutos antes do estímulo com RANKL, II: 48h e III: 96h após o estímulo). Em B) Imagens obtidas em microscopia de fluorescência (aumento de 4x), representativas da diferenciação dos osteoclastos induzida pelo RANKL, após tratamento ou não das células com a chalcona. As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes, realizados em duplicata.

Figura 2: Chalcona T4 inibe a atividade dos osteoclasto de maneira dose-dependente, em todos os períodos analisados. As células foram estimuladas com RANKL e tratadas com a chalcona, como descrito anteriormente. A atividade reabsorviva dos osteoclastos foi avaliada através da área das lacunas de reabsorção nas placas revestidas com fosfato de cálcio sintético. (A) (I,II,III) resultado quantitativa da área reabsorvida pelos osteoclastos, nos diferentes períodos de adição da chalcona. B) I,II,III Imagens representativas da área de reabsorção após estímulo das células com RANKL e tratamento com o composto (aumento de 4x). As barras indicam os valores médios e as linhas verticais o erro padrão da média (SEM) de três diferentes experimentos avaliados em triplicata.

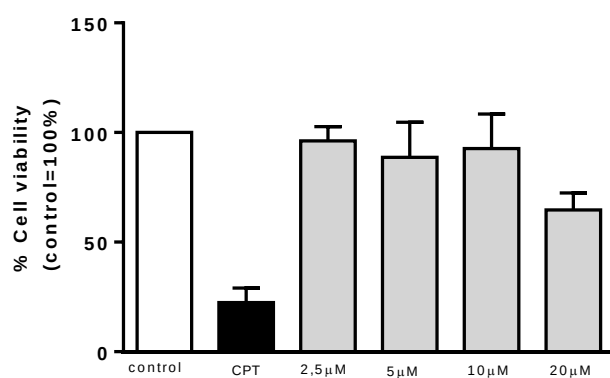
Figura 3: Chalcona T4 inibe a expressão gênica de marcadores ósseos em células RAW 264.7 estimuladas com RANKL. Efeito da chalcona T4 na expressão gênica de Oscar (A), Nfatc1 (B), Trap (C), Cathepsina k (D) e Mmp-9 (E). A chalcona inibiu de maneira significativa a expressão gênica de Mmp9, Cathepsin k e Oscar no terceiro e quinto dia após estímulo com RANKL ($p < 0,0001$), e somente no período mais tardio (quinto dia) a expressão de TRAP. A expressão de Nfatc1 não foi alterada pelo tratamento com a chalcona. As barras indicam os resultados médios e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Figura 4: Chalcona T4 inibe a ativação de vias de sinalização intracelular. (A) Efeito da chalcona na ativação de ERK; (B) AKT; (C) p38 e (D) NF-kB, após 10 min (i) de estímulo com RANKL ou 40 min (ii). Após 10 minutos a chalcona inibiu a ativação de Erk estimulada por RANKL, de maneira dose-dependente, e após 40 minutos reduziu a ativação de Akt. As barras indicam os resultados médios e as linhas verticais o erro padrão (SEM) de três experimentos em duplicata. (*) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle; (#) indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo RANKL.

Figura 5: Chalcona T4 aumenta a formação de nódulos de matriz mineralizada. MC3TE-E1 foram cultivados em meio osteogênico, e após 24h tratados com as diferentes concentrações da chalcona T4. Em (A), os valores médios da absorbância ao final de cada período experimental (7, 14 e 21 dias). (B) imagem representativa da coloração com vermelho de alizarina nos diferentes períodos experimentais (I= 7, II= 14, e III= 21 dias). Os dados são representativos de três experimentos em duplicata. (*) indica diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com 5 μ M e os grupos controle e veículo. (**) indica diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas com 10 μ M controle e veículo.

