UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA

PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS (PPGFARMA)

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO (E)–*N*'–(3,4–DIMETOXIBENZILIDENO)– 4– METOXI-N-METILBENZOHIDRAZIDA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA

JULIANA DIZAIRA TELES DE LIMA

Salvador

2021

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO (E)–*N*'–(3,4–DIMETOXIBENZILIDENO)– 4– METOXI-N-METILBENZOHIDRAZIDA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA

JULIANA DIZAIRA TELES DE LIMA

Dissertação apresentada ao de Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB), como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Co-Orientadora: Profa. Dra. Silvana Rodrigues de Albuquerque Taddei

Linha de Pesquisa: Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador

2021

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

L732 Lima, Juliana Dizaira Teles de

Investigação da atividade do (E) N (3,4 dimetoxibenzilideno) 4 metoxi N metilbenzohidrazida na remodelação óssea / Juliana Dizaira Teles de Lima. - Salvador, 2021.
58 fls : il.

Orientador(a): Profª Drª Elisalva Teixeira Guimarães.
Coorientador(a): Profª Drª Silvana Rodrigues de Albuquerque Taddei.
Inclui Referências
Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2021.

1.Remodelação óssea. 2.Osteoporose. 3.Movimentação dentária. 4.LASSBio-1386.

CDD: 615

FOLHA DE APROVAÇÃO

"INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DO (E)–N'–(3,4–DIMETOXIBENZILIDENO)– 4–METOXI-N-METILBENZOHIDRAZIDA NA REMODELAÇÃO ÓSSEA"

JULIANA DIZAIRA TELES DE LIMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 30 de julho de 2021, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:

Dra. Elisalva T. Guimarães
Universidade do Estado da Bahia
Mat. nº 745313275

Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA

Professor(a) Dr.(a) SILVANA RODRIGUES DE ALBUQUERQUE TADDEI
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Biologia Celular
Universidade Federal de Minas Gerais

Professor(a) Dr.(a) ANDRE LACERDA BRAGA TELES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Estadual de Feira de Santana

Professor(a) Dr.(a) MARCIO CAJAZEIRA AGUIAR
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Ciências (Biologia Celular e Tecidual)
Universidade de São Paulo

À minha família, os maiores incentivadores do meu crescimento profissional.

Agradecimentos

À minha família, pois mesmo com a distância física sempre acreditou no meu potencial e me apoiou nos momentos mais difíceis. Ao meu esposo, Francisco, por ser um grande parceiro e ter enfrentado comigo cada passo desse árduo caminho. À minha mãe Elisangela pelo amor incondicional. À minha tia Emilene por todo ensinamento e motivação dada aos meus estudos desde quando eu era pequena. À vovó Graça e o vovô Dinaldo, por todo carinho e comemoração das minhas vitórias. À minha sogra Socorro pelas orações diárias e palavras de conforto. Ao meu sogro Sales pela imensa torcida.

À minha amiga Tainá que tanto me acalmou nos momentos de maior ansiedade. E aos seus pais, tia Sineide e tio Ricardo. Tia, muito obrigada pelas orações, pelo colo, e por ter sempre um cafezinho pronto pra me ajudar a despertar nas horas de estudo. Sou muito grata por terem me acolhido nesses últimos meses dessa caminhada.

Aos amigos que a ortodontia me deu, Camila, Maria Clara e Paulo. Vocês sempre torceram por mim. Obrigada por estarem a todo o momento dispostos a me ouvir e me distrair com as melhores risadas.

À minha querida orientadora Liu, pela grande oportunidade confiada, por sempre exigir de mim o melhor, pelos conhecimentos compartilhados, pelos desafios e conselhos. Eu sei que esse foi um desafio muito grande para nós duas. Muito obrigada por toda paciência e por ter me ajudado a chegar até aqui. À Profa. Silvana, minha co-orientadora, obrigada por ter acreditado no meu potencial e pelo convite para entrar nesse projeto.

Às minhas companheiras e amigas de pesquisa do GEPPE, Dahara, Jessica e Tatiana. Vocês tornaram esse desafio muito mais prazeroso, com todo apoio e aprendizado dentro e fora do laboratório. Dah e Jeu, sou grata pelos ensinamentos e por estarem disponíveis para dúvidas a qualquer momento. Tati, você foi o meu pilar nessa caminhada, você não só acreditou em mim a todo instante, como também correu ao meu lado atrás de todos os objetivos. Obrigada pelo incentivo quando tudo parecia desandar.

Aos professores e funcionários do PPGFARMA/UNEB, representado pelo prof. Aníbal e Leia, sempre solícitos e prestativos para resolver qualquer dificuldade que surgiu ao longo do percurso. À Rose e Sérgio, obrigada pelo apoio e suporte no desenvolvimento das atividades no DCV. Ao NUHISPAT, representado pelos professores Djalma e Manoela, pela

disponibilidade do laboratório. À FAPESB e ao CNPq (Chamada Universal MCTI/CNPq N° 28/2018) pelo apoio financeiro.

À equipe do LETI/Fiocruz sempre disposta em contribuir. À Dra. Milena por me permitir desenvolver a pesquisa no laboratório. Ao Dr. Diogo pelo fornecimento de materiais e reagentes, quando necessário. À Rute e Larissa pelo apoio técnico quando precisei. Agradeço também aos colegas do laboratório, Patrícia, Val, Breno, Cássio, Renan, Jadson, Luciano, Gabriela, Paula e Carine, obrigada pelo suporte e constante colaboração no trabalho. À equipe da microscopia, Márcio e Dra. Adriana, sempre tão solícitos e atenciosos. Aos funcionários do biotério, Valdomiro, Cleber e Antônio Carlos pelo auxílio nos cuidados com os animais. À Ana Paula do laboratório de histotecnologia, sou extremamente grata pela ajuda e disposição fundamentais. Aos funcionários da segurança e portaria que ao longo desses anos me acompanharam chegar e sair da Fiocruz nos horários mais surpreendentes. E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram e contribuíram nesse processo.

Lista de Abreviaturas e Siglas

APC	Aloficocianina (do inglês: *Allophicocyanin*)
BRAZOS	Estudo Brasileiro de Osteoporose (do inglês: *Brazilian Osteoporosis Study*)
CC_{50}	Concentração citotóxica para 50% da população celular
CCL	Quimiocina ligante (do inglês: *Chemokine ligand*)
CD	Cluster de diferenciação (do inglês: *Cluster of differentiation*)
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
c-Fms	Receptor do fator estimulador de colônias (do inglês: *Colony stimulating factor-1 receptor*)
CFU-F	Unidades formadoras de colônias de fibroblastos (do inglês: *Colony forming units – fibroblasts*)
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (do inglês: *Calcitonin gene related peptide*)
COX	Ciclooxigenase
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CXCL	Ligante de quimiocina da família CXC (do inglês: *Chemokine ligand CXC family*)
Cy	Cianina (do inglês: *Cyanine*)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: *Dulbecco's modified Eagle medium*)
DMO	Densidade mineral óssea
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
HAP	Hipertensão arterial pulmonar
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (do inglês: *Insulin growth factor 1*)
IL	Interleucina

IOF	Fundação Internacional de Osteoporose (do inglês: *International Osteoporosis Foundation*)
JAC	Junção amelocementária
LASSBio	Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
LHCC	Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago (do inglês: *Macrophage colony stimulating factor*)
MSRE	Modulador seletivo de receptor de estrogênio
MOD	Movimentação ortodôntica dentária
NAH	*N*-acilhidrazona
NFκB	Fator nuclear kappa B (do inglês: *Nuclear factor kappa-B*)
Ni-Ti	Níquel-Titânio
OPG	Osteoprotegerina (do inglês: *Osteoprotegerin*)
OPM	Osteoporose pós-menopausa
OVX	Ovariectomia
PBS	Tampão fosfato-salino (do inglês: *Phosphate buffered saline*)
PDE	Fosfodiesterase (do inglês: *Phosphodiesterase*)
PE	Ficoeritrina (do inglês: *Phycoerythrin*)
PFA	Paraformaldeído (do inglês: *Paraformaldehyde*)
PGE	Prostaglandina E (do inglês: *Prostaglandin E*)
PTH	Hormônio da paratireoide (do inglês: *Parathyroid hormone*)
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B (do inglês: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B*)
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (do inglês: *Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*)
RPM	Rotações por minuto

Runx-2	Fator de transcrição 2 relacionado à runt (do inglês: *Runt-related transcription factor 2*)
S.E.M.	Erro padrão da média (do inglês: *Standard error mean*)
SAPORI	Índice de risco de osteoporose de São Paulo (do inglês: *São Paulo osteoporosis risk index*)
SAPOS	Estudo de osteoporose de São Paulo (do inglês: *São Paulo osteoporosis study*)
SBF	Soro bovino fetal
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: *Tumor necrosis factor alpha*)
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato (do inglês: *Tartrate-resistant acid phosphatase*)
TRE	Terapia de reposição de estrogênio
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: *Vascular endothelial growth factor*)
Wnt	Via de sinalização Wingless

Lista de Figuras

Figura 1	Osteoclastogênese e reabsorção óssea.	**19**
Figura 2	Estrutura química do (E)– *N*'-(3,4– dimetoxibenzilideno)–4-metoxi-*N*- metilbenzohidrazida (LASSBio-1386).	**26**
Figura 3	Aspectos morfológicos das células-tronco de medula óssea.	**36**
Figura 4	Imunofenotipagem das células-tronco isoladas da medula óssea.	**37**
Figura 5	Diferenciação osteoblástica e tratamento ou não com o LASSBio-1386.	**40**
Figura 6	Depósitos de cálcio em CTMs diferenciadas em osteoblastos e tratadas ou não com LASSBio-1386.	**41**
Figura 7	Diferenciação osteoclástica e tratamento ou não com o LASSBio-1386.	**42**
Figura 8	Porcentagem de células morfologicamente semelhantes à osteoclastos, tratadas ou não com LASSBio-1386.	**42**
Figura 9	Avaliação enzimática da fosfatase ácida resistente ao tartarato.	**43**
Figura 10	Movimentação dentária ortodôntica após o tratamento ou não com LASSBio-1386.	**45**
Figura 11	Produção de RANKL e OPG em soro animal após tratamento ou não com LASSBio-1386.	**48**

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1	Especificação dos conjuntos de antígenos e conjugados utilizados na imunofenotipagem celular por citometria de fluxo.	**29**
Tabela 2	Grupos experimentais dos ensaios *in vivo*.	**32**
Tabela 3	Citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais.	**38**

Resumo

DE LIMA, J. D. T. **Investigação da atividade do (E)–*N*'–(3,4–dimetoxibenzilideno)– 4–metoxi-N-metilbenzohidrazida na remodelação óssea** (dissertação). Salvador: Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Estado da Bahia, 2021; 58p.

A remodelação óssea pode ser modulada tanto pela resposta imune quanto por ação de carga mecânica sobre o tecido. O desequilíbrio desse processo caracteriza a osteoporose, uma doença osteoimunológica. Atualmente, os medicamentos para a osteoporose incluem os inibidores da reabsorção óssea e os promotores da formação óssea, porém, ambos apresentam efeitos adversos. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito do (E)-*N*'-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386), um derivado das *N*-acilhidrazonas, na diferenciação de células ósseas *in vitro* e na remodelação óssea em modelo murino de osteoporose associada à força ortodôntica. Para os ensaios *in vitro*, células-tronco mesenquimais (CTM) foram obtidas da medula óssea de camundongos fêmeas C57BL/6. A citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às CTMs foi realizada para determinar a concentração atóxica. A influência do composto na diferenciação das células ósseas também foi avaliada. Nos ensaios *in vivo*, camundongos fêmeas C57BL/6 foram ovariectomizados (OVX) para a indução da osteoporose. Após 30 dias, foi iniciada a movimentação dentária e o tratamento imediato com dose única de LASSBio-1386. A mensuração da movimentação dentária no osso alveolar foi determinada por análise histopatológica. As citocinas inflamatórias envolvidas na remodelação óssea foram avaliadas no soro de animais por ELISA. As células isoladas da medula óssea apresentaram perfil morfológico e expressão de moléculas de superfície celular que caracterizam as CTM. O LASSBio-1386 aumentou a deposição óssea e diminuiu a diferenciação osteoclástica em ensaios *in vitro* em concentrações não tóxicas para CTM. No modelo murino de osteoporose associada à força ortodôntica, nenhuma diferença significativa foi encontrada na quantidade de movimentção dentário entre os camundongos tratados e não tratados com LASSBio-1386. No entanto, o composto modulou a produção de citocinas envolvidas na remodelação óssea, apresentando níveis séricos de OPG aumentados e RANKL diminuídos. Esses dados sugerem que o LASSBio-1386 é uma importante molécula com ação antirreabsortiva, influenciando no equilíbrio entre o processo de reabsorção e formação óssea *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: Remodelação óssea; Osteoporose; Movimentação dentária; LASSBio-1386.

Abstract

DE LIMA, J. D. T. **Investigation of (E)–*N*'–(3,4–dimethoxybenzylidene)– 4– methoxy-N-methylbenzohydrazide activity in bone remodeling** (dissertation). Salvador: Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences, Bahia State University, 2021; 58p.

Bone remodeling is modulated by the immune response and mechanical load. The imbalance of this process characterizes the osteoporosis, an osteoimmunological disease. The drugs for osteoporosis include bone resorption inhibitors and bone formation promoters, however, both categories presented adverse effects. The present study aims to evaluate the effect of (E)-N'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386), a *N*-acylhydrazone derivative, on the differentiation of bone cells *in vitro* and in bone remodeling in a murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength. For *in vitro* assays, mesenchymal stem cells (MSC) were obtained from bone marrow of female C57BL/6 mice. LASSBio-1386 cytotoxicity against MSC were performed to determine the non-toxic concentration. The influence of LASSBio-1386 on bone cell differentiation also was evaluated. For *in vivo* assays, female C57BL/6 mice were ovariectomized (OVX) to induced osteoporosis. After 30 days, tooth movement and immediate treatment with a single dose of LASSBio-1386 was started. Orthodontic tooth movement in the alveolar bone was determined by histopathological analysis. Inflammatory cytokines involved in bone remodeling was evaluated in the serum of animals by ELISA. Cells isolated from bone marrow presented morphological profile and expression of cell surface molecules that characterize MSC. LASSBio-1386 increases bone deposition and decreases osteoclastic differentiation in *in vitro* assays in concentrations noncytotoxic to MSC. In the murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength, no significant difference was found in the amount of tooth movement between the mice treated with LASSBio-1386 and mice no treated. However, LASSBio-1386 modulated the production of cytokines involved in bone remodeling, OPG had increased and RANKL decreased levels in the serum after treatment, respectively. These data suggest that LASSBio-1386 is an important molecule with anti-resorptive action, influencing the balance between bone resorption versus formation process *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Bone remodeling; Osteoporosis; Tooth movement; LASSBio-1386.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 14
2. OBJETIVOS 16
   I. Objetivo Geral 16
   II. Objetivos Específicos 16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA 17
   3.1 Tecido ósseo e suas células 17
   3.2 Remodelação óssea 18
   3.3 Movimentação ortodôntica 20
   3.4 Osteoporose 21
   3.5 Células-tronco mesenquimais 22
   3.6 Tratamento da osteoporose 23
   3.7 *N*-acilhidrazonas 25
4. MATERIAIS E MÉTODOS 27
   4.1 Camundongos 27
   4.2 Moléculas 27
   4.3 Obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos 27
   4.4 Imunofenotipagem celular 28
   4.5 Teste de citotoxicidade sobre células-tronco mesenquimais 29
   4.6 Cultura de osteoblastos 29
   4.7 Cultura de osteoclastos – Coloração com Giemsa 30
   4.8 Cultura de osteoclastos – Método TRAP 30
   4.9 Modelo de osteoporose experimental em camundongo 31
   4.10 Modelo de movimentação ortodôntica 32
   4.11 Análise histomorfométrica 33
   4.12 Mensuração da movimentação dentária 34
   4.13 Dosagem de citocinas 34
   4.14 Análise estatística 35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 36
   5.1 Características morfológicas das células-tronco obtidas da medula óssea de camundongos 36
   5.2 Caracterização de células-tronco mesenquimais por citometria de fluxo 37
   5.3 Citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais 38

5.4 Influência do LASSBio-1386 na diferenciação osteoblástica 39
5.5 Diferenciação osteoclástica – Avaliação Morfológica 41
5.6 Avaliação enzimática da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) 43
5.7 Efeito do LASSBio-1386 na reabsorção óssea alveolar 44
5.8 Síntese dos níveis de RANKL e OPG 46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 49
REFERÊNCIAS 50
ANEXO – Artigo submetido na revista Archives of Oral Biology 58

1. INTRODUÇÃO

O osso é um órgão vivo extremamente dinâmico, em constante movimento e remodelação por meio de atividades acopladas dos osteoclastos (reabsorção óssea) e dos osteoblastos (formação óssea) (YU *et al*., 2021). Um desequilíbrio dessas ações em direção à reabsorção pode levar à osteoporose, uma doença insidiosa caracterizada por perda óssea excessiva, deterioração micro arquitetônica e aumento do risco de fratura do osso (BORCIANI *et al*., 2020).

A osteoporose é uma doença de alta prevalência e grave que afeta a saúde pública. Esta condição atinge principalmente mulheres na pós-menopausa, mas também pode afetar homens mais velhos (MADEIRA *et al*., 2020). Cerca de 200 milhões de pessoas sofrem de osteopenia e osteoporose em todo o mundo; aproximadamente 1 em cada 3 mulheres e 1 em cada 5 homens com mais de 50 anos apresentam algumas formas de anormalidades ósseas (TOBEIHA *et al*., 2020). Com a tendência global de longevidade, houve um crescimento da expectativa de vida, resultando no envelhecimento acelerado da população (SACCO, 2019). Estima-se que a prevalência de doenças ósseas aumentará de 2,4 vezes nas mulheres e 3,1 vezes nos homens até 2050 (SEEM *et al*., 2019).

A osteoporose pós-menopausa (OPM) está associada à insuficiência hormonal do climatério – conjunto de sintomas que surgem antes e depois da menopausa (PARDINI, 2014). Durante a menopausa, há um aumento da reabsorção óssea causado pela deficiência na produção do estrogênio (BLACK e ROSEN, 2016). A redução do estrogênio desencadeia um aumento na expressão de RANKL pelos osteoblastos, estimulando a formação de osteoclastos (ONO e NAKASHIMA, 2018). Além disso, o estrogênio exerce uma função osteoprotetora ao estimular a secreção de reguladores negativos da reabsorção óssea, como, por exemplo, a osteoprotegerina (OPG) por células estromais osteoblásticas (MARTIN e SIMS, 2015). Assim, os efeitos do estrogênio na homeostase óssea dependem da regulação das citocinas inflamatórias e óxido nítrico, e sua desregulação pode resultar em perda e fratura óssea (LI *et al*., 2020).

Nos últimos anos houve um desenvolvimento notável para a compreensão da patogênese da osteoporose e a disponibilidade de novos fármacos para tratar a doença. As terapias atuais para a osteoporose incluem o uso de agentes com ação antirreabsortiva, como a reposição de estrogênio, os moduladores de receptor de estrogênio, os bisfosfonatos e o

anticorpo monoclonal humano para RANKL (KHOSLA e HOFBAUER, 2017). A maioria desses agentes reduz a perda óssea através da inibição da atividade ou diferenciação dos osteoclastos, mas não promove a síntese óssea (GENNARI *et al*., 2015). Por outro lado, a teriparatida (PTH [1-34]rh), um polipeptídeo sintético obtido a partir do hormônio das paratiróides (PTH) humano, estimula a formação óssea pela ativação dos osteoblastos, mas sua aplicação é limitada a dois anos devido ao risco aumentado de desenvolvimento de osteossarcoma (CHAN *et al*., 2017) e osteonecrose da mandíbula (RADOMINSKI *et al*., 2017). Neste contexto, a identificação de novos fármacos de maior efetividade e que possuam menos efeitos adversos do que as substâncias atualmente disponíveis se torna necessária.

As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos sintéticos e o seu derivado *N*-acilhidrazona (NAH) é uma estrutura utilizada como modelo para derivatização de medicamentos multialvo. Os derivados das hidrazonas apresentam descrições na literatura de diversas atividades biológicas, como: antimicrobiana e antifúngica (APOTROSOAEI *et al*., 2013), anti-inflamatória e analgésica (BARREIRO *et al*., 2002; HAMDY *et al*., 2013) e antitumoral (MU, 2016). Entretanto, ainda não há dados na literatura sobre a atividade antirreabsortiva das hidrazonas.

Em estudos realizados no Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular (LHCC) da UNEB e no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fiocruz-BA pelo nosso grupo de pesquisa foi constatada a atividade imunomoduladora promissora de um 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 (NFκB), em ensaios *in vitro* e em modelo murino de choque endotóxico e de hipersensibilidade tardia (GUIMARÃES *et al*., 2018). Como o ligante do receptor ativador de NFκB (RANKL), expresso por osteoblastos e linfócitos, é um dos principais reguladores da diferenciação de monócitos mononucleares em osteoclastos maduros (BOYCE *et al*., 2012), este trabalho visa investigar a atividade do LASSBio-1386 frente à remodelação óssea.

2. OBJETIVOS

I. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do LASSBio-1386 sobre a diferenciação das células ósseas em ensaios *in vitro* e no modelo murino de osteoporose associado à força ortodôntica.

II. Objetivos Específicos

- Isolar e caracterizar células-tronco mesenquimais;
- Avaliar a citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais;
- Investigar o efeito do LASSBio-1386:
  - na atividade e sobrevida de células-tronco mesenquimais diferenciadas em osteoclastos e osteoblastos *in vitro*;
  - no processo de remodelação óssea alveolar induzida por força mecânica *in vivo*;
  - no controle da reabsorção óssea induzida pela redução de estrogênio.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Tecido ósseo e suas células

O osso é composto por aproximadamente 70% de minerais e 30% de material orgânico. Os constituintes minerais são os cristais de cálcio e fósforo, hidroxiapatita e alguns íons como sódio, fluoreto e magnésio. O material orgânico contém em sua grande maioria fibras de colágeno e, em menor quantidade, glicoproteínas e proteoglicanos (TOBEIHA *et al*., 2020). O osso tem como funções vitais a proteção de órgãos internos, promover suporte e local de adesão aos músculos e atuar como a maior reserva de cálcio e fósforo (MORGAN e GERSTENFELD, 2021).

O osso é um tecido vivo e dinâmico que está em constante remodelação fisiológica para a manutenção da integridade estrutural e homeostase mineral, o que permite a sua adaptação frente às alterações de carga mecânica, necessidades minerais, crescimento e reparo de fraturas (SINAKI, 2021). O processo de remodelação é coordenado por meio de atividades acopladas dos osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e seus precursores (YU *et al*., 2021).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, são células multinucleadas de origem hematopoiética que derivam de precursores mieloides da linhagem monócito-macrófago, cuja diferenciação é desencadeada pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) (BLANGY *et al*., 2020). Os osteoclastos expressam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K e metaloproteinases, que participam da degradação do colágeno tipo I da matriz óssea (DU *et al.*, 2020). Durante o processo de reabsorção do tecido ósseo, o osteoclasto maduro adere intimamente ao osso, selando completamente a superfície de contato membrana/superfície tecidual. Quando ativado, enzimas hidrolíticas e ácido clorídrico são secretados por estas células para a dissolução da matriz mineralizada (ZHU *et al*., 2020).

Os osteoblastos originam-se de células-tronco mesenquimais (CTM) por um processo denominado osteogênese membranosa e produzem diversas proteínas como o colágeno tipo I, a osteocalcina e a fosfatase alcalina, as quais são empregadas como marcadores de diferenciação e atividade destas células (GOMATHI *et al*., 2020). Os osteoblastos têm potencial de diferenciação osteogênica e são responsáveis por mediar o metabolismo ósseo por meio da síntese e depósito de matriz extracelular (ZHANG *et al*., 2020). A diferenciação das CTMs em osteoblastos é controlada por fatores de transcrição tais como *Runt-related*

transcription factor 2 (Runx-2), que reflete diretamente na diferenciação dos osteoclastos e controle da reabsorção óssea (GOMATHI *et al*., 2020). O recrutamento, diferenciação e ativação dos osteoblastos são controlados por diversos fatores locais e sistêmicos como hormônios, a via de sinalização Wingless (Wnt)/ beta-catenina, o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) e forças mecânicas (NEVE *et al.*, 2011).

