



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
CURSO BIOMEDICINA

JOICY ALVES DA SILVA

**Avaliação da atividade antirreabsortiva de um derivado de *N*-
acilhidrazona *in vitro***

SALVADOR – BA

2021

JOICY ALVES DA SILVA

**Avaliação da atividade antirreabsortiva de um derivado de *N*-
acilhidrazona *in vitro*.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola Bahiana de
Medicina e Saúde Pública, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Orientador(a): Prof. Dra. Elisalva
Teixeira Guimarães.

SALVADOR – BA

2021

JOICY ALVES DA SILVA

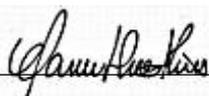
Avaliação da atividade antirreabsortiva de um derivado de *N*-acilhidrazona *in vitro*.

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina e aprovada em sua forma final pelo Curso de Biomedicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública.

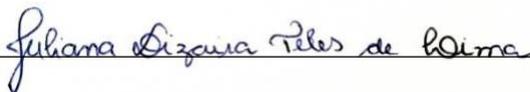
Salvador – BA, 17 de Novembro de 2021.



Prof. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA



Prof. Dra. Mara Dias Pires
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA



Prof.ª. Juliana Dizaira de Lima
UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

Dedico este trabalho aos meus pais como fruto de uma conquista muito importante em nossas vidas. Aos meus familiares, professores e amigos pelo apoio e incentivo durante minha trajetória acadêmica.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado força e coragem para superar todas as dificuldades que surgiram no caminho. Ele sempre esteve comigo me mostrando que sim, eu sempre posso sonhar mais alto.

A minha família que sempre me apoiou, acreditou e incentivou a seguir em frente. Aos meus pais Antônia e Gildo por não medirem esforços na realização dos meus sonhos e lutarem com todas as forças para que esta conquista se tornasse realidade. Ao meu irmão Gildo Filho por estar comigo em todos os momentos da minha vida e me apoiar sempre nas minhas escolhas.

Aos meus amigos que sempre estiveram comigo e me ajudaram nos momentos mais difíceis. A minha orientadora Elisalva, por acreditar em mim e me ajudar nas minhas escolhas desde o início da graduação. Por todo conhecimento passado sempre da melhor forma, paciência e por seu olhar humano em diversas situações. À Mestre Juliana por acrescentar tanto em minha vida acadêmica, além das palavras de conforto e incentivo durante alguns momentos desta trajetória.

Aos meus professores e à instituição pelo suporte no decorrer da vida acadêmica e por me proporcionar experiências maravilhosas durante esse processo. E a todos que direta, ou indiretamente me ajudaram a galgar esta conquista.

*Não fui eu que lhe ordenei? Seja forte e corajoso!
Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o
seu Deus, estará com você por onde você andar.
(Josué 1:9)*

1. **Artigo Científico**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIRREABSORTIVA DE UM DERIVADO
DE N-ACILHIDRAZONA *IN VITRO***

Evaluation of the antiresorptive activity of an *N*-acylhydrazone derivative *in vitro*

Joicy Alves da Silva¹ & Elisalva Teixeira Guimarães^{1,2}

¹Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, EBMSP, Salvador, Bahia, Brasil.

²Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz,
Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Salvador, Bahia, Brasil.

Correspondência: Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública. Rua Silveira Martins,
nº 3386, Cabula. CEP: 41150-100

Tel.: 55-71-3257-8200; FAX: 55-71-3257-8230

E-mail: elisalvateixeira@bahiana.edu.br

RESUMO

A osteoporose é uma doença que afeta mais de 200 milhões de pessoas no Brasil e no mundo. É caracterizada pelo desequilíbrio osteoimunológico do processo de reabsorção/formação óssea, resultando em perda da estrutura óssea e fratura dos ossos. A quantidade de fármacos disponíveis para o tratamento da osteoporose é limitado e apresenta efeitos colaterais. Diante disto, a identificação de novos fármacos com menos efeitos adversos e com ação antirreabsortiva mais efetiva torna-se necessária. Estudos prévios do nosso grupo demonstraram uma atividade imunomoduladora promissora do derivado da classe das *N*-acilhidrazonas, o (E)-*N'*-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-metoxi-*N*-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386). O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do LASSBio-1386 sobre a diferenciação das células ósseas em ensaios *in vitro*. As células foram obtidas da medula óssea de camundongos C57BL/6, cultivadas em condições estéreis e caracterizadas quanto à morfologia e ao perfil imunofenotípico. Após três passagens em cultura, essas células apresentavam capacidade de adesão ao plástico, proliferação e formato fibroblastóide. As análises por citometria de fluxo revelaram a expressão de moléculas de superfície celular que caracterizam as células-tronco mesenquimais/estromais (CTM) como o CD44, CD73, CD90 e CD105. Em seguida, ensaios de citotoxicidade frente às CTMs foram realizados e o LASSBio-1386 apresentou valor de CC₅₀ igual a 41,62 µM. Após determinar a concentração atóxica, ensaios de diferenciação osteogênica foram realizados. As CTMs foram cultivadas com meio indutor de formação de osteoblastos e tratadas com duas concentrações do composto (15 e 30 µM). Após 21 dias de cultura, as células foram coradas com alizarina vermelha a 2%. Nos grupos tratados com o LASSBio-1386, foi observado, através de visualização por microscópio óptico, que os poços apresentaram maior deposição de cálcio, sugerindo um estímulo à diferenciação osteoblástica. Para além disso, o LASSBio-1386 diminuiu a diferenciação osteoclástica em ensaios *in vitro* em concentrações não tóxicas para CTM. De acordo com estes dados, sugere-se que o composto LASSBio-1386 apresenta baixa citotoxicidade e possui ação antirreabsortiva, influenciando no equilíbrio entre o processo de reabsorção e formação óssea *in vitro*.

Palavras-chave: Osteoporose; Remodelação óssea; *N*-acilhidrazona.