Fig. 1 Suplementar

FONTE: Prof. Dr. Luis Octavio

Fig. 2 Suplementar**Fig. 3 Suplementar**

Nome do Gene	Nome do Gene TaqMan Gene Expression Assays
Gapdh	Mm99999915_g1
Acp5 (Trap)	Mm00475698_m1
Oscar	Mm01338227_g1
Nfatc1	Mm01265944_m1
Ctsk	Mm004804039_m1
Mmp-9	Mm00442991_m1

Fig. 4 Suplementar

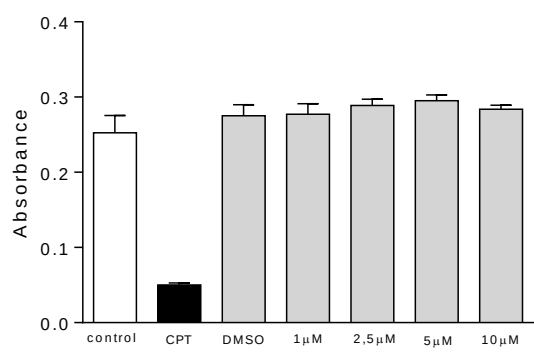


Fig. 1.

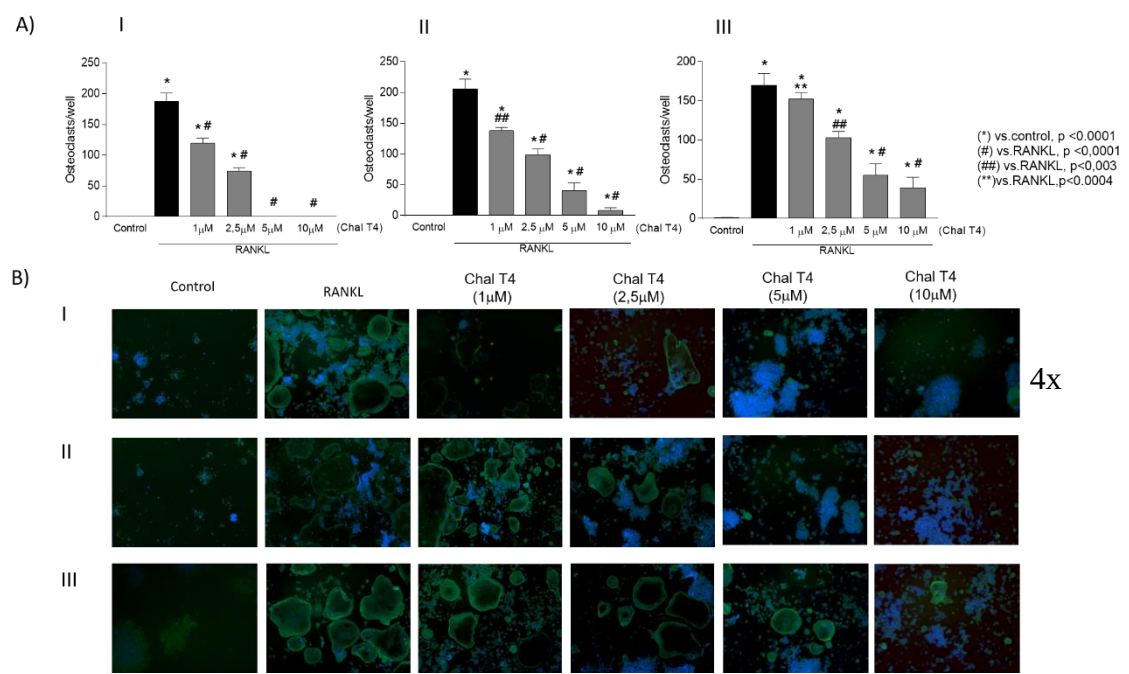


Fig. 2.