Os osteócitos estão em maior número no tecido ósseo, são diferenciados dos osteoblastos e incorporados na matriz óssea. Durante a formação óssea, os osteoblastos aprisionam-se na matriz recém sintetizada, transformando-se em osteócitos (ROCHEFORT *et al*., 2010). Estudos indicam que os osteócitos desempenham papeis essenciais na homeostase óssea, regulando os osteoblastos e osteoclastos (PLOTKIN e BELLIDO, 2016). Por exemplo, os osteócitos participam da troca de íons por meio de sua vasta rede de células e atuam como células mecano-sensoriais realizando a transdução de sinais (ATKINS *et al*., 2014). As vias de sinalização dos osteócitos ocorrem via geração de óxido nítrico e prostaglandinas assim como por meio de junções tipo gap (HEUCK, 1970).

3.2 Remodelação óssea

A remodelação óssea é um processo fisiológico constante, responsável pela manutenção do *turnover* ósseo, o qual ocorre por meio da ação coordenada de células ósseas, resultando em reabsorção óssea por osteoclastos e deposição óssea por osteoblastos (XIAO *et al*., 2016). As atividades destas células ósseas de reabsorção/formação de osso são moduladas tanto pela resposta osteoimunológica quanto por ação de carga mecânica sobre este tecido (TOBEIHA *et al.*, 2020).

Mecanismos de sinalização diretos ou indiretos dos osteoblastos regulam o processo de diferenciação, recrutamento e ativação dos osteoclastos. Duas citocinas que são o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), expresso por osteoblastos e células estromais, e o ligante do receptor ativador de NFκB (RANKL), expresso por osteoblastos e linfócitos, são os principais reguladores da diferenciação de monócitos mononucleares em osteoclastos maduros. Este processo ocorre quando M-CSF e RANKL ligam-se aos seus respectivos receptores, receptor fator estimulador de colônia-1 (c-Fms) e receptor ativador do NFκB (RANK), expressos nos precursores de osteoclastos (BOYCE *et al.*, 2012). O osteoblasto pode também enviar estímulos inibitórios a reabsorção óssea ao expressar a OPG, que age como receptor solúvel de RANKL e, como consequência, interrompe o sinal pró-

osteoclástico (HENRIKSEN *et al.*, 2011). Além disso, a OPG contribui para a inibição da reabsorção óssea por meio da inibição da fase terminal de diferenciação dos osteoclastos e induz a sua apoptose (DOMAZETOVIC *et al.*, 2017). Portanto, pode-se afirmar que a interação RANK-RANKL-OPG é a importante via de regulação da remodelação óssea (**Figura 1**).

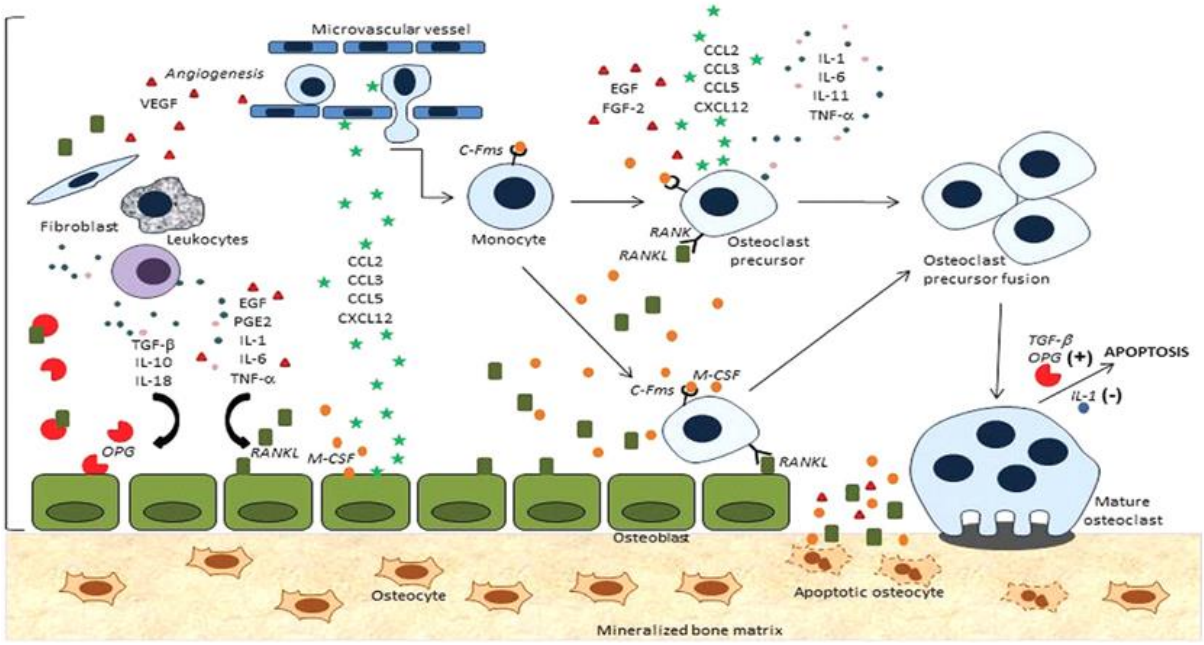


Figura 1. Osteoclastogênese e reabsorção óssea (Adaptado de ANDRADE JR., TADDEI e SOUZA, 2012).

Além do desequilíbrio entre fatores pró e anti-inflamatórios, a estimulação mecânica gerada por contração muscular e tensionamento de tendões nos ossos afeta o processo de remodelação óssea (MACARI *et al.*, 2015; HART *et al.*, 2017). Este pode ser um dos fatores que contribuem para a perda óssea em idosos após a diminuição da atividade física (HART *et al.*, 2017). Alguns estudos *in vitro* identificam possíveis mecanismos através dos quais a carga mecânica é convertida em respostas biológicas (mecanotransdução) (AL-DUJAILI *et al.*, 2011). Nesse contexto, a força de compressão induz necrose, hipóxia, dano físico às células e reabsorção óssea. Em contraste, a força de tensão promove angiogênese, estiramento de células da matriz e formação óssea (ANDRADE *et al.*, 2009; TADDEI *et al.*, 2012[a]; TADDEI *et al.*, 2012[b]; TADDEI *et al.*, 2013). Deste modo, compreender a biologia básica da remodelação óssea é um fator importante para o esclarecimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos em doenças associadas à desordens ósseas, como observado na osteoporose, artrite reumatoide (OHTSUJI *et al.*, 2018), doença periodontal (HOWAIT *et al.*, 2019), osteomielite e tumores ósseos (ROODMAN e GUISE, 2019).

3.3 Movimentação ortodôntica

Todos os ossos do esqueleto sofrem remodelação, entretanto, esse processo pode ser mais rápido em alguns sítios como no osso alveolar presente ao redor dos dentes da maxila e mandíbula. O osso alveolar tem alta capacidade de sofrer reabsorção/deposição óssea, o que possibilita a erupção dentária, movimentação fisiológica dos dentes durante o crescimento dos maxilares e a movimentação dentária induzida por aparelho ortodôntico (LI *et al*., 2018).

A carga mecânica desencadeia o processo inflamatório local, caracterizado pela liberação precoce de mediadores inflamatórios específicos. Essas moléculas induzem a reabsorção óssea na área do periodonto que sofre compressão, ou formação de osso na região que é acometida por força de tração (ANDRADE *et al*., 2009; TADDEI *et al*., 2012[a]; TADDEI *et al*., 2012[b]; TADDEI *et al*., 2013).

A movimentação dentária ortodôntica acontece devido ao remodelamento do osso alveolar e ligamento periodontal induzido por força mecânica (ANDRADE *et al*., 2009; TADDEI *et al*., 2012[a]; TADDEI *et al*., 2012[b]; TADDEI *et al*., 2013). Este processo ocorre em três fases: fase inicial, fase platô e fase pós-platô (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006). Na fase inicial, após a aplicação de uma força mecânica surgem duas áreas distintas no ligamento periodontal: a área de pressão decorrente da compressão provocada pelo movimento inicial do dente no alvéolo e a área de tensão com o estiramento das fibras do ligamento periodontal (LI *et al*., 2018). Esta alteração na região do ligamento periodontal desencadeia uma resposta inflamatória aguda com a liberação de mediadores químicos, tais como: citocinas pró e anti-inflamatórias (IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, RANKL, IL-10, IL-33), fatores de crescimento (VEGF), prostaglandina (PGE_2), neuropeptídio (CGRP e substância P), óxido nítrico, quimiocinas (CCL3, CCL2 e CCL5, CXCL12) e hormônios (PTH, estrogênio, calcitonina). Estes mediadores podem atuar conjuntamente para controlar a proliferação, recrutamento, diferenciação, atividade e sobrevivência das células ósseas, e consequentemente, regulam a remodelação óssea (ANDRADE *et al*., 2009; TADDEI *et al*., 2012[a]; XIAO *et al*., 2016).

A fase platô é caracterizada pela estagnação da movimentação ortodôntica, é resultado da presença de tecidos necróticos na região do ligamento periodontal. Isto acontece porque a aplicação de uma força mecânica, mesmo em quantidade adequada, gera uma redução do fluxo sanguíneo e, consequentemente, o surgimento de uma pequena área hialinizada nos sítios de compressão. Os osteoclastos e macrófagos são recrutados de regiões adjacentes e

responsáveis pela reabsorção óssea e remoção do tecido hialinizado (LI *et al*., 2018). Na área de tensão ocorre depósito de matriz óssea pelos osteoblastos. A última fase da movimentação ortodôntica, pós-platô, é caracterizada pela presença de superfície óssea irregular no lado de pressão, enquanto que no lado de tensão há formação de tecido ósseo (KRISHNAN e DAVIDOVITCH, 2006). Essas características e quantificação da perda óssea não são completamente simuladas em estudos *in vitro*. Neste contexto, o uso de modelos *in vivo*, que permitem a avaliação do efeito da inflamação na remodelação óssea asséptica induzida por carga mecânica, como o modelo de movimentação dentária ortodôntica, podem ser úteis para estudar a conexão entre osso e sistema imunológico (TADDEI *et al*., 2013).

3.4 Osteoporose

A osteoporose é uma doença silenciosa, sem sintomas e evidências óbvias até que ocorra uma fratura (KUO e CHEN, 2017). Segundo a IOF, estima-se que esta doença afete 200 milhões de pessoas mundialmente (KANIS *et al*., 2008). No Brasil, cerca de 10 milhões de pessoas são afetadas pela doença (BACCARO *et al.*, 2015). De acordo com o Estudo Brasileiro de Osteoporose (BRAZOS), 15,1% das mulheres e 12,8% dos homens relataram fraturas por fragilidade (PINHEIRO *et al*., 2009). A prevalência de osteoporose masculina em um serviço de densitometria óssea na cidade de Salvador – BA foi de 29,68% (MEDRADO *et al*., 2004). Mais recentemente, dois estudos epidemiológicos brasileiros, SAPOS e SAPORI (Estudo de Osteoporose de São Paulo e Índice de Risco de Osteoporose de São Paulo), mostraram que 33% das mulheres na pós-menopausa apresentavam osteoporose (PINHEIRO *et al*., 2012 e PINHEIRO *et al*., 2010).

A osteoporose causa mais de 8,9 milhões de fraturas por ano em todo o mundo, resultando em 1 fratura osteoporótica a cada 3 segundos. Cerca de 50% das mulheres e 20% dos homens com idade igual ou superior a 50 anos sofrerão uma fratura osteoporótica ao longo da vida (KANIS *et al*., 2008). No Brasil, os dados disponíveis confirmam que a osteoporose incorre em significativo fardo individual e social: aproximadamente 15% das mulheres e 13% dos adultos brasileiros do sexo masculino apresentam fraturas por fragilidade (PINHEIRO *et al*., 2009), e os custos anuais para o tratamento das fraturas osteoporóticas podem chegar a 310 milhões de dólares (AZIZIYEH *et al*., 2019).

De acordo com o *National Institutes of Health Consensus Development Panel* sobre Osteoporose (LORENTZON e CUMMINGS, 2015), a osteoporose é definida como “uma

doença esquelética caracterizada por comprometimento da resistência óssea que leva a um risco aumentado de fratura". Além disso, o Ministério da Saúde do Brasil (Portaria nº 224, de 26 de março de 2014) define a osteoporose como uma condição em que a densidade mineral óssea (DMO) é igual ou inferior a 2,5 desvios padrão abaixo do pico de massa óssea encontrada no adulto jovem. Assim, o número de desvios padrão abaixo do normal, também conhecido como escore T, deve ser usado para definir a doença. Osteoporose grave ou estabelecida se refere a uma condição em que a densidade mineral óssea encontra-se abaixo de 2,5 desvios padrão, acompanhada de pelo menos uma fratura por fragilidade óssea (COSMAN *et al*., 2014).

A osteoporose pode ser classificada em primária que inclui a osteoporose pós-menopausa, senil e idiopática, e em secundária, que tem um mecanismo etiológico claramente definível, como má absorção de nutrientes, medicamentos como glicocorticoides e algumas doenças como hiperparatireoidismo (ZOU *et al*., 2020). Durante a osteoporose há um desequilíbrio na regulação da remodelação óssea, a velocidade de reabsorção do osso é maior do que a velocidade de formação, resultando em massa total reduzida (SILVA *et al*., 2015). O conhecimento do processo de remodelação pelas células ósseas é fundamental para avaliar a eficácia de terapias para inibir a perda óssea ou reduzir os estímulos osteoclastogênicos (XIAO *et al*., 2016).

3.5 Células-tronco mesenquimais

Pela sua capacidade de diferenciação em tecido ósseo, as células-tronco mesenquimais (CTM) têm sido utilizadas como modelo de estudo das propriedades de remodelação óssea. Von Knoch e colaboradores (2005), por exemplo, estudaram que CTMs diferenciadas em osteoblastos e tratadas com bisfosfonatos apresentaram significativo potencial de diferenciação e proliferação. As CTMs foram inicialmente isoladas da medula óssea e descritas como sendo células morfologicamente semelhantes a fibroblastos e com capacidade elevada de adesão à superfície plástica (FRIEDENSTEIN *et al*., 1970). Estas células são multipotentes, não hematopoiéticas, com propriedade de autorrenovação e capacidade de diferenciação em diversos tipos celulares (REISER *et al*., 2005). O isolamento de CTM foi relatado em diferentes tecidos como medula óssea, tecido adiposo, polpa dentária, cordão umbilical e sangue periférico (KOERNER *et al*., 2006). As CTMs são isoladas do aspirado de medula óssea por um processo de centrifugação em gradiente de densidade, selecionadas e expandidas em garrafas de cultivo *in vitro* (TAYLOR *et al*., 2007).

As CTMs constituem uma população heterogênea de células, em termos de morfologia e expressão de antígenos de superfície, que podem ser reconhecidas por anticorpos específicos. Para a caracterização fenotípica dessas células deve-se empregar um conjunto de anticorpos monoclonais que permitem a avaliação quantitativa e qualitativa da expressão dos antígenos de superfície por citometria de fluxo, caracterizando um perfil imunofenotípico das células isoladas (DOMINICI *et al*., 2006). A população de CTMs isoladas da medula óssea de humanos e camundongos são caracterizadas pela expressão em sua superfície dos marcadores moleculares CD73, CD90 e CD105. As CTMs não possuem marcadores típicos de células de linhagens hematopoiéticas e endoteliais, tais como o CD14, CD11b, CD34, CD45, CD19 e CD79 (DOMINICI *et al*., 2006). No entanto, a expressão desses antígenos pode mudar durante o cultivo destas células *in vitro*, a depender da fonte de obtenção, das condições da cultura específicas e do tempo de cultivo entre as passagens (PSALTIS *et al*., 2008).

As CTMs são a fonte celular favorita para estudos envolvendo a medicina regenerativa, visto que as células adultas podem ser obtidas de uma variedade de locais anatômicos, tem fornecimento ilimitado, capacidade de autorrenovação clonal e potencial de diferenciação em multilinhagem mesenquimal, incluindo as células formadoras de osso (BORCIANI *et al*., 2020).

3.6 Tratamento da osteoporose

A redução do risco de fratura é o principal objetivo da terapia para osteoporose. Como estratégias de tratamento e prevenção da osteoporose e fraturas osteoporóticas incluem-se: evitar quedas corrigindo a acuidade visual, reduzir o consumo de medicamentos que alteram o estado de alerta e equilíbrio, praticar atividade física para o equilíbrio e manutenção da massa óssea, evitar tabagismo e ingestão excessiva de álcool, dieta adequada de proteínas, cálcio e vitamina D (KANIS *et al*., 2008; AKKAWI e ZMERLY, 2018).

As terapias medicamentosas atuais para a osteoporose são classificadas em dois grupos: as drogas antirreabsortivas (bisfosfonatos, reposição de estrogênio, moduladores de receptor de estrogênio e anticorpo monoclonal humano para RANKL), as quais inibem o desenvolvimento, ativação e sobrevida dos osteoclastos e consequentemente reduzem a reabsorção óssea (KHOSLA e HOFBAUER, 2017); e as drogas anabólicas (teraparatida), que estimulam a formação óssea (RADOMINSKI *et al*., 2017).

Os bisfosfonatos são a primeira opção de droga prescrita para o tratamento da osteoporose. Essas drogas, como alendronato, risedronato, ibandronato, etidronato, clodronato e ácido zoledrônico, são potentes inibidores da reabsorção óssea e aumentam principalmente a DMO dos ossos trabeculares (SANTORA e SHARMA, 2020). No entanto, o uso prolongado dos bisfosfonatos está associado a sintomas gastrointestinais superiores leves, além de osteonecrose da mandíbula e fraturas femorais atípicas (AKKAWI e ZMERLY, 2018).

A terapia com reposição de estrogênio (TRE) é indicada para prevenção de osteoporose pós-menopausa (OPM), uma vez que a menopausa é caracterizada por deficiência de estrogênio (AKKAWI e ZMERLY, 2018). Porém, a TRE está associada a um risco aumentado de doença coronariana, câncer de mama, derrame e demência (KANIS *et al*., 2008). O raloxifeno é o único modulador seletivo de receptor de estrogênio (MSRE) amplamente disponível para prevenção e tratamento da OPM (KANIS *et al*., 2008). Reduz o risco de fraturas, mas não tem efeito sobre fraturas não-vertebrais, logo não é um agente de primeira linha para o tratamento da OPM. Além disso, o uso prolongado de raloxifeno aumenta o risco de eventos tromboembólicos venosos (ENSRUD *et al*., 2019).

Com o intuito de inibir a reabsorção óssea sem tantos efeitos colaterais, outra classe de fármacos está sendo testada, através da inibição das vias de sinalização celular que ativam o desenvolvimento e sobrevida dos osteoclastos. Dentre elas, pode-se citar o anticorpo humano contra RANKL (Denosumab), que impede a via de sinalização RANK/RANKL responsável pela de diferenciação, sobrevida e ativação dos osteoclastos (COSMAN *et al*., 2020). Entretanto, a inibição do RANKL por longos períodos de tempo pode também afetar a remodelação fisiológica e a homeostase óssea, além disso, a descontinuação do uso do Denosumab está associada a um risco aumentado de múltiplas fraturas vertebrais (FERRARI *et al*., 2020).

A teriparatida (PTH [1-34]rh), um polipeptídeo sintético, obtido a partir do hormônio das paratireoides (PTH) humano, é uma droga anabólica que estimula a formação óssea. O tratamento com teriparatida reduz as fraturas vertebrais e não vertebrais em mulheres com OPM (AKKAWI e ZMERLY, 2018). No entanto, este medicamento também pode aumentar a reabsorção do osso, pois seu efeito anabólico diminui ao longo do tempo. Além disso, o uso deste PTH sintético é limitado a dois anos, devido ao risco de desenvolvimento de osteossarcoma observado em ratos (REID, 2015). Desta forma, a procura por substâncias com

atividades imunossupressoras semelhantes, com pouca ou nenhuma toxicidade e efeitos adversos, é de grande relevância.

3.7 *N*-acilhidrazonas

As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos sintéticos que podem ser formados pela condensação quimiosseletiva de cetonas ou aldeídos aromáticos com hidrazidas derivadas da hidrazinólise de um éster com uma hidrazina (BARREIRO *et al*., 2002). O grupo funcional das hidrazonas apresenta em sua estrutura dois átomos de nitrogênio e um de carbono, havendo uma ligação covalente dupla entre o carbono e um dos nitrogênios, constituindo, assim, o grupo farmacofórico. As hidrazonas possuem dois sítios de substituição, o que possibilita a obtenção de séries variadas com relação aos efeitos dos substituintes. As hidrazonas e seus derivados apresentam descrições na literatura por suas atividades antimicrobiana e antifúngica (APOTROSOAEI *et al*., 2013), anti-inflamatória e analgésica (HAMDY *et al*., 2013) e antitumoral (MU *et al*., 2016).

A subunidade *N*-acilhidrazona (NAH) possui vantagens em sua exploração farmacológica, pois são de fácil obtenção por via sintética e estáveis à temperatura ambiente, apresentando-se na forma de cristais incolores, além de ser considerada uma estrutura privilegiada que pode ser usada como modelo para a derivatização de medicamentos multi-alvo (BARREIRO *et al*., 2002). Os seus diferentes derivados apresentam ação antiparasitária, antimicrobiana e imunomoduladora (DUARTE *et al*., 2007; KÜMMERLE *et al*., 2012; ALENCAR *et al*., 2014; GUIMARÃES *et al*., 2018). O LASSBio-930, por exemplo, apresenta atividade anti-inflamatória devido à sua atividade inibitória não seletiva da ciclooxigenase (COX) (DE MELO *et al.*, 2014). O LASSBio-1764 e o LASSBio-1514 também apresentam atividades anti-inflamatória e analgésica (CORDEIRO *et al*., 2016).

Entre estes compostos, o derivado NAH metilado (E)–*N*'–(3,4– dimetoxibenzilideno)–4– metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386) (**Figura 2**), obtido pela *N*-alquilação de compostos derivados do safrol (BARCO *et al*., 1973), demonstrou inibir a atividade da fosfodiesterase-4 (PDE-4) em parasitos (SILVA *et al*., 2020) e em células mononucleares de sangue humano estimuladas por lipopolissacarídeo (LPS). Como resultado há a redução de forma significativa da produção de TNF-α e de óxido nítrico (KÜMMERLE *et al*., 2012). Além disso, o LASSBio-1386 demonstrou modular a hipertrofia vascular na hipertensão

arterial pulmonar (HAP) estabelecida em um modelo induzido em ratos (ALENCAR *et al*., 2014).

Outra potente atividade demonstrada pelo LASSBio-1386 é a de imunomodulação (GUIMARÃES *et al*., 2018). Em ensaios em modelo murino de choque endotóxico o LASSBio-1386 foi capaz de inibir a produção de citocinas pró-inflamatória, tais como: IL-1β e TNF-α, além de aumentar a síntese de importantes citocinas regulatórias (IL-6 e IL-10). Da mesma maneira, nos testes *in vitro*, a molécula reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos e linfócitos ativados, através da inibição da via do NFκB e aumento da síntese de IL-10. O ligante do receptor ativador de NFκB (RANKL), expresso por osteoblastos e linfócitos, é um dos principais reguladores da remodelação óssea, através da diferenciação de monócitos mononucleares em osteoclastos maduros (BOYCE *et al.*, 2012). Logo, torna-se necessário investigar a atividade dessa molécula frente à remodelação óssea.