ABSTRACT

Osteoporosis is a disease that affects more than 200 million people in Brazil and worldwide. It is characterized by the osteoimmunological imbalance of the bone resorption/formation process, eliminating the loss of bone structure and bone fracture. The number of drugs available for treatment is limited and has side effects. Therefore, the identification of new drugs with fewer adverse effects and with more effective anti-resorptive action is necessary. Previous studies by our group have shown a promising immunomodulatory activity of the derivative of the *N*-acylhydrazone class, (E) -N'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386). The present study aims to evaluate the effect of LASSBio-1386 on bone cell differentiation in *in vitro* assays. Cells were adjusted from the bone marrow of C57BL/6 mice, cultured under sterile conditions and characterized for morphology and immunophenotypic profile. After three passages in culture, these cells showed the ability to adhere to plastic, proliferate and fibroblastoid format. Flow cytometric analysis revealed an expression of cell surface molecules that characterize mesenchymal stem cells (MSC) such as CD44, CD73, CD90 and CD105. Then, cytotoxicity assays against MSCs were performed and LASSBio-1386 presented a CC50 value equal to 69.53 μ M. Removing the non-toxic concentration, osteogenic differentiation assays were performed. As MSCs were cultured with medium inducing osteoblast formation and treated with two must make compost (15 and 30 μ M). After 21 days of culture, cells were stained with 2% alizarin red. In the groups treated with LASSBio-1386, it was observed, through optical microscope visualization, that larger wells had calcium deposition, suggesting a stimulus to osteoblastic differentiation. According to these data, it is essential that the compound LASSBio-1386 has low cytotoxicity and induces MSC osteogenesis.

Keywords: Osteoporosis; Bone remodeling; N-acylhydrazone.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
2	MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
	2.1 Camundongos.....	12
	2.2 Moléculas.....	12
	2.3 Obtenção de células-tronco mesenquimais/estromais derivadas da medula óssea de camundongos.....	12
	2.4 Caracterização celular.....	13
	2.5 Teste de citotoxicidade sobre células-tronco mesenquimais/estromais (ctms).....	13
	2.6 Cultura de osteoblastos.....	14
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
	3.1 Características morfológicas das células-tronco obtidas da medula óssea de camundongos.....	16
	3.2 Caracterização celular por citometria de fluxo:	17
	3.3 Citotoxicidade do lasbio-1386 frente às células-tronco mesenquimais/estromais (ctms)	18
	3.4 Influência do lassbio-1386 na diferenciação osteoblástica	19
4	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
5	PROPOSTA DE SUBMISSÃO	27

1 INTRODUÇÃO

A queda da mortalidade, seguida da redução da fecundidade e aumento da expectativa de vida, resulta no envelhecimento da população e no aumento das taxas de doenças crônico-degenerativas, como por exemplo, a osteoporose (1). Esta doença é caracterizada pela deteriorização microarquitetural do tecido ósseo, com redução da massa óssea em níveis insuficientes para a função de sustentação, tendo como consequência elevado risco de fratura (2). Estima-se que a osteoporose afete cerca de 200 milhões de mulheres no mundo, segundo dados da Fundação Internacional de Osteoporose (IOF) (3). A osteoporose se apresenta de forma silenciosa e acomete, principalmente, mulheres acima de 50 anos na pós-menopausa e idosos com elevada taxa de morbimortalidade. As fraturas ósseas associadas à osteoporose ocorrem com maior frequência no quadril, nas vértebras, no rádio distal e no fêmur, os quais são dominados pelo osso trabecular (4).

O processo de remodelamento ósseo ocorre de maneira fisiológica e coordenada. Em pequenas unidades funcionais multicelulares básicas ocorrem a formação e a quebra da matriz óssea pela linhagem de células osteoblásticas e osteoclásticas, respectivamente, que se responsabilizam por assumir essa função cíclica (5). Na osteoporose há um desequilíbrio destes processos, e a reabsorção passa a superar a formação óssea (6).

Existem dois tipos de terapias medicamentosas para a osteoporose. A primeira delas utiliza drogas anabólicas, as quais estimulam a formação do osso; e a segunda emprega o uso de drogas antirreabsortivas, as quais inibem o desenvolvimento, a ativação e a sobrevivência dos osteoclastos e conseqüentemente reduzem a reabsorção óssea (4). O PTH sintético é a única droga atualmente aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) que estimula a formação óssea. No entanto, este medicamento também pode aumentar a reabsorção óssea, pois seu efeito anabólico diminui ao longo do tempo. Além disso, o uso do PTH sintético é limitado a dois anos, devido ao risco de desenvolvimento de osteossarcoma observado em ratos (7). Por outro lado, os bisfosfonatos nitrogenados são a classe de drogas que inibem a reabsorção óssea mais prescrita em todo o mundo para o tratamento da osteoporose pós-menopausa (8). No entanto, a osteonecrose da mandíbula e as fraturas atípicas subtrocantéricas são efeitos colaterais do uso prolongado do bisfosfonato, devido à sua característica de acúmulo no osso (4).

Neste contexto, é necessário o estudo de novas drogas com maior efetividade para o tratamento desta doença. As *N*-acilhidrazonas são uma classe de compostos

orgânicos sintéticos com ampla atividade imunossupressora. Entre seus diferentes compostos, o derivado metilado (E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386), apresentou efeitos inibitórios sinérgicos aos glicocorticoide, reduzindo a produção de TNF- α e óxido nítrico (9). De acordo com a literatura, os derivados da classe das N-acilhidrazonas apresentaram atividades com perfis: antimicrobiano e antifúngico (10); anti-inflamatório e analgésico (11,12,13), e antitumoral (14).

Em estudos realizados no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fiocruz-BA pelo nosso grupo de pesquisa foi constatado uma atividade imunomoduladora promissora do derivado da classe das N-acilhidrazonas, o (E)-N'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386). O LASSBio-1386 inibiu a resposta imune e inflamatória, através da inibição da via do fator nuclear kappa B (NF κ B), em ensaios *in vitro* e em modelo murino de choque endotóxico e de hipersensibilidade tardia (9). Como o ligante do receptor ativador de NF κ B (RANKL), expresso por osteoblastos e linfócitos, é um dos principais reguladores da diferenciação de monócitos mononucleares em osteoclastos maduros (15), o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do LASSBio-1386 sobre a diferenciação das células ósseas em ensaios *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Camundongos

Neste projeto foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6 com fornecimento de água e ração *ad libitum*. Os experimentos utilizando animais foram realizados seguindo as normas permitidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Instituto Gonçalo Moniz.

2.2 Moléculas

A molécula LASSBio-1386, pertencentes à classe das *N*-acilhidrazonas, foi preparada por via sintética utilizando métodos validados por pesquisadores do grupo liderado pelo Prof. Eliezer J. Barreiro, do Programa de Desenvolvimento de Fármacos da UFRJ.

