



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOFUNCIONAIS**

**VALDO NOGUEIRA JÚNIOR**

**EFEITOS OSTEOGÊNICOS IN VITRO E IN SILICO DE DOIS TRITERPENOS  
SEMI-SINTÉTICOS DERIVADOS DE COMBRETUM LEPROSUM: POSSÍVEIS  
MECANISMOS DE AÇÃO**

**FORTALEZA**

**2022**

VALDO NOGUEIRA JÚNIOR

EFEITOS OSTEOGÊNICOS IN VITRO E IN SILICO DE DOIS TRITERPENOS SEMI-  
SINTÉTICOS DERIVADOS DE COMBRETUM LEPROSUM: POSSÍVEIS  
MECANISMOS DE AÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais  
Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal do Ceará, como requisito parcial à  
obtenção do título de mestre em Ciências  
Morfofuncionais. Área de concentração:  
Morfologia

Orientador: Profa. Dra. Renata Ferreira de  
Carvalho Leitão

FORTALEZA

2022

VALDO NOGUEIRA JÚNIOR

EFEITOS OSTEOGÊNICOS IN VITRO E IN SILICO DE DOIS TRITERPENOS SEMI-SINTÉTICOS DERIVADOS DE COMBRETUM LEPROSUM: POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de concentração: Morfologia

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Renata de Carvalho Leitão (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Fátima Regina Nunes de Sousa  
Universidade Federal Do Piauí (UFPI)

---

Prof. Dr. Mirna Marques Bezerra Brayner  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, todo poderoso, pela a graça de viver com saúde

Aos Meus Pais e família, por ser a base em todos os momentos

A minha irmã Geruza Maria e sua família, pela recepção com amor nas minhas visitas

A minha orientadora Dra. Renata Leitão, pela oportunidade e direcionamento

Ao Professor, amigo e mentor, Dr. Silvio Roberto, pelo exemplo de caráter, hombridade e cidadão

Às co-orientadoras Dra. Conceição Martins (Josy) e Dra Mirna Marques, pela atenção, prontidão e direção

A Dra Fátima Regina, pela prontidão em participar da banca examinadora

A minha namorada Eduarda, carinho, apoio e amizade

A minha amiga e parceira de pesquisa Luana, Por me ajudar nos diversos experimentos com muito carinho e paciência

A todos os Professores Nempi por todos os ensinamentos

Aos amigos do Nempi, por toda ajuda e amizade

Aos vigilantes do departamento, por sempre receber-me com cordiais boas-vindas

A todos os alunos e ICs, por disposição e ajuda

Aos amigos, por dividirem o ontem o hoje e o amanhã

“Como a cidade derribada, que não tem muros,  
assim é o homem que não pode conter o seu  
espírito.”

(Provérbios 25:28)

## RESUMO

O tecido ósseo é uma forma especializada de conjuntivo extremamente organizado e um dos mais adaptáveis do corpo humano. Entre suas células, os osteoblastos atuam na reposição tecidual, fazendo parte do processo denominado remodelação óssea. Com o avanço da idade, o equilíbrio entre reabsorção e neoformação é alterado, acarretando uma diminuição da resistência e densidade óssea. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo investigar os compostos CL-P2 e CL-P2a (derivados da planta *Combretum leprosum*) na proliferação, ativação e mecanismo de ação em osteoblastos murinos *in vitro*. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas através do ensaio MTT e imunomarcagem com Ki67, respectivamente, após 24, 48 e 72 horas de incubação dos osteoblastos com os compostos CL-P2 e CL-P2a. Para o MTT foram utilizadas diferentes concentrações das duas substâncias (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM), e a partir dos resultados obtidos, uma concentração de cada composto (CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM)) foram selecionadas para os ensaios posteriores: imunomarcagem com Ki67, quantificação dos níveis de fosfatase alcalina óssea (FAO) no meio de cultura após 24, 48 e 72 horas, 5, 7, 14 e 21, para confirmar a atividade óssea pelas células, realizamos o ensaio de mineralização pela coloração de Von Kossa, após 7, 14 e 21 dias de cultivo celular. Para a investigação dos mecanismos envolvidos na ativação celular, as expressões proteicas de BMP-2, OPG e RANK-L foram investigadas por Imunomarcagem e Western Blot (WB) e comparadas com as interações fornecidas no estudo de docking molecular. Um aumento significativo na viabilidade de osteoblastos foi observado após a incubação das células com os compostos CL-P2 e CL-P2a, por 24, 48 e 72h, assim como um aumento importante na proliferação celular nas doses de CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) no período de 24h. No ensaio para a dosagem de FAO no meio de cultura, foi observado aumento significativo de FAO após a incubação CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) a partir de 48 horas, mantendo-se aumentada até 21 dias de ensaio. No ensaio de Von Kossa foi observado aumento e aceleração da mineralização nas concentrações de CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM), nos tempos de 14 e 21 dias. Nos ensaios de imunomarcagem e WB, houve um aumento da expressão de BMP2, RANK-L e OPG, caracterizando a ativação da via óssea, na investigação da via WNT, β-catenina, DKK, houve aumento da expressão proteica de WNT (CL-P2 2,5µM) e β-catenina (CL-P2 2,5µM/ CL-P2a 10µM), não altera a expressão de DKK. Os resultados sugerem um efeito positivo dos compostos CL-P2 e CL-P2a, nas melhores concentrações de 2,5µM e 10µM, respectivamente, na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos. Desse modo, estudos promissores podem ser realizados com os compostos CL-P2 e CL-P2a com o seu emprego nas vias de metabolismo ósseo.

**Palavras-chaves:** *Combretum leprosum*. Triptenos. Osteoblastos.

## ABSTRACT

Bone tissue is a specialized form of extremely organized connective tissue and one of the most adaptable in the human body. Among its cells, osteoblasts act in tissue replacement, being part of the process called bone remodeling. With advancing age, the balance between reabsorption and neoformation is altered, causing a decrease in bone strength and density. In this perspective, the present study aimed to investigate the compounds CL-P2 and CL-P2a (derived from the plant *Combretum leprosum*) in the proliferation, activation and mechanism of action in murine osteoblasts in vitro. Cell viability and proliferation were evaluated by MTT assay and immunostaining with Ki67, respectively, after 24, 48 and 72 hours of incubation of osteoblasts with compounds CL-P2 and CL-P2a. Different concentrations of both substances were used for MTT (2.5µM, 5µM, 10µM and 20µM), and from the results obtained, a concentration of each compound (CL-P2 (2.5µM) and CL-P2a (10µM)) were selected for further assays: immunostaining with Ki67, quantification of bone alkaline phosphatase (FAO) levels in the culture medium after 24, 48 and 72 hours, 5, 7, 14 and 21, to confirm the bone activity by the cells, we performed the mineralization assay by Von Kossa stain, after 7, 14 and 21 days of cell culture. To investigate the mechanisms involved in cell activation, the protein expressions of BMP-2, OPG and RANK-L were investigated by immunostaining and Western Blot (WB) and compared with the interactions provided in the molecular docking study. A significant increase in osteoblast viability was observed after incubation of cells with CL-P2 and CL-P2a compounds for 24, 48 and 72h, as well as an important increase in cell proliferation at CL-P2 doses (2.5 µM) and CL-P2a (10µM) in a 24h period. In the assay for FAO dosage in the culture medium, a significant increase in FAO was observed after CL-P2 (2.5µM) and CL-P2a (10µM) incubation after 48 hours, keeping it if increased up to 21 days of trial. In the Von Kossa assay, an increase and acceleration of mineralization were observed in the concentrations of CL-P2 (2.5µM) and CL-P2a (10µM), at 14 and 21 days. In immunostaining and WB assays, there was an increase in the expression of BMP2, RANK-L and OPG, characterizing the activation of the bone pathway, in the investigation of the WNT, β-catenin, DKK pathway, there was an increase in the protein expression of WNT (CL- P2 2.5M) and β-catenin (CL-P2 2.5µM/ CL-P2a 10µM), do not alter the expression of DKK. The results suggest a positive effect of the compounds CL-P2 and CL-P2a, in the best contractions of 2.5µM and 10µM, respectively, on the proliferation, viability and activation of osteoblasts. Thus, promising studies can be carried out with the compounds CL-P2 and CL-P2a with their use in bone metabolism pathways.