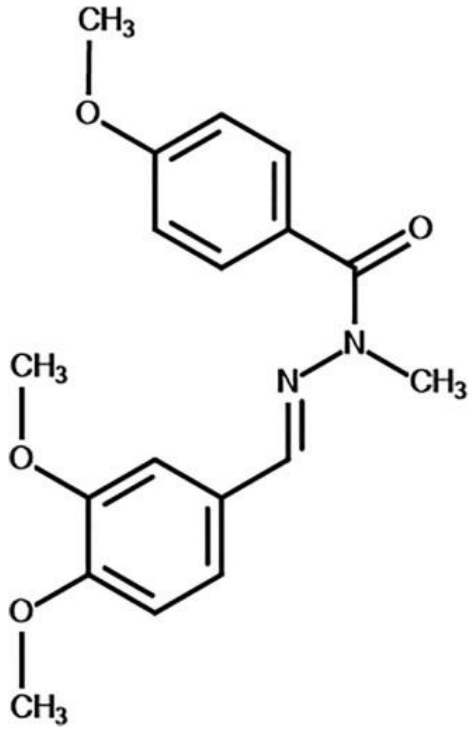


Figura 2. Estrutura química do (E)– *N*'–(3,4– dimetoxibenzilideno)–4- metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386) (BARREIRO *et al*., 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Camundongos

Neste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculos*) da linhagem C57BL/6, fêmeas, com a idade de 5 a 12 semanas. Os camundongos foram produzidos e mantidos no biotério do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz/BA, com fornecimento de água e ração comercial balanceada *ad libitum* até o dia da eutanásia. Para os ensaios de movimentação dentária, onde foi instalada a mola ortodôntica, a ração foi umedecida com água destilada para facilitar a mastigação dos animais. Todos os procedimentos experimentais realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz/BA, nº 012/2019.

4.2 Moléculas

O LASSBio-1386 foi preparado por via sintética utilizando métodos validados por pesquisadores do grupo liderado pelo Dr. Eliezer J. Barreiro, do Programa de Desenvolvimento de Fármacos da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ (Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas), conforme descrito anteriormente (KÜMMERLE *et al*., 2012). A violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil) foi utilizada como controle positivo nos ensaios de citotoxicidade. O alendronato de sódio (Neo Química, Anápolis, GO, Brasil) foi usado como controle positivo em ensaios de remodelação óssea. Todos os compostos foram dissolvidos em DMSO (PanReac, Castellar del Vallès, BCN, Espanha). A concentração final de DMSO (PanReac) foi <0,1% em todos os ensaios *in vitro* e <5% nos ensaios *in vivo* (GUIMARÃES *et al*., 2018).

4.3 Obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de camundongos

As CTMs derivadas da medula óssea foram utilizadas nos ensaios *in vitro* devido a sua capacidade de diferenciação em diferentes tipos celulares, inclusive em tecido ósseo (FRIEDENSTEIN *et al*., 1970). Para obtenção destas células, cinco camundongos C57BL/6, fêmeas, com cinco semanas de idade foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fêmures e tíbias removidos assepticamente foram imediatamente transferidos para placas de Petri contendo meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF;

Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e 50 μL^{-1} de gentamicina (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). As epífises foram cortadas com auxílio de uma tesoura e no espaço medular foi introduzido uma agulha 0,45x13-26 G 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 ressuspendido em 10 mL de meio completo, e a suspensão das células foi transferida para frasco de cultura de 75 cm² com filtro na tampa, contendo 12 mL de meio DMEM (Gibco) completo. As culturas foram mantidas a 37 ^{o}C em estufa, com atmosfera úmida e mistura de 95% de ar e 5% de CO_2.

O meio de cultura foi substituído a cada 3-4 dias. Após 10 a 15 dias, quando ocorreu a confluência, as células aderentes foram liberadas com solução de tripsina a 0,25% (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e transferidas para frascos de cultura com filtro de 75 cm^2 com 12 mL de meio completo. As células foram expandidas por sucessivas passagens nessas condições até atingirem a quantidade suficiente para a realização dos experimentos. O acompanhamento do processo de isolamento, da evolução da cultura e a caracterização morfológica das células isoladas foram realizados utilizando um microscópio invertido CKX 41 (Olympus, Tóquio, Japão). Para criopreservação, alíquotas ($5x10^6$ células/mL) foram transferidas para tubos criogênicos contendo meio DMEM (Gibco) suplementado com 20% de SBF (Gibco) e 10% de DMSO (PanReac).

4.4 Imunofenotipagem celular

Para a caracterização das células da medula óssea como mesenquimais, a técnica de citometria de fluxo foi empregada. Para detecção do antígeno de superfície, as células aderentes foram destacadas com solução de tripsina a 0,25% (Gibco) 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 $1x10^6$ células foram incubadas à 4º C, por 30 minutos, com os anticorpos conjugados à ficoeritrina (PE), cianina (CY) ou aloficocianina (APC) na concentração 1/100, contra CD73 (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA), CD44 (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA), CD90 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), CD105 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), CD11b (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA), CD45 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, 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 FACSCalibur (Becton Dickinson, San Diego, CA, EUA), utilizando o software FlowJo (FlowJo LLC, Ashland, OR, 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

4.5 Teste de citotoxicidade sobre células-tronco mesenquimais

A citotoxicidade do LASSBio-1386 foi determinada frente às CTMs derivadas da medula óssea. As CTMs foram incubadas em placas de 96 poços ($5x10^4$ células/poço) em meio DMEM (Gibco), suplementado com 10% de SBF (Gibco) e 50 μL^{-1} de gentamicina (Gibco), e mantidos por 24 horas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. O composto LASSBio-1386 foi testado em séries de seis concentrações, diluídos na proporção 1/3 (0,41 – 100 μM), em triplicatas, incubado por 72 horas. O alendronato de sódio (Neo Química) foi usado como controle positivo, testado em série de seis concentrações, diluído na proporção 1/3 (0,41 – 100 μM), em triplicatas. Posteriormente, foram adicionados 20 μL/poço de AlamarBlue (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e mantidos durante 24 horas a 37 ºC e 5% de CO^2. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) foi realizada a 570 e 600 nm. A violeta de genciana (Synth) foi utilizada como a droga citotóxica de referência. A concentração citotóxica de 50% das células (CC_{50}) foi calculada com base no percentual de inibição do crescimento das células comparado aos controles negativos. Os valores obtidos correspondem a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

4.6 Cultura de osteoblastos

Para promover a osteogênese, $5x10^4$ CTMs derivadas de medula óssea foram incubadas em placa de 24 poços em meio DMEM (Gibco) suplementado com 10% de SBF (Gibco) e 50 μL^{-1} de gentamicina (Gibco) em estufa a 37ºC e 5% de CO_2. Após 24 horas, quando as células atingiram 50-60% de confluência, todo o meio foi removido e em seguida,

as células foram estimuladas com meio de diferenciação osteogênica StemPro® (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) suplementado com 50 μL^{-1} de gentamicina (Gibco). O LASSBio-1386 foi adicionado às culturas em duas concentrações (15 e 30 μM) 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 μM). O grupo controle negativo foi cultivado com meio completo. Após 21 dias de cultura, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% (PFA) por 15 minutos em temperatura ambiente, lavadas com água destilada por 3 vezes e coradas com alizarina vermelha a 2% (Sigma, St. Louis, MO, EUA) para avaliar a deposição de cálcio. 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).

4.7 Cultura de osteoclastos – Coloração com Giemsa

Para diferenciação osteoclástica, $5x10^5$ CTMs 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 37ºC e 5% de CO_2 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).

4.8 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 (DU *et al*., 2020). As CTMs ($1x10^5$) foram incubadas em placa de 96 poços. O protocolo de diferenciação dos osteoclastos foi o mesmo utilizado no item 4.7. 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)

4.9 Modelo de osteoporose experimental em camundongo

Para a indução de osteoporose experimental por meio de ovariectomia - OVX (MACARI *et al*., 2015), foram utilizados camundongos da linhagem C57BL/6, fêmeas, com 10-12 semanas de idade. Os animais foram divididos em 10 grupos quanto à ovariectomia, movimentação ortodôntica dentária (MOD) e eutanásia (**Tabela 2**). A anestesia foi realizada por de injeção intraperitoneal 0,1 mL de uma solução de xilazina (14 mg/kg) e ketamina (100 mg/kg) e os animais foram posicionados em decúbito ventral. Após a tricotomia e higienização com álcool a 70% da região da coluna lombar, foi realizada única incisão dorsal na linha média (0,5 cm) penetrando na pele usando uma tesoura pequena. Os ovários foram localizados e excisionados bilateralmente. A incisão foi suturada com fio de nylon 6-0 (Shalon, Goiânia, GO, Brasil). Os camundongos foram mantidos em placa aquecedora até o despertar da anestesia e monitorados 2 vezes ao dia, durante 3 dias, para acompanhamento pós-cirúrgico.

Tabela 2. Grupos experimentais dos ensaios *in vivo*.

GRUPO	PROCEDIMENTOS	EUTANÁSIA
MOD	Sem ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / Sem Tratamento	12 dias
MOD	Sem ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / Sem Tratamento	6 dias
OVX + MOD	Ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / Sem Tratamento	12 dias
OVX + MOD	Ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / Sem Tratamento	6 dias
MOD + LASSBio-1386	Sem ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / LASSBio-1386	12 dias
MOD + LASSBio-1386	Sem ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / LASSBio-1386	6 dias
OVX + MOD + LASSBio-1386	Ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / LASSBio-1386	12 dias
OVX + MOD + LASSBio-1386	Ovariectomia / Movimentação ortodôntica dentária / LASSBio-1386	6 dias
Naïve	Sem ovariectomia / Sem movimentação ortodôntica dentária / Sem Tratamento	6 dias
OVX	Ovariectomia / Sem movimentação ortodôntica dentária / Sem Tratamento	6 dias

4.10 Modelo de movimentação ortodôntica

Após 30 dias da ovariectomia (OVX), foram instalados aparelho ortodôntico nos animais para promover a movimentação ortodôntica dentária. Os camundongos foram pesados e anestesiados por injeção intraperitoneal de 0,2 mL de uma solução de xilazina (14 mg/kg) e ketamina (100 mg/kg). Uma vez anestesiados, os animais foram colocados em decúbito dorsal sob a mesa cirúrgica, especialmente desenhada para restringir movimentos e permitir o acesso intra-oral. Para possibilitar uma melhor visualização dos dentes, um afastador de mucosa foi confeccionado com fio de aço, além disso, foi utilizado um estereomicroscópio (Leica EZ4, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). A assepsia da superfície oclusal do primeiro molar superior do lado direito e dos incisivos foi realizada com acetona por 10 segundos e posteriormente um selante auto-condicionante (*self-etching primer*, Unitek/3M, Mineapolis, MN, EUA) foi aplicado. A porção distal/posterior de uma mola ortodôntica aberta em Níquel-Titânio (Ni-Ti) de 0,25 x 0,76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, EUA) foi posicionada na face oclusal do primeiro molar superior direito. A colagem da mola foi realizada com resina fotopolimerizável (Transbond, Uniteck/3M, Monrova, CA, EUA). A porção anterior/mesial da mola foi ativada no sentido mesial e fixada com a mesma resina nos

incisivos. Foi preconizada a força de 0,35 N (TADDEI *et al*., 2012) para ativação da mola, mensurada em um dinamômetro. O lado esquerdo da maxila (sem movimentação dentária) foi utilizado como controle do experimento. Os animais do grupo tratado receberam o LASSBio-1386 na dose única de 100 mg/kg diluída 5% de DMSO e solução salina 0,9% (GUIMARÃES *et al*., 2018). A droga foi administrada via intraperitoneal. Após 6 ou 12 dias, os animais foram pesados e eutanasiados para análise histomorfométrica da perda óssea alveolar e dosagem de citocinas.

4.11 Análise histomorfométrica

Conforme descrito anteriormente por Taddei *et al*., 2012, o maxilar superior dos animais foi dissecado e imediatamente imerso em solução contendo formalina tamponada a 10% (pH 7,2) por 48 horas, para a fixação tecidual. Em seguida, foi iniciado o processo de desmineralização. As amostras foram transferidas para trouxas de gaze e submersas em solução de ácido nítrico 7% (pH 7.4) durante 5 dias. Após esse período, as amostras foram lavadas por 4 horas com água corrente. Como parte do processamento, houve a desidratação do material utilizando banhos em álcool a 70%, 80%, 90% e álcool absoluto durante 30 minutos cada. As amostras foram clarificadas através de 3 banhos de xilol de 20, 15 e 10 minutos utilizando o processador de tecidos (HistoCore Pearl; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Para a obtenção de secções longitudinais, 2 cortes foram realizados nas maxilas com auxílio de uma lâmina de bisturi e um estereomicroscópio (Leica EZ4). Inicialmente foi realizado um corte na região anterior para a liberação e descarte dos incisivos, e em seguida, um corte transversal na região do palato. Para efeitos de padronização, todos os cortes foram realizados a 1 mm da superfície palatal da coroa dos molares e paralelos a uma linha imaginária que passa pelo centro da superfície oclusal molares. Todas as amostras eram compostas de três molares. Posteriormente, foi realizada a inclusão em parafina. A superfície palatina da maxila foi posicionada voltada para o plano da microtomia. Uma vez incluídas, o bloco foi cortado com espessura de 3 μm utilizando um micrótomo rotatório (Hyrax M55; Carl Zeiss, Jena, Alemanha). Os cortes foram colocados em lâmina e selecionados para coloração. Como critérios de inclusão para análise histológica, foram selecionadas lâminas com cortes sem artefatos, apresentando ao menos 1/3 de formação da raiz disto-vestibular do primeiro molar e mesio-vestibular do segundo molar superior.

4.12 Mensuração da movimentação dentária

Para a mensuração da MOD, as lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e fotografadas com um microscópio AX70 (Olympus) conectado a uma câmera digital. A movimentação dentária foi calculada pela mensuração da distância entre a junção amelocementária (JAC) do primeiro e segundo molar do lado experimental (hemi-maxila direita) em relação ao lado controle (hemi-maxila esquerda) do mesmo animal. O *software Image* J (National Institutes of Health, EUA) foi utilizado para quantificar a movimentação dentária. A mensuração foi realizada avaliando 5 cortes por animal e a menor distância obtida foi considerada a distância amelocementária deste camundongo.

4.13 Dosagem de citocinas

As dosagens de RANKL e OPG foram realizadas a partir do soro dos camundongos submetidos ao modelo de osteoporose associado à força ortodôntica e tratamento com o LASSBio-1386, pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando o protocolo anticorpos e citocina recombinante dos kits ELISA Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Os kits apresentavam o anticorpo de captura específico para o alvo adsorvido nas placas. O padrão foi diluído seriadamente (1:2), a partir da concentração inicial de 2.000 pg/mL (RANKL) e 1.200 pg/mL (OPG), com oito diluições em duplicata. Para a curva padrão, foi adicionado 100 μL/poço do recombinante aos poços apropriados. As amostras diluídas do soro dos animais (RANKL – 1:3 e OPG – 1:10) foram adicionadas aos poços (100 μL/poço). As placas foram incubadas por 24 horas a 4 ºC. Em seguida, as placas foram lavadas quatro vezes com a solução de lavagem (300 μL) utilizando uma pipeta multicanal. O anticorpo de detecção (biotinilado) foi adicionado (100 μL/poço) às placas e incubado por 1 hora em temperatura ambiente com agitação suave. As placas foram, novamente, lavadas quatro vezes com a solução de lavagem e incubadas durante 45 minutos com 100 μL/poço da solução de estreptavidina diluída 1:200. A revelação foi realizada adicionando o substrato TMB e interrompida com solução de parada. A leitura da reação foi determinada utilizando o espectrofotômetro (Spectramax 190), com filtro de 450 nm. As análises foram realizadas no Software Softmax 4.3.1 (Molecular Devices).

4.14 Análise estatística

Os valores numéricos apresentados nos gráficos e tabelas correspondem as médias ±S.E.M de mensurações efetuadas nos diferentes grupos de animais. A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando o teste one way ANOVA e o pós-teste de comparação múltipla Newman Keuls para o grupo de amostras ou análise de variância. O limite crítico de significância foi estabelecido para $p \leq 0{,}05$ (GUIMARÃES *et al*., 2018).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

As células-tronco isoladas da medula óssea apresentaram um perfil de CTMs: são células aderentes ao plástico e mostraram rápida capacidade de expansão e proliferação *in vitro* após o isolamento. Inicialmente, as células apresentavam morfologia arredondada (**Figura 3A**), com formação de agregados após 48 horas de cultura. Células com formato fusiforme predominavam após 20 a 28 dias de cultura (**Figura 3B**). A criopreservação das células a longo prazo, demonstrou capacidade de reiniciar rapidamente a proliferação em cultura, de maneira semelhante à das células isoladas recentemente.

Em 1970, Friedenstein e colaboradores foram os primeiros a evidenciar a existência de células com características de mesenquimais na medula óssea. Estas células foram inicialmente denominadas de células progenitoras do estroma multipotentes. Eram também conhecidas como unidades formadoras de colônias de fibroblastos (CFU-F) pela sua capacidade de formar agregados celulares e possuir semelhança morfológica a fibroblastos (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1966; 1974, OWEN e FRIEDENSTEIN, 1988). Em nosso estudo, as culturas das CTMs isoladas da medula óssea aderiram ao plástico da garrafa de cultivo, formavam agregados semelhantes às CFU-F e, após 48 horas, apresentaram morfologia fibroblastóide ou arredondada, mantendo essa aparência após sucessivas passagens de forma semelhante à de CTM descritas em outros trabalhos (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1970; MEIRELLES *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2019).

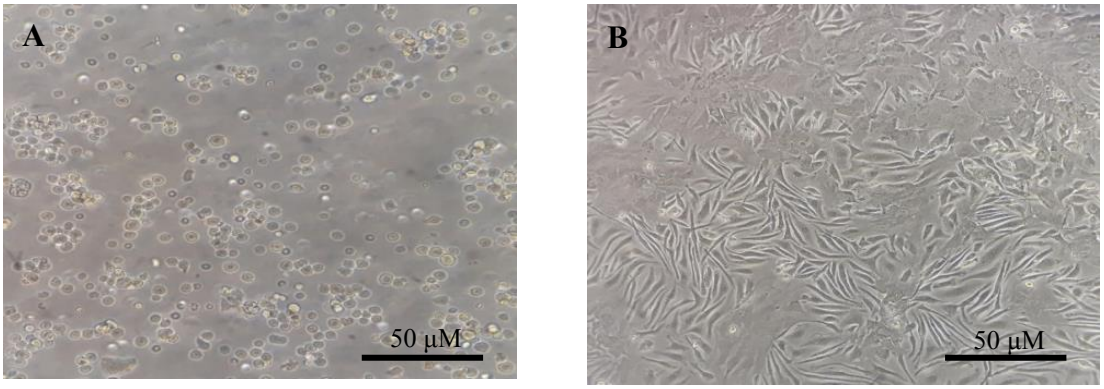


Figura 3. Aspectos morfológicos das células-tronco de medula óssea. As células aderentes cultivadas *in vitro* apresentam heterogeneidade na morfologia. Micrografias de contraste de fase foram tiradas no dia da coleta (A) e após 28 dias (B). Podem ser observadas formas de células arredondadas ou fusiformes (A), alongadas e estreladas (B). Aumento x40.

5.2 Caracterização de células-tronco mesenquimais 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. A análise por citometria de fluxo revelou a expressão de moléculas da superfície celular que caracterizam CTM, como CD44, CD73, CD90, CD105 (**Figura 4**). A porcentagem de marcadores de células hematopoiéticas foi menor (CD11b e CD45).

Neste estudo, a expressão de marcadores de células hematopoéticas foi detectada na terceira passagem. Várias linhagens de células-tronco mesenquimais apresentam contaminantes hematopoiéticos nas passagens iniciais da cultura, porém, com o aumento do tempo de cultura, a expressão de marcadores hematopoiéticos é reduzida (MEIRELLES *et al.*, 2006). Em contraste, em ensaios de imunofenotipagem de células-tronco obtidas da medula óssea de camundongos, uma alta porcentagem de marcadores de células mesenquimais é expressa (GRONTHOS *et al.*, 2003; HONG *et al.*, 2005; SHIN *et al.*, 2005; MEIRELLES *et al.*, 2006). Esses dados corroboram com nossos resultados, nos quais foi observada a expressão de marcadores de CTM (CD44, CD73, CD90 e CD105).

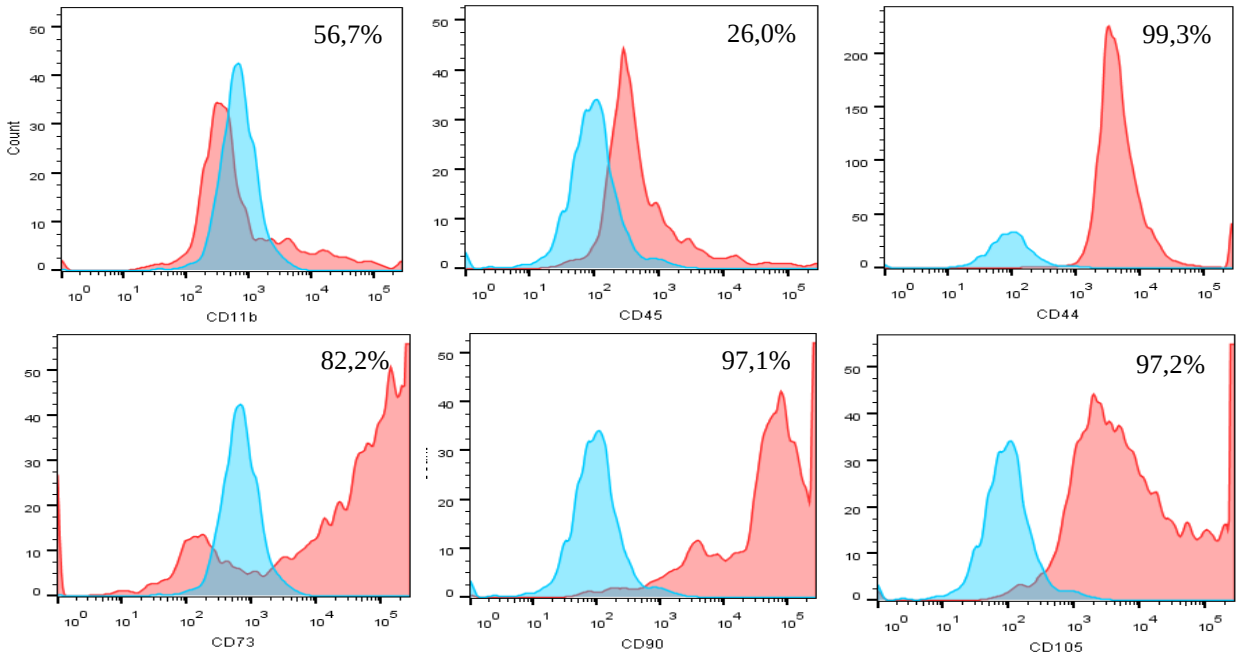


Figura 4. Imunofenotipagem das células-tronco isoladas da medula óssea. A expressão dos marcadores de superfície CD44, CD73, CD90, CD105, CD45 e CD11b foi avaliada por citometria de fluxo. Os histogramas mostram controle de isotipo (picos azuis) versus coloração de anticorpo específico (picos cor de rosa) e as porcentagens de células positivas para as moléculas selecionadas.

5.3 Citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais

A determinação do CC_{50} foi realizada em CTM e os valores das moléculas em estudo foram comparados com a violeta de genciana (CC_{50} = 2,66 ± 0,21 μM), a droga citotóxica de referência. O LASSBio-1386 apresentou valor de CC_{50} igual a 41,62 ± 1,13 μM. O alendronato de sódio, medicamento utilizado na clínica para tratamento da osteoporose, apresentou valor de CC_{50} igual a 14,27 ± 2,96 μM. Estes dados indicam que o LASSBio-1386 apresenta menor citotoxicidade frente às CTMs que o alendronado de sódio. A partir dos valores de citotoxicidade, concentrações atóxicas foram usadas nos experimentos *in vitro* subsequentes (**Tabela 3**).