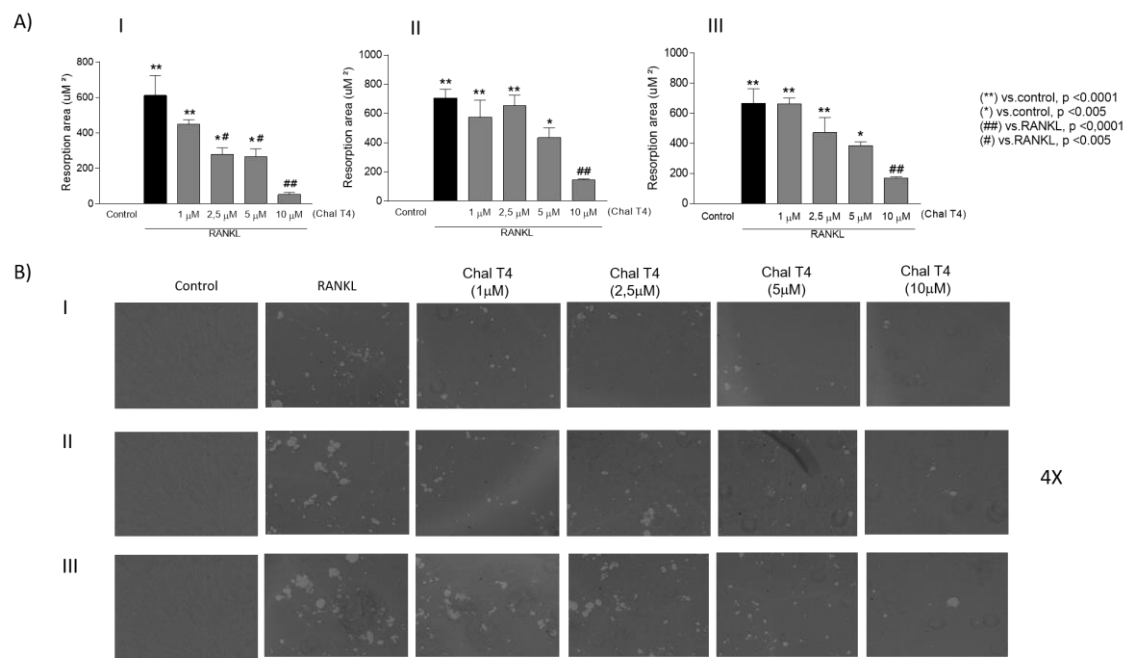
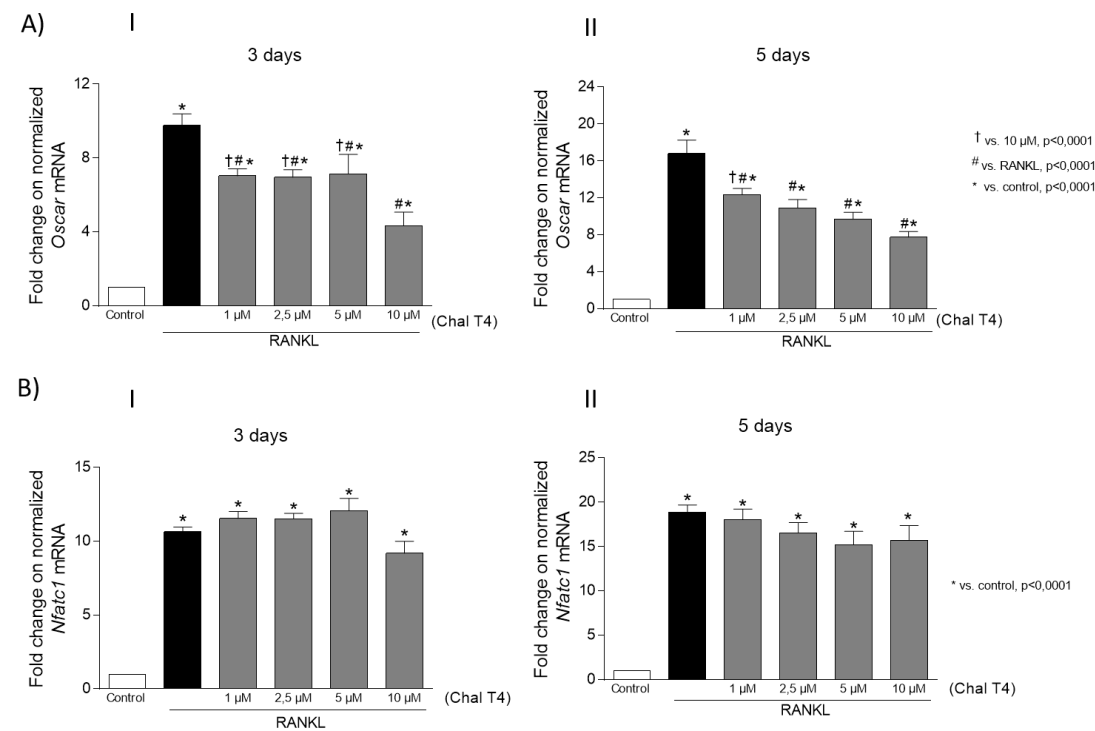