**Keywords:** *Combretum leprosum*. Triptenes. Osteoblasts.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução geral.....</b>	<b>09</b>
	1.1. Metabolismo ósseo.....	09
	1.2. Mediadores que regulam o tecido ósseo.....	10
	1.3. Reabsorção óssea - saúde e doença.....	13
	1.5. Produtos Naturais.....	14
<b>2</b>	<b>Proposições.....</b>	<b>17</b>
	2.1. Objetivo Geral.....	17
	2.2. Objetivos específicos.....	17
<b>4</b>	<b>Capítulos.....</b>	<b>18</b>
	1.3. Capítulo 1 - Efeitos osteogênicos <i>in vitro</i> e <i>in silico</i> de dois triterpenos semi-sintéticos derivados de <i>Combretum leprosum</i> : possíveis mecanismos de ação	
<b>5</b>	<b>Conclusões.....</b>	<b>49</b>
	<b>Referências.....</b>	<b>50</b>



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1 Metabolismo ósseo

O tecido ósseo é uma forma especializada de conjuntivo extremamente organizado e um dos mais adaptáveis do corpo humano, exerce funções importantes no corpo, tais como locomoção, suporte e proteção de tecidos moles. Atua como reserva de cálcio e fósforo, compartimentalizando a medula óssea. Encontra-se em constante transformação sendo continuamente reabsorvido e neoformado, mediado por sua estrutura complexa, formada por células, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos e uma matriz extracelular (CLARKE, 2008; DOWNEY & SIEGEL, 2006).

O alto grau de remodelação é uma das principais características do tecido ósseo. Esse processo ocorre a partir das interações entre as células que compõem o tecido, e resulta no equilíbrio fisiológico entre reabsorção e formação óssea. Esse processo de remodelação permite a reparação de fraturas ou de defeitos ósseos resultando em um novo tecido formado e é necessária para a homeostase do cálcio (DALLAS et al., 2013). A remodelação ocorre de forma coordenada entre osteoclastos, osteoblastos, osteócitos e células osteoprogenitoras (ANDERSEN et al., 2009; FLORENCIO-SILVA et al., 2015)

As células responsáveis pelo processo de formação óssea são os osteoblastos. Essas células estão localizadas ao longo da superfície óssea compreendendo de 4 a 6% do total de células residentes do tecido ósseo e mostram características morfológicas de células sintetizadoras de proteínas, incluindo abundante retículo endoplasmático rugoso e proeminente complexo de Golgi, bem como diversas vesículas secretoras (KARNER; LONG, 2017). Os Osteoblastos são derivados das células tronco mesenquimais (CTM). A diferenciação de CTM na linhagem de células osteoprogenitoras, evento fundamental no processo de formação óssea, requer a expressão de genes específicos, incluindo a síntese de proteína morfogenéticas ósseas (BMPs) e membros da via Wingless (Wnt) (MANOLAGAS *et al.*, 2014; FLORENCIO-SILVA et al., 2015).

Os osteócitos, os quais consistem de 90-95% do total de células ósseas, são os tipos celulares mais abundantes do tecido ósseo e apresentam vida útil de até 25 anos. Eles são derivados de osteoblastos, que ao longo do desenvolvimento do tecido ósseo, é circundada por matriz mineralizada, localizando-se dentro de uma lacuna. Sua principal função é mecanossensitiva, que é alcançada devido sua morfologia dendrítica e localização estratégica dentro da matriz óssea (BONEWALD, 2011).

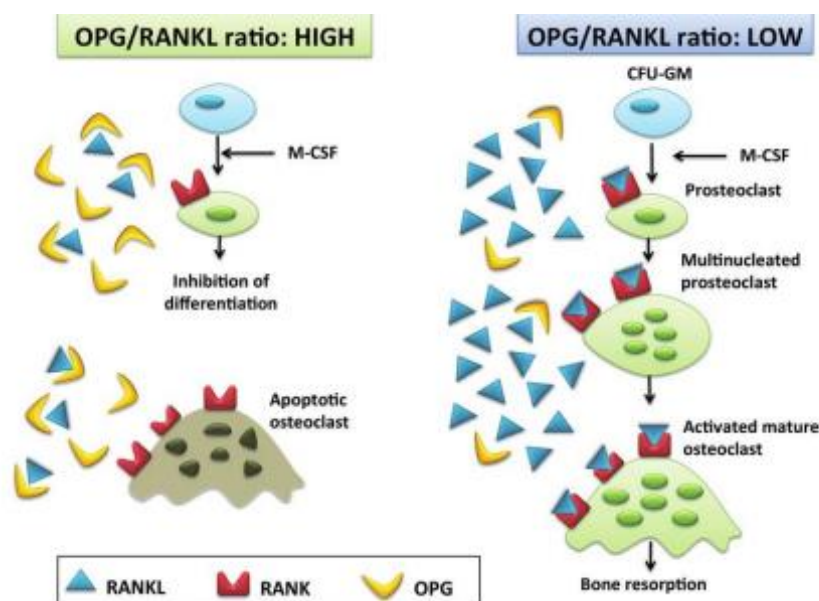
Os osteoclastos, cuja função é de reabsorção óssea, são terminalmente diferenciados em células multinucleadas, as quais se originam de células mononucleares da linhagem hematopoiética sob a influência de fator estimulador de colônia de macrófagos, secretado por células mesenquimais osteoprogenitoras e osteoblastos, bem como de RANKL, secretado por osteoblastos, osteócitos e células estromais (CROCKETT et al., 2011).

A MEC do tecido ósseo, é uma matriz rígida pois é calcificada, entretanto apresenta certa elasticidade. Ela é composta por uma fase orgânica constituída especialmente por colágeno do tipo I, além de proteínas não colagenosas tais como: proteoglicana, glicoproteína, osteonectina, fibronectina, osteopontina, sialoproteína óssea, osteocalcina, dentro outras. A fase inorgânica, é composta principalmente por fosfato e cálcio que se organizam em cristais de hidroxiapatita, proporcionando resistência e rigidez ao tecido . Quando ainda está na fase não calcificada a MEC recebe o nome de osteoide (ORYAN et al., 2015).

Os osteoblastos e os osteoclastos são células diferenciadas com vida curta. Portanto, ambos precisam ser continuamente renovados por células da linhagem mesenquimal e hematopoiética, respectivamente (LONG, 2012; CASTROGIOVANNI *et al.* 2016). O recrutamento de células diferenciadas de qualquer linhagem é regulada para cima ou para baixo, a fim de atender a demanda. Isto ocorre através de mediadores que regulam o aumento ou diminuição da replicação de precursores da linhagem das respectivas células-tronco. (PARK *et al.*, 2012)

## **1.2 Mediadores que regulam do tecido ósseo**

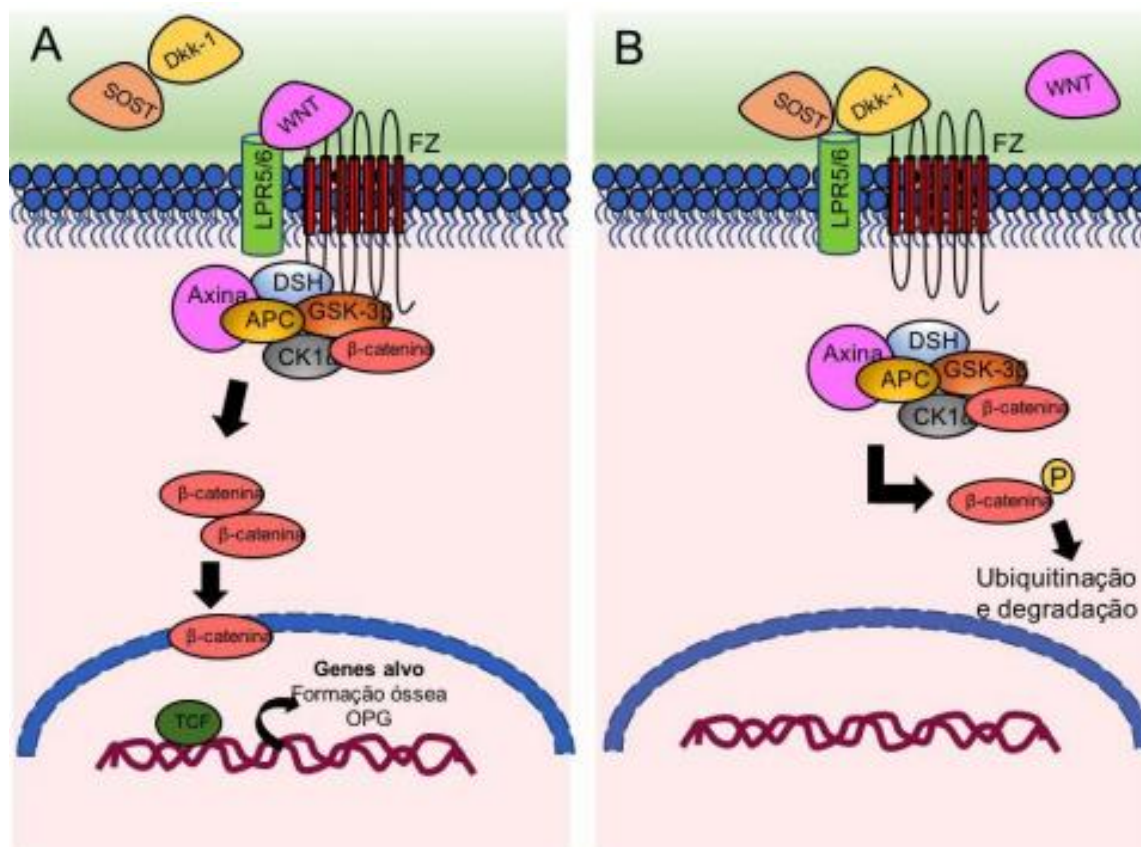
A saúde óssea depende do equilíbrio correto entre neoformação óssea por osteoblastos (com vias de regulação como Wnt/ $\beta$ -catenina) e reabsorção por osteoclastos (com o RANK/RANKL/OPG como principal eixo regulador. Os osteoblastos produzem RANKL, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e OPG, que são os reguladores mais importantes da remodelação. M-CSF e RANKL induzem a proliferação e diferenciação de osteoclastos maduros. O OPG inibe a diferenciação de osteoclastos por sua ligação ao RANKL e, assim, bloqueia a ligação entre o RANKL e o receptor RANK presente no precursor de osteoclastos (LERNER, 2006) Figura 1.