As *N*-acilhidrazonas são uma importante classe de compostos orgânicos que podem interagir com diversos bioreceptores, além disso, adotam várias orientações conformacionais favoráveis devido às características de sua estrutura química (FRAGA & BARREIRO, 2016). O derivado NAH metilado (E) –*N*' - (3,4-dimetoxibenzilideno) -4-metoxi-N-metilbenzohidrazida (LASSBio-1386) apresentou baixa citotoxicidade para CTMs obtidas da medula óssea (CC_{50} = 41,62 ± 1,13 μM). Resultado semelhante foi relatado por Guimarães e colaboradores (2018), onde o LASSBio-1386 demonstrou valores de CC_{50} acima de 55 μM frente à macrófagos da linhagem J774. Estes resultados indicam que o composto apresenta baixa citotoxicidade em diferentes linhagens celulares, incluindo precursores de células ósseas.

Tabela 3. Citotoxicidade do LASSBio-1386 frente às células-tronco mesenquimais.

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

5.4 Influência do LASSBio-1386 na diferenciação osteoblástica

Para avaliar se o LASSBio-1386 interfere no processo de diferenciação osteogênica, as CTMs foram cultivadas em meio indutor e tratadas com duas concentrações deste composto. Após 21 dias, agregados celulares foram observados nas culturas, um indicativo que estavam em processo de diferenciação em osteoblastos. As culturas controle negativo foram mantidas apenas em meio DMEM (**Figura 5A**). Depósitos substanciais de cálcio foram observados pela coloração com alizarina vermelha (**Figura 5B**). Além disso, quando comparado ao grupo controle positivo, o tratamento com LASSBio-1386 aumentou o número de células coradas com alizarina vermelha, sugerindo o seu potencial em induzir a diferenciação em osteoblastos, especialmente na maior concentração utilizada (**Figuras 5C, D; Figura 6**). O tratamento com alendronato de sódio, fármaco de referência na clínica, também preservou os depósitos de cálcio (**Figura 5E**).

De acordo com estudos prévios, os bisfosfonatos estimulam a formação de precursores de osteoblastos e nódulos mineralizados em culturas de medula óssea murina e humana (IM *et al.*, 2004; VON KNOCH *et al*., 2005; SHER *et al*., 2020; FASOLINO *et al*., 2020). Kim e colaboradores (2008) investigaram os efeitos do alendronato de sódio em culturas de CTMs derivadas da medula óssea de camundongos em meio de diferenciação osteogênica e determinaram que o composto promove a proliferação e maturação do osteoblasto, conforme evidenciado pela coloração positiva de alizarina vermelha. Reinholz *et al*. relataram resultados semelhantes em seu trabalho sobre o pamidronato e o zoledronato. No presente estudo, a presença de depósitos de cálcio foi confirmada pela coloração com alizarina vermelha. A intensidade da coloração e a quantidade de células foram maiores na presença do LASSBio-1386 na concentração de 30 μM, sugerindo um estímulo osteogênico. Essas observações indicam que os principais componentes minerais da matriz óssea calcificada, ou os precursores da matriz óssea calcificada, foram formados (PITTENGER *et al*., 1999).

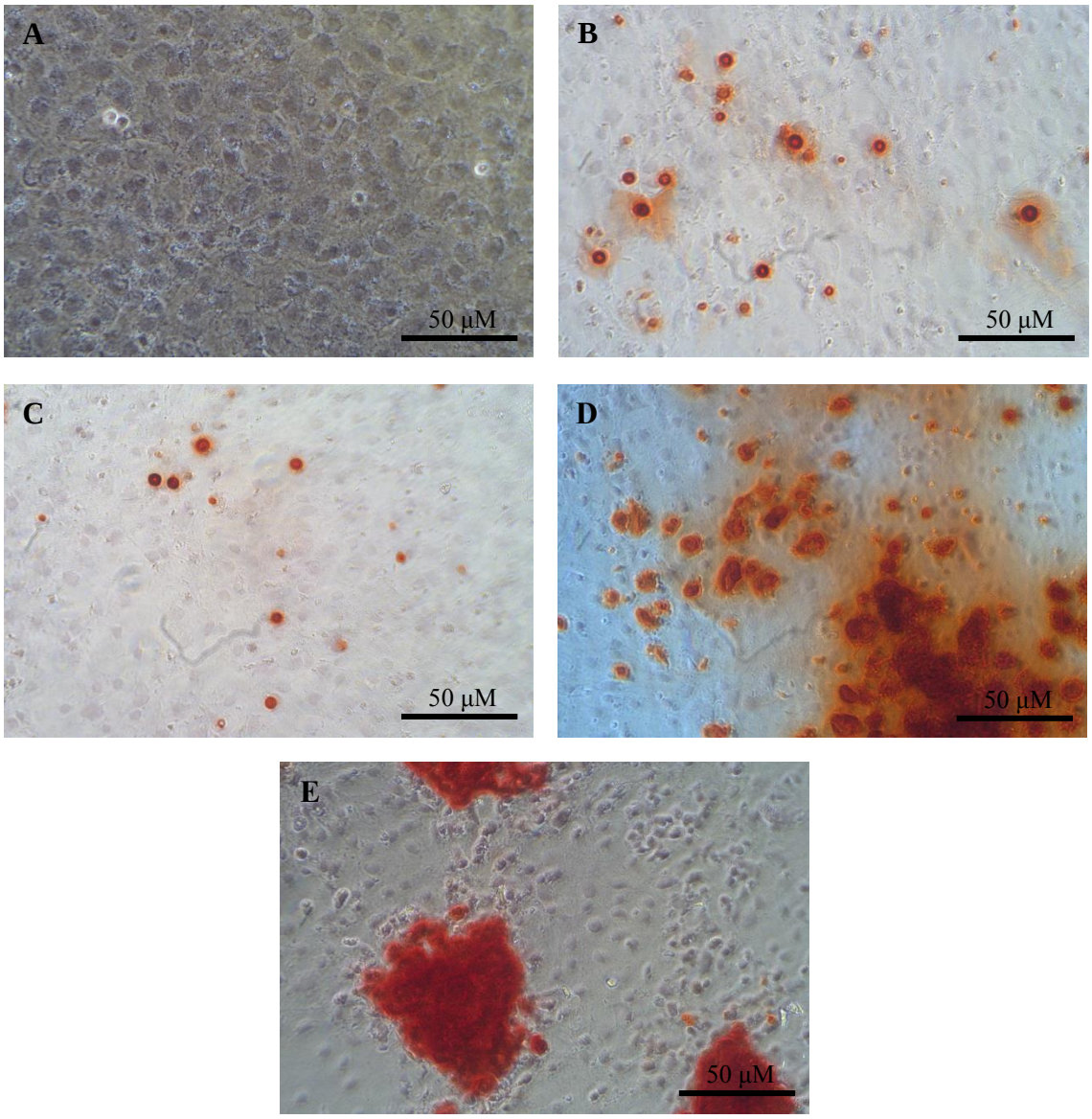


Figura 5. Diferenciação osteoblástica e tratamento ou não com o LASSBio-1386. CTMs não submetidas ao protocolo de diferenciação osteogênica (A) e diferenciadas (B), diferenciadas e tratadas com LASSBio-1386 nas concentrações de 15 µM (C) e 30 µM (D), diferenciadas e tratadas com alendronato de sódio na concentração de 30 µM (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.

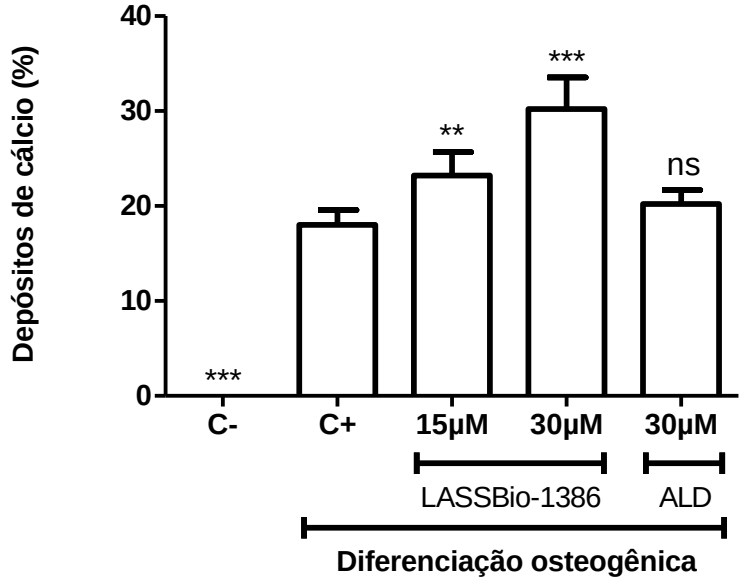


Figura 6. Depósitos de cálcio em CTMs diferenciadas em osteoblastos e tratadas ou não com LASSBio-1386. As CTMs foram diferenciadas em osteoblastos e tratadas ou não com LASSBio-1386 (15 ou 30 µM) ou alendronato de sódio (ALD; 30 µM) durante 21 dias. A significância estatística foi avaliada por ANOVA 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.

5.5 Diferenciação osteoclástica – Avaliação Morfológica

As 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 7B**). O tratamento com o LASSBio-1386 reduziu o número destas células (15 e 30 µM), demonstrando influenciar no processo de diferenciação osteoclástica (**Figura 7C e D; Figura 8**). Resultado semelhante foi observado após o tratamento com o alendronato de sódio (Neo Química) (**Figura 8**).

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 (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2013). 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.

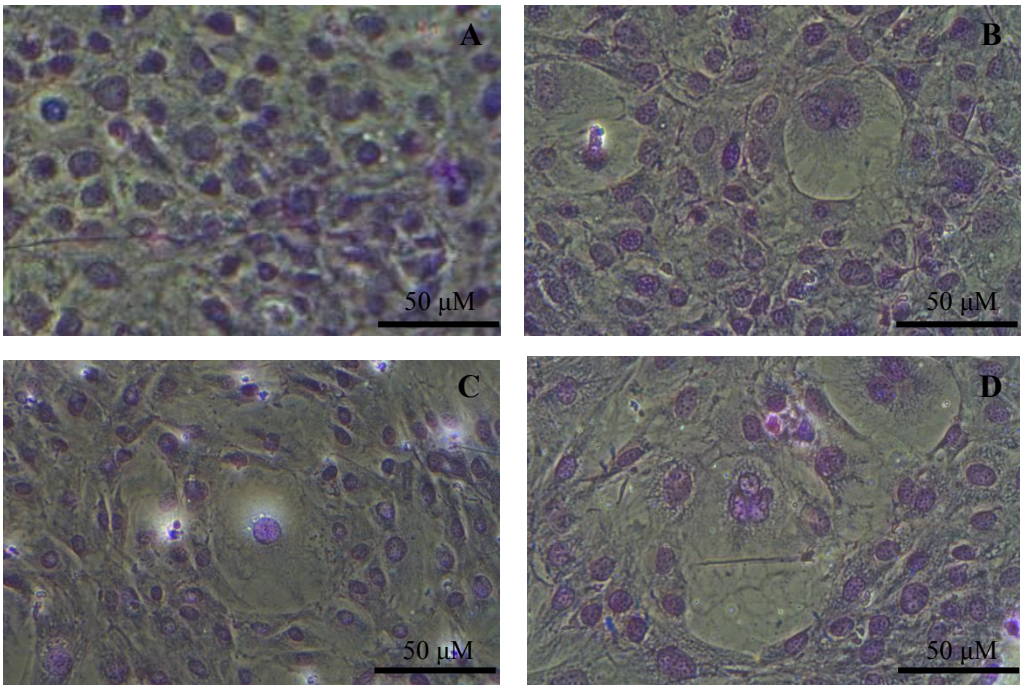


Figura 7. Diferenciação osteoclástica e tratamento ou não com o LASSBio-1386. CTMs não submetidas ao protocolo de diferenciação (A) e diferenciadas (B), diferenciadas e tratadas com LASSBio-1386 nas concentrações de 15 µM (C) e 30 µM (D). Células grandes e multinucleadas são evidenciados pela coloração em Giemsa. Aumento x40.

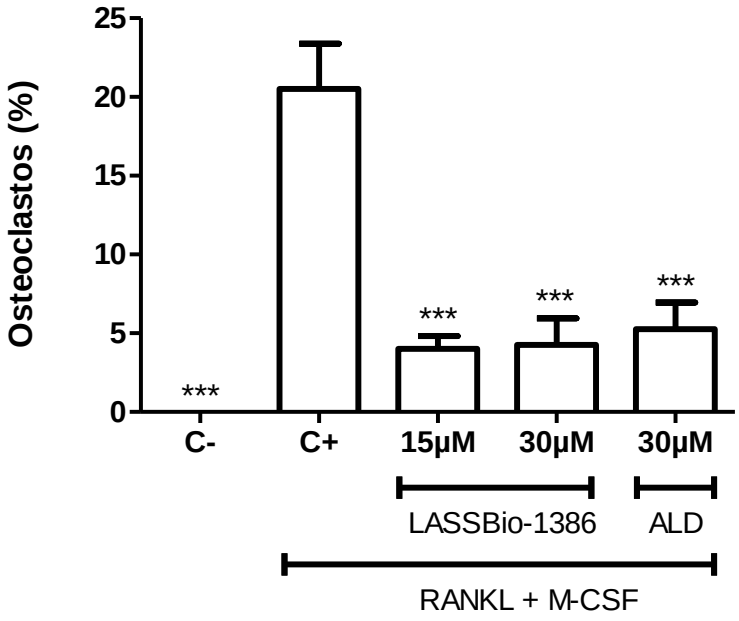


Figura 8. Porcentagem de células morfologicamente semelhantes à osteoclastos, tratadas ou não com LASSBio-1386. As CTMs "semelhantes a osteoclastos" foram tratadas ou não com LASSBio-1386 (15 ou 30 µM) ou com alendronato de sódio (ALD; 30 µM) durante 5 dias. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. ***$p < 0{,}001$; comparado ao grupo controle positivo.

5.6 Avaliação enzimática da fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP)

As 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, consequentemente, 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 µM (**Figura 9**).

As células-tronco expressam RANK e podem tornar-se precursores de osteoclastos ou se diferenciar em osteoclastos quando cultivadas com RANKL (VAN BEEK *et al*., 1997). Os osteoclastos expressam fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP), catepsina K e metaloproteinases, que participam da degradação do colágeno tipo I da matriz óssea (DU *et al*., 2020). 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 (2015), os quais observaram que o alendronato de sódio reduz a expressão do TRAP em osteoclastos derivados da linhagem celular RAW 264.7.

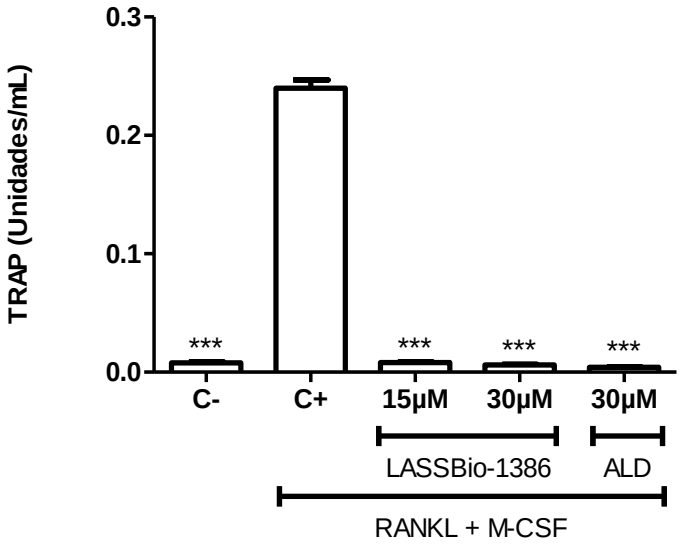


Figura 9. Avaliação enzimática da fosfatase ácida resistente ao tartarato. As CTMs foram estimuladas com RANKL e M-CSF e tratadas ou não com LASSBio-1386 (15 ou 30 µM) ou alendronato de sódio (ALD; 30 µM) durante 5 dias. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. ***$p < 0,001$; comparado ao grupo controle positivo.

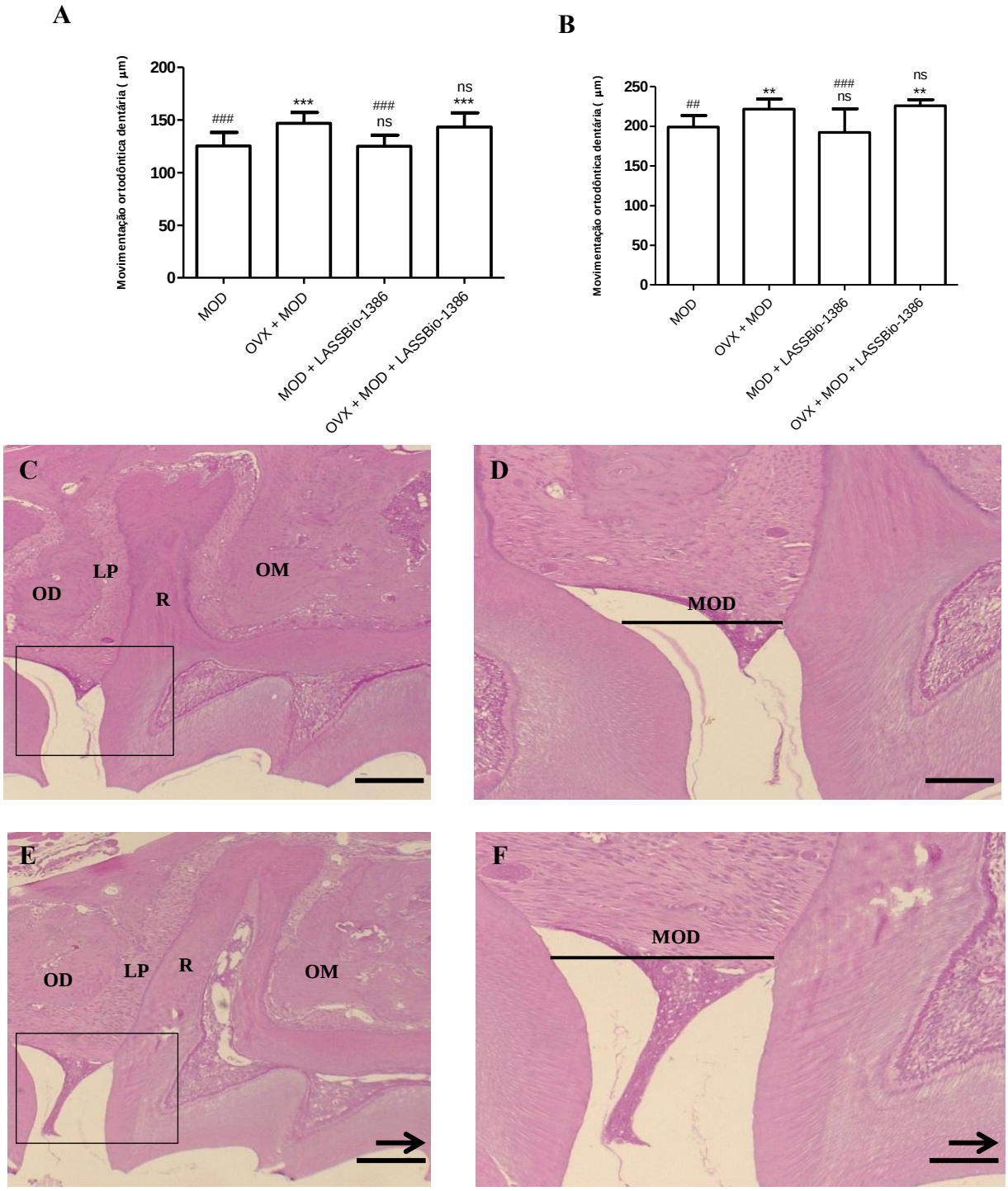
5.7 Efeito do LASSBio-1386 na reabsorção óssea alveolar

Os animais foram ovariectomizados, após 30 dias foi iniciado a movimentação dentária (durante 6 e 12 dias) e o tratamento com o LASSBio-1386. A análise histológica revelou movimentação mesial dos dentes nos grupos de animais com movimentação ortodôntica dentária (grupo MOD); ovariectomizado e MOD (grupo OVX + MOD); MOD e tratados com LASSBio-1386 (grupo MOD + LASSBio-1386); OVX, MOD, e tratado com LASSBio-1386 (grupo). Grupos de camundongos ovariectomizados (OVX + MOD e OVX + MOD + LASSBio-1386) apresentaram aumento significativo na reabsorção óssea alveolar quando comparados ao grupo de camundongos sem ovariectomia (MOD e MOD + LASSBio-1386). O tratamento com LASSBio-1386 não demonstrou alterar a perda óssea alveolar em animais OVX (**Figuras 10A e B**). Além disso, a análise microscópica mostrou que, no lado controle, nenhuma atividade foi observada na região mesial do periodonto e entre o 1º e 2º molar (**Figuras 10C e D**). Em contrapartida, nos grupos com ou sem OVX e tratados com LASSBio-1386 foram observadas compressão do periodonto mesial da raiz disto-vestibular e tensão na face distal desta raiz (**Figuras 10E e G**). Além disso, a MOD foi detectada pelo aumento da distância da junção amelocementária entre o primeiro e o segundo molar (**Figuras 10F e H**).

O estrogênio é o principal regulador hormonal do metabolismo ósseo em mulheres e homens, sua deficiência está associada a uma lacuna entre a reabsorção e a formação óssea (KHOSLA *et al*., 2012). Uma possível relação entre a deficiência de estrogênio e a perda óssea alveolar é observada na periodontite experimental (AMADEI *et al*., 2011). Em nosso trabalho, os animais foram submetidos à ovariectomia para induzir deficiência de estrogênio, modelo confirmado por outros estudos (KOBAYASHI *et al*., 2012; MACARI *et al*., 2015). Nos camundongos ovariectomizados, a reabsorção óssea alveolar aumentou significativamente quando comparados ao grupo de camundongos sem ovariectomia. Corroborando com Bonnet *et al*. (2013), a área da junção amelocementária foi maior 30 dias após OVX.

Guimarães *et al*. (2018), utilizaram modelo de choque endotóxico em camundongo para avaliar a atividade imunomoduladora do LASSBio-1386. O tratamento com o composto em dose única (100 mg/kg) aumentou a sobrevida de camundongos frente ao estímulo por lipopolissacarídeo (LPS). Seguindo este protocolo de tratamento, no presente estudo, o LASSBio-1386 não controlou as taxas de perda óssea alveolar quando comparado aos animais

que não receberam o tratamento com o composto. Mais pesquisas são necessárias para definir o papel do LASSBio-1386 na remodelação óssea em ensaios *in vivo*, sugere-se um tratamento com mais doses durante a movimentação dentária.



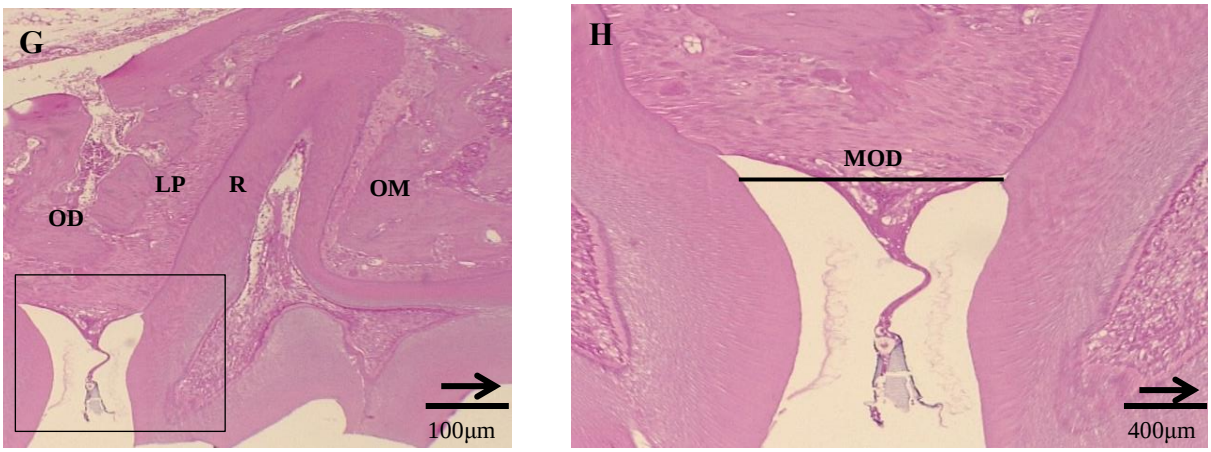


Figura 10. Movimentação dentária ortodôntica após o tratamento ou não com LASSBio-1386. Quantidade de movimentação dentária após 6 dias (A) e 12 dias (B) em camundongos tratados ou não com LASSBio-1386. Alterações histológicas relacionadas à movimentação ortodôntica dentária em camundongos tratados ou não com LASSBio-1386 e OVX ou não, com cortes da distância entre a junção amelocementária do 1º e 2º molar (C-H). Grupo controle - sem carga mecânica (C); Grupo sem OVX e tratado com LASSBio-1386 (E); Grupo com OVX e tratado com LASSBio-1386 (G); Vistas ampliadas das áreas identificadas em C, E e G (D, F e H); OM: osso alveolar mesial; OD: osso alveolar distal; R: raiz; LP: ligamento periodontal; MOD movimentação ortodôntica dentária. As setas indicam a direção do movimento dentário. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$ comparado ao grupo MOD. ### $p < 0,001$; ## $p < 0,01$ comparado ao grupo OVX + MOD; ns = não significativo.