2.3 Obtenção de células-tronco mesenquimais/estromais derivadas da medula óssea de camundongos

Para as culturas primárias foram utilizadas células de medula óssea de camundongos C57BL6/J. Esses animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e em seguida as tíbias e fêmures foram retirados de maneira asséptica e transferidas para placas de Petri contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg MD), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF; SIGMA, Aldrich) e 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA). Em seguida, as epífises dos ossos foram cortadas com auxílio de uma tesoura e no espaço medular foi introduzido uma agulha para irrigação de 5 mL de meio de cultura. O lavado medular foi coletado e centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos. O *pellet* proveniente desse processo foi ressuspensionado em 10 mL de meio completo, e a suspensão das células foi transferida para frascos de cultura de 25 cm² com filtro na tampa, contendo 5 mL de meio DMEM completo. As culturas foram mantidas a 37°C em estufa com 5% de CO₂. O meio de cultura foi trocado a cada 3-4 dias. Quando houve a confluência das células, estas foram liberadas com solução de tripsina a 0,25% (SIGMA, Aldrich) e transferidas para frascos de cultura com filtro de 75 cm² com 15 mL de meio completo. As células foram expandidas por sucessivas passagens nessas condições até atingirem a quantidade suficiente para a realização dos experimentos.

2.4 Caracterização celular

Para a caracterização das células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) derivadas da medula óssea foi empregada a técnica de citometria de fluxo. Para detecção do antígeno de superfície, as células aderentes foram destacadas com solução de tripsina a 0,25% (SIGMA, Aldrich) e a suspensão celular foi lavada 2 vezes com solução salina 0,9% e centrifugadas a 3000 rpm por 2 minutos. Em seguida, o *pellet* foi ressuspendido em solução salina 0,9%, e 1×10^6 células foram incubadas à 4° C, por 30 minutos, com os anticorpos conjugados à ficoeritrina (PE), cianina (CY) ou alofococianina (APC) na concentração 1/100, contra CD11b, CD73, CD105, CD45 (BioLegend, EUA), CD90, CD44 (Becton Dickinson, EUA) (**Tabela 1**). Após o período de incubação, procedeu-se com duas lavagens com solução salina 0,9%. A detecção dos marcadores específicos conjugados aos anticorpos foi realizada no equipamento BD LSRFortessa™ (Becton Dickinson, EUA), utilizando o software BD FACSDiva™ versão 6.1.3 (Becton Dickinson, EUA). Pelo menos 10.000 eventos foram coletados.

Tabela 1. Especificação dos conjuntos de antígenos e conjugados utilizados na imunofenotipagem celular por citometria de fluxo.

MARCADORES	CONJUGADOS
CD73	PE-A
CD44	
CD90	
CD105	APC-A
CD11b	
CD45	PE-CY5-A

2.5 Teste de citotoxicidade sobre células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs)

As células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) foram incubadas em placas de 96 poços com 5×10^4 células/poço em meio DMEM completo. Após 24 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, as células foram tratadas com o composto LASSBio-1386 em séries de seis concentrações em triplicatas, incubados por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 24

horas. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) foi realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos através dos valores da concentração citotóxica de 50% para as células (CC₅₀). A violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como controle positivo e o Alendronato de Sódio, droga referência já utilizada no mercado para o tratamento da osteoporose, (EMS, São Paulo, SP, Brasil) como controle negativo.

2.6 Cultura de osteoblastos

No que se refere à osteogênese celular, 5×10^4 células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) derivadas de medula óssea foram incubadas em placa de 24 poços, em DMEM completo. Após atingirem 50-60% de confluência todo o meio foi removido e em seguida, as células foram estimuladas com meio de DMEM completo suplementado com 10 mM de β -glicerofosfato (Dinâmica), 0,05 mM de ácido ascórbico (Dinâmica) e 100 nM de dexametasona (SIGMA, Aldrich). O LASSBio-1386 foi adicionado às culturas em duas concentrações (15 e 30 μ M) para avaliar a sua influência no processo de diferenciação das células ósseas. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana durante 21 dias, e a evolução da diferenciação foi acompanhada em microscópio invertido CKX 41 (OLYMPUS). O Alendronato de sódio (Neo Química) foi controle positivo do experimento (30 μ M). O grupo controle negativo foi cultivado com meio completo. As células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) por 10 minutos em temperatura ambiente, lavadas com água destilada por 3 vezes e coradas com alizarina vermelha a 2% para avaliar a deposição de cálcio (SIGMA, Aldrich). As imagens das células diferenciadas em osteoblastos e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (Olympus, Tóquio, Japão). A percentagem de nódulos mineralizados formados em relação à área total foi calculada utilizando o programa *Image J* (Universidade do Texas, Health Science Center, San Antonio, TX, EUA).

2.7 Cultura de osteoclastos – Coloração com Giemsa

Para diferenciação osteoclástica, 5×10^5 células-tronco mesenquimais/estromais derivadas de medula óssea foram incubadas em placa de 24 poços em meio DMEM (Gibco) completo estimuladas com 50 ng/mL de RANKL (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e 30 ng/mL de M-CSF (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) solúveis. As culturas foram mantidas em estufa a

37°C e 5% de CO₂ durante 5 dias. O meio de cultura e os indutores de diferenciação foram trocados após 2 dias. O LASSBio-1386 foi adicionado às culturas em duas concentrações (15 e 30 µM). O alendronato de sódio (Neo Química) foi o controle positivo do experimento (30 µM). O grupo controle negativo foi cultivado com meio completo. Após 5 dias de cultura, as células foram fixadas com metanol por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas com salina e coradas com Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 30 minutos. As imagens das células sugestivas de diferenciação osteoclástica e seus controles foram adquiridas utilizando um microscópio AX70 (Olympus, Tóquio, Japão).

2.8 Cultura de osteoclastos – Método TRAP

O método do TRAP foi utilizado para identificação dos osteoclastos, o qual é baseado na detecção da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato. Esta enzima, expressa por osteoclastos, participa da degradação do colágeno tipo I (16). As células-tronco mesenquimais/estromais (1×10^5) foram incubadas em placa de 96 poços. O protocolo de diferenciação dos osteoclastos foi o mesmo utilizado no item 2.7. Após 5 dias de cultura, o kit TRAP (Acid Phosphatase Assay Kit; Sigma, St. Louis, MO, EUA) foi preparado segundo as instruções do fabricante. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax 190), com filtro de 405 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). O cálculo da atividade do TRAP na amostra foi obtido em unidade/mL de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Unidades/mL} = \frac{(A_{405}[\text{amostra}] - A_{405}[\text{branco}] \times 0,05 \times 0,3 \times \text{FD})}{A_{405}[\text{padrão}] \times \text{Tempo} \times \text{Venz}}$$

$A_{405}[\text{amostra}]$ = a absorbância da amostra

$A_{405}[\text{branco}]$ = a absorbância do branco

$A_{405}[\text{padrão}]$ = a absorbância do padrão

FD = fator de diluição da amostra original

Tempo = tempo de incubação a 37 °C em minutos

Venz = volume da enzima padrão adicionada ao ensaio em mL

0,05 = concentração (µM/mL) de 4-nitrofenol na solução padrão

0,3 = o volume total por poço na placa de 96 poços (mL)

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Características morfológicas das células-tronco obtidas da medula óssea de camundongos

As células-tronco provenientes da medula dos camundongos apresentaram um perfil de células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs), uma vez que possuíam características semelhantes às aquelas descritas na literatura, como capacidade de expansão, adesão à superfície plástica, e morfológicamente similar aos fibroblastos. Após a coleta, foi observado um formato celular arredondado (**Figura 1A**), formação de agregados celulares evidentes após 48 horas (**Figura 1B**), e predomínio do formato celular fusiforme a partir do 20º ao 28º dia (**Figura 1C**). As criopreservações dessas células mostraram uma capacidade rápida de proliferação quando submetidas a reiniciar uma nova cultura.