**Figura 1. Papel do sistema RANKL/RANK/OPG na remodelação óssea**

As Wnt compreendem uma grande família de glicoproteínas secretadas, que controlam a proliferação, diferenciação, apoptose, sobrevivência, migração e polaridade celular, em uma infinidade de células. A via de sinalização Wnt tem sido dividida em 3 braços principais: as vias não canônicas, via Wnt-cálcio, e a via Wnt/ $\beta$ -catenina também chamada de via canônica, sendo que esta última tem se destacado por seus efeitos em células ósseas.

A via canônica se inicia quando as proteínas WNT entregam seu sinal ligando-se ao receptor transmembrana Frizzled (FZD) e receptor de lipoproteínas de baixa densidade - relacionado a proteína 5/6 (LRP5/6) (GRUBER et al., 2016). Diferentes Wnt reconhecem diferentes conjuntos de receptores e, assim, ativam seletivamente vias intracelulares. Esta interação resulta na inativação do complexo de destruição de  $\beta$ -catenina. Consequentemente,  $\beta$ -catenina se acumula no citoplasma, e então é translocada para o núcleo onde associa-se com fatores de transcrição para ativar genes alvo para estimular a formação óssea. A via Wnt pode ser modulada por antagonistas extracelulares tais como Dickkopfs 1 (Dkk-1) ou Esclerostina (SOST), que se ligam ao LRP bloqueando seu sítio de interação (Figura 2).



**Figura 2. Via de sinalização Wnt/beta-catenina.** (A) Wnt se liga ao receptor FZD e coreceptores LRP5/6. DSH recruta o complexo de destruição de beta-catenina para a membrana celular permitindo que beta-catenina se acumule no citoplasma e transloque para o núcleo. No núcleo, beta-catenina interage com TCF e ativa a transcrição gênica. (B) Quando Dkk-1 e SOST interagem com os receptores de Wnt, beta-catenina é sequestrada pelo complexo de destruição composto por Axina, CK1alfa, APC e GSK3beta, fosforilada e ubiquitinada e consequentemente degradada por proteassomo. (Fonte: DUTRA, 2021)

No tecido ósseo, a via Wnt regula a osteogênese e parece estar envolvida no processo de reparo ósseo (KRISHNAN et al., 2006). A via canônica Wnt afeta toda a linhagem osteoblástica, estimulando o comprometimento e diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos. A ativação da via Wnt em osteoblastos promove expressão de OPG causando menor diferenciação de osteoclastos e consequentemente redução da reabsorção óssea (BARON & KNEISSEL, 2013). Durante o reparo ósseo, a via Wnt melhora a massa óssea, pois promove osteoblastogênese e contribui para função do osteoblasto sendo considerada, portanto, osteoindutora (KRISHNAN et al., 2006; MAJIDINIA et al., 2017).

Como dito anteriormente, a via Wnt pode ser regulada pela ação de alguns inibidores. Dkk-1 é o membro mais bem estudado da família de DKK que tem 4 formas diferentes (DIARRA et al., 2007). Ele está amplamente expresso em diversas células, incluindo osteoblastos e osteócitos (KE et al., 2012). Sabendo que Dkk-1 é inibidor chave da interação Wnt/LRP5, espera-se que a redução da expressão de Dkk-1 resulte no aumento da atividade de

Wnt e consequentemente aumente a massa óssea (MORVAN et al., 2006). A desregulação da expressão de Dkk-1 está relacionada a diversas desordens ósseas, incluindo artrite reumatoide, vários tipos de câncer, tais como câncer de mama, próstata e mieloma, bem como na osteoporose induzida por glicocorticoide ou pós-menopausa, e diabetes (HUANG et al., 2018). Assim, Dkk-1 se destaca não apenas como regulador negativo chave da diferenciação de osteoblastos, mas também porque está envolvido na patogênese de diversas doenças que afetam o tecido ósseo (COLDITZ et al., 2018).

### **1.3 Reabsorção óssea - saúde e doença**

Sob condições fisiológicas, a reabsorção e a formação óssea são equilibradas com a exata quantidade de osso adicionado no local de onde foi previamente reabsorvido. Com o avanço da idade, o equilíbrio entre reabsorção e neoformação é alterado e a massa óssea diminui. Além do osso perde progressivamente a resistência mecânica, há um problema maior, onde ocorre o declínio da massa óssea devido à deterioração de sua microarquitetura e a qualidade de sua matriz mineral (por mecanismos que não são bem compreendidos) e um aumento do número de osteócitos mortos ou disfuncionais, bem como aumento da porosidade cortical. A diminuição da resistência e densidade óssea levam a uma série de distúrbios, entre eles a síndrome da fragilidade óssea conhecida como osteoporose. (ZEBABE *et al.*, 2010; BONEWALD, 2011)

Durante a infância e no início da vida, a quantidade de tecido ósseo recém-formado é superior ao reabsorvido, consequentemente a densidade óssea e sua resistência atinge um máximo em torno de 30 anos (Gerber et al., 2003). Depois, o corpo passa a degradar mais tecido ósseo do que neoformar. Se, depois dos 30 anos, a degradação do tecido ósseo ocorre muito rapidamente ou se a densidade da massa óssea for baixa, doenças ósseas como a osteoporose podem aparecer (Rizzoli, 2014; PARK *et al.*, 2012).

A osteoporose é uma doença silenciosa caracterizada por baixa densidade mineral óssea e deterioração estrutural do tecido ósseo, o que leva à fragilidade óssea e maior suscetibilidade a fraturas. A doença é amplamente reconhecido como um importante problema de saúde pública, particularmente entre mulheres na pós-menopausa. A osteoporose é um dos mais comuns distúrbios ósseos, caracterizado pelo enfraquecimento dos ossos, que pode causar fraturas ósseas mesmo após simples quedas ou lesões leves (Musumeci et al., 2011). Na

osteoporose, o tecido ósseo apresenta baixa massa óssea e sinais de deterioração, responsáveis pela fragilidade óssea típica nesta patologia (Lips e van Schoor, 2005; Pichler et al., 2013).

Apesar da notável capacidade regenerativa inata do tecido ósseo, seu reparo após trauma ou doenças ainda é um desafio na clínica médica, representando um grande ônus aos serviços de saúde e que vem aumentando substancialmente com o envelhecimento da população. O tratamento farmacológico convencional nessas condições compreende terapia hormonal com estrogênio (TELLA AND GALLAGHER, 2014), bifosfonatos (REYES et al. 2016) e anti-inflamatórios não-esteróides (RICHARDS et al. 2017). No entanto, essas estratégias têm grandes limitações, como falta de especificidade do local e toxicidade associada a medicamentos, gerando uma demanda por compostos que apresentem uma melhor relação risco-benefício.

#### 1.4 Produtos naturais

Os produtos naturais isolados das plantas são considerados boas alternativas aos produtos químicos sintéticos, podendo representar interessantes ferramentas farmacológicas na bioprospecção de novos fármacos para o controle de doenças ósseas. Estudos de etnobotânica/etnofarmacologia têm demonstrado espécimes de uso popular para o tratamento de diversas doenças. Essas pesquisas fornecem dados importantes a respeito das atividades farmacológicas, toxicológicas e efeitos adversos existentes nas espécies medicinais avaliadas, além de contribuírem para o resgate de informações de espécies vegetais utilizadas popularmente, para que possam ser usadas com segurança (KAYSER, 2018). Dentre a grande variedade de plantas medicinais, encontra-se a família Combretaceae, que consiste de 18 gêneros, dos quais o maior é o *Combretum* possuindo aproximadamente 370 espécies (PIETROVSKI et al., 2006).