Fig. 3



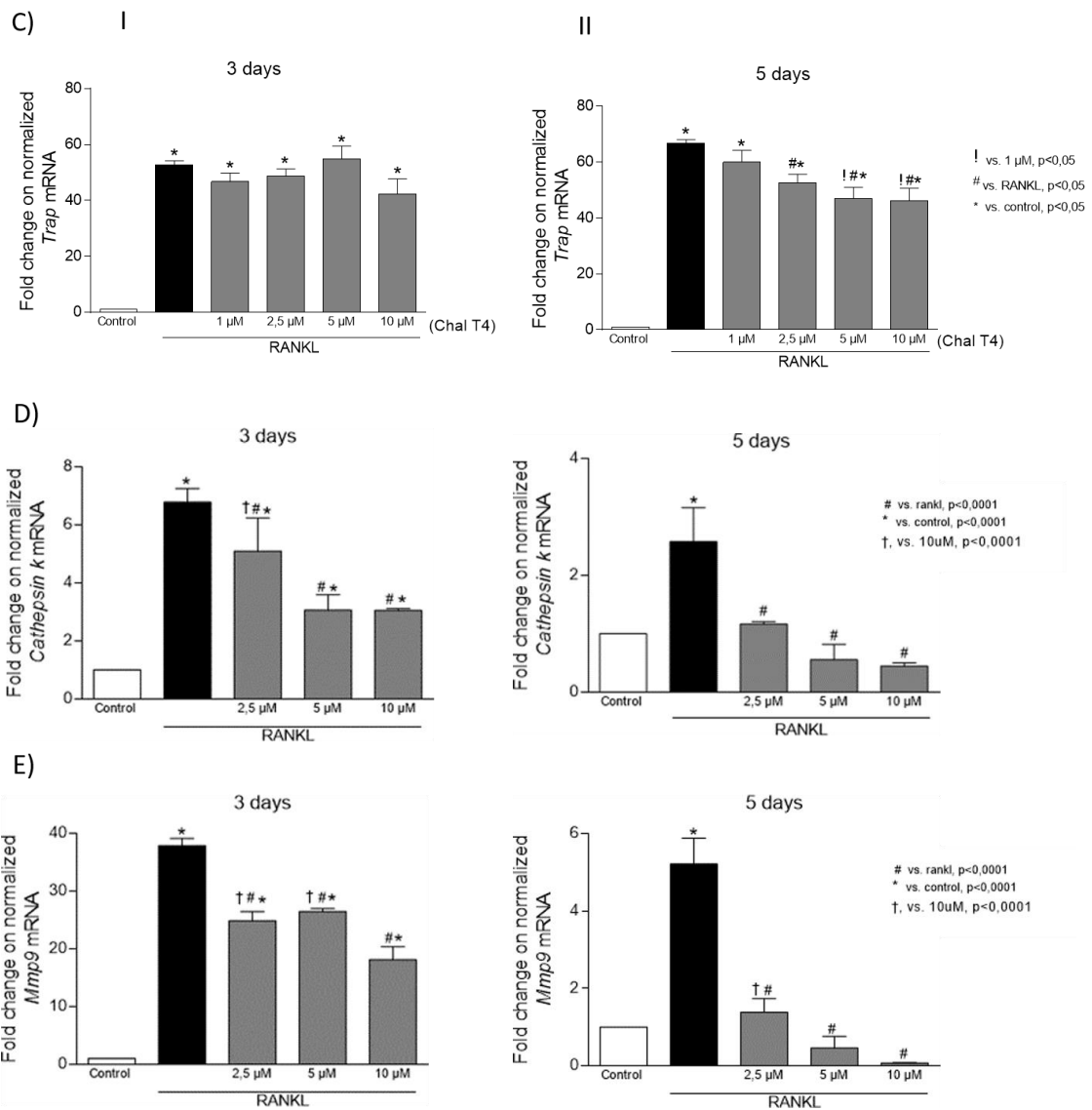


Fig. 4