Friedenstein *et al*, em 1970, foi o primeiro a descrever e identificar a habilidade dos fibroblastos formadores de colônia à adesão em superfície plástica (17). Nesse estudo, as CTMs apresentaram características semelhantes às aquelas já descritas em outros trabalhos, como formação de agregados semelhantes aos fibroblastos e capacidade de adesão ao plástico das garrafas de cultivo (18,17).

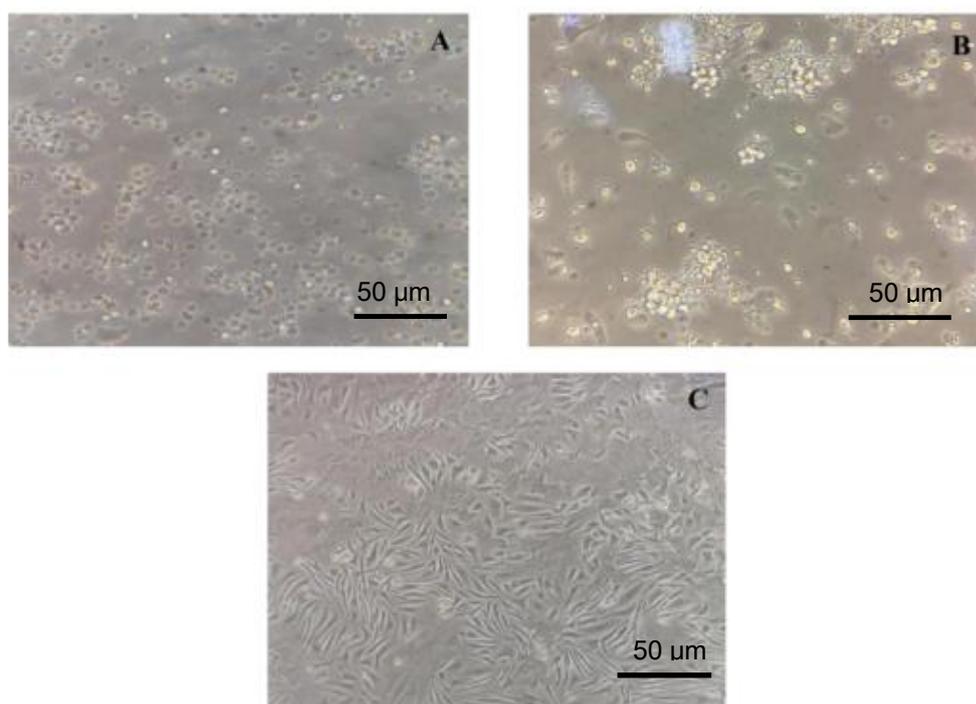


Figura 1. Morfologia das células-tronco mesenquimais/estromais de medula óssea. Células cultivadas *in vitro* após a coleta (A); com 48 horas (B); e 28 dias depois (C). Aumento x40.

3.2 Caracterização celular por citometria de fluxo

Para investigar as características fenotípicas das células isoladas a partir da medula óssea, as culturas celulares foram analisadas usando anticorpos contra vários antígenos intracelulares e de superfície celular. Na terceira passagem, a análise por citometria de fluxo revelou a expressão de moléculas da superfície celular que caracterizam células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs), como CD44, CD73, CD90, CD105 (**Figura 2**). A porcentagem de marcadores de células hematopoiéticas foi menor (CD11b e CD45) nesta passagem.

As células que constituem o organismo apresentam marcadores de superfície celular específicos que caracterizam a tipicidade da célula que os contém (19). Este trabalho demonstrou a presença de marcadores hematopoiéticos durante o período inicial da cultura. Esse achado pode ser explicado devido à presença de contaminantes hematopoiéticos durante as passagens iniciais. No entanto, com o decorrer do tempo de cultura, a expressão desses marcadores é reduzida (18). As CTMs podem ser encontradas em diversos órgãos e tecidos, como músculo, baço e medula óssea. Contudo, quando obtidas desta última, uma alta porcentagem de marcadores de células mesenquimais é expresso (18). Em nosso estudo foi constatada a presença de marcadores específicos desse grupo celular (CD44, CD73, CD90 e CD105).