5.8 Síntese dos níveis de RANKL e OPG

Para as dosagens de RANKL e OPG o soro dos animais tratados ou não com LASSBio-1386 foi coletado. Os grupos de animais ovariectomizados, com movimentação dentária e tratados com LASSBio-1386 (OVX + MOD + LASSBio-1386) apresentaram redução significativa na produção de RANKL quando comparados ao grupo de camundongos que receberam as mesmas condições, mas não tratados (OVX + MOD). Resultados semelhantes foram observados na ausência de ovariectomia (MOD e MOD + LASSBio-1386) (**Figura 11A e B**). Além disso, os grupos que receberam tratamento com LASSBio-1386 (MOD + LASSBio-1386 e OVX + MOD + LASSBio-1386) apresentaram aumento na produção de OPG quando comparados ao grupo sem tratamento (**Figura 11C e D**).

Diversos mecanismos moleculares estão envolvidos na perda óssea, em particular, muitos estudos demonstram o papel de RANKL e OPG na mediação da perda óssea alveolar após ovariectomia (IKEDA *et* al., 2001; AOKI *et al*., 2006; KOBAYASHI *et al*., 2012). O

RANKL é uma proteína transmembrana homotrimétrica que se apresenta ligada à membrana ou solúvel. Esta proteína atua como um fator-chave para a osteoclastogênese, através da ligação ao ativador do receptor de NF-κB (RANK). É também conhecida como citocina induzida por ativação relacionada ao fator de necrose tumoral, ligante de OPG e fator de diferenciação de osteoclasto (IKEDA *et al*., 2001). Sua presença em grandes quantidades pode indicar que a velocidade de reabsorção óssea é maior que a de aposição do osso, uma das características da osteoporose. No presente estudo, a produção do RANKL reduziu significativamente em grupos de animais tratados com LASSBio-1386, sugerindo que o composto diminui a reabsorção óssea mesmo nos animais submetidos à ovariectomia. Em estudo realizado por Giner e colaboradores (2011), a expressão do mRNA de RANKL (RT-PCR) foi elevada em culturas primárias de osteoblastos humanos tratados com alendronato. Estes dados sugerem que o LASSBio- 1386 e o alendronato atuam por diferentes mecanismos moleculares de ação.

Simonet e colaboradores (1997) descreveram a OPG como uma proteína osteoprotetora, devido sua característica de proteger o esqueleto da reabsorção óssea excessiva. A OPG se liga ao RANKL impedindo que este se ligue ao RANK, logo, a fase terminal da diferenciação dos osteoclastos é interrompida, induzindo a sua apoptose (DOMAZETOVIC *et al*., 2017). A principal fonte de OPG são os osteoblastos maduros, portanto, a quantidade diminuída destas células nos ossos está associado à níveis reduzidos de OPG. Enjuanes e colaboradores (2010) analisaram o efeito do alendronato na expressão de OPG em osteoblastos humanos e constatou-se que a droga não altera os níveis da proteína. Porém, os nossos resultados demonstraram que o LASSBio-1386 induz a um aumento significativo na produção de OPG, sugerindo que o composto pode estimular a formação óssea.

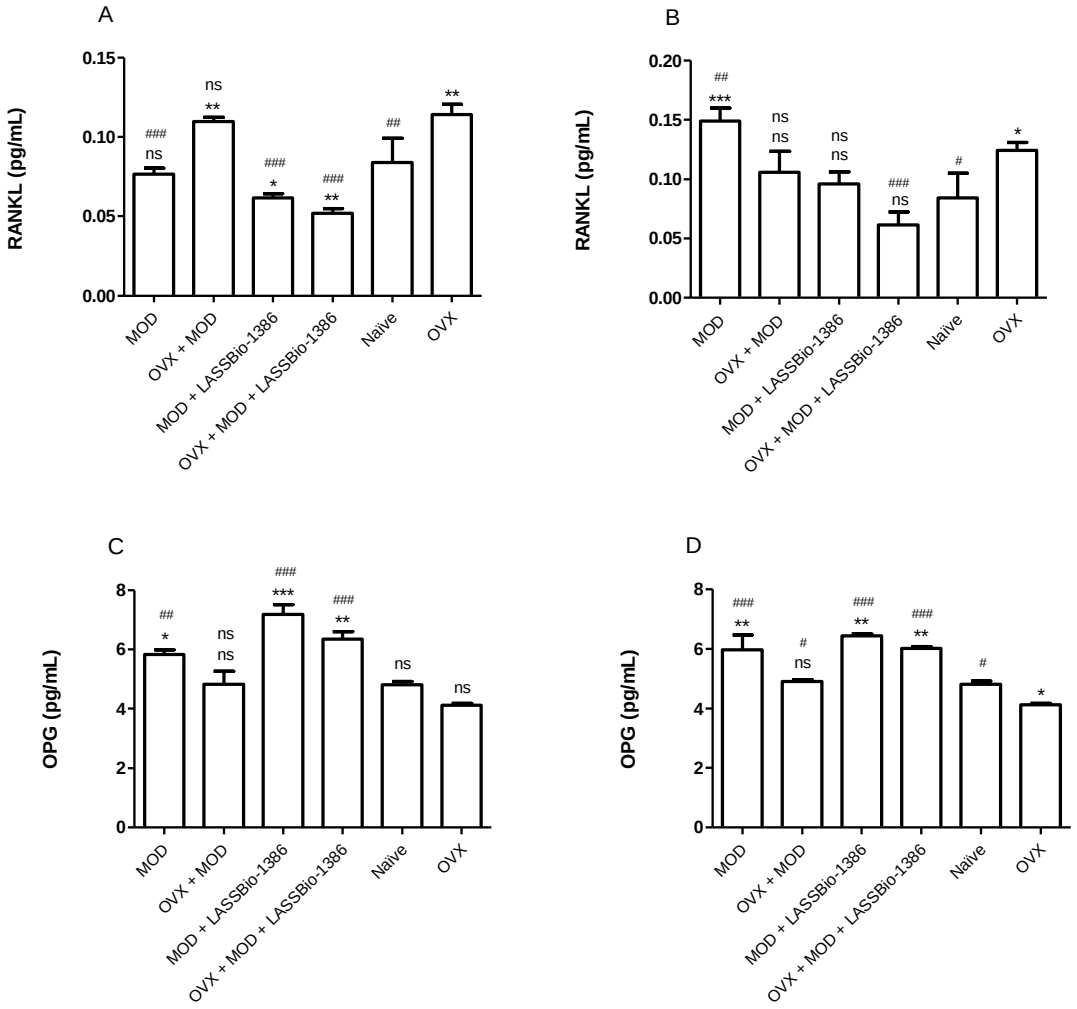


Figura 11. Produção de RANKL e OPG em soro animal após tratamento ou não com LASSBio-1386. As concentrações de RANKL (A, B) e OPG (C, D) (pg/mL) foram determinadas pela coleta de soro de animais tratados ou não com LASSBio-1386 em dose única (100 mg/kg) após 6 dias (A, C) ou 12 dias (B, D). As dosagens de RANKL e OPG foram realizadas por ELISA. Os valores representam as médias ± DP de cinco animais por grupo. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Newman-Keuls. ***$p < 0{,}001$; **$p < 0{,}01$ e *$p < 0{,}05$ em comparação ao grupo Naïve ###$p < 0{,}001$; ##$p < 0{,}01$ e #$p < 0{,}05$ em comparação ao grupo OVX; ns = não significativo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho demonstra, de forma inédita, o potencial do LASSBio-1386 em interferir na remodelação óssea, inibindo a atividade reabsortiva e estimulando a formação do osso, em modelos *in vitro* e no modelo murino de osteoporose associada à força ortodôntica, por meio das alterações no perfil de citocinas mediadoras da perda óssea alveolar. Logo, sugere-se que o LASSBio-1386 pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da osteoporose.

REFERÊNCIAS

AKKAWI, Ibrahim; ZMERLY, Hassan. Osteoporosis: current concepts. **Joints**, v. 6, n. 02, p. 122-127, 2018.

AL-DUJAILI, Saja A. *et al*. Apoptotic osteocytes regulate osteoclast precursor recruitment and differentiation *in vitro*. **Journal of cellular biochemistry**, v. 112, n. 9, p. 2412-2423, 2011.

ALENCAR, Allan KN *et al*. N-acylhydrazone derivative ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension through the modulation of adenosine AA2R activity. **International journal of cardiology**, v. 173, n. 2, p. 154-162, 2014.

AMADEI SU, SOUZA DM, BRANDAO AA, ROCHA RF. Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. **Braz Oral Res**; 25(6):538–43, 2011.

ANDRADE JR, I. *et al*. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. **Journal of dental research**, v. 88, n. 11, p. 1037-1041, 2009.

AOKI K, SAITO H, ITZSTEIN C, ISHIGURO M, SHIBATA T, BLANQUE R, *et al*. A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand-induced signaling, bone resorption, and bone loss. **J Clin Invest**; 116(6):1525–34, 2006.

APOTROSOAEI, Maria *et al*. New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. **Rev Med Chir Soc Med Nat Iaşi**, v. 117, n. 2, p. 538-544, 2013.

ATKINS, Ayelet *et al*. Remodeling in bone without osteocytes: billfish challenge bone structure–function paradigms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 45, p. 16047-16052, 2014.

AZIZIYEH, Rima *et al*. The burden of osteoporosis in four Latin American countries: Brazil, Mexico, Colombia, and Argentina. **Journal of medical economics**, v. 22, n. 7, p. 638-644, 2019.

BARCO, A. *et al*. A Facile Alkylation of Ethyl 2-Oxocyclopentane-carboxylate. 1973.

BARREIRO, E. J. Medicinal chemistry of n-acylhydrazones: novel lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Quimica Nova**, v. 25, p. 129-148, 2002.

BACCARO, L.F. *et al*. The epidemiology and management of postmenopausal osteoporosis: a viewpoint from Brazil. **Clinical interventions in aging**, v. 10, p. 583, 2015.

BLACK, Dennis M.; ROSEN, Clifford J. Postmenopausal osteoporosis. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 3, p. 254-262, 2016.

BLANGY, Anne *et al*. The osteoclast cytoskeleton–current understanding and therapeutic perspectives for osteoporosis. **Journal of Cell Science**, v. 133, n. 13, p. jcs244798, 2020.

BONNET N, LESCLOUS P, SAFFAR JL, FERRARI S. Zoledronate effects on systemic and jaw osteopenias in ovariectomized periostin-deficient mice. **PLOS ONE**; 8(3):e58726, 2013.

BORCIANI, Giorgia *et al*. Co–culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating *in vitro* bone remodeling in regenerative approaches. **Acta biomaterialia**, v. 108, p. 22-45, 2020.

BOYCE, Brendan F. *et al*. The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. **European journal of clinical investigation**, v. 42, n. 12, p. 1332-1341, 2012.

CHAN, Christopher KY *et al*. Novel advances in the treatment of osteoporosis. **British medical bulletin**, v. 119, n. 1, p. 129-142, 2016.

CORDEIRO, Natália M. *et al*. Discovery of novel orally active tetrahydro-naphthyl-N-acylhydrazones with *in vivo* anti-TNF-α effect and remarkable anti-inflammatory properties. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0156271, 2016.

COSMAN, Felicia *et al*. Clinician's guide to prevention and treatment of osteoporosis. **Osteoporosis international**, v. 25, n. 10, p. 2359-2381, 2014.

COSMAN, Felicia *et al*. Standard versus cyclic teriparatide and denosumab treatment for osteoporosis: a randomized trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 35, n. 2, p. 219-225, 2020.

DE MELO, Thais Regina Ferreira *et al*. Pharmacological evaluation and preparation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs containing an N-acyl hydrazone subunit. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 4, p. 5821-5837, 2014.

DOMAZETOVIC, Vladana *et al*. Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. **Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism**, v. 14, n. 2, p. 209, 2017.

DOMINICI, M. L. B. K. *et al*. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DU, Ningchao *et al*. Phytoestrogens protect joints in collagen induced arthritis by increasing IgG glycosylation and reducing osteoclast activation. **International immunopharmacology**, v. 83, p. 106387, 2020.

DUARTE, Carolina D.; BARREIRO, Eliezer J.; FRAGA, Carlos AM. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 7, n. 11, p. 1108-1119, 2007.

ENJUANES, Anna *et al*. The effect of the alendronate on OPG/RANKL system in differentiated primary human osteoblasts. **Endocrine**, v. 37, n. 1, p. 180-186, 2010.

ENSRUD, Kristine E.; CRANDALL, Carolyn J. Bisphosphonates for postmenopausal osteoporosis. **Jama**, v. 322, n. 20, p. 2017-2018, 2019.

FASOLINO, Ines *et al*. Osteogenic and Anti-Inflammatory Behavior of Injectable Calcium Phosphate Loaded with Therapeutic Drugs. **Nanomaterials**, v. 10, n. 9, p. 1743, 2020.

FERRARI, Serge *et al*. Favorable skeletal benefit/risk of long-term denosumab therapy: A virtual-twin analysis of fractures prevented relative to skeletal safety events observed. **Bone**, v. 134, p. 115287, 2020.

FRAGA, Carlos AM; BARREIRO, Eliezer J. Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 13, n. 2, p. 167-198, 2006.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, KS5523063. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell Proliferation**, v. 3, n. 4, p. 393-403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A. J.; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I.; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. 1966.

FRIEDENSTEIN, Alexander J. *et al*. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues: cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331-340, 1974.

GENNARI, Luigi *et al*. Appropriate models for novel osteoporosis drug discovery and future perspectives. **Expert opinion on drug discovery**, v. 10, n. 11, p. 1201-1216, 2015.

GINER, Mercè *et al*. Alendronate and raloxifene affect the osteoprotegerin/RANKL system in human osteoblast primary cultures from patients with osteoporosis and osteoarthritis. **European journal of pharmacology**, v. 650, n. 2-3, p. 682-687, 2011.

GOMATHI, K. *et al*. Regulation of Runx2 by post-translational modifications in osteoblast differentiation. **Life sciences**, v. 245, p. 117389, 2020.

GRONTHOS, Stan *et al*. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. **Journal of cell science**, v. 116, n. 9, p. 1827-1835, 2003.

GUIMARÃES, Elisalva Teixeira *et al*. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. **International immunopharmacology**, v. 65, p. 108-118, 2018.

HAMDY, Nehal A. *et al*. Convenient synthesis, anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activites of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. **Acta Pol. Pharm**, v. 70, p. 469-480, 2013.

HENRIKSEN, K. *et al*. Osteoclast activity and subtypes as a function of physiology and pathology—implications for future treatments of osteoporosis. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 1, p. 31-63, 2011.

HEUCK, F. Comparative investigations of the function of osteocytes in bone resorption. **Calcified tissue research**, v. 4, n. 1, p. 148-149, 1970.

HONG, Seung Hyun *et al*. *In vitro* differentiation of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells into hepatocyte-like cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 330, n. 4, p. 1153-1161, 2005.

HOWAIT, Mohammed *et al*. Elevated expression of macrophage migration inhibitory factor promotes inflammatory bone resorption induced in a mouse model of periradicular periodontitis. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 7, p. 2035-2043, 2019.

IKEDA, Tohru *et al*. Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand and Their Differential Expression in Bone and Thymus. **Endocrinology**, v. 142, n. 4, p. 1419-1426, 2001.

IM, Gun-Il *et al*. Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 4105-4115, 2004.

JUNQUEIRA, Luiz Carlos Uchoa; CARNEIRO, José. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 524 p, 2012.

KANIS, J. A. European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. **Osteoporosis Int**, v. 19, p. 399-428, 2008.

KHOSLA, Sundeep; HOFBAUER, Lorenz C. Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. **The lancet Diabetes & endocrinology**, v. 5, n. 11, p. 898-907, 2017.

KHOSLA, Sundeep; OURSLER, Merry Jo; MONROE, David G. Estrogen and the skeleton. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 23, n. 11, p. 576-581, 2012.

KIM, Hyung Keun *et al*. Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study. **Clinical Orthopaedics and Related Research®**, v. 467, n. 12, p. 3121-3128, 2009.

KOBAYASHI M, MATSUMOTO C, HIRATA M, TOMINARI T, INADA M, MIYAURA C. The correlation between postmenopausal osteoporosis and inflammatory periodontitis regarding bone loss in experimental models. **Exp Anim** ; 61(2):183–7, 2012.

KOERNER, Jens *et al*. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Stem cells**, v. 24, n. 6, p. 1613-1619, 2006.

KRISHNAN, Vinod; DAVIDOVITCH, Ze'ev. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics**, v. 129, n. 4, p. 469. e1-469. e32, 2006.

KÜMMERLE, Arthur E. *et al*. Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7525-7545, 2012.

KUO, Tsung-Rong; CHEN, Chih-Hwa. Bone biomarker for the clinical assessment of osteoporosis: recent developments and future perspectives. **Biomarker research**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

LI, Jiao *et al*. The relationship between bone marrow adipose tissue and bone metabolism in postmenopausal osteoporosis. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 52, p. 88-98, 2020.

LI, Yina *et al*. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. **The Kaohsiung journal of medical sciences**, v. 34, n. 4, p. 207-214, 2018.

LIN, Hang *et al*. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. **Biomaterials**, v. 203, p. 96-110, 2019.

LORENTZON, Mattias; CUMMINGS, Steven R. Osteoporosis: the evolution of a diagnosis. **Journal of internal medicine**, v. 277, n. 6, p. 650-661, 2015.

MACARI, Soraia *et al*. Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. **Archives of oral biology**, v. 60, n. 2, p. 333-341, 2015.

MADEIRA, Miguel *et al*. Prevention and treatment of oral adverse effects of antiresorptive medications for osteoporosis–A position paper of the Brazilian Society of Endocrinology and Metabolism (SBEM), Brazilian Society of Stomatology and Oral Pathology (Sobep), and Brazilian Association for Bone Evaluation and Osteometabolism (Abrasso). **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 64, p. 664-672, 2020.

MARTIN, T. John; SIMS, Natalie A. RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 2, p. 131-139, 2015.

MARTINS, Caroline A. *et al*. Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. **Journal of endodontics**, v. 41, n. 1, p. 45-49, 2015.

MEIRELLES, Lindolfo da Silva; CHAGASTELLES, Pedro Cesar; NARDI, Nance Beyer. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. **Journal of cell science**, v. 119, n. 11, p. 2204-2213, 2006.

MORGAN, Elise F.; GERSTENFELD, Louis C. The bone organ system: form and function. In: **Marcus and Feldman's Osteoporosis**. Content Repository Only!, 2021. p. 15-35.

MU, Jin-Xia *et al*. Microwave assisted synthesis, antifungal activity, DFT and SAR study of 1, 2, 4-triazolo [4, 3-a] pyridine derivatives containing hydrazone moieties. **Chemistry Central Journal**, v. 10, n. 1, p. 1-9, 2016.

NEVE, Anna; CORRADO, Addolorata; CANTATORE, Francesco Paolo. Osteoblast physiology in normal and pathological conditions. **Cell and tissue research**, v. 343, n. 2, p. 289-302, 2011.

OHTSUJI, Mareki *et al*. Anti-CD11b antibody treatment suppresses the osteoclast generation, inflammatory cell infiltration, and autoantibody production in arthritis-prone FcγRIIB-deficient mice. **Arthritis research & therapy**, v. 20, n. 1, p. 1-11, 2018.

ONO, Takehito; NAKASHIMA, Tomoki. Recent advances in osteoclast biology. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 149, n. 4, p. 325-341, 2018.

OWEN, Maureen; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. **Cell and molecular biology of vertebrate hard tissues**, v. 136, p. 42-60, 1988.

PARDINI, Dolores. Terapia de reposição hormonal na menopausa. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 58, p. 172-181, 2014.

PINHEIRO, M. M. *et al*. Development and validation of a tool for identifying women with low bone mineral density and low-impact fractures: the São Paulo Osteoporosis Risk Index (SAPORI). **Osteoporosis International**, v. 23, n. 4, p. 1371-1379, 2012.

PINHEIRO, Marcelo M. *et al*. Clinical risk factors for osteoporotic fractures in Brazilian women and men: the Brazilian Osteoporosis Study (BRAZOS). **Osteoporosis international**, v. 20, n. 3, p. 399-408, 2009.

PINHEIRO, Marcelo M. *et al*. Risk factors for osteoporotic fractures and low bone density in pre and postmenopausal women. **Revista de saude publica**, v. 44, p. 479-485, 2010.

PITTENGER, Mark F. *et al*. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PLOTKIN, Lilian I.; BELLIDO, Teresita. Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 10, p. 593-605, 2016.

PSALTIS, Peter J. *et al*. Concise review: mesenchymal stromal cells: potential for cardiovascular repair. **Stem cells**, v. 26, n. 9, p. 2201-2210, 2008.

RADOMINSKI, Sebastião Cézar *et al*. Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. **Revista brasileira de reumatologia**, v. 57, p. s452-s466, 2017.

REID, Ian R. Short-term and long-term effects of osteoporosis therapies. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 7, p. 418-428, 2015.

REINHOLZ, Gregory G. *et al*. Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. **Cancer research**, v. 60, n. 21, p. 6001-6007, 2000.

REISER, Jakob *et al*. Potential of mesenchymal stem cells in gene therapy approaches for inherited and acquired diseases. **Expert opinion on biological therapy**, v. 5, n. 12, p. 1571-1584, 2005.

ROCHEFORT, Gael Y.; PALLU, Stéphane; BENHAMOU, Claude-Laurent. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. **Osteoporosis international**, v. 21, n. 9, p. 1457-1469, 2010.

ROODMAN, G. David; GUISE, Theresa A. Bone and Cancer. In: **Basic and Applied Bone Biology**. Academic Press, 2019. p. 411-423.

SACCO, Ruth da Conceição Costa *et al*. Evaluation of micro-level managementof older person carein primary healthcenters in a health region in the Federal District of Brazil. **Ciencia & saude coletiva**, v. 24, p. 2173-2183, 2019.

SANTORA, Arthur C.; SHARMA, Anupa. Bisphosphonates: Mechanisms of Action and Role in Osteoporosis Therapy. In: **Osteoporosis**. Humana, Cham, 2020. p. 277-307.

SEEM, Stephanie A.; YUAN, Yvonne V.; TOU, Janet C. Chocolate and chocolate constituents influence bone health and osteoporosis risk. **Nutrition**, v. 65, p. 74-84, 2019.

SHER, Judd; MILLER, Catherine; SHARMA, Dileep. Effect of Bisphosphonates on the Osteogenic Activity of Osteoprogenitor Cells Cultured on Titanium Surfaces. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 35, n. 5, 2020.

SHIN, Jeong-Won *et al*. Isolation of endothelial progenitor cells from cord blood and induction of differentiation by ex vivo expansion. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 2, p. 260-267, 2005.

SILVA, Dahara Keyse Carvalho *et al*. *In Vitro*, *In Vivo* and *In Silico* Effectiveness of LASSBio-1386, an N-Acyl Hydrazone Derivative Phosphodiesterase-4 Inhibitor, Against Leishmania amazonensis. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 1995, 2020.