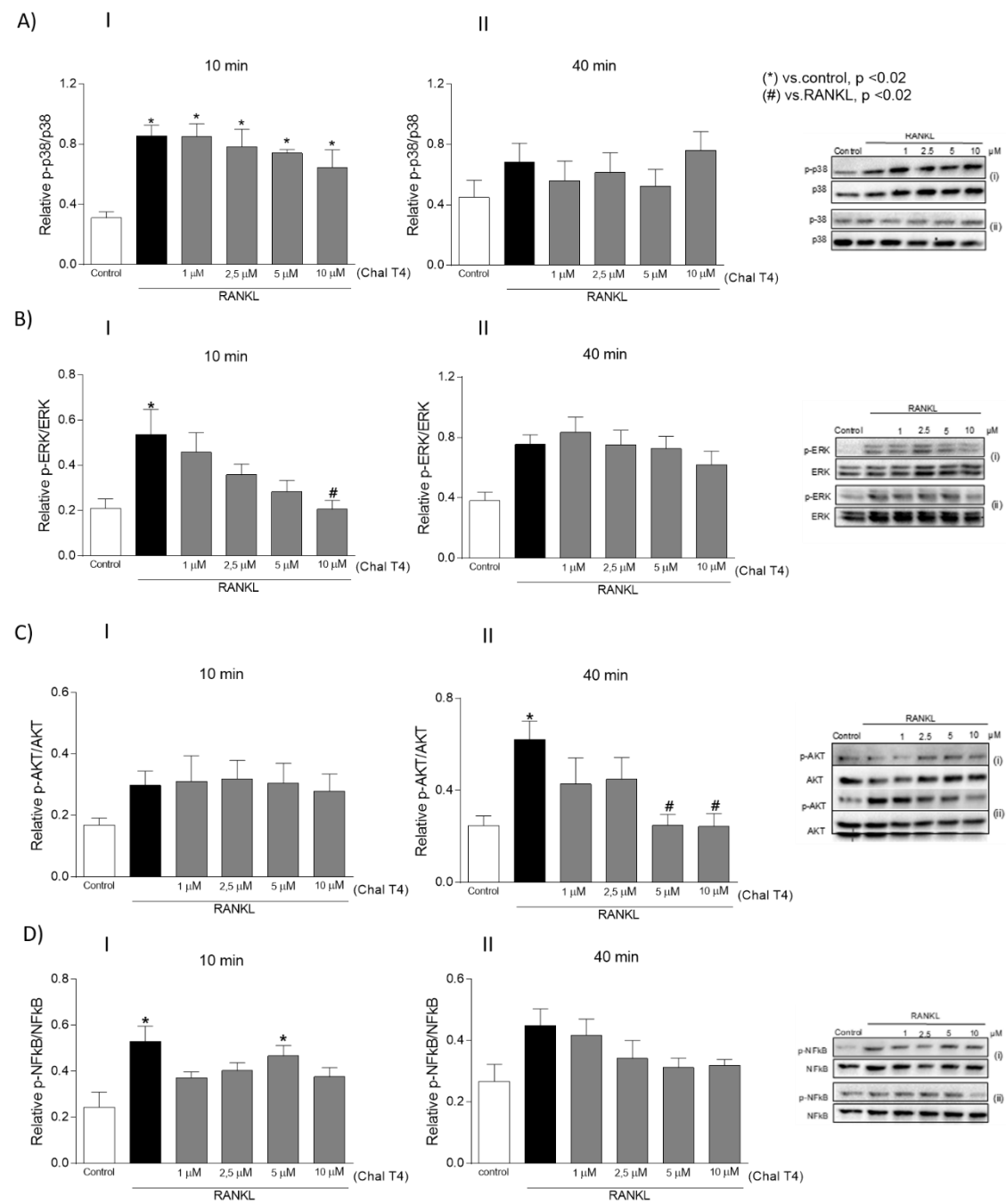
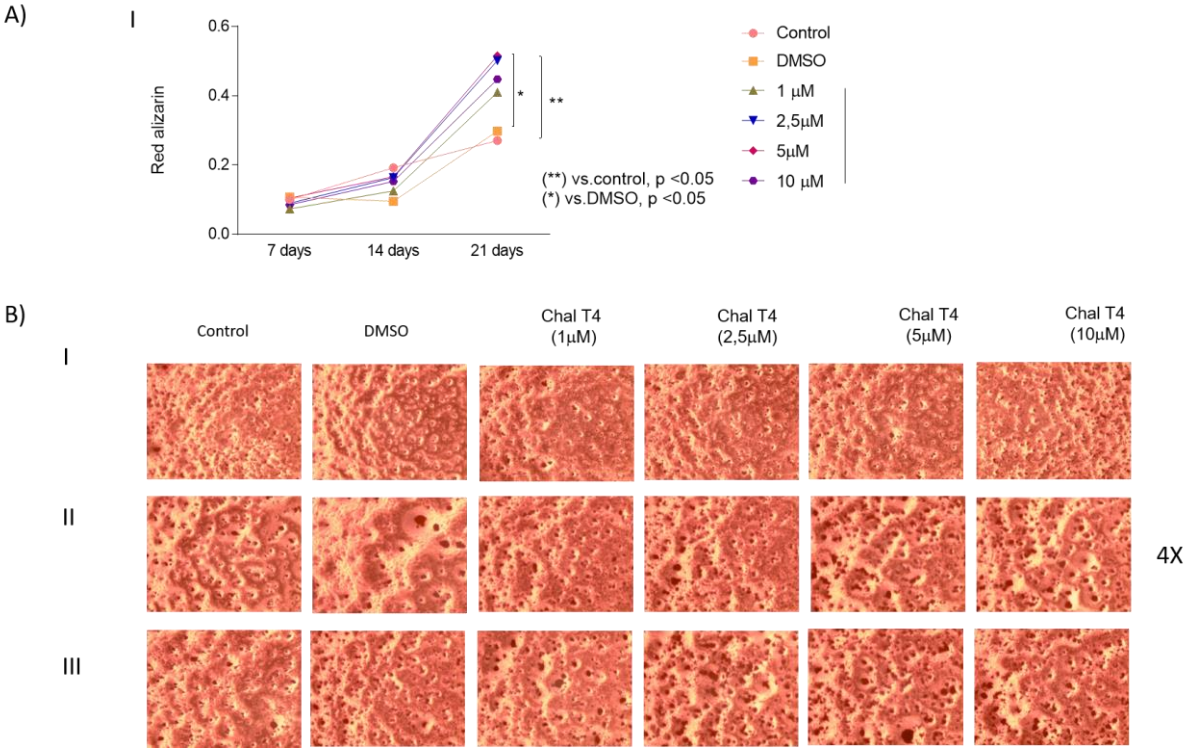