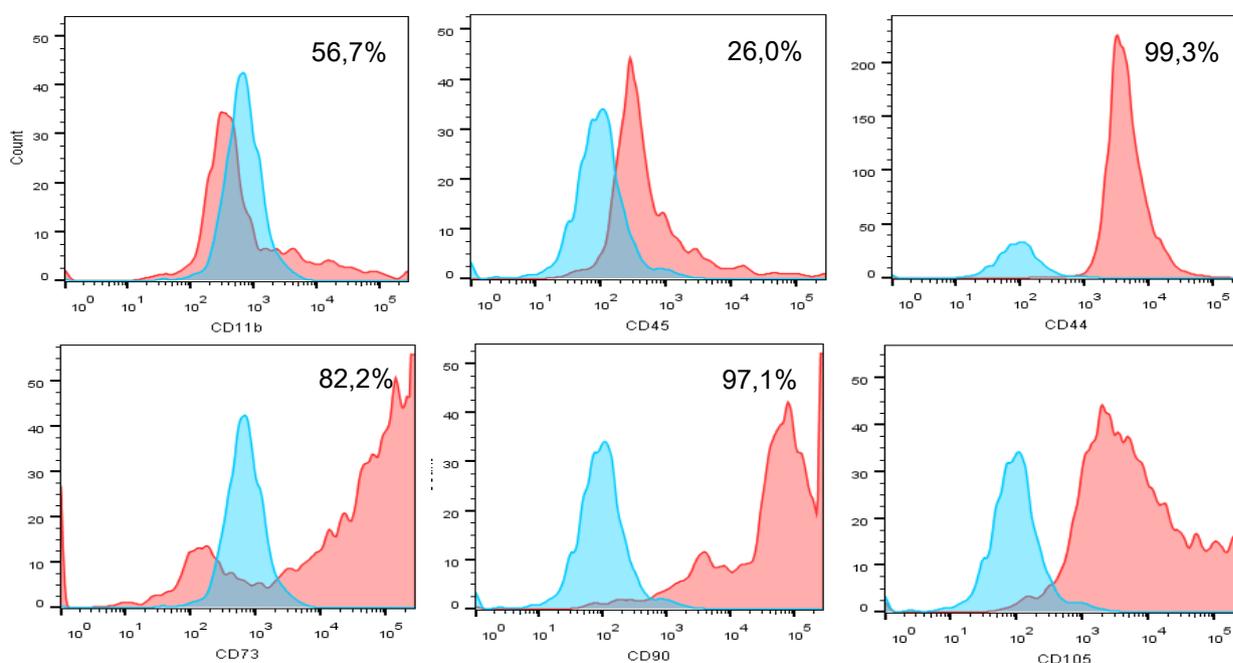


Figura 2. Imunofenotipagem das células-tronco mesenquimais/estromais isoladas da medula-óssea. A expressão dos marcadores de superfície CD44, CD73, CD90, CD105, CD45 e CD11b foi avaliada por citometria de fluxo. Os histogramas mostram controle de isotipo (picos azuis) versus coloração de anticorpo específico (picos cor de rosa) e as porcentagens de células positivas para as moléculas selecionadas.

3.3 Citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs)

Os experimentos para a avaliação da citotoxicidade do LASSBio-1386 apresentaram resultados promissores. A determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi realizada frente às células-tronco mesenquimais/estromais e os valores comparados com a violeta de genciana ($CC_{50} = 2,66 \pm 0,21 \mu\text{M}$), droga citotóxica utilizada como referência. O composto em teste apresentou o CC_{50} igual a $41,62 \pm 1,13 \mu\text{M}$, sendo este um resultado promissor, uma vez que o alendronato de sódio (droga já utilizada para tratamento da osteoporose) possui o CC_{50} igual a $14,27 \pm 2,96 \mu\text{M}$ (**Tabela 2**).

O composto em estudo, (E) -N' - (3,4-dimetoxibenzilideno) -4-metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386), apresentou uma baixa citotoxicidade quando comparado com a droga referência já utilizada no mercado para o tratamento da osteoporose. Estudos anteriores também demonstraram um perfil de citotoxicidade menor frente à macrófagos da linhagem J774, onde o LASSBio-1386 apresentou CC_{50} acima de $55 \mu\text{M}$ (9). Os resultados obtidos indicam que a droga em estudo possui em perfil citotóxico baixo em diferentes linhagens celulares, incluindo, também, precursores de células ósseas.

Tabela 2. Citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais/estromais.

COMPOSTOS	$CC_{50} \pm DP$ (μM)
LASSBio-1386	$41,62 \pm 1,13$
Alendronato de sódio	$14,27 \pm 2,96$
Violeta Genciana	$2,66 \pm 0,21$

3.4 Influência do LASSBio-1386 na diferenciação osteoblástica

As células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) foram cultivadas em meio indutor e tratadas com duas concentrações do referido composto (15 e 30 μM). Após 21 dias, as culturas configuraram a presença de agregados celulares, sendo este um indício do processo de diferenciação. As culturas controle negativo foram mantidas apenas em meio DMEM (**Figura 3A**). As células foram coradas com alizarina vermelha a 2% e, com isso, observada a aparição do depósito de cálcio nas culturas celulares. (**Figura 3B**). Além disso, em relação ao controle positivo, o grupo tratado com o LASSBio-1386 aumentou o número células coradas com alizarina vermelha, evidenciando assim o papel de induzir a diferenciação em osteoblastos, principalmente na maior concentração utilizada (**Figuras 3C, D; Figura 4**). O tratamento com alendronato de sódio, droga referência já utilizada no tratamento da osteoporose, também preservou o depósito de cálcio (**Figura 3E**).

O efeito do alendronato de sódio está ligado a inibição da atividade osteoclástica. Porém, Kim e colaboradores (2008) relataram que, apesar dessa droga atuar nos osteoclastos, a mesma também apresentava efeito sobre a diferenciação osteoblástica. Tal fator foi evidenciado através da coloração positiva de alizarina vermelha (20). Em nosso estudo, a presença do depósito de cálcio nas culturas foi confirmado pela alizarina vermelha. É válido salientar que na presença do LASSBio-1386, especialmente na maior concentração em teste (30 μM), houve uma intensidade na coloração e uma maior quantidade de células, sugerindo assim um estímulo osteogênico. Esses achados indicam que os principais componentes minerais da matriz óssea foram formados, e que, de fato, se tratava de células ósseas ali presentes (21).