SILVA, Maria Rita de Sousa; ANDRADE, Sara Rosa de Sousa; AMARAL, Waldemar Naves do. Fisiopatologia da osteoporose: uma revisão bibliográfica. **Femina**, p. 241-244, 2015.

SIMONET, W. S. *et al*. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309-319, 1997.

SINAKI, Mehrsheed. Osteoporosis. In: **Braddom's Physical Medicine and Rehabilitation**. Elsevier, 2021. p. 690-714. e3.

TADDEI, S. R. de A. *et al*. Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. **Journal of biomechanics**, v. 45, n. 16, p. 2729-2735, 2012.

TADDEI, S. R. de A. *et al*. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. **American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics**, v. 141, n. 2, p. 153-160, 2012.

TADDEI, S. R. de A. *et al*. The effect of CCL3 and CCR1 in bone remodeling induced by mechanical loading during orthodontic tooth movement in mice. **Bone**, v. 52, n. 1, p. 259-267, 2013.

TAYLOR, S. E.; SMITH, R. K. W.; CLEGG, P. D. Mesenchymal stem cell therapy in equine musculoskeletal disease: scientific fact or clinical fiction?. **Equine veterinary journal**, v. 39, n. 2, p. 172-180, 2007.

TOBEIHA, Mohammad *et al*. RANKL/RANK/OPG pathway: a mechanism involved in exercise-induced bone remodeling. **BioMed research international**, v. 2020, 2020.

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.

VON KNOCH, Fabian *et al*. Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. **Biomaterials**, v. 26, n. 34, p. 6941-6949, 2005.

XIAO, Wenmei *et al*. Cellular and molecular aspects of bone remodeling. **Tooth Movement**, v. 18, p. 9-16, 2016.

YU, Wei *et al*. Bone marrow adipogenic lineage precursors promote osteoclastogenesis in bone remodeling and pathologic bone loss. **The Journal of clinical investigation**, v. 131, n. 2, 2021.

ZHANG, Yiwen *et al*. METTL3 regulates osteoblast differentiation and inflammatory response via Smad signaling and MAPK signaling. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 1, p. 199, 2020.

ZHU, Lingxin *et al*. Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases. **Science translational medicine**, v. 12, n. 529, 2020.

ZOU, Zi *et al*. Advances in the occurrence and biotherapy of osteoporosis. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 4, p. 1623-1636, 2020.

ANEXO – Artigo submetido na revista Archives of Oral Biology

Archives of Oral Biology

Effect of (E)-N'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386) in vitro and in a murine model of bone remodeling induced by osteoporosis associated with orthodontic strength

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	Bone remodeling; Osteoporosis; Tooth movement; LASSBio-1386
Corresponding Author:	ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES, Ph.D. Universidade do Estado da Bahia Salvador, BA BRAZIL
First Author:	Juliana Dizaira Teles de Lima
Order of Authors:	Juliana Dizaira Teles de Lima
	Tatiana Barbosa dos Santos Magalhães
	Rodolfo do Couto Maia
	Eliezer J. Barreiro
	Patricia Kauanna Fonseca Damasceno
	Manoela Carrera
	Milena Botelho Pereira Soares
	Silvana Rodrigues de Albuquerque Taddei
	ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES, Ph.D.
Abstract:	Objective: To evaluate the effect of (E)-N'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386), on the differentiation of bone cells in vitro and in bone remodeling in a murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength. Design: For in vitro assays, mesenchymal stem cells (MSC) were obtained from bone marrow of female C57BL/6 mice. LASSBio-1386 cytotoxicity against MSC were performed to determine the non-toxic concentration. The influence of LASSBio-1386 on bone cell differentiation was evaluated in vitro . For in vivo assays, female C57BL/6 mice were ovariectomized (OVX) to induced osteoporosis. After 30 days, tooth movement and immediate treatment with a single dose of LASSBio-1386 was started. Orthodontic tooth movement in the alveolar bone was determined by histopathological analysis. Inflammatory cytokines involved in bone remodeling was evaluated in the serum of animals by ELISA. Results: Cells isolated from bone marrow presented morphological profile and expression of cell surface molecules that characterize MSC. LASSBio-1386 increases bone deposition and decreases osteoclastic differentiation in in vitro assays in concentrations noncytotoxic to MSC. In the murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength, no significant difference was found in the amount of tooth movement between the mice treated with LASSBio-1386 and mice no treated. However, LASSBio-1386 modulated the production of cytokines involved in bone remodeling, as OPG and RANKL, in the mice serum. Conclusions: These data suggest that LASSBio-1386 is an important molecule with anti-resorptive action, influencing the balance between bone resorption versus formation process in vitro and in vivo .
Suggested Reviewers:	Ildeu Andrade Júnior andradei@musc.edu
	Gustavo Garlet garletgp@usp.br
	Yan Jin yanjin@fmmu.edu.cn

Powered by Editorial Manager® and ProduXion Manager® from Aries Systems Corporation

Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Gonçalo Moniz

Dear Professors Cadden and Lundy,

N-acylhydrazones are an important class of bioactive organic compounds with great potential in drug discovery process. In this study, we evaluated the influence of LASSBio-1386, an *N*-acylhydrazone derivative, in bone cell differentiation *in vitro* and bone remodeling induced by orthodontic tooth movement in ovariectomized animals.

LASSBio-1386 has a potential anti-resorptive activity *in vitro* and *in vivo*. It is a promising molecule due to its low cytotoxicity against mammalian cells. Furthermore, it is suggested that the compound has the potential to induce differentiation into osteoblasts, due to the formation of calcium deposits. LASSBio-1386 also inhibited the osteoclastic differentiation, as evidenced by the TRAP dosage. In the murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength, the amount of tooth movement was maintained in mice treated with LASSBio-1386, however, this molecule modulated the production of cytokines involved in bone remodeling (RANKL and OPG).

Based on these findings, LASSBio-1386 is a potential alternative for the development of new therapeutic agents with anti-resorptive activity. We hope that our data will be of a broad interest for the development of anti-resorptive agents, as well as of great interest for Archives of Oral Biology readers. We thank you in advance for your consideration of our work.

Looking forward to hearing from you.
Sincerely,
Elisalva Teixeira Guimarães, PhD

INSTITUTO GONÇALO MONIZ – FIOCRUZ – LABORATÓRIO DE ENGENHARIA TECIDUAL E IMUNOFARMACOLOGIA
Rua Waldemar Falcão, nº 121, Candeal, Salvador, Bahia, CEP 40296-710, Brasil
Tel. (71) 3176-2260 Fax: (71) 3176-2272 **etguimaraes@uneb.br**

Highlights:

- LASSBio-1386 affects bone deposition and osteoclastogenesis in *in vitro* assays;
- Tooth movement was maintained in mice ovariectomized and treated with LASSBio-1386;
- LASSBio-1386 influences the modulation of cytokines involved in bone remodeling.

Manuscript File Click here to view linked References

Effect of (E)-*N*'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386) *in vitro* and in a murine model of bone remodeling induced by osteoporosis associated with orthodontic strength

Juliana Dizaira Teles de Lima[a,b], Tatiana Barbosa dos Santos Magalhães[a,b], Rodolfo do Couto Maia[c,d], Eliezer J. Barreiro[c,d], Patricia Kauanna Fonseca Damasceno[b,e], Manoela Carrera[a], Milena Botelho Pereira Soares[b,e], Silvana Rodrigues de Albuquerque Taddei[a], Elisalva Teixeira Guimarães[a,b*]

[a] Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular, Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Salvador, Bahia, Brazil

[b] Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil

[c] Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio®), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[d] Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), CCS, Cidade Universitária, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

[e] Instituto Senai de Inovação em Sistemas Avançados em Saúde (SENAI/CIMATEC), Salvador, Bahia, Brazil

*** Corresponding author:** Elisalva Teixeira Guimarães; Universidade do Estado da Bahia (UNEB), Rua Silveira Martins, 2555, Departamento de Ciências da Vida, Cabula, Salvador, Bahia, Brazil, CEP: 41.150-000; Telephone: +55-71-3177-2200; E-mail: etguimaraes@uneb.br

Abstract

Objective: To evaluate the effect of (E)-N'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386), on the differentiation of bone cells *in vitro* and in bone remodeling in a murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength.

Design: For *in vitro* assays, mesenchymal stem cells (MSC) were obtained from bone marrow of female C57BL/6 mice. LASSBio-1386 cytotoxicity against MSC were performed to determine the non-toxic concentration. The influence of LASSBio-1386 on bone cell differentiation was evaluated *in vitro*. For *in vivo* assays, female C57BL/6 mice were ovariectomized (OVX) to induced osteoporosis. After 30 days, tooth movement and immediate treatment with a single dose of LASSBio-1386 was started. Orthodontic tooth movement in the alveolar bone was determined by histopathological analysis. Inflammatory cytokines involved in bone remodeling was evaluated in the serum of animals by ELISA.

Results: Cells isolated from bone marrow presented morphological profile and expression of cell surface molecules that characterize MSC. LASSBio-1386 increases bone deposition and decreases osteoclastic differentiation in *in vitro* assays in concentrations noncytotoxic to MSC. In the murine model of osteoporosis associated with orthodontic strength, no significant difference was found in the amount of tooth movement between the mice treated with LASSBio-1386 and mice no treated. However, LASSBio-1386 modulated the production of cytokines involved in bone remodeling, as OPG and RANKL, in the mice serum.

Conclusions: These data suggest that LASSBio-1386 is an important molecule with anti-resorptive action, influencing the balance between bone resorption versus formation process *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: Bone remodeling; Osteoporosis; Tooth movement; LASSBio-1386.

1. Introduction

Bone remodeling is related to the osteoimmune response and mechanical loading (Tobeiha et al., 2020; Yu et al., 2021). This process is regulated of coupled activity of osteoclast on the pressure sites, and osteoblast on the tension sites (Taddei et al., 2012a). An imbalance in the regulation of bone remodeling towards resorption can leads to osteoporosis, an insidious disease characterized by excessive bone loss, micro-architectural deterioration and increased risk of bone fracture (Borciani et al., 2020).

Postmenopausal osteoporosis (PMOP) is a type of this disease associated with climacteric hormonal insufficiency, and involves decreased of oestrogen production (Pardini, 2014; Black & Rosen, 2016). Oestrogen deficiency-induced bone loss is related with an increase of RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) (Ono & Nakashima, 2018). In addition, it has been shown that oestrogen has an osteoprotective function by stimulating the secretion of negative regulators of bone resorption, such as osteoprotegerin (OPG) by osteoblastic stromal cells (Martin & Sims, 2015).

The past years have witnessed remarkable development to understanding of the pathogenesis of osteoporosis and the availability of new drugs to treat the disease. Current therapies include anti-resorptive activity, such as oestrogen replacement, selective oestrogen receptor modulator, bisphosphonates and human monoclonal antibody to the RANKL (Khosla & Hofbauer, 2017). However, most of these agents reduce the rate of bone loss, but do not promote bone synthesis (Gennari et al., 2015). In contrast, teriparatide (PTH [1-34] rh) stimulates bone formation by activating osteoblasts, but its application is limited to two years due to the increased risk of osteosarcoma and osteonecrosis of the jaw (Chan et al., 2016; Radominski et al., 2017). Therefore, the identification of new drugs that are more effective and have less adverse effects than the currently available substances become necessary.

The *N*-acylhydrazone (NAH) is a structure used as a template for derivatization of multi-target drugs. Compounds with this subunit showed antimicrobial, anti-inflammatory, and immunomodulatory actions (Barreiro 2002; Apotrosoaei et al., 2013; Hamdy et al., 2013; Guimarães et al., 2018). Previous studies of our group have shown that (*E*)-*N*'-(3,4-dimethoxybenzylidene)-4-methoxy-N-methylbenzohydrazide (LASSBio-1386), a *N*-acylhydrazone derivative, presented a potent immunomodulatory response via NF-κB pathway inhibition, which could contribute in the inflammatory or immune-mediated diseases treatment (Guimarães et al., 2018). As the receptor activator of NFκB ligand (RANKL),

expressed by osteoblasts and lymphocytes, is one of the main regulators of the differentiation of mononuclear monocytes into mature osteoclasts (Boyce et al., 2012), this work aims to investigate the activity of LASSBio-1386 in the face of bone remodeling.

2. Materials and Methods

2.1 Animals

Female, 5 to 12-week-old C57BL/6 mice (*Mus musculus*) were used. All animals were raised and maintained under controlled conditions of light and temperature in a pathogen-free environment at the animal facilities of the Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). For the tooth movement tests, the feed was moistened to facilitate the chewing of the animals. Experiments protocols were approved by the local Animal Ethics Committee (Approval number: L-IGM-012/2019).

2.2 Drugs

LASSBio-1386 was synthetized by Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas at Federal University of Rio de Janeiro, Brazil (Figure 1) (Kümmerle et al., 2012). Gentian violet (Synth, São Paulo, SP, Brazil) was used as a positive control in the cytotoxicity assays. Alendronate sodium (Neo Química, Anápolis, GO, Brazil), was used as a positive control in bone remodeling assays. All compounds were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO; PanReac, Castellar del Vallès, BCN, Spain).

2.3 Isolation and immunophenotyping of bone marrow-derived mesenchymal stem cells

Bone marrow derived MSCs were used in *in vitro* assays due to their ability to differentiate into several cell types, including bone tissue (Friedenstein, Chailakhjan, & Lalykina, 1970). These cells were obtained by flushing femurs and tibias with complete medium constituted of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), 50 μg mL^{-1} gentamicin (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). Cells were cultivated at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. For detection of surface antigen, $1x10^6$ cells were incubated at 4 ºC for 30 min with following antibodies diluted 1:100: PE anti-mouse CD73 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA), CD44 (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA), CD90 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA), CD105 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA,

USA), CD11b (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA), CD45 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). The acquisition and analysis were done using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA) with the FlowJo software (FlowJo LLC, Ashland, OR, USA). At least 10,000 events were collected.

2.4 Cytotoxicity evaluation

MSCs ($5x10^4$ cells/well) were incubated in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% FBS (Gibco) and 50 μg mL^{-1} gentamicin (Gibco), for 24 hours, at 37 °C and 5% CO_2. LASSBio-1386 was added in six sets of serial diluted concentrations (100 – 0.41 μM), in triplicates, and incubated for 72 hours. Subsequently, 20 μL/well of AlamarBlue (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added for 24 hours at 37 °C and 5% CO_2. Colorimetric readings were performed on the spectrophotometer (Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) at 570 and 600 nm. Gentian violet (Synth) was used as the reference cytotoxic drug. CC_{50} values were determined based on the percentage of cell growth inhibition compared to the negative controls, from three independent experiments by using Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA).

2.5 Osteoclast and osteoblast generation

In vitro experiments were conducted to investigate the activity of LASSBio-1386 in the differentiation of osteoclasts and osteoblasts. For osteoclastic differentiation, MSCs cells were cultured in DMEM medium (Gibco) and stimulated with 50 ng/mL RANKL (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) and 30 ng/mL M-CSF (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA). LASSBio-1386 was added (15 and 30 μM). After 5 days of culture, the TRAP method was used to identify osteoclasts, which is based on the detection of tartrate-resistant acid phosphatase enzyme (Du et al., 2020). The TRAP kit (Acid Phosphatase Assay Kit; Sigma, St. Louis, MO, USA) was performed according to the manufacturer's instructions. The reaction was determined using the spectrophotometer (Spectramax 190), with a 405 nm filter. The analyzes were performed using the Softmax 4.3.1 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Osteoblastic differentiation in adherent MSC was induced by in StemPro® osteogenesis differentiation kit (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) supplemented with 50 μg mL^{-1} gentamicin (Gibco). LASSBio-1386 was added (15 and 30 μM). The culture

media were replaced once every 3 days. On day 21 post induction, the cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with Alizarin Red (Sigma, St. Louis, MO, USA) to evaluate the presence of calcium deposits.

2.6 Ovariectomy and orthodontic tooth movement

For *in vivo* assays, mice were divided into 10 groups regarding ovariectomy, tooth movement, LASSBio-1386 treatment and time (Table 1). Initially, female mice (10 to 12-week-old C57BL/6) were bilaterally ovariectomized to induces osteoporosis (Macari et al., 2015). After 30 days of ovariectomy (OVX), induction of orthodontic tooth movement (OTM) was performed as described previously (Taddei et al., 2012b). An orthodontic appliance consisting of a Ni-Ti open-coil spring 0.25×0.76 mm (Lancer Orthodontics, San Marcos, CA, USA) was bonded between maxillary right first molar and the incisors of mice, exerting a force of 0.35 N in the mesial direction. There was no reactivation during the experimental period. The animals in the treated group received LASSBio-1386 in a single dose of 100 mg/kg (Guimarães et al., 2018). The left side of maxilla (without appliance) was used as control in histomorphometric analysis. For every set of experiments, 5 mice were used for each time-point.

2.7 Histomorphometric analysis

The right and left maxillae halves were dissected and fixed in 10% buffered formalin (pH 7.2), decalcified in 7% nitric acid (pH 7.4) and embedded in paraffin. Sagittal sections of 3-μm were stained with hematoxylin and eosin. Five sections per animal were evaluated under AX70 microscope (Olympus). The quantification of OTM was performed as described previously (Taddei et al., 2012b). Images of the first and second molars were obtained using an optical microscope AX70 (Olympus). Image J software (National Institutes of Health, USA) was used to quantify the degree of orthodontic tooth movement by measuring the difference between the distance of the cementum–enamel junction of the first molar and the second molar of the experimental side in comparison to the control side of the same animal. Five vertical sections per animal were evaluated.

2.8 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

The levels of RANKL and OPG were determined from the serum of mice by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the kit ELISA Invitrogen (Thermo Fisher

Scientific Inc., Waltham, MA, USA), according to the manufacturer's instructions. After incubation with a streptavidin-peroxidase conjugate, the reaction was developed using stop solution and the absorbance at 450 nm wavelength read using a spectrophotometer (Spectramax 190). The analyzes were performed using the Softmax 4.3.1 software (Molecular Devices).

2.9 Statistical analysis

One-way analysis of variance and Newman-Keuls multiple comparison tests were employed by using Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software). Differences were considered significant when the values of p were < 0.05 (Guimarães et al., 2018).

3. Results

3.1 Isolation and characterization of MSC

Bone marrow stem cells were isolated from female C57BL/6 mice and expanded *in vitro*. The cells are plastic-adherent and showed rapid expansion and proliferation capacity after isolation. The cells exhibited a polymorphic morphology. Initially the cells had rounded shapes (Figure 2A) with formation of aggregates after 48 hours of culture. Fusiform shaped cells predominated after 20 to 28 days of culture (Figure 2B). MSCs that were cryopreserved showed the ability to quickly restart proliferation in culture, in a similar way to that of recently isolated cells.

In the third passage, these cells were analyzed using antibodies against several cell surface and intracellular antigens, to determine the phenotypic characteristics. Flow cytometric analysis revealed the expression of cell surface molecules that characterize MSCs, such as CD44, CD73, CD90, CD105 (Figure 3). Moreover, the percentage of hematopoietic cell markers was low (CD11b and CD45).

3.2 Cytotoxicity evaluation

We first assayed the cell viability of MSC treated with LASSBio-1386. The compound presented a CC_{50} value of 41.62 ± 1.13 μM after 72 hours of incubation. Alendronate sodium, the reference drug in osteoporosis treatment, present CC_{50} value of 14.27 ± 2.96 μM. These

data indicate that LASSBio-1386 is less cytotoxic than alendronate sodium and gentian violet (CC_{50} = 2.66 ± 0.21 μM), a known cytotoxic drug (Table 2).

3.3 Influence of LASSBio-1386 on osteoblastic differentiation

Confluent monolayers of the MSC were submitted to conditions known to promote osteogenesis. After 21 days, cell aggregates were observed in the cultures, an indicative of osteoblastic differentiation. Control MSC were cultured only with growth medium (Figure 4A). Substantial calcium deposits were seen by alizarin red staining, which localized specifically in the mineral nodules (Figure 4B). Furthermore, treatment with LASSBio-1386 increased the number of cells stained with alizarin red when compared to the positive control group, suggesting its potential to induce differentiation into osteoblasts, especially at the highest concentration used (Figures 4C, D and Figure 5). Treatment with alendronate, a reference drug, also preserved calcium deposits (Figure 4E).

3.4 TRAP activity

MSCs were cultured and induced to osteoclastic differentiation through stimulation with soluble RANKL and M-CSF. LASSBio-1386 was added to cultures to assess whether its presence interferes with TRAP expression and, consequently, differentiation into osteoclasts. After 5 days, stimulated MSC increase TRAP production. In contrast, cells treated with LASSBio-1386 exhibited a reduction in TRAP production, regardless of the concentration used (15 and 30 μM). Similarly, sodium alendronate also reduced TRAP production at 30 μM (Figure 6).

3.5 Effect of LASSbio-1386 on alveolar bone resorption

Mice were OVX, after 30 days OTM (6 and 12 days) and treatment with LASSBio-1386 was performed. Histological analysis revealed mesial movement of the teeth in the animals groups with orthodontic tooth movement (OTM group); ovariectomized and OTM (OVX + OTM group); OTM and treated with LASSBio-1386 (OTM + LASSBio-1386 group); OVX, OTM and treated with LASSBio-1386 (OVX + OTM + LASSBio-1386 group) (Figure 7A and B). No significant loss of weight was observed during experimental period. Groups of ovariectomized animals (OVX + OTM group) showed a significant increase in amount of tooth movement and the alveolar bone resorption when compared to the group of mice without ovariectomy (OTM group) after 6 (Figure 7A) and 12 days (Figure 7B) of mechanical loading. However, the treatment with LASSBio-1386 demonstrated not change alveolar bone

loss in animals OVX in comparing with OTM + LASSBio-1386 group (Figure 7A and B). Moreover, microscopic analysis showed that, in the control side, no activity was observed in the region of the periodontium and between 1st and 2nd molar (Figure 8A and B). In contrast, in groups with or without OVX and treated with LASSBio-1386 were observed the compression of mesial periodontium of the distobuccal root and the tension on the distal side of this root (Figure 8C and E). In addition, OTM was detected by increasing the distance from the cemento-enamel junction between the 1st and 2nd molar (Figure 8D and F).

3.6 RANKL and OPG levels in the serum

Mice serum treated or not with LASSBio-1386 was collected for RANKL and OPG dosages. Groups of ovariectomized animals, with tooth movement and treated with LASSBio-1386 (OVX + OTM + LASSBio-1386) showed a significant reduction in the RANKL production when compared to the group of mice that received the same conditions, but no treated (OVX + OTM). Similar results were observed in the absence of ovariectomy (OTM; OTM + LASSBio-1386) (Figure 9A and B). In addition, groups that received treatment with LASSBio-1386 (OTM + LASSBio-1386; OVX + OTM + LASSBio-1386) presented an increase in the OPG production when compared to the group without treatment (Figure 9C and D).

4. Discussion

N-acylhydrazones are an important class of bioactive organic compounds, considered a privileged structure, because it can interact with several bioreceptors (Duarte, Barreiro, & Fraga, 2007). It is a versatile structure that can act both as hydrogen bonds donor or acceptor and can adopt several conformational orientations due to the flexibility of its chemical structure (Fraga & Barreiro, 2006). LASSBio-1386, a *N*-methylated NAH derivative, presents a potent immunomodulatory response via NF-κB pathway inhibition, and could contribute in the inflammatory or immune-mediated diseases treatment (Guimarães et al., 2018). The receptor activator of NF-κB ligand (RANKL), expressed by osteoblasts and lymphocytes, are regulators of the differentiation of mononuclear monocytes into mature osteoclasts (Boyce et al., 2012). This indicates that LASSBio-1386 also can act on bone remodeling. In this study, we demonstrated that LASSBio-1386 influences bone cell differentiation *in vitro* and bone remodeling induced by orthodontic tooth movement in ovariectomized animals.

LASSBio-1386 showed low cytotoxicity for MSCs obtained from bone marrow (CC_{50} = 41.62 μM). Similar result was reported by Guimarães and coworkers (2018), which LASSBio-1386 demonstrated CC_{50} values above 55 μM against J774 macrophages lineage. These results indicate that the compound exhibits low cytotoxicity in different cell lines, including bone cell precursors. In our assays, non-toxic concentrations were used.