*Combretum leprosum* é uma espécie encontrada nos estados do norte, nordeste brasileiros e também no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (MARINHO et al., 2002; CHAVES et al., 2007). As espécies desse gênero apresentam inúmeros metabólitos secundários como taninos, saponinas, flavonóides, cumarinas, alcalóides, di e triterpenos, dentre outros (LIMA et al., 2012; FARIAS et al., 2015). Conhecida popularmente pelo nome de mofumbo, a espécie é utilizada como planta medicinal com função cicatrizante, na prevenção de irritações cutâneas e na limpeza de feridas, na contenção de hemorragias, como sedativo (PIETROVSKI et al., 2006), antitussígeno e expectorante (AGRA et al., 2007). Estudos pré-clínicos a partir do



extrato ou compostos isolados já demonstram efeitos diversos desta espécie, que está demonstrada na Figura 3.



**Figura 3. *Combretum leprosum* (Mofumbo) em local de coleta** *C. leprosum* é uma espécie arbustiva ou arvoreta, com 2 - 3 m de altura. Suas inflorescências são grandes, compostas por muitas flores amareladas, pequenas e muito perfumadas. Na base da flor forma um pequeno tubo onde é produzido e armazenado o néctar, é o principal recurso coletado pelas abelhas nativas. Além disso, suas flores são muito atrativas para outros insetos como borboletas, mariposas e vespas.

Dentre os compostos encontrados em *C. leprosum*, o triterpeno 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -tri-hidroxilup20(29)-eno (CL-1) foi descrito por Facundo e colaboradores (1993). A partir deste composto, diferentes moléculas puderam ser sintetizadas. A partir do CL-1, foi realizado o isolamento deste metabólito e obtenção de seis derivados semissintéticos (hidrogenado - CL-P5, desidratado - CL-P1, diacilado - CL-P2A, triacilado - CL-P2, oxidado - CL-P3, hidrazona - CL-P6 e oxima - CL-P9) (SILVA FILHO, 2020).

Recentemente pesquisadores realizaram estudos com os compostos semi-sintéticos CL-P2 e CL-P2a derivados do triterpeno CL-1, obtido das flores do *Combretum leprosum* mart.

Para ambos os compostos foi demonstrado a ausência de toxicidade em fibroblastos murinos (L929) e em queratinócitos humanos (HaCaT), atividade antinociceptiva em camundongos e a capacidade de exercer ações proliferativas e ativadoras do metabolismo celular (ASSIS, 2015; PASSOS, 2020).

Portanto, considerando o potencial inovador da presente proposta para geração de tecnologias estratégicas, com a obtenção de dois triterpenos a partir de uma planta já usada pela comunidade, somado à demanda da indústria farmacêutica por novos fármacos que possam contribuir para o reparo ósseo com melhor relação risco-benefício, este estudo investigou a ação de dois triterpenos semi-sintéticos (CLP-2 e CLP-2a) na ativação de osteoblastos murinos.



## 2. OBJETIVOS:

### 2.1 Objetivo geral:

Avaliar *in silico* e *in vitro* os efeitos osteogênicos dos triterpenos semi-sintéticos (CLP-2 e CLP-2a) em osteoblastos murino (OFCOOL-II).

### 2.2 Objetivo específico:

- Investigar a viabilidade e proliferação de osteoblastos murinos incubados com os compostos CLP-2 e CLP-2a através do ensaio de MTT e imunomarcagem para Ki-67;
- Avaliar o efeito dos compostos CLP-2 e CLP-2a na ativação de osteoblastos a partir dos níveis de fosfatase alcalina óssea secretados por osteoblastos por Elisa;
- Avaliar o efeito de CLP-2 e CLP-2a na deposição de sais cálcio por ensaio de mineralização Von Kossa;
- Investigar a ação do CLP-2 e CLP-2a no metabolismo de osteoblastos murinos através da expressão proteica de BMP-2, RANK-L e OPG;
- Investigar a participação de CLP-2 e CLP-2<sup>a</sup> na expressão de proteínas da via WNT,  $\beta$ -CATENINA e DKK1 em cultura de osteoblastos;
- Avaliar a interação dos compostos CLP-2 e CLP-2a sob a via do metabolismo ósseo e a via de proliferação através do docking molecular.

### 3. CAPÍTULO

Esta dissertação de Mestrado baseia-se no Artigo 37º do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado. Este capítulo consta de uma cópia do artigo científico de autoria do candidato, redigido de acordo com as normas da revista científica escolhida para publicação (“BONE”) Impact Factor (Anexo B).

Qualis capes: A2

Fator de Impacto: 4,5

## **AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DOS COMPOSTOS CL-P2 E CL-P2A NA PROLIFERAÇÃO E ATIVAÇÃO DE OSTEÓBLASTOS MURINOS**

Valdo Nogueira Júnior\*; Renata de Carvalho Leitão\*\*

### **RESUMO**

O tecido ósseo é uma forma especializada de conjuntivo extremamente organizado e um dos mais adaptáveis do corpo humano. Entre suas células, os osteoblastos atuam na reposição tecidual, fazendo parte do processo denominado remodelação óssea. Com o avanço da idade, o equilíbrio entre reabsorção e neoformação é alterado, acarretando uma diminuição da resistência e densidade óssea. Nessa perspectiva, o presente estudo teve como objetivo investigar os compostos CL-P2 e CL-P2a (derivados da planta *Combretum leprosum*) na proliferação, ativação e mecanismo de ação em osteoblastos murinos *in vitro*. A viabilidade e proliferação celular foram avaliadas através do ensaio MTT e imunomarcagem com Ki67, respectivamente, após 24, 48 e 72 horas de incubação dos osteoblastos com os compostos CL-P2 e CL-P2a. Para o MTT foram utilizadas diferentes concentrações das duas substâncias (2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM), e a partir dos resultados obtidos, uma concentração de cada composto (CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM)) foram selecionadas para os ensaios posteriores: imunomarcagem com Ki67, quantificação dos níveis de fosfatase alcalina óssea (FAO) no meio de cultura após 24, 48 e 72 horas, 5, 7, 14 e 21, para confirmar a atividade óssea pelas células, realizamos o ensaio de mineralização pela coloração de Von Kossa, após 7, 14 e 21 dias de cultivo celular. Para a investigação dos mecanismos envolvidos na ativação celular, as expressões proteicas de BMP-2, OPG e RANK-L foram investigadas por Imunomarcagem e Western Blot (WB) e comparadas com as interações fornecidas no estudo de docking molecular. Um aumento significativo na viabilidade de osteoblastos foi observado após a incubação das células com os compostos CL-P2 e CL-P2a, por 24, 48 e 72h, assim como um aumento importante na proliferação celular nas doses de CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) no período de 24h. No ensaio para a dosagem de FAO no meio de cultura, foi observado aumento significativo de FAO após a incubação CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) a partir de 48 horas, mantendo-se aumentada até 21 dias de ensaio. No ensaio de Von Kossa foi observado aumento e aceleração da mineralização nas concentrações de CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM), nos tempos de 14 e 21 dias. Nos ensaios de imunomarcagem e WB, houve um aumento da expressão de BMP2, RANK-L e OPG, caracterizando a ativação da via óssea, na investigação da via WNT, β-catenina, DKK, houve aumento da expressão proteica de WNT (CL-P2 2,5µM) e β-catenina (CL-P2 2,5µM/ CL-P2a 10µM), não altera a expressão de DKK. Os resultados sugerem um efeito positivo dos compostos CL-P2 e CL-P2a, nas melhores concentrações de 2,5µM e 10µM, respectivamente, na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos. Desse modo, estudos promissores podem ser realizados com os compostos CL-P2 e CL-P2a com o seu emprego nas vias de metabolismo ósseo.

**Keywords:** *Combretum leprosum*. Tripterenes. Osteoblasts.

## 1. INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é uma forma especializada de conjuntivo extremamente organizado e um dos mais adaptáveis do corpo humano, exerce funções importantes no corpo, tais como locomoção, suporte e proteção de tecidos moles. Encontra-se em constante transformação sendo continuamente reabsorvido e neoformado, mediado por sua estrutura complexa, formada por células, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos e uma matriz extracelular (Clarke, 2008; Downey & Siegel, 2006).