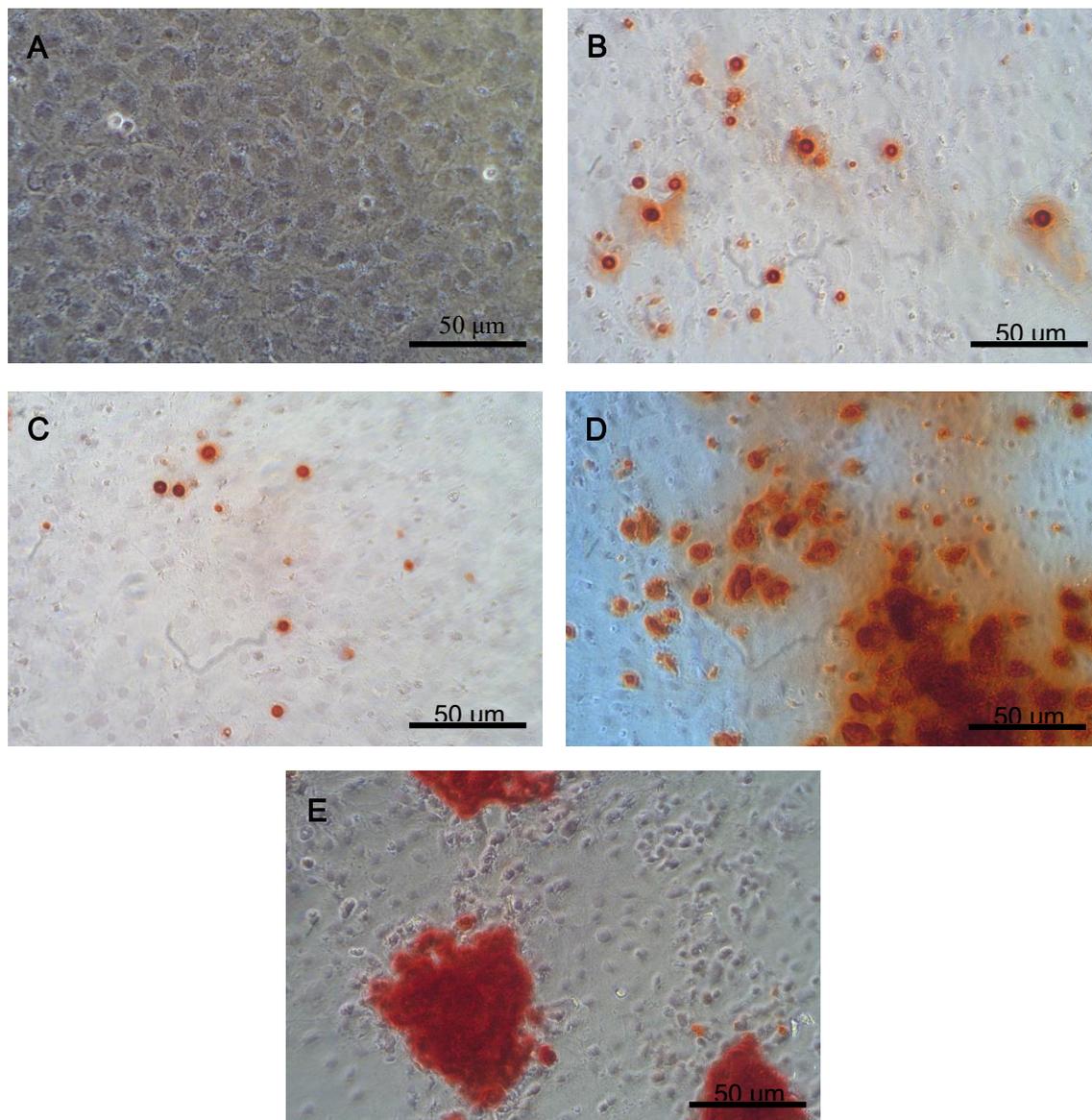


Figura 3. Diferenciação osteoblástica e tratamento ou não com o LASSBio-1386. Células-tronco mesenquimais/estromais não submetidas ao protocolo de diferenciação osteogênica (A) e diferenciadas (B), diferenciadas e tratadas com LASSBio-1386 nas concentrações de 15 μ M (C) e 30 μ M (D), diferenciadas e tratadas com alendronato de sódio na concentração de 30 μ M (E). Depósitos de cálcio são evidenciados pela coloração em alizarina vermelha a 2%. As imagens foram adquiridas usando um microscópio AX70 (Olympus, Tóquio, Japão). Aumento x40.

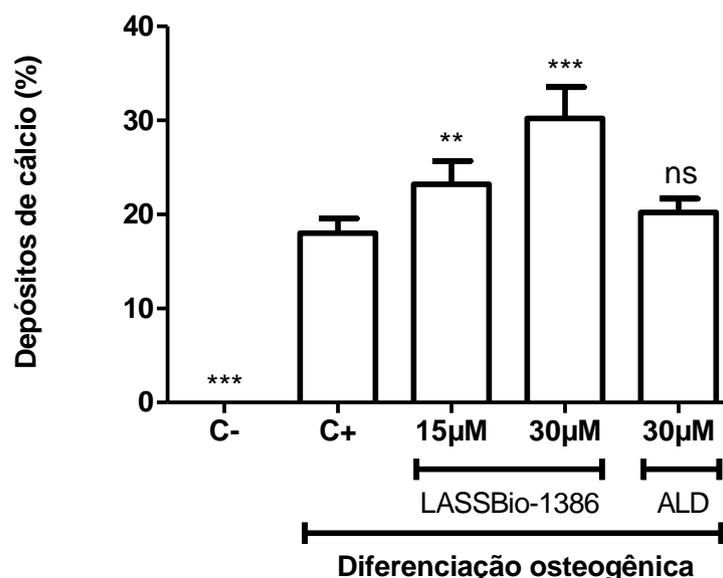


Figura 4. Depósitos de cálcio em células-tronco mesenquimais/estromais diferenciadas em osteoblastos e tratadas ou não com LASSBio-1386. As células-tronco foram diferenciadas em osteoblastos e tratadas ou não com LASSBio-1386 (15 ou 30 μM) ou alendronato de sódio (ALD; 30 μM) durante 21 dias. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. ns = não significativo em comparação com o grupo controle positivo. *** $p < 0,001$; comparado ao grupo controle positivo. ** $p < 0,05$; comparado ao grupo controle positivo.

3.5 Diferenciação osteoclástica – Avaliação Morfológica

As células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) foram cultivadas e induzidas à diferenciação osteoclástica por meio de estímulo com RANKL e M-CSF solúvel. O LASSBio-1386 foi adicionado às culturas em duas concentrações para avaliar se sua presença interfere na diferenciação. Após 5 dias, as células estimuladas (controle positivo) apresentavam características morfológicas de osteoclastos (células grandes e multinucleadas) (**Figura 5B**). O tratamento com o LASSBio-1386 reduziu o número destas células (15 e 30 μM), demonstrando influenciar no processo de diferenciação osteoclástica (**Figura 5C e D; Figura 6**). Resultado semelhante foi observado após o tratamento com o alendronato de sódio (Neo Química) (**Figura 6**).

Os osteoclastos são células grandes e multinucleadas resultantes da fusão de várias células do sistema fagocitário mononuclear, além disso, têm origem em células que se originam na medula óssea (22). No presente estudo, foram considerados osteoclastos as células que, após coradas com Giemsa, apresentaram 3 ou mais núcleos. Através das imagens adquiridas em microscópio óptico e contagem das células, sugere-se que o LASSBio-1386 reduziu o número de células sugestivas de osteoclastos.