Several drugs are used in treatment of osteoporosis, the most common are the bisphosphonates. These drugs stimulate the formation of osteoblast precursors and mineralized nodules in murine and human bone marrow cultures (Im et al., 2004; von Knoch et al., 2005; Fasolino et al., 2020; Sher, Miller, & Sharma, 2020). Kim and coworkers (2009) investigated the effects of alendronate sodium on mouse bone marrow-derived MSCs cultures in osteogenic differentiation medium and determined that the compound promotes osteoblast proliferation and maturation, as evidenced by positive alizarin red staining. Reinholz and coworkers (2000) reported similar findings in their work on pamidronate and zoledronate. In the present study, the presence of calcium deposits was confirmed by alizarin red staining. Intensities of staining were greater in the presence of LASSBio-1386 at a concentration of 30 μM, suggesting an osteogenic stimulus for differentiation. These observations indicate the main mineral components of calcified bone matrix, or the precursors of calcified bone matrix, were formed (Pittenger et al., 1999).

Osteoclasts express TRAP, cathepsin K and metalloproteinases, which participate in the degradation of type I collagen in the bone matrix (Du et al., 2020). In this study, the presence of osteoclasts-derived MSC was confirmed by measuring the TRAP enzyme. Based on our results, it is suggested that the compound LASSBio-1386 significantly reduced the production of TRAP. These findings were similar to those found by Martins and coworkers (2015), who analyzed the activity of alendronate sodium on osteoclasts derived from the RAW 264.7 lineage and concluded that the expression of TRAP significantly decreased in the presence of alendronate.

Estrogen is the major hormonal regulator of bone metabolism in women and men, the deficiency is associated with a gap between bone resorption and formation (Khosla, Oursler, & Monroe, 2012). A possible relationship between oestrogen deficiency and alveolar bone loss is seen in the experimental periodontitis (Amadei et al., 2011). In our work, animals were subjected to ovariectomy to cause oestrogen deficiency, a model confirmed by other studies (Kobayashi et al., 2012; Macari et al., 2015). In ovariectomized mice, alveolar bone

resorption significantly increased when compared to the group of mice without ovariectomy. In the same way, corroborating with Bonnet and coworkers (2013) the cementum–enamel junction area was enhanced 30 days after OVX.

Guimarães and coworkers (2018) used a mice endotoxic shock model to assess an immunomodulatory activity of LASSBio-1386. The treatment with the compound in a single dose (100 mg/kg) increased the survival of mice in face of the stimulation by lipopolysaccharide (LPS). Following this treatment protocol, in the present study, LASSBio-1386 did not control the alveolar bone loss rates when compared to untreated animals. More research is needed to define the role of LASSBio-1386 in bone remodeling in *in vivo* assays, a treatment with more doses during mechanical strength is suggested.

Molecular mechanisms are involved in bone loss, in particular there have been many studies demonstrating the role of RANKL and OPG in mediating alveolar bone loss after ovariectomy (Ikeda et al., 2001; Aoki et al., 2006; Kobayashi et al., 2012). RANKL acts as a key factor in osteoclastogenesis, through binding to the NF-κB receptor activator (RANK) (Ikeda et al., 2001). The presence of RANKL in large quantities may indicate that bone resorption is greater than bone apposition (Aoki et al., 2006). In the present study, LASSBio-1386 reduces the RANKL levels even in animals submitted to ovariectomy. In addition of *in vitro* results, these data suggest that this molecule acts to maintain a balance in bone remodeling. Giner and coworkers (2011) evaluated the effects of alendronate on RANKL expression (RT-PCR) in primary cultures of human osteoclasts and determined that there was an increase in RANKL mRNA expression. These data suggest that there are different molecular mechanisms of action for both drugs.

Simonet and coworkers (1997) described OPG as an osteoprotective protein, due to its characteristic of protecting the skeleton from excessive bone resorption. OPG binds to RANKL preventing it from binding to RANK, so the terminal phase of osteoclast differentiation is interrupted, inducing its apoptosis (Domazetovic et al., 2017). The main source of OPG is mature osteoblasts, the low number of osteoblasts is associated with reduced levels of OPG in the bones. Effect of alendronate on OPG expression in human osteoblasts was analyzed and the drug does not change protein levels (Enjuanes et al., 2010). However, our results demonstrated that LASSBio-1386 induces a significant increase in OPG production, suggesting that the compound can stimulate bone formation.

5. Conclusions

This study was the first report demonstrating that LASSBio-1386 has a potential of LASSBio-1386 to interfere with bone remodeling, inhibiting the reabsorptive activity and stimulating bone formation, in *in vitro* models and in the murine model of osteoporosis associated with orthodontic force, through alterations in the profile of cytokines mediating alveolar bone loss. Therefore, LASSBio-1386 is a promising therapeutic alternative for the development of new agents with anti-resorptive activity.

Acknowledgments

We are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Chamada Universal MCTI/CNPq Nº 28/2018, INCT-INOFAR Grant #465.249/2014-0 and Grant #381138/2019-4) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) for the funding. We are grateful to Ana Paula Pacheco for help with histomorphometric analysis.

References

Amadei, S. U., Souza, D. M. D., Brandão, A. A. H., & Rocha, R. F. D. (2011). Influence of different durations of estrogen deficiency on alveolar bone loss in rats. *Brazilian oral research*, *25*, 538-543.

Aoki, K., Saito, H., Itzstein, C., Ishiguro, M., Shibata, T., Blanque, R., ... & Baron, R. (2006). A TNF receptor loop peptide mimic blocks RANK ligand–induced signaling, bone resorption, and bone loss. *The Journal of clinical investigation*, *116*(6), 1525-1534.

Apotrosoaei, M., Vasincu, I., Tuchilus, C., Lupascu, F., Constantin, S., LUPASCU, D., & Profire, L. (2013). New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iaşi*, *117*(2), 538-544.

Barreiro, E. J. (2002). Medicinal chemistry of n-acylhydrazones: novel lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Química Nova*, *25*, 129-148.

Barros, A. N., Cruz, R. C., Xavier, W. S., Carrieri, A. P., & Lima, G. C. O. (2011). Apropriação dos saberes administrativos: um olhar alternativo sobre o desenvolvimento da área. Revista de Administração Mackenzie, 12, 43-67.

Black, D. M., & Rosen, C. J. (2016). Postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, *374*(3), 254-262.

Bonnet, N., Lesclous, P., Saffar, J. L., & Ferrari, S. (2013). Zoledronate effects on systemic and jaw osteopenias in ovariectomized periostin-deficient mice. *PLoS One*, *8*(3), e58726.

Borciani, G., Montalbano, G., Baldini, N., Cerqueni, G., Vitale-Brovarone, C., & Ciapetti, G. (2020). Co–culture systems of osteoblasts and osteoclasts: Simulating in vitro bone remodeling in regenerative approaches. *Acta biomaterialia*, *108*, 22-45.

Boyce, B. F., Rosenberg, E., de Papp, A. E., & Duong, L. T. (2012). The osteoclast, bone remodelling and treatment of metabolic bone disease. *European journal of clinical investigation*, *42*(12), 1332-1341.

Chan, C. K., Mason, A., Cooper, C., & Dennison, E. (2016). Novel advances in the treatment of osteoporosis. *British medical bulletin*, *119*(1), 129-142.

Domazetovic, V., Marcucci, G., Iantomasi, T., Brandi, M. L., & Vincenzini, M. T. (2017). Oxidative stress in bone remodeling: role of antioxidants. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, *14*(2), 209.

Du, N., Song, L., Li, Y., Wang, T., Fang, Q., Ou, J., & Nandakumar, K. S. (2020). Phytoestrogens protect joints in collagen induced arthritis by increasing IgG glycosylation and reducing osteoclast activation. *International immunopharmacology*, *83*, 106387.

Duarte, C. D., Barreiro, E. J., & Fraga, C. A. (2007). Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *7*(11), 1108-1119.

Enjuanes, A., Ruiz-Gaspà, S., Peris, P., Ozalla, D., Álvarez, L., Combalia, A., ... & Guañabens, N. (2010). The effect of the alendronate on OPG/RANKL system in differentiated primary human osteoblasts. *Endocrine*, *37*(1), 180-186.

Fasolino, I., Soriente, A., Ambrosio, L., & Raucci, M. G. (2020). Osteogenic and Anti-Inflammatory Behavior of Injectable Calcium Phosphate Loaded with Therapeutic Drugs. *Nanomaterials*, *10*(9), 1743.

Fraga, C. A., & Barreiro, E. J. (2006). Medicinal chemistry of N-acylhydrazones: new lead-compounds of analgesic, antiinflammatory and antithrombotic drugs. *Current medicinal chemistry*, *13*(2), 167-198.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., & Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Proliferation*, *3*(4), 393-403.

Gennari, L., Rotatori, S., Bianciardi, S., Gonnelli, S., Nuti, R., & Merlotti, D. (2015). Appropriate models for novel osteoporosis drug discovery and future perspectives. *Expert opinion on drug discovery*, *10*(11), 1201-1216.

Giner, M., Rios, M. J., Montoya, M. J., Vázquez, M. A., Miranda, C., & Pérez-Cano, R. (2011). Alendronate and raloxifene affect the osteoprotegerin/RANKL system in human osteoblast primary cultures from patients with osteoporosis and osteoarthritis. *European journal of pharmacology*, *650*(2-3), 682-687.

Guimarães, E. T., Dos Santos, T. B., Silva, D. K. C., Meira, C. S., Moreira, D. R. M., da Silva, T. F., ... & Soares, M. B. P. (2018). Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. *International immunopharmacology*, *65*, 108-118.

Hamdy, N. A., Abdel-Aziz, H. A., Kamel, G. M., & Fakhr, I. M. (2013). Convenient synthesis, anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activites of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. *Acta Pol. Pharm*, *70*, 469-480.

Ikeda, T., Kasai, M., Utsuyama, M., & Hirokawa, K. (2001). Determination of Three Isoforms of the Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand and Their Differential Expression in Bone and Thymus. *Endocrinology*, *142*(4), 1419-1426.

Im, G. I., Qureshi, S. A., Kenney, J., Rubash, H. E., & Shanbhag, A. S. (2004). Osteoblast proliferation and maturation by bisphosphonates. *Biomaterials*, *25*(18), 4105-4115.

Khosla, S., & Hofbauer, L. C. (2017). Osteoporosis treatment: recent developments and ongoing challenges. *The lancet Diabetes & endocrinology*, *5*(11), 898-907.

Khosla, S., Oursler, M. J., & Monroe, D. G. (2012). Estrogen and the skeleton. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *23*(11), 576-581.

Kim, H. K., Kim, J. H., Abbas, A. A., & Yoon, T. R. (2009). Alendronate enhances osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells: a preliminary study. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, *467*(12), 3121-3128.

Kobayashi, M., Matsumoto, C., Hirata, M., Tominari, T., Inada, M., & Miyaura, C. (2012). The correlation between postmenopausal osteoporosis and inflammatory periodontitis regarding bone loss in experimental models. *Experimental animals*, *61*(2), 183-187.

Kümmerle, A. E., Schmitt, M., Cardozo, S. V., Lugnier, C., Villa, P., Lopes, A. B., ... & Barreiro, E. J. (2012). Design, synthesis, and pharmacological evaluation of N-acylhydrazones and novel conformationally constrained compounds as selective and potent orally active phosphodiesterase-4 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, *55*(17), 7525-7545.

Macari, S., Duffles, L. F., Queiroz-Junior, C. M., Madeira, M. F., Dias, G. J., Teixeira, M. M., ... & Silva, T. A. (2015). Oestrogen regulates bone resorption and cytokine production in the maxillae of female mice. *Archives of oral biology*, *60*(2), 333-341.

Martin, T. J., & Sims, N. A. (2015). RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, *16*(2), 131-139.

Martins, C. A., Leyhausen, G., Volk, J., & Geurtsen, W. (2015). Effects of alendronate on osteoclast formation and activity in vitro. *Journal of endodontics*, *41*(1), 45-49.

Ono, T., & Nakashima, T. (2018). Recent advances in osteoclast biology. *Histochemistry and Cell Biology*, *149*(4), 325-341.

Pardini, D. (2014). Hormone replacement therapy in menopause. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, *58*(2), 172-181.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., ... & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *science*, *284*(5411), 143-147.

Radominski, S. C., Bernardo, W., Paula, A. P. D., Albergaria, B. H., Moreira, C., Fernandes, C. E., ... & Borba, V. Z. (2017). Brazilian guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Revista brasileira de reumatologia*, *57*, s452-s466.

Reinholz, G. G., Getz, B., Pederson, L., Sanders, E. S., Subramaniam, M., Ingle, J. N., & Spelsberg, T. C. (2000). Bisphosphonates directly regulate cell proliferation, differentiation, and gene expression in human osteoblasts. *Cancer research*, *60*(21), 6001-6007.

Sher, J., Miller, C., & Sharma, D. (2020). Effect of Bisphosphonates on the Osteogenic Activity of Osteoprogenitor Cells Cultured on Titanium Surfaces. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *35*(5).

Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M. C. M. S., Chang, M. S., Lüthy, R., ... & Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, *89*(2), 309-319.

Taddei, S. R. A., Andrade Jr, I., Queiroz-Junior, C. M., Garlet, T. P., Garlet, G. P., de Queiroz Cunha, F., ... & da Silva, T. A. (2012a). Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*, *141*(2), 153-160.

Taddei, S. R. A., Moura, A. P., Andrade Jr, I., Garlet, G. P., Garlet, T. P., Teixeira, M. M., & da Silva, T. A. (2012b). Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. *Journal of biomechanics*, *45*(16), 2729-2735.

Tobeiha, M., Moghadasian, M. H., Amin, N., & Jafarnejad, S. (2020). RANKL/RANK/OPG pathway: a mechanism involved in exercise-induced bone remodeling. *BioMed research international*, *2020*.

von Knoch, F., Jaquiery, C., Kowalsky, M., Schaeren, S., Alabre, C., Martin, I., ... & Shanbhag, A. S. (2005). Effects of bisphosphonates on proliferation and osteoblast differentiation of human bone marrow stromal cells. *Biomaterials*, *26*(34), 6941-6949.

Yu, W., Zhong, L., Yao, L., Wei, Y., Gui, T., Li, Z., ... & Qin, L. (2021). Bone marrow adipogenic lineage precursors promote osteoclastogenesis in bone remodeling and pathologic bone loss. *The Journal of clinical investigation*, *131*(2).

Figure 1. Chemical structure of LASSBio-1386.

Figure 2. Morphological aspects of bone marrow stem cells. Adherent cells cultured in vitro present heterogeneity in the morphology. Phase-contrast micrographs were taken on day 1 (A) and day 28 (B) of culture. Rounded or fusiform (A), elongated and stellated (B) cell shapes can be observed.

Figure 3. Expression of mesenchymal and hematopoietic stem cells markers in bone marrow stem cells. The expression of the surface markers CD44, CD73, CD90, CD105, CD45 and CD11b was evaluated by flow cytometry. The histograms show isotype control (blue peaks) versus specific antibody staining (pink peaks) and the percentage of positive cells for the selected molecules.

Figure 4. Osteoblastic differentiation and treatment or not with LASSBio-1386. The MSCs were cultured in appropriate media to induce the differentiation into osteogenic lineages. MSC not submitted to osteogenic differentiation protocol (A) and differentiated (B), differentiated and treated with LASSBio-1386 at concentrations of 15 μM (C) and 30 μM (D), differentiated and treated with alendronate sodium at a concentration of 30 μM (E). Calcium deposits are evidenced by the 2% alizarin red staining. Images were acquired using an AX70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

Figure 5. Calcium deposits in MSCs differentiated into osteoblasts and treated or not with LASSBio-1386. MSCs were differentiated into osteoblasts and treated or not with LASSBio-1386 (15 or 30 μM) or alendronate sodium (ALD; 30 μM) for 21 days. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. ns = not significant compared to the positive control group. ***$p < 0.001$; compared to the positive control group. **$p<0.05$; compared to the positive control group.

Figure 6. Enzymatic evaluation of tartrate resistant acid phosphatase. MSCs were stimulated with RANKL and M-CSF and treated or not with LASSBio-1386 (15 or 30 μM) or alendronate sodium (ALD; 30 μM) for 5 days. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. ***$p < 0.001$; compared to the positive control group.

Figure 7. Orthodontic tooth movement after treatment or not with LASSBio-1386. Amounts of tooth movement after 6 days (A) and 12 days (B) in mice treated or not with LASSBio-

1386. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. ***$p < 0.001$ and **$p < 0.01$ compared to OTM group; ns = not significant. $^{###}p < 0.001$; $^{##}p < 0.01$ compared to OVX + OTM group; ns = not significant.

Figure 8. Histological changes related to orthodontic tooth movement in mice treated or not with LASSBio-1386 and OVX or not. Sections of the distance between the cemento-enamel junction of the 1st and 2nd molar (A-F). Control group - without mechanical loading (A); Group without OVX and treated with LASSBio-1386 (C); Group with OVX and treated with LASSBio-1386 (E); Magnified views of the identified areas in A, C and E (B, D and F); MB: mesial alveolar bone; DB: distal alveolar bone; R: root; PL: periodontal ligament; OTM: orthodontic tooth movement. Arrows indicate the direction of tooth movement.

Figure 9. RANKL and OPG production in animal serum after treatment or not with LASSBio-1386. RANKL (A, B) and OPG (C, D) concentrations (pg/mL) were determined by collecting serum from animals treated or not with LASSBio-1386 in a single dose (100 mg/kg) after 6 days (A, C) or 12 days (B, D). The dosages of RANKL and OPG were performed by ELISA. Values represent the means ± SD of five animals per group. Statistical significance was assessed by ANOVA followed by the Newman-Keuls multiple comparison test. ***$p < 0.001$; **$p < 0.01$ and *$p < 0.05$ compared to naïve group. $^{###}p < 0.001$; $^{##}p < 0.01$ and $^{#}p < 0.05$ compared to OVX group; ns = not significant.

Table 1

Experimental groups of *in vivo* assays.

GROUP	PROCEDURES	EUTHANASIA
OTM	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	6 days
OTM	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	12 days
OVX + OTM	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	6 days
OVX + OTM	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	12 days
OTM + LASSBio-1386	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	6 days
OTM + LASSBio-1386	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	12 days
OVX + OTM + LASSBio-1386	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	6 days
OVX + OTM + LASSBio-1386	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	12 days
Naïve	No ovariectomy / No orthodontic tooth movement / No treatment	6 days
OVX	Ovariectomy / No orthodontic tooth movement / No treatment	6 days

Table 2

Cytotoxicity evaluation (CC_{50}) of LASSBio-1386 on mesenchymal stem cells.

COMPOUNDS	CC_{50} ± S.D. (μM)
LASSBio-1386	41.62 ± 1.13
Alendronate sodium	14.27 ± 2.96
Gentian Violet	2.66 ± 0.21