O tecido ósseo é regulado por múltiplos fatores de crescimento, a saúde óssea depende do equilíbrio correto dos fatores que controlam a neoformação óssea por osteoblastos (com vias de regulação como Wnt/ $\beta$ -catenina) e reabsorção por osteoclastos (com o RANK/RANKL/OPG como principal eixo regulador). Os osteoblastos produzem RANKL, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e OPG, que são os reguladores mais importantes da remodelação. M-CSF e RANKL induzem a proliferação e diferenciação de osteoclastos maduros. OPG inibe a diferenciação de osteoclastos por sua ligação ao RANKL e, assim, bloqueia a ligação entre o RANKL e o receptor RANK presente no precursor de osteoclastos (Lerner, 2006).

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina tem papel central no desenvolvimento e homeostasia, bem como no reparo e regeneração óssea após injúria. Ligantes da via estimulam crescimento ósseo, sugerindo sua participação na regulação da cicatrização óssea, e destacando o seu potencial como alvo terapêutico nos casos de reparo de fraturas. (Xu et al., 2014) Além de seus efeitos nos osteoblastos, a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina diminui a diferenciação dos osteoclastos, estimulando a produção e secreção de osteoprotegerina (OPG) um antagonista natural da RANK-L (GLASS *et al.* 2005). A RANK-L é indispensável para a diferenciação, maturação e função dos osteoclastos; portanto, fundamental para a reabsorção óssea. (Xiong *et al.* 2011).

Os produtos naturais isolados das plantas são considerados boas alternativas aos produtos químicos sintéticos, podendo representar interessantes ferramentas farmacológicas na bioprospecção de novos fármacos para o controle de doenças ósseas. Recentemente nosso grupo de pesquisa obteve dois triterpenos semi-sintéticos (CL-P2 e CL-P2a) derivados do triterpeno 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -triidroxilup-20(29)-eno (CL-1) obtido das flores do *Combretum leprosum*.

Estudos *in silico* e *in vivo* têm sido extensamente utilizados e têm contribuído grandemente para o desenvolvimento e estabelecimento de uma ampla variedade

de abordagens que contribuam para a regeneração do tecido ósseo (Bezerra, 2017; Veras, 2021). Em suma, neste artigo investigamos os efeitos osteogênicos dos triterpenos semi-sintéticos (CLP-2 e CLP-2a) em osteoblastos murino (OFCOOL-II) e seus possíveis mecanismos de ação.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Obtenção dos compostos isolados de *Combretum leprosum* Mart.

Foram utilizados dois triterpenos semi-sintéticos (CL-P2 e CL-P2a) obtidos a partir do triterpeno 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -triidroxilup-20(29)-eno (CL1) isolado das flores do *Combretum leprosum* Mart. Esses derivados serão sintetizados pelo grupo dos Professores Francisco Geraldo Barbosa e Jair Mafezoli do Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Ceará – *Campus* do Pici.

### 2.2 Ensaio *in vitro*

#### 2.2.1 Cultura de osteoblastos OFCOL II

Foram utilizados osteoblastos murinos (OFCOL II) adquiridos no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ), mantidos em meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) contendo 10 % de soro fetal bovino na presença de antibióticos (100 U/ml de penicilina e 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina) a 37°C em estufa umidificada, incubada em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Neste estudo, as células foram utilizadas entre as passagens 16-30 e mantendo células estocadas em nitrogênio líquido. A partir do estoque, foi preparada uma garrafa de cultura de 25cm<sup>3</sup>, contendo 1ml de células, adicionando-se 4 ml de meio de cultura, DMEM, enriquecido com 10% SFB. As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37°C e pressão de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação em microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100).

Estas células foram subcultivadas após tripsinização quando formada uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2ml de tripsina a 0,05%, as células foram retiradas, adicionando-se 6 ml de meio de cultura DMEM suplementado com 10 % de SFB. Para liberação das células da parede da garrafa, utilizou-se jato forte com o auxílio de pipetador automático. Em seguida as células foram transferidas para um falcon de 15ml, centrifugadas (SOLAB SL-701) a 2000rpm, 4°C por 5 minutos. Após este período, o sobrenadante é removido e as células ressuspensas com adição de um 4ml de meio completo. Deste volume serão retiradas alíquotas de, no mínimo, 1 ml e passadas para novas garrafas. As trocas de meio foram realizadas a cada 48hrs

### 2.2.2 Teste de viabilidade celular pelo método direto MTT

O teste de citotoxicidade tem como objetivo avaliar os efeitos letais ou subletais de uma substância ou produto a nível celular. Para esse trabalho, foi utilizado o teste de citotoxicidade pelo método direto com MTT.

Esse teste avalia de forma quantitativa a função mitocondrial através da redução do tetrazolium MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide; Sigma) em cristais de formazana (MOSMANN,1983; LOBNER,2000). Essa reação de redução ocorre dentro da mitocôndria através da enzima succinatodesidrogenase, portanto, a quantidade de cristais de formazana está diretamente relacionada com o potencial de redução do tetrazolium MTT nas mitocôndrias.

Para a realização dos testes utilizou-se células OFCOLL II em placas de 96 poços em uma quantidade de 100µl de meio de cultura com 3.000 células por poço nos períodos de 24 e 48 horas. Todos os poços extremos das placas foram descartados de forma que foram utilizados apenas 60 poços e preenchidos com 150 µl de PBS (Sigma).

Depois de 24 horas do plaqueamento das células, todo o volume de meio de cultura foi removido dos poços e adicionou-se 100µl em cada poço das diluições das doses utilizadas nesse teste. As amostras foram divididas em grupo controle contendo apenas meio de cultura DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina e estreptomicina (meio completo) nas concentrações de 2,5µM, 5µM, 10µM e 20µM dos compostos CL-P2 e CL-P2a, de acordo com os respectivos grupos (DMEM, CL-P2 E CL-P2a).

Passado os períodos de interesse de incubação das drogas para análises das amostras, 24 e 48 horas, todo o conteúdo dos poços foi retirado e adicionou-se 100µl por poço de MTT diluído com o meio de cultura completo em uma concentração de 1mg/ml. O MTT foi incubado por 3 horas em uma temperatura de 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Passado esse período, todo o conteúdo foi removido novamente e foi adicionado 100 µl DMSO em cada poço sob agitação de 30 segundos para solubilizar os cristais de formazana.

As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Biotek) no comprimento de onda de 570nm. Os valores das absorbâncias de cada amostra foram submetidos a seguinte equação:

$$\% \text{abi} = \frac{\text{absorv. amostra}}{\text{média das absorv. dos controles}} \times 100$$

As concentrações que apresentaram melhores resultados em cada grupo, de CL-P2(2,5) e CL-PA2(10), foram utilizadas nos testes subsequentes.

### 2.2.3 Avaliação da proliferação celular por imunofluorescência Ki-67

Os osteoblastos foram cultivados na concentração de  $9 \times 10^3$  células por poço em placas de 24 poços com meio de cultura DMEM à temperatura de  $37^\circ\text{C}$  e na concentração de 5% de  $\text{CO}_2$ . Lamínulas de 13mm foram utilizadas como superfície para fixação de células, colocadas previamente na placa de cultura. O meio de cultura foi removido após 24h da semeadura e as células foram incubadas com ranelato de estrôncio de acordo com os grupos: Controle (DMEM + SBF 10%); 0,01mM e 0,1mM durante os períodos de 24h e 48h. Após este período de exposição, o meio foi removido e as células fixadas com 500 $\mu\text{L}$  de paraformaldeído (PFA) 4% por poço durante 30 minutos. Em seguida, foi utilizada 500 $\mu\text{L}$  solução de bloqueio por 1h, seguida da incubação com o anticorpo primário diluído mantido por um período de overnight em refrigeração. Terminado este período, foi adicionado 100 $\mu\text{L}$  do anticorpo secundário diluído em solução de lavagem por 1h. Para concluir o ensaio o núcleo das células foi corado com DAPI (1:2000) diluído em PBS 1x por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. Os preparados foram observados em um microscópio confocal (LM710-Confocal-Zeiss), usando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com a câmara integrada e processador de imagem, usando uma objetiva de 20x. Para quantificar o número de células positivas marcadas para KI67, utilizou-se o programa Image J para obter o número de células imunomarcadas por campo. Foram fotografados 6 campos por lâmina sendo um total de 4 lâminas por grupo no Photoshop.

### 2.2.4 Atividade de Fosfatase Alcalina no meio de cultura

A dosagem de fosfatase alcalina óssea foi realizada com intuito de avaliar a atividade dos osteoblastos. Para avaliação deste parâmetro, amostras de meio completo foram coletadas das placas de cultura de 96 poços após 24, 48, 72, 5 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias de



exposição aos compostos CL-P2(2,5 $\mu$ M) e CL-PA2(10 $\mu$ M). Após a coleta, as amostras foram utilizadas para a dosagem de Fosfatase Alcalina Total (FAT), utilizando um “Kit” específico, cuja metodologia segue orientação do laboratório fabricante (LABTEST®). Posteriormente, uma amostra do material foi aquecida para obtenção da atividade da fosfatase alcalina óssea (FAO). O método está fundamentado na labilidade da isoforma óssea da fosfatase alcalina frente ao calor. Aliquotas de 100  $\mu$ L da amostra foram incubadas em banho-maria a 56 oC por 10 minutos e imediatamente transferidas para um banho de gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea (termoestável) foi determinada diretamente no espectrofotômetro em temperatura de 30 oC com leitura das absorbâncias em 405 nm, tendo como substrato o p-nitrofenilfosfato. A fração óssea, por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (MOSS; WHITBY, 1975).