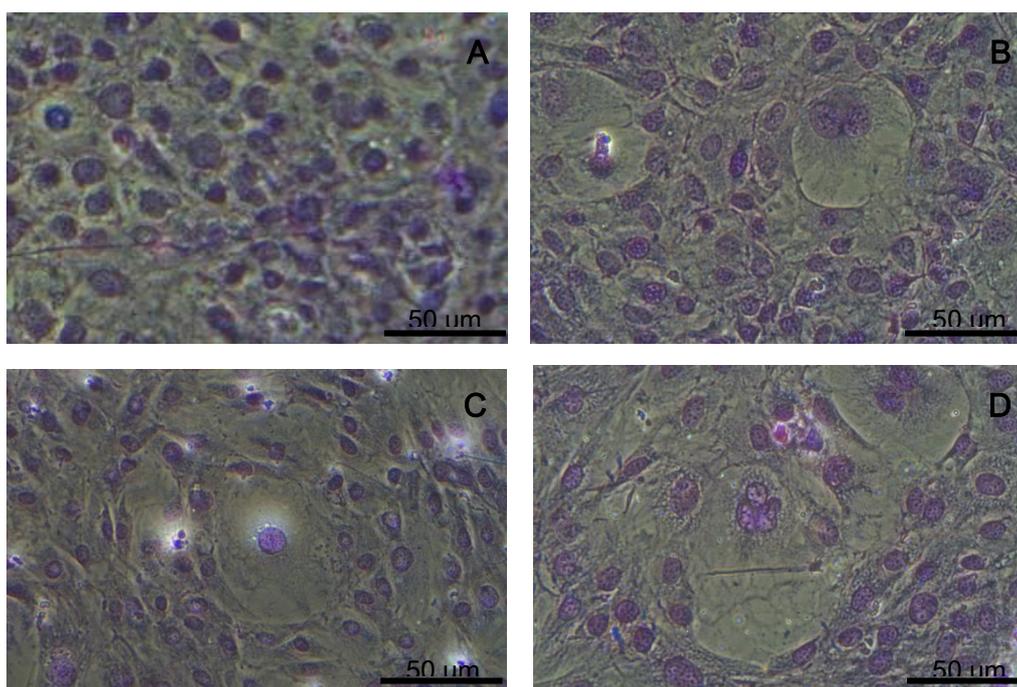


Figura 5. Diferenciação osteoclástica e tratamento ou não com o LASSBio-1386. Células-tronco mesenquimais/estromais não submetidas ao protocolo de diferenciação (A) e diferenciadas (B), diferenciadas e tratadas com LASSBio-1386 nas concentrações de 15 μ M (C) e 30 μ M (D). Células grandes e multinucleadas são evidenciadas pela coloração em Giemsa. Aumento x40.

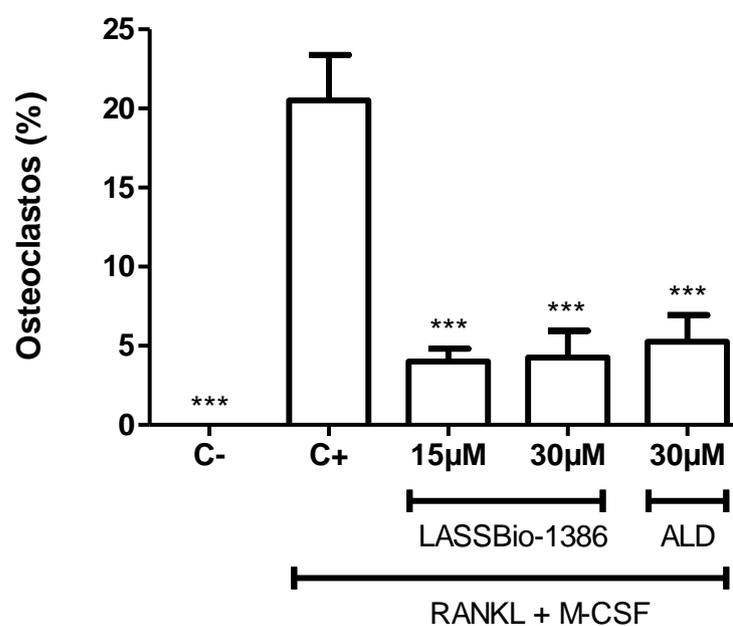


Figura 6. Porcentagem de células morfologicamente semelhantes à osteoclastos, tratadas ou não com LASSBio-1386. As células-tronco mesenquimais/estromais “semelhantes a osteoclastos” foram tratadas ou não com LASSBio-1386 (15 ou 30 μ M) ou com alendronato de sódio (ALD; 30 μ M) durante 5 dias. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$; comparado ao grupo controle positivo.

3.6 Avaliação enzimática da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP):

As células-tronco mesenquimais/estromais (CTMs) foram cultivadas e induzidas à diferenciação osteoclástica por meio de estímulo com RANKL e M-CSF solúveis. O LASSBio-1386 foi adicionado às culturas em duas concentrações para avaliar se sua presença interfere na expressão de TRAP e, conseqüentemente, na diferenciação em osteoclastos. Após 5 dias, as células estimuladas (controle positivo) apresentaram aumento na produção de TRAP. A adição de LASSBio-1386 reduziu significativamente a produção de TRAP, nas duas concentrações testadas, da mesma forma que o grupo tratado com alendronato de sódio a 30 μ M (Figura 7).

As CTMs expressam RANK e podem tornar-se precursores de osteoclastos ou se diferenciar em osteoclastos quando cultivadas com RANKL (23). Os osteoclastos expressam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K e metaloproteinases, que participam da degradação do colágeno tipo I da matriz óssea (16). Neste estudo, a presença de osteoclastos derivados de CTMs foi confirmada através da dosagem de TRAP e o composto LASSBio-1386 reduziu significativamente a produção desta enzima. Estes dados foram semelhantes aos encontrados por Martins e colaboradores, os quais observaram que o alendronato de sódio reduz a expressão do TRAP em osteoclastos derivados da linhagem celular RAW 264.7 (24).

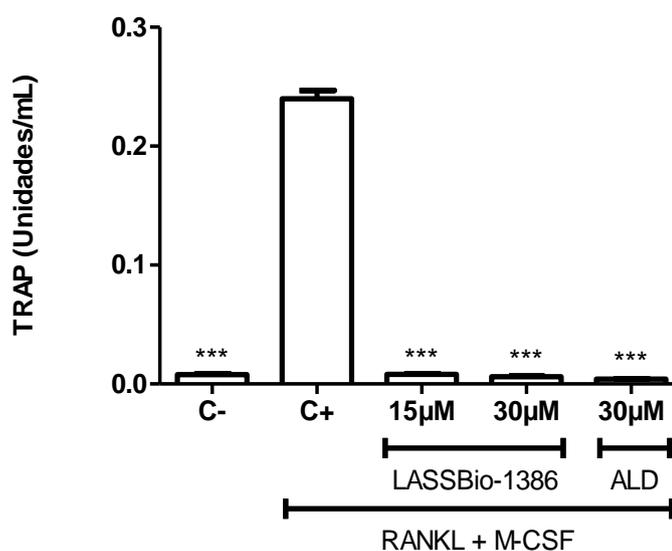


Figura 7. Avaliação enzimática da fosfatase ácida resistente ao tartarato. As células-tronco mesenquimais/estromais foram estimuladas com RANKL e M-CSF e tratadas ou não com LASSBio-1386 (15 ou 30 μ M) ou alendronato de sódio (ALD; 30 μ M) durante 5 dias. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$; comparado ao grupo controle positivo.