Fig. 5



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.

APÊNDICE A: MATERIAIS E MÉTODOS

CHALCONA

A substância encontra-se depositada na compostoteca do Laboratório de Química Verde e Medicinal, Departamento de Química e Ciências Ambientais, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, São José do Rio Preto. A chalcona foi sintetizada pelo Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, colaborador deste projeto. A síntese da substância foi realizada por meio da reação de condensação de Claisen-Schmidt, com rendimentos satisfatórios (50–70%). Para a purificação das substâncias utilizou-se técnicas de recristalização e cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna de fase normal (gel de sílica), cromatografia em coluna de fase reversa (octadecilsilano) e cromatografia de permeação em gel (LH-20).

A estrutura do composto foi identificada por espectrometria de massas e técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono treze (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C). A pureza da substância foi determinada por análises de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), exibindo valores iguais ou superiores a 95.0%.

Efeito da Chalcona T4 sobre a diferenciação de osteoclastos – Coloração do anel de Actina (microscopia de fluorescência)

Foram utilizadas as células precursoras de osteoclastos RAW 264.7. As células foram plaqueadas ($0,5 \times 10^3$ céls/poço), em placa de 96 poços, e cultivadas em α -MEM suplementado (10% FBS + 1% P/S), na presença de RANKL (100 ng/ml) para diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Diferentes concentrações não citotóxicas da chalcona (1, 2.5, 5 e $10\mu\text{M}$), ou veículo (DMSO), foram acrescentados ao meio de cultura em diferentes tempos em relação ao estímulo de diferenciação (adição de RANKL): 30 minutos antes, 48h e 96h após, de acordo com a (tabela 1). Estes tempos foram selecionados considerando que a dinâmica de diferenciação destas células ocorre entre o segundo e sexto dia após o estímulo. O meio de cultura contendo o composto e o RANKL foram substituídos em intervalos de 48h, retirando-se $100\mu\text{L}$ com o auxílio de uma micropipeta e adicionando o mesmo volume de meio fresco com os tratamentos propostos. As culturas foram