Click here to access/download;Figure;DE LIMA et al. 2021 - Figures.docx

Figure 1

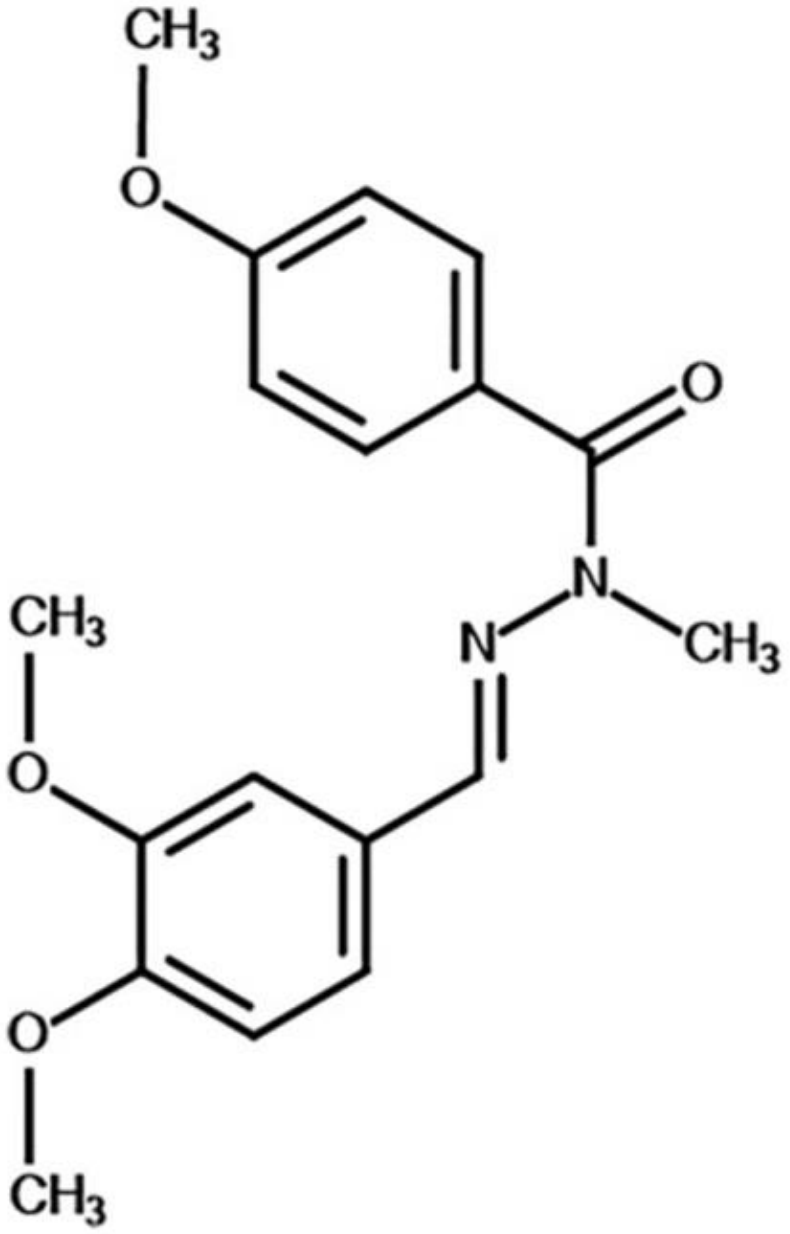


Figure 2

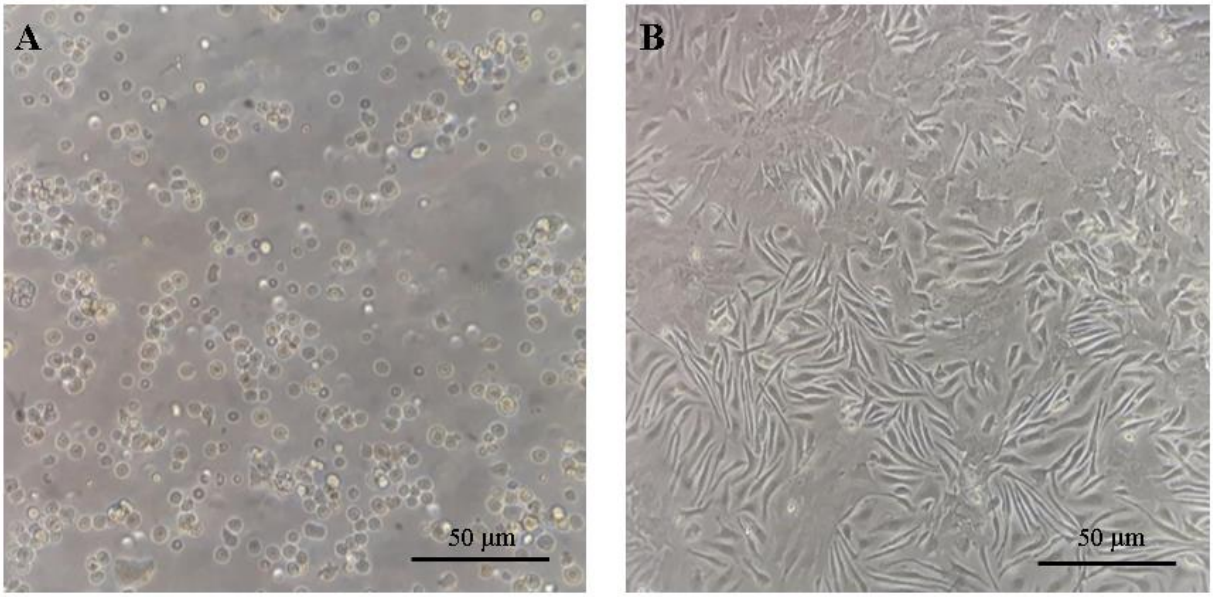


Figure 3

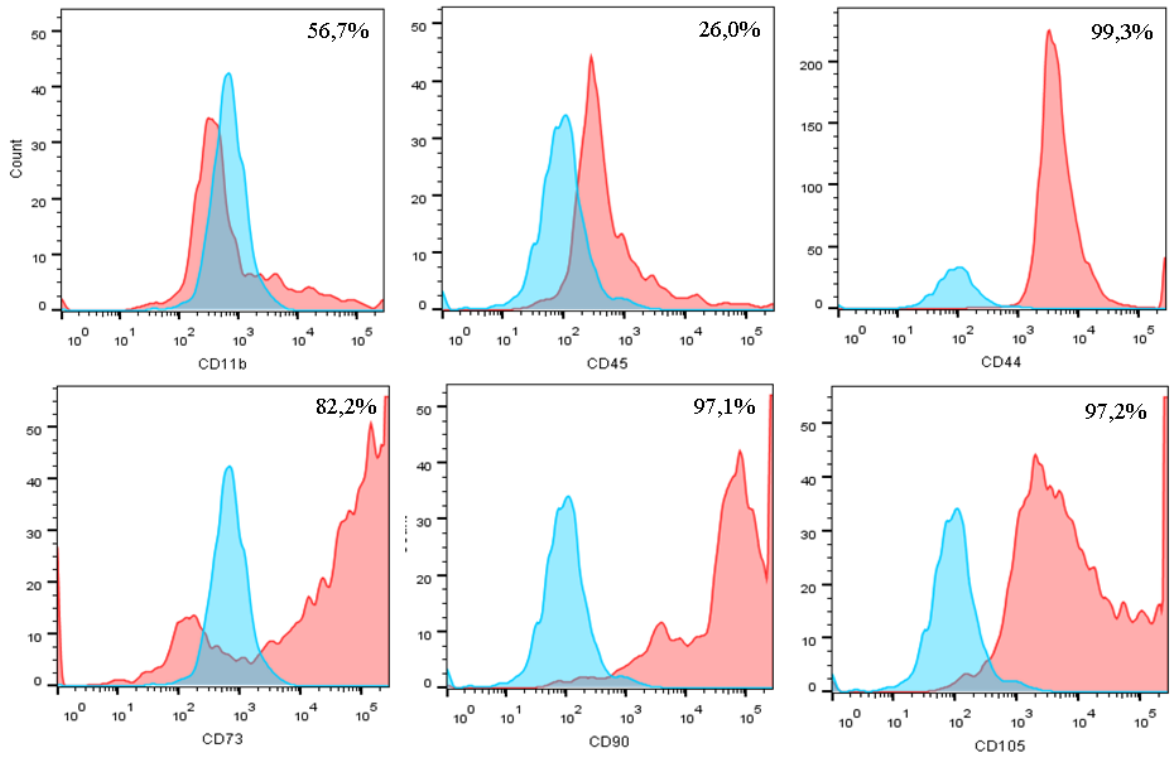


Figure 4

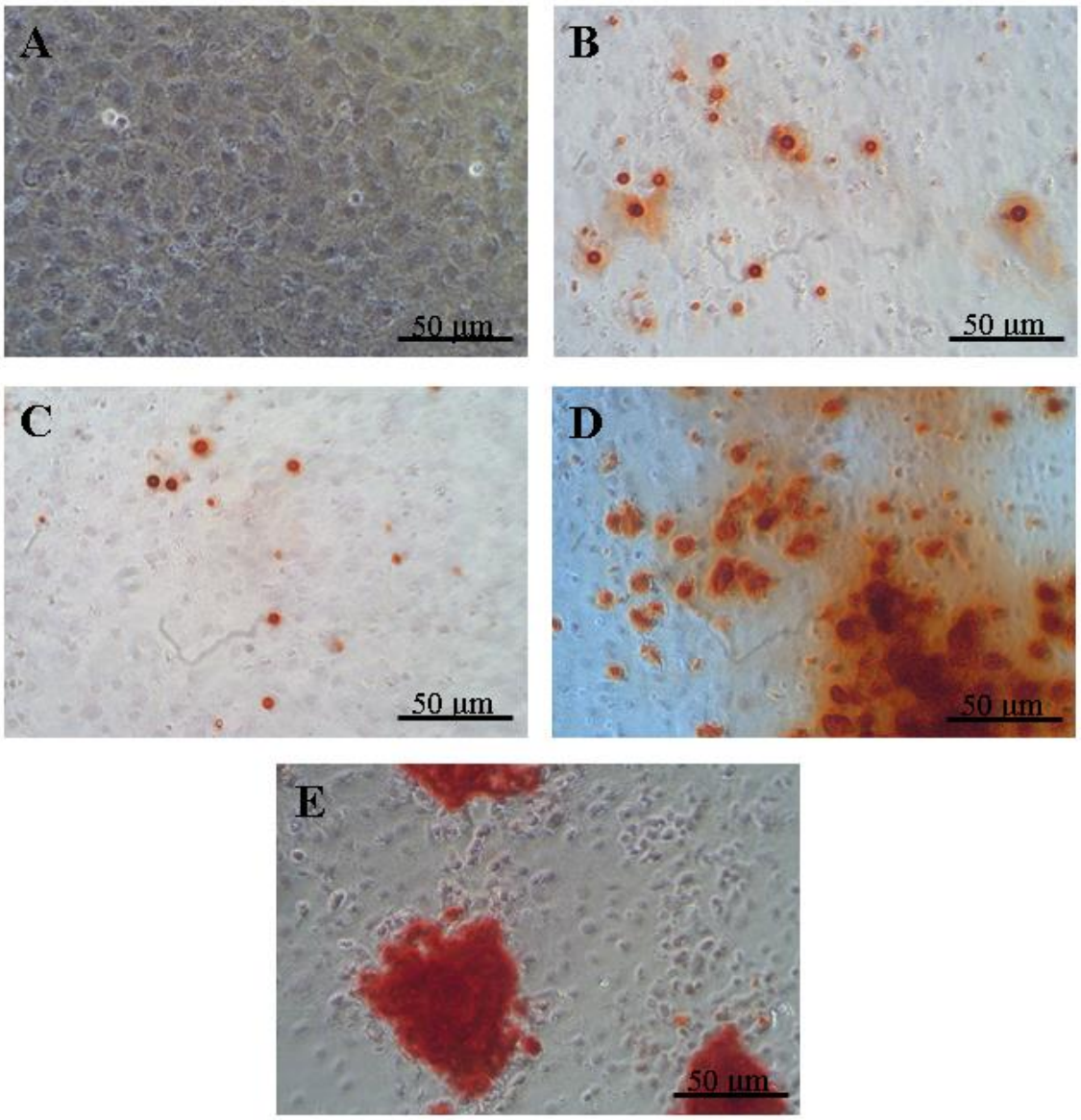


Figure 5

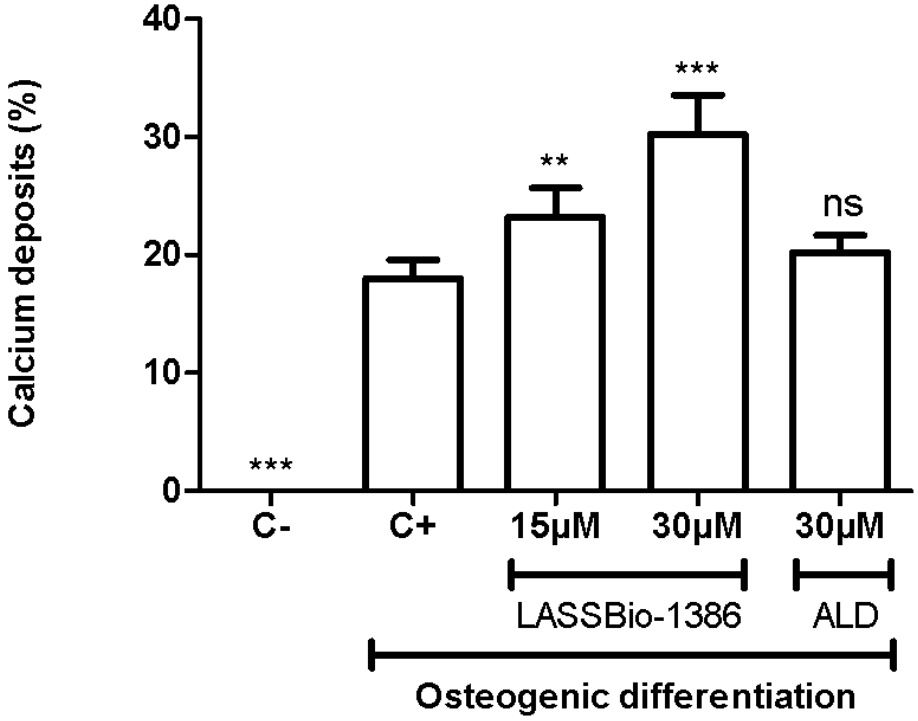

Calcium deposits (%)
40
30
20
10
0
***
**
***
ns
C-
C+
15µM
30µM
30µM
LASSBio-1386
ALD
Osteogenic differentiation

Figure 6

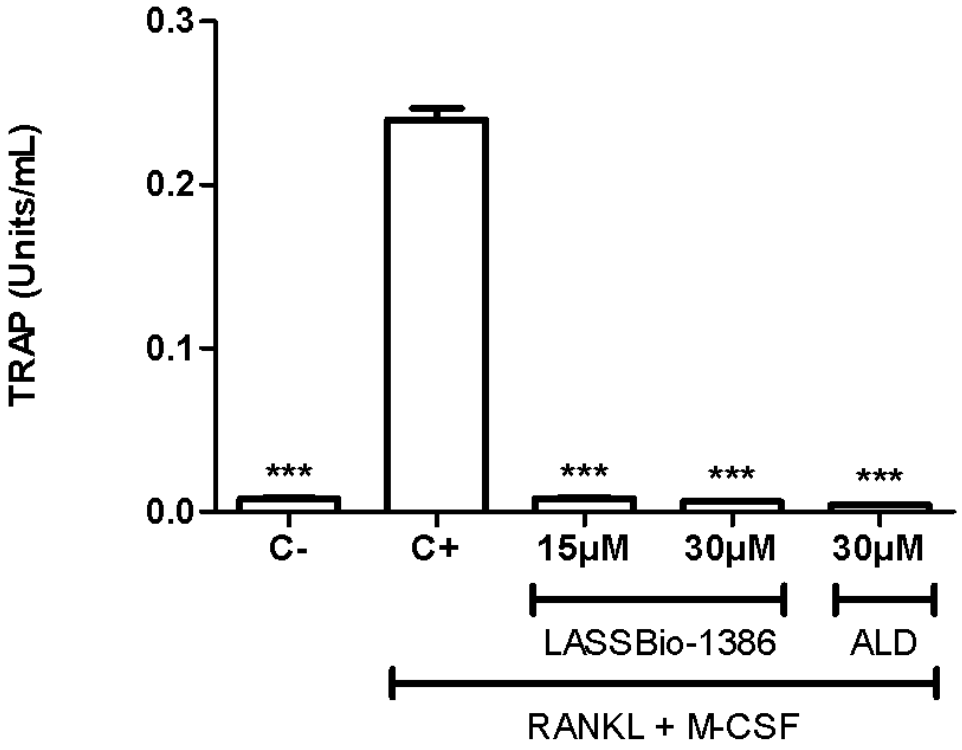

0.3
0.2
0.1
0.0
TRAP (Units/mL)
***
***
***
***
C-
C+
15µM
30µM
30µM
LASSBio-1386
ALD
RANKL + M-CSF

Figure 7

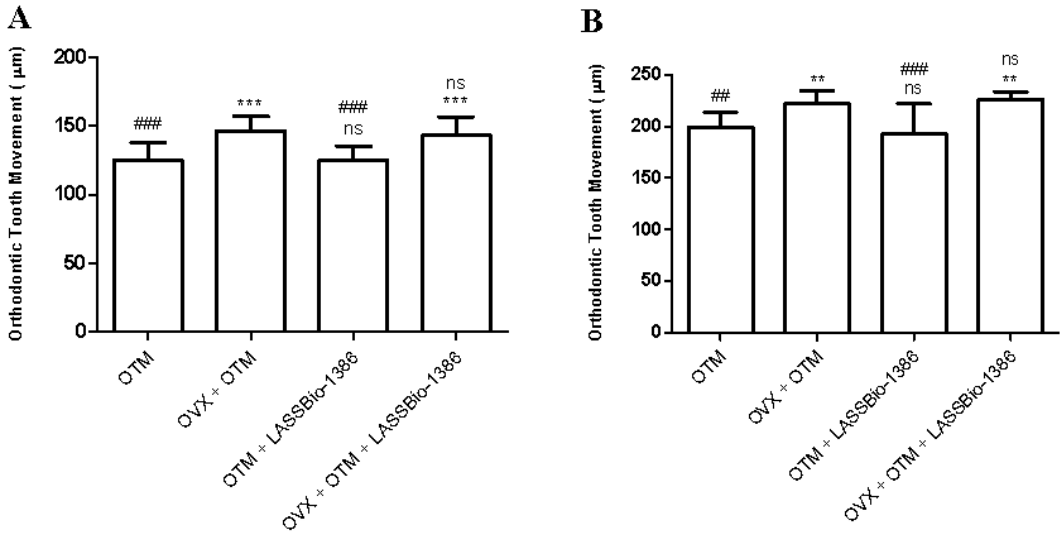

A
Orthodontic Tooth Movement (µm)
200
150
100
50
0
###
***
###
ns
ns
***
OTM
OVX + OTM
OTM + LASSBio-1386
OVX + OTM + LASSBio-1386
B
Orthodontic Tooth Movement (µm)
250
200
150
100
50
0
##
**
###
ns
ns
**
OTM
OVX + OTM
OTM + LASSBio-1386
OVX + OTM + LASSBio-1386

Figure 8

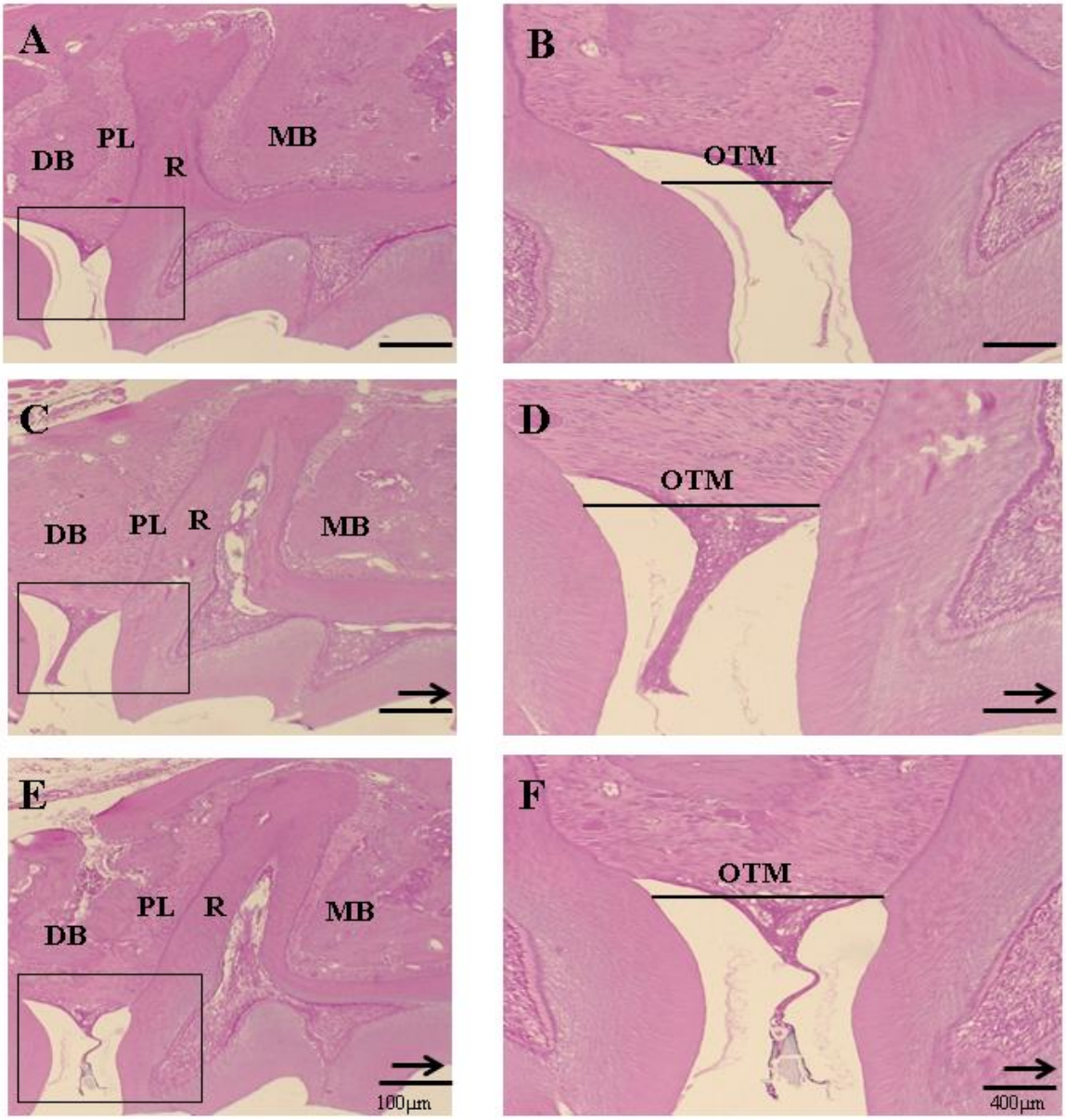
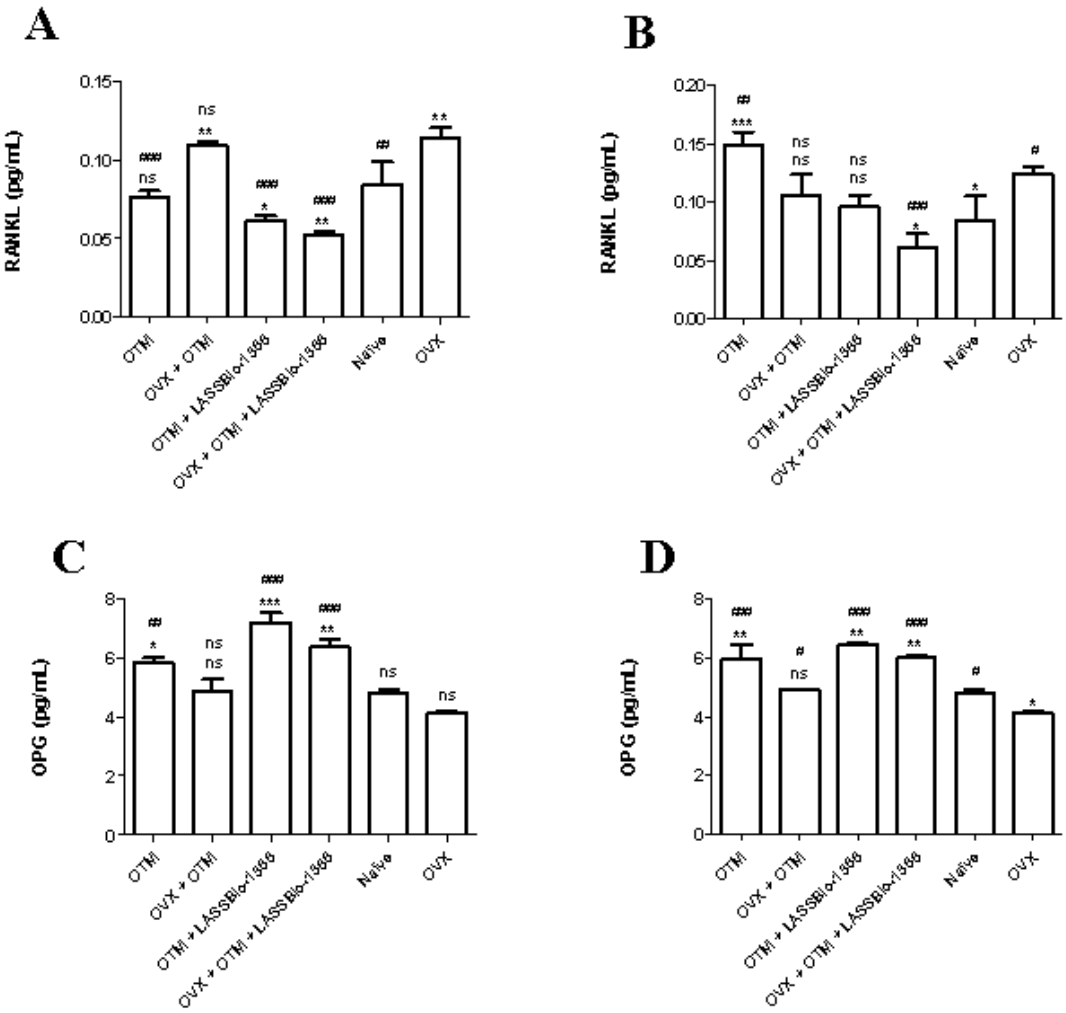


Figure 9


A
RANKL (pg/mL)
0.15
0.10
0.05
0.00
ns
**
###
ns
*
###
**
#
**
OTMI
OVX + OTMI
OTMI + LASSBio-1366
OVX + OTMI + LASSBio-1366
Naïve
OVX
B
RANKL (pg/mL)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
#
***
ns
ns
ns
ns
###
*
*
#
OTMI
OVX + OTMI
OTMI + LASSBio-1366
OVX + OTMI + LASSBio-1366
Naïve
OVX
C
OPG (pg/mL)
8
6
4
2
0
#
*
ns
ns
###
***
###
**
ns
ns
OTMI
OVX + OTMI
OTMI + LASSBio-1366
OVX + OTMI + LASSBio-1366
Naïve
OVX
D
OPG (pg/mL)
8
6
4
2
0
###
**
#
ns
###
**
###
**
#
*
OTMI
OVX + OTMI
OTMI + LASSBio-1366
OVX + OTMI + LASSBio-1366
Naïve
OVX

Click here to access/download;Table;DE LIMA et al. 2021 - Tables .docx

Table 1

Experimental groups of *in vivo* assays.

GROUP	PROCEDURES	EUTHANASIA
OTM	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	6 days
OTM	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	12 days
OVX + OTM	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	6 days
OVX + OTM	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / No treatment	12 days
OTM + LASSBio-1386	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	6 days
OTM + LASSBio-1386	No ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	12 days
OVX + OTM + LASSBio-1386	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	6 days
OVX + OTM + LASSBio-1386	Ovariectomy / Orthodontic tooth movement / LASSBio-1386	12 days
Naïve	No ovariectomy / No orthodontic tooth movement / No treatment	6 days
OVX	Ovariectomy / No orthodontic tooth movement / No treatment	6 days

Table 2

Cytotoxicity evaluation (CC_{50}) of LASSBio-1386 on mesenchymal stem cells.

COMPOUNDS	CC_{50} ± S.D. (μM)
LASSBio-1386	41.62 ± 1.13
Alendronate sodium	14.27 ± 2.96
Gentian Violet	2.66 ± 0.21

Declaration of interests

☒ The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

☐The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

Author Contributions Statement

Juliana de Lima: Conceptualization, Investigation, Biological assays, Data curation, Writing – original draft.

Tatiana Magalhães: Investigation, Biological assays.

Rodolfo Maia: Synthesis of compounds.

Eliezer Barreiro: Synthesis of compounds.

Patrícia Damasceno: Biological assays.

Manoela Pereira: Conceptualization.

Milena Soares: Conceptualization, Writing - Review & Editing.

Silvana Taddei: Conceptualization, Methodology, Writing - Review & Editing.

Elisalva Guimarães: Conceptualization, Methodology, Supervision, Data curation, Writing - Review & Editing.