4 CONCLUSÃO

Com base nos resultados alcançados, sugere-se que o composto LASSBio-1386 apresenta uma baixa citotoxicidade, demonstra induzir a osteogênese de células-tronco mesenquimais/estromais e inibe a diferenciação osteoclástica, sugerindo uma atividade antirreabsortiva em ensaios *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Frazão P, Naveira M. Prevalência de osteoporose: uma revisão crítica. *Rev Bras Epidemiol.* 2006;9(2):206–14.
2. Caires ELP, Bezerra MC, Junqueira AFT de A, Fontenele SM de A, Andrade SC de A, d'Alva CB. Tratamento da osteoporose pós-menopáusia: um algoritmo baseado na literatura para uso no sistema público de saúde. *Rev Bras Reumatol.* 2017;57(3):254–63.
3. Sozen T, Ozisik L, Calik Basaran N. An overview and management of osteoporosis. *Eur J Rheumatol.* 2017;4(1):46–56.
4. Radominski SC, Bernardo W, Paula AP de, Albergaria BH, Moreira C, Fernandes CE, et al. Diretrizes brasileiras para o diagnóstico e tratamento da osteoporose em mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Reumatol [Internet].* 2017;57(S 2):452–66.
5. Robling AG, Castillo AB, Turner CH. Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:455–98.
6. Ramalho AC, Lazaretti-Castro M. Fisiopatologia da osteoporose involutiva. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 1999;43(6):409–14.
7. Reid IR. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies. *Nat Rev Endocrinol.* 2015;11(7):418–28.
8. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ, Boyce, Roodman, et al. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: Current status. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 PART 2):6222–31.
9. Guimarães ET, dos Santos TB, Silva DKC, Meira CS, Moreira DRM, da Silva TF, et al. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. *Int Immunopharmacol.* 2018;65(May):108–18.
10. Apotrosoaei M, Vasincu I, Tuchiluş C, Lupascu F, Constantin S, Lupaşcu D, et al. New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. *Rev medico-chirurgicală a Soc Medici și Nat din Iași.* 2013;117(2):538–44.
11. Barreiro EJ, Fraga CAM, Miranda ALP, Rodrigues CR. A química medicinal de N-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-trombóticos. *Quim Nova.* 2002;25(1):129–48.
12. Alam MM, Akhter M, Husain A, Marella A, Tanwar OP, Ali R, et al. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of 4,5-dihydropyrimidine-5- carbonitrile derivatives: Their synthesis and spectral elucidation. *Acta Pol Pharm - Drug Res [Internet].* 2012;69(6):1077–85.
13. Hamdy NA, Abdel-Aziz HA, Kamel GM, Fakhr IMI. Convenient synthesis, anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activities of some new bis-hydrazones

and pyrazole derivatives. *Acta Pol Pharm - Drug Res.* 2013;70(3):469–80.

14. Mu JX, Shi YX, Wu HK, Sun ZH, Yang MY, Liu XH, et al. Microwave assisted synthesis, antifungal activity, DFT and SAR study of 1,2,4-triazolo[4,3-a]pyridine derivatives containing hydrazone moieties. *Chem Cent J* [Internet]. 2016;10(1):1–9.
15. Boyce BF, Rosenberg E, de Papp AE, Duong LT. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *Eur J Clin Invest* [Internet]. 2012;42(12):1332–41.
16. Du N, Song L, Li Y, Wang T, Fang Q, Ou J, et al. Phytoestrogens protect joints in collagen induced arthritis by increasing IgG glycosylation and reducing osteoclast activation. *Int Immunopharmacol.* 2020;83(March):106387.
17. Lin H, Sohn J, Shen H, Langhans MT, Tuan RS. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. *Biomaterials.* 2019;203:96–110.
18. da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006;119(11):2204–13.
19. Zago MA, Covas DT. *Células-tronco: a nova fronteira da medicina.* 2006.
20. Kim HK, Kim JH, Abbas AA, Yoon TR. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: A preliminary study. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2009;467(12):3121–8.
21. Smajilagić A, Aljičević M, Redžić A, Filipović S, Lagumdžija AC. Rat bone marrow stem cells isolation and culture as a bone formative experimental system. *Bosn J Basic Med Sci* [Internet]. 2013;13(1):27–30.
22. Junqueira, LC; Carneiro, J. *Histologia básica.* 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
23. VAN BEEK, E. R.; LÖWIK, C. W. G. M.; PAPAPOULOS, S. E. Effect of alendronate treatment on the osteoclastogenic potential of bone marrow cells in mice. *Bone*, v. 20, n. 4, p. 335-340, 1997.
24. Martin TJ, Sims NA. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Rev Endocr Metab Disord.* 2015;16(2):131–9.

5 PROPOSTA DE SUBMISSÃO

5.1 Revista: **International Journal of health education da Escola bahiana de medicina e saúde pública**

5.2 Regras para Submissão:

Formatação: Utilize fonte tamanho 12pt, com 1,5 de espaçamento entre linhas, em coluna única, tamanho A4. As margens esquerda e direita devem ter 3 centímetros cada uma e as margens superior e inferior devem ter 2 centímetros cada uma. Para citações diretas, utilize fonte tamanho 10pt. Evite citações diretas sempre que possível e empregue o sistema métrico.

Título, resumo e palavras-chave: O manuscrito deve conter título, resumo e palavras-chave em português e inglês. Adicionalmente, o sistema solicitará a inclusão do título, resumo e palavras-chave durante a submissão. Esses dados devem ser inseridos conforme solicitado para que o artigo possa ser encaminhado para avaliação. O título deve ser objetivo, todo em letras maiúsculas, e conter de 5 a 15 palavras. As palavras-chave, no mínimo 3 e no máximo 5, devem ser selecionadas no Medical Subject Headings (MeSH) ou na Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Os resumos devem ser estruturados com introdução, objetivos, materiais e métodos, resultados e conclusão, e conter no mínimo 200 palavras e no máximo 250 palavras.

Tabelas, figuras, quadros, gráficos, bancos de dados etc: Questionários, entrevistas, tabelas, figuras, gráficos, quadros e bancos de dados devem ser enviados como arquivos suplementares, devidamente identificados. Tabelas, figuras, quadros e gráficos também devem constar no manuscrito nos seus devidos lugares.

Extensões de arquivos: Arquivos de textos devem ser enviados com extensão **.doc**. Tabelas devem ser enviadas com extensão **.xls** ou **.doc**. Os bancos de dados devem ser enviados com extensão **.xls**. Arquivos de imagem, como figuras e gráficos devem ser enviados com extensão **.jpg**, **.png** ou **.tiff** e 300dpi de resolução. Nenhum arquivo deve exceder 4Mb.

Referências: As referências bibliográficas devem ser formatadas no Estilo Vancouver. Artigos originais podem empregar no máximo 25 referências; estudos de caso, 15; e revisões de literatura, 50. Quando uma referência possuir um Digital Object Identifier (doi®) associado a ela, o doi® deve ser informado na referência.