#### **2.2.5 Mineralização por Von Kossa**

Com o intuito de investigar dos compostos CL-P2(2,5 $\mu$ M) e CL-PA2(10 $\mu$ M) no processo de mineralização pelos osteoblastos, observou-se também a formação de nódulos mineralizados através do ensaio de Von Kossa. Nesse ensaio, as trocas do meio de cultura aconteciam a cada 48 horas com a adição de CL-P2(2,5 $\mu$ M) e CL-PA2(10 $\mu$ M), nos respectivos grupos. No grupo controle não foi adicionado nenhum composto. Os grupos analisados foram semeados em quadruplicata em placas de 12 poços, a uma concentração de 103 células/poço, mantidos em meio de cultura padrão. As análises de mineralização foram realizadas nos períodos de 7, 14 e 21 dias. Ao final de cada período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente e as células foram fixadas com etanol 100% (1mL/poço) por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram reidratadas em concentrações decrescentes de etanol (100% até 50%, por 5 minutos em cada solução), e lavadas em água destilada por duas vezes. Em seguida, 1mL de solução de 5% de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) foi colocado em cada poço e as células foram incubadas no escuro por 1 hora. Então, as células foram lavadas quatro vezes em água destilada e expostas à luz até que o mineral escurecesse.

#### **2.2.6 Morfologia celular por imunofluorescência**

Os osteoblastos foram cultivados a uma concentração de 5x10<sup>4</sup> células por poço em uma placa de cultura de células (35 mm x 10 mm) de 4 poços.

Após 24 horas, o meio foi removido e as células foram fixadas com 500µL de paraformaldeído (PFA) 4% por poço por 30 minutos. Em seguida, 500µL de solução de bloqueio foi usado por 1h, seguido pela incubação com os anticorpos primários diluídos para BMP-2 (1:100), RANK-L (1:100) e DKK (1:100) (SANTA CRUZ); e WNT(1:500),  $\beta$ -CATENINA (1:500) e OPG (1:200) (ABICAM), que foram mantidos por 4 horas. Após este período, foram adicionados 100µL do anticorpo secundário Alexa Fluor 594 anti-rabbit (Invitrogen) diluído em solução de lavagem por 30 minutos. Em seguida, o núcleo da célula foi corado com DAPI (1: 2000) diluído em 1x PBS por 5 minutos. Todas as etapas foram intercaladas com lavagens sucessivas. As preparações foram observadas em microscópio confocal (LM710- Confocal-Zeiss), utilizando filtros seletivos para cada fluoróforo, as imagens foram capturadas com câmera integrada e processador de imagens. Para quantificar o número de células positivas marcadas com BMP-2, OPG e RANK-L, WNT,  $\beta$ -CATENINA e DKK o programa Image J foi usado para obter o número de células imunomarcadas por campo. Dez campos por slide foram fotografados com um total de 4 slides por grupo. (VERÍSSIMO et al., 2012). Posteriormente, foi realizada análise quantitativa dessas imagens por meio de uma pontuação, com modificações (RYCKE et al., 2009). Para isso, as células foram categorizadas de acordo com a intensidade da coloração do núcleo (corado com DAPI) e do citoesqueleto (corado com os anticorpos: BMP-2, OPG, RANK-L, WNT,  $\beta$ -CATENINA e DKK). As células que apresentam marcação difusa, granulada e de baixa intensidade foram denominadas fracas (+) e conforme a marcação tornou-se mais evidente e mais intensa foram denominadas moderadas (++) e fortes (+++). As imagens foram analisadas por 3 avaliadores por meio de um estudo cego.

### **2.2.7 Expressão protéica de BMP-2, OPG, RANK-L, WNT, $\beta$ -CATENINA e DKK**

Para avaliar a expressão protéica de BMP-2, RANK-L, OPG, WNT, DKK e  $\beta$ -Catenina, realizou-se Western Blotting. Seguiram-se sequencialmente as seguintes etapas: extração de proteínas, dosagem de proteínas e Western Blotting.

#### **2.2.7.1 Extração de proteínas**

As células foram cultivadas na concentração de 1.000 células/poço em placas de 6 poços com meio de cultura completo à temperatura de 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48h de semeadura, o meio foi trocado e as células incubadas de acordo com os grupos: Controle (DMEM + SBF 10%) e CL-P2(2,5µM) e CL-PA2(10µM) nas respectivas concentrações. O período de incubação do fármaco foi de 48h. Ao final desse período, o meio de cultura foi removido, cada poço foi lavado com PBS em temperatura ambiente.

Colocou-se 100ml de tampão RIPA (25 mM Tris-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 5 mM EDTA; 1% NP-40; 1% Triton-X-100; 1% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS) e inibidor de protease (Sigma-Aldrich, EUA, 1µL de inibidor de protease: 100µL de RIPA) em cada poço da placa. Em seguida, com um raspador de células, as amostras foram removidas e colocadas em microtubos devidamente identificadas, vortexadas por 30 segundos, a cada 10 min por 30 min, e centrifugadas (17 min, 4°C, 13000 rpm). O pellet foi desprezado e o sobrenadante (porção que contém as proteínas) foi transferido para um novo microtubo.

#### 2.2.7.2 Dosagem de proteína

As proteínas foram dosadas pelo método do ácido bicinonínico e foi realizado conforme descrito pelo fabricante (ThermoScientific, Estados Unidos, EUA). De acordo com este método, as proteínas presentes nas amostras redzem o cobre da sua forma cúprica ( $\text{Cu}^{2+}$ ) para a cuprosa ( $\text{Cu}^{1+}$ ). Este se liga a duas moléculas de ácido bicinonínico, resultando na cor púrpura visualizada no final da reação. Inicialmente, a proteína foi diluída (1 µl de proteína: 20 µl de RIPA) e preparado 75µL de proteína diluída. Em seguida, misturou-se o reagente A (Contém ácido bicinonínico) e B (contém cobre) respectivamente na proporção de 50:1. Posteriormente, colocou-se em duplicata 25 µl de cada amostra diluída e 200 µl da mistura final do reagente A e B em placa de 96 poços. Posteriormente, a placa foi incubada por 30 min a 37°C em estufa. Enfim, efetuou-se a leitura da reação em leitor de Elisa a 562 nm. Para a curva, foram utilizadas concentrações conhecidas de Albumina sérica bovina (BSA): 2000, 1500, 1000, 750, 500, 250, 125, 25 e 0 µg/mL.

#### 2.2.7.3 Western Blotting

Inicialmente, preparou-se 20 µg de proteína referente a cada amostra, adicionando tampão da amostra (BioRad, EUA 65,8 mM Tris-HCl, pH 6,8; 26,3% glicerol; 2,1% SDS; 0,01% azul de bromofenol) e β-mecaptoetanol (BioRad, EUA), vortexando por 10 s, aquecendo no banho maria (95°C, 5 min) e centrifugando (10000 rpm, 4°C, 30s). Foi utilizado um número de seis amostras para o experimento. Em seguida, realizou-se a eletroforese vertical de proteínas em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) a 60 v nos primeiros 15 min para deposição das amostras no fundo do poço e 120 v para o restante da corrida, onde foi utilizado gel a 10% (S100β, NFκB p65, RAGE e β-actina) ou 8% (iNOS e β-actina) e tampão de corrida (25 mM Tris; 192 mM glicina; 1% SDS). Após a corrida, efetuou-se a transferência por eletroforese das proteínas do gel para a membrana de PVDF (BioRad, EUA, Fluoreto de polivinilideno) a 100 v por duas horas em tampão de transferência (25 mM Tris; 192 mM glicina; 20% metanol).