observadas diariamente em microscópio invertido até o término do experimento. Ao final do período experimental (6º dia), as células foram fixadas e permeabilizadas (BD Cytofix/Cytoperm, BD Biosciences). Em seguida, as células foram coradas com 5µg/ml de Faloidina conjugada ao fluoróforo (AlexaFluor 488 Phalloidin, Molecular Probes, ThermoFisher Scientific), por 40 min à temperatura ambiente, e subsequentemente com 2.5 µg/mL de 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 5 min à temperatura ambiente, e visualizadas em microscópio invertido de fluorescência (Evos fl, AMG Micro) na objetiva de 10x. O número de osteoclastos foi quantificado em toda a extensão do poço, sendo considerado osteoclastos células com 3 ou mais núcleos. O experimento foi realizado três vezes em triplicata de maneira independente.

Quadro 1 - Condições experimentais avaliadas de acordo com o momento inicial de tratamento das células com a chalcona T4

Condição experimental	Período de adição da chalcona T4 em relação ao estímulo com RANKL
I	30 minutos antes
II	48h após
III	96h após

Fonte: Elaboração própria.

Efeito da Chalcona T4 na atividade de osteoclastos: ensaio de atividade

Para investigarmos o impacto da chalcona T4 sobre a atividade dos osteoclastos, RAW 264.7 foram cultivadas em placas de 96 poços revestidas com fosfato de cálcio sintético (Osteologic Corning Plate, Corning), e o estímulo com RANKL e tratamento com as diferentes concentrações da chalcona T4 foram realizadas conforme descrito no protocolo anterior, por um período de 6 dias, seguindo as instruções do fabricante. Após o término do período experimental, o sobrenadante foi descartado e adicionado 50 µl de hipoclorito de sódio a 1% por 5 min. Em seguida, os poços foram lavados com água Milli-Q, e as placas foram deixadas sobre a bancada em temperatura ambiente por 24 horas para completa evaporação da água, e então

fotografadas em microscópio invertido com câmera acoplada (Evos fl, AMG Micro) na objetiva de 10x. As áreas de reabsorção óssea foram quantificadas em toda a extensão do poço através do software Image J. Este experimento foi realizado três vezes em triplicata de forma independente.

Avaliação dos efeitos da chalcone T4 sobre expressão gênica de marcadores ósseos

Células RAW 264.7 foram plaqueadas (3×10^5 cels/poço), em placa de 6 poços, e cultivados em α -MEM completo na presença de RANKL (100 ng/ml) para diferenciação dos macrófagos em osteoclastos. Diferentes concentrações da chalcona foram acrescentadas ao meio de cultura em (1, 2.5, 5 e 10 μ M), 30 min previamente ao estímulo com RANKL. O meio de cultura contendo o composto e/ou RANKL foi substituído em intervalos de 48h. Ao final do 3º e 5º dia foi realizada a extração do RNA total das células com o kit Total RNA Purification (Cellco Biotec), de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação e pureza das amostras de RNA foram realizadas em espectrofotômetro de nanovolumes (Nanoview Plus, GE Healthcare), e o cDNA sintetizado a partir de 500 ng de RNA total (High capacity cDNA synthesis kit, Applied Biosystem). A detecção da expressão gênica na amostra foi realizada utilizando o sistema TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems; Life Technologies- Califórnia - USA). Foi realizado o PCR para detecção dos genes-alvo de interesse (*Nfatc1*, *Oscar*, *Trap*, *Mmp-9* e *Ctsk*) (Tabela 2) e a expressão de GAPDH foi utilizada para normalização dos resultados, que foram analisados pelo método delta(delta Ct). Este experimento foi realizado três vezes em duplicata de maneira independente. Os períodos de 3 e 5 dias foram selecionados a partir dos resultados de experimento de time course avaliando os períodos de maior expressão dos genes alvos após estímulo com RANKL (dados não apresentados).

Quadro 2: Referências dos ensaios de expressão gênica (*primers* e sondas pré- desenhados) do sistema TaqMan utilizados.