Após esta etapa, as membranas foram bloqueadas por uma hora em agitação constante, para reduzir as ligações inespecíficas, com 5% BSA (Sigma-Aldrich, EUA) diluído em tampão salina Tris-HCl suplementado com Tween 20 (TBST- 20 mM Tris pH 7,5; 150 mMNaCl; 0,1% Tween 20). Em seguida, realizou-se a lavagem das membranas com TBST, sendo três lavagens por 10 min cada. Na etapa seguinte, as membranas foram incubadas, overnight a 4°C sob agitação constante, com os anticorpos anti-BMP-2 (Santa Cruz Biotechnology, SC-6895, 1:200), anti- anti-RANK-L (Santa Cruz Biotechnology, SC- 7628, 1:200), anti-OPG (ABICAM1:500), WNT (ABICAN 1:500),  $\beta$ -Catenina (ABICAN 1:500), DKK (Santa Cruz Biotechnology, 1:200), ou anti- $\alpha$ -tubulina (Santa Cruz Biotechnology, SC-8035, 1:500) diluídos em 1% de BSA em TBST. Após esta etapa, realizaram-se três lavagens de 10 min cada com TBST. As membranas foram incubadas com os anticorpos secundários HRP-goatanti-rabbit (Invitrogen, 656120, 1:1000), ou HRP-goatanti-mouse (Invitrogen, 626520, 1:500) ou HRP-rabbitanti-goat (Invitrogen, A16142, 1:1000) por duas horas em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, as membranas foram lavadas três vezes, duração de 10 min cada, com TBST. Enfim, adicionou-se o reagente de quimioluminescência (BioRad, EUA, Clarity western ECL blotting substrate) e as membranas foram agitadas por 5 min. As imagens das bandas foram capturadas por um sistema de ChemiDoc XRS (BioRad, EUA).

A densidade das bandas foi mensurada por meio do software ImageJ NIH, Bethesda, MD, EUA).

## **2.2 Ensaio *in silico***

### **2.2.1 Docking molecular**

Nas preparações das estruturas, CLP2 e CLP2a foram modeladas tridimensionalmente no software Avogadro 1.1.2 (HANWELL et al., 2012) e otimizada geometricamente utilizando o método Teoria Funcional da Densidade (DFT) com funcional de correlação B3LYP e base 6-31G(d) presentes no software GAMESS (BARCA et al., 2020). As estruturas proteicas (alvos neste docking) BMP-2 (PDB: 3BMP), FoxO (PDB: 3COA), LRP6 (PDB: 3S8Z), SOST (PDB: 5DR5) e RANK-L (PDB: 3ME2) de organismo *homo sapiens* foram obtidas no Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). A posição do encaixe do acoplamento das proteínas foi baseada no ligante nativo da macromolécula e/ou com Web Server Computed Atlas of Surface Topography of proteins - CASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>) para estruturas sem ligantes nativos. Para

simulação de docking molecular foram utilizados o AutoDock tools (ADT) v4.2 para preparação do ligante e alvo (MORRIS et al., 2009) e AutoDock Vina 1.1.2 para execução dos cálculos (TROTT; OLSON, 2010). A afinidade de ligação e as interações entre resíduos foram usados para determinar melhores interações moleculares. O resultado foi visualizado usando ADT, Discovery Studio v4.5 (BIOVIA, 2020) e PLIP (SALENTIN et al., 2015).

### **2.2.2 Interactoma**

Para realização desta análise foi pesquisado algumas listas de genes e proteínas que estão envolvidos nas vias de formação óssea com o objetivo de encontrar os principais alvos super relacionados com estes processos, assim como ativadores e receptores dessas vias. Esses processos foram fornecidos pelo NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e usado o portal STRING 10.5 (<http://string-db.org/>) para a construção de um interactoma de tipo IPP (interação proteína-proteína) de todos os processos biológicos encontrados.

## **2.3 Análise estatística**

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

A análise estatística dos dados foi realizada por meio do software GraphPad Prism, versão 6.0. Para a realização da análise estatística entre os grupos foram utilizados os seguintes testes: o teste t de Student para comparar dois grupos e o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Bonferroni. O nível de significância adotado foi de 0,05 ( $\alpha = 5\%$ ) e níveis descritivos (p) inferiores a esse valor foram considerados significantes.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Investigação de viabilidade e proliferação

##### 3.1.1 Teste de viabilidade celular pelo método direto MTT

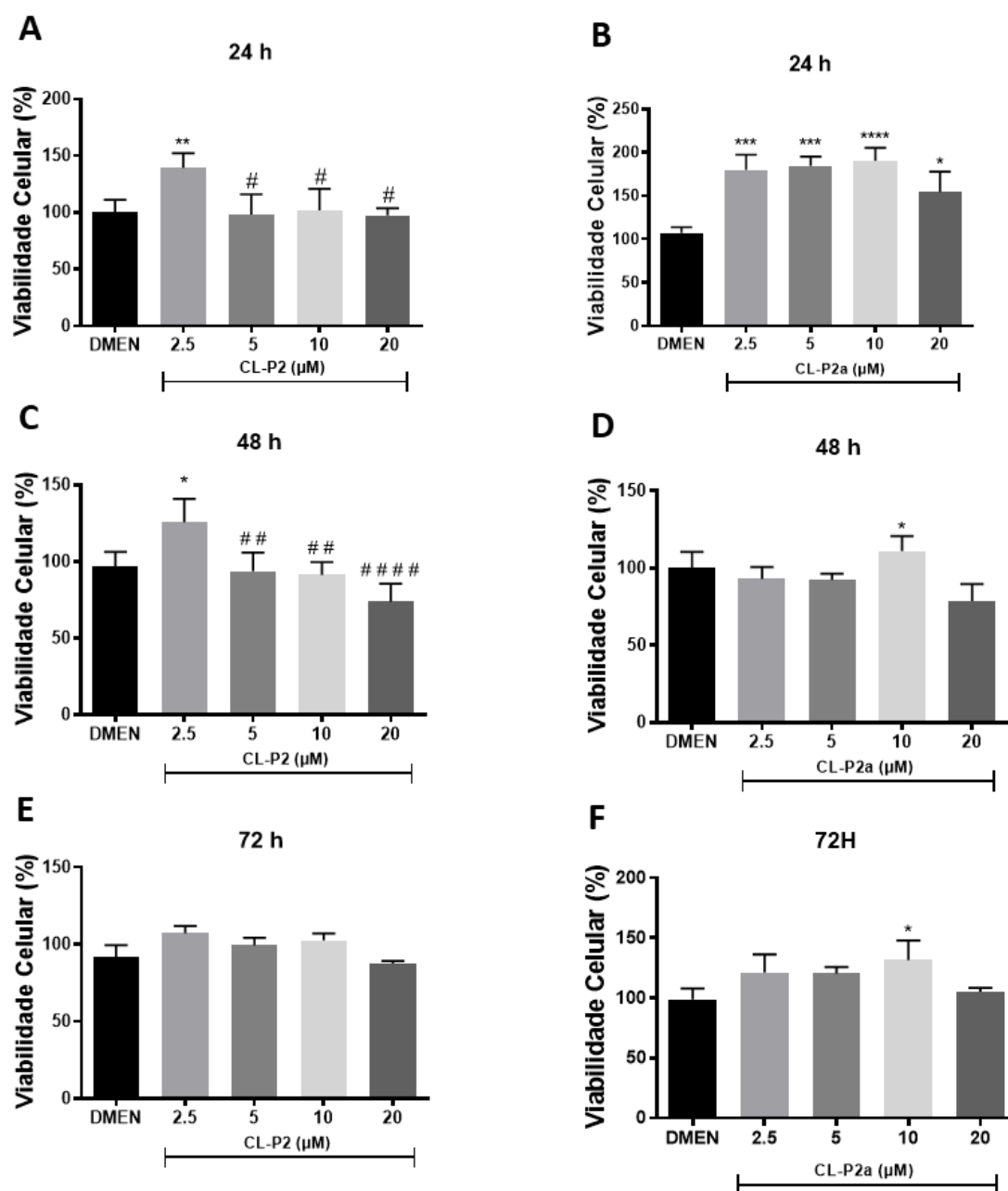
Para avaliarmos a viabilidade e proliferação celular utilizamos o método direto MTT, os dados estão expressos na figura 1. Após 24 horas de incubação com o composto CL-P2 (2,5 $\mu$ M) observou-se uma maior proliferação de osteoblastos (\*\* $p < 0,01$ ) quando comparado ao grupo controle (DMEM), sugerindo uma ausência de citotoxicidade da concentração estudada sobre as células; houve diferença estatística entre os grupos CL-P2 (5 $\mu$ M), CL-P2 (10 $\mu$ M) e CL-P2 (20 $\mu$ M), comparados ao grupo CL-P2 (2,5 $\mu$ M) (# $p < 0,05$ ).

Após 24 horas de incubação com os compostos CL-P2a, foi observado, em todas as concentrações, maior proliferação de osteoblastos (\* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ ) quando comparado ao grupo controle (DMEM).

Após 48 horas de incubação, as concentrações dos compostos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M), permaneceram aumentadas quando comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ); em relação ao composto CL-P2, houve diferença estatística entre as concentrações 5, 10 e 20 $\mu$ M, quando comparadas a concentração de 2,5 $\mu$ M (## $p < 0,01$ ; #### $p < 0,0001$ ).