Nome do Gene	Nome do Gene TaqMan Gene Expression Assays
Gapdh	Mm99999915_g1
Acp5 (Trap)	Mm00475698_m1
Oscar	Mm01338227_g1
Nfatc1	Mm01265944_m1
Ctsk	Mm004804039_m1
Mmp-9	Mm00442991_m1

Fonte: Elaboração própria.

Papel da Chalcona na ativação das vias de sinalização intracelular (Western Blot)

Com objetivo de investigar os efeitos da chalcona sobre a fosforilação das vias de sinalização intracelular NF- κ B, p38 MAPK, ERK e Akt, macrófagos foram plaqueados na concentração de 3×10^5 células/poço com α -MEM suplementado, em placas de 35 mm, e após 24 horas desinduzidas com meio de cultura contendo 0,3% de soro fetal bovino por 6 horas, e então estimulados com RANKL por 10 e 40 minutos, com e sem pré-tratamento (30 min antes) com a chalcona em diferentes concentrações (1, 2.5, 5 ou 10 μ M). Ao final do período experimental, o meio foi aspirado, as placas lavadas com PBS 1x e adicionado RIPA Buffer suplementado com inibidor de fosfatase e protease em cada placa. As proteínas totais foram quantificadas pelo método de Bradford (Bio-Rad). Para realização do Western Blot foram utilizadas 20 μ g de proteína total por amostra, conforme protocolo descrito anteriormente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários (p-p38 #9211 Cell Signaling, p38 #9212 Cell Signaling, p-Akt #9275 Cell Signaling, Akt #9272 Cell Signaling, p-NF- κ B #3033 Cell Signaling, NF- κ B #sc8008 Santa Cruz, p-ERK #4376 Cell Signaling e ERK #9102 Cell Signaling) overnight. Os resultados foram obtidos pela análise densitométrica das bandas e normalizados através da razão entre a forma fosforilada e não fosforilada da proteína alvo. O experimento foi realizado três vezes em duplicata de maneira independente.

Vermelho de Alizarin – Osteogênese

Células pré-osteoblásticas de camundongos (MC3T3-ETC1) foram plaqueadas em placa de 96 poços, com 3×10^3 células por poços, e cultivadas α -MEM suplementado (10% FBS + 1% P/S + 20 μ M de ácido ascorbico + 10mM de β -glicerolfosfato + 10 μ M de dexametasona), com diferentes concentrações não citotóxicas da chalcona (determinadas em experimentos preliminares: concentrações 1, 2.5, 5 e 10 μ M), ou veículo, (DMSO) , por 7, 14 e 21 dias. Após os períodos o meio foi aspirado, e os poços lavados gentilmente com PBS. Em seguida as células foram fixadas com paraformol a 4% por 60 minutos à 4°C, lavadas com água destilada, e então adicionados 50 μ l de solução de vermelho de alizarin a 2% por 15 minutos. Após remoção do corante, adicionou-se cloreto de cetilpiridínio a 10% por 10 minutos para solubilizar os nódulo de cálcio corados com vermelho de alizarin. e a solução transferida para nova placa de 96 poços para realização da leitura em espectrofotômetro a 550nm.

Análise estatística

Os dados foram analisados usando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). O teste ANOVA (one-way), seguido do teste de Tukey foi utilizado para comparações múltiplas entre os grupos. O nível de significância adotado foi de 5%.

ANEXO A - DECLARAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Araraquara, 10 de março de 2022.

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que as células utilizadas na pesquisa pertinente ao trabalho “***Efeito da Chalcona T4 sobre a osteoclastogênese e mecanismos biológicos associados: estudo in vitro***”, são células obtidas comercialmente e congeladas, de linhagem imortalizada conforme a descrição – RAW 264.7 (macrófagos murinos) e MC3T3-E1 (pré-osteoblastos murinos), portanto, não houve necessidade de submissão e aprovação de comitê de ética do projeto de pesquisa inicial, uma vez que não utilizamos cultura primária de humanos ou de nenhuma espécie animal para extração das células ou para qualquer outro propósito.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Morgana R G Stabili

Não autorizo a publicação deste trabalho até 28 março de 2024.

Araraquara, 28 de março de 2022.

Iolanda Augusta Fernandes de Matos