No período de 72 horas de incubação, apenas o composto CL-P2a (10 $\mu$ M), apresentou maior proliferação celular comparado ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Nota-se que os dados de citotoxicidade e viabilidade celular através do método direto por MTT apontam bons resultados para os compostos CL-P2 e CL-P2a, com maiores níveis de proliferação nas concentrações CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M).

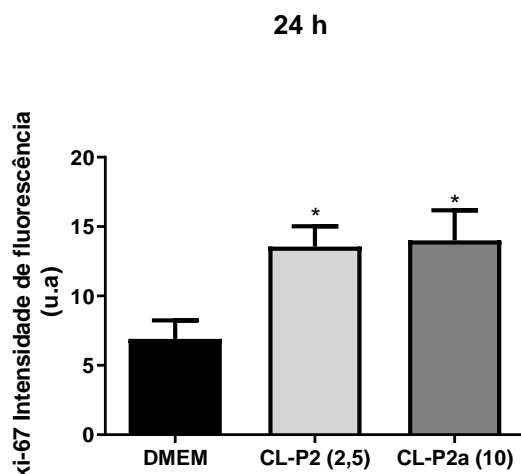


**FIGURA 1. Viabilidade e proliferação celular de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24h (A e B), 48h (C e D) e 72h (E e F), de cultivo celular.** A viabilidade celular foi investigada através do ensaio MTT nos respectivos tempos de incubação. Os compostos CL-P2 e CL-P2a foram incubados nas concentrações de 2,5; 5; 10 e 20 µM. O grupo DMEM corresponde ao controle (células com o meio de cultura DMEM). Nota-se menores taxas de citotoxicidade sobre as células nos composto CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM). Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,01$ ; comparados ao grupo controle, e # $p < 0,05$ ; ## $p < 0,01$ ; ### $p < 0,001$ ; #### $p < 0,01$ ; comparados ao grupo CL-P2 (2,5). ANOVA, Bonferroni.

### 3.1.2 Avaliação da proliferação por expressão de Ki-67

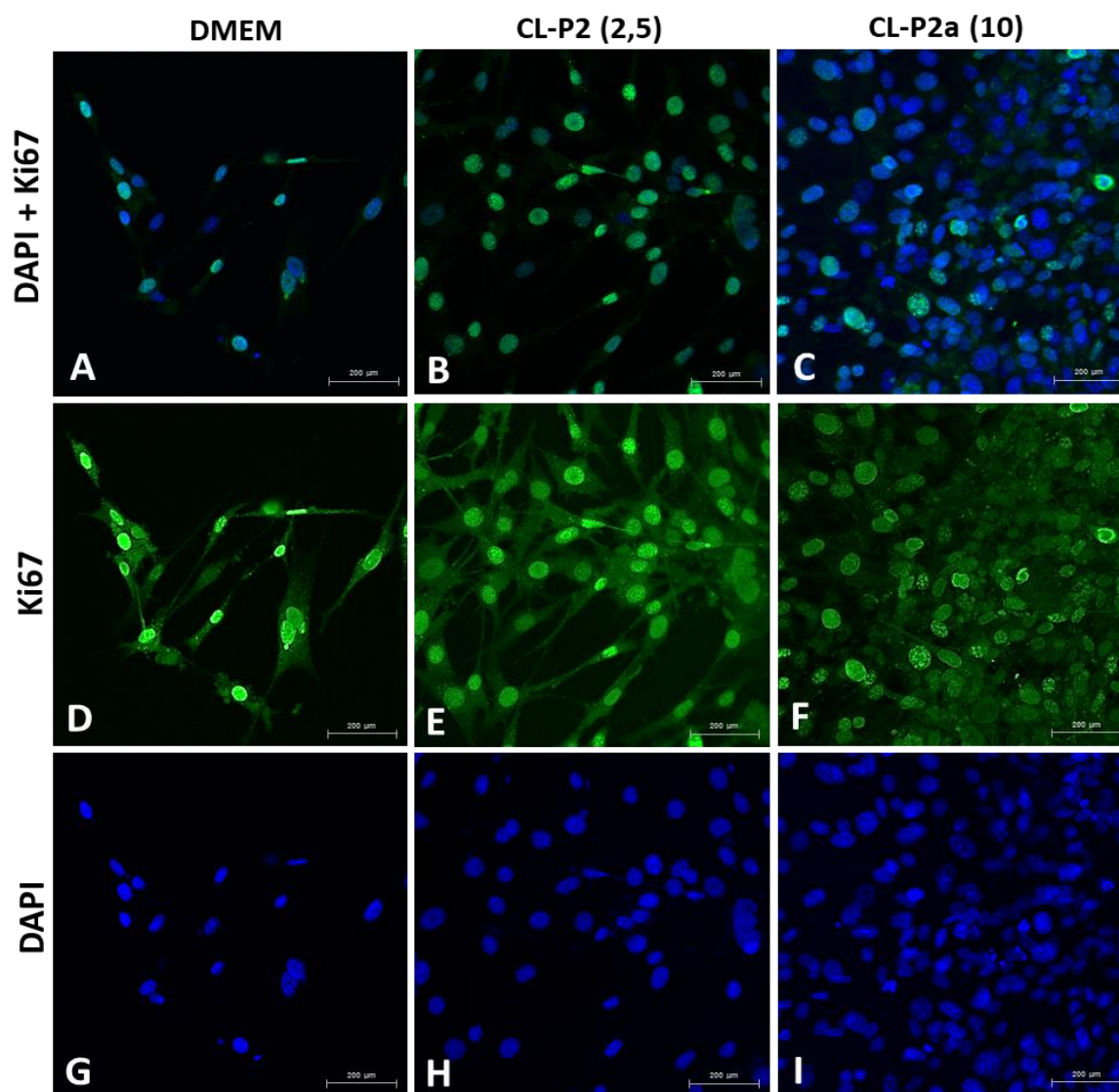
Foi utilizado o ensaio de proliferação celular através da marcação de Ki-67 para confirmar os resultados obtidos pelo MTT. Para este ensaio, os osteoblastos foram incubados

por 24 horas na presença dos compostos CL-P2; na concentração de 2,5 $\mu$ M; e CL-P2a; na concentração de 10 $\mu$ M. A quantificação das células imunomarcadas demonstraram o efeito proliferativo dos compostos, CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M), quando comparados ao grupo controle (DMEM) (\* $p$ <0,05). (Figura 5). As figuras 2 e 3 ilustram esses resultados, observando-se os núcleos celulares marcados em azul e a imunomarcação de ki-67 em verde.



**FIGURA 2. Efeito do CL-P2 E CL-P2a sobre a proliferação celular de osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24h de incubação.** O número de células com imunomarcação para ki-67 em osteoblastos incubados com DMEM, CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) adicionado ao meio de cultura, foram contados por campo e os dados expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05; comparado ao controle. ANOVA, Bonferroni.





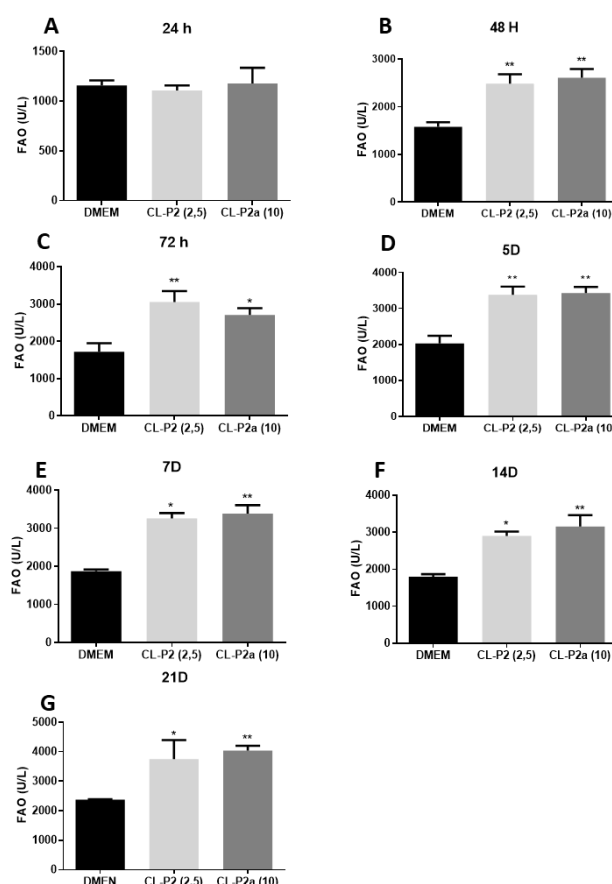
**FIGURA 3.** Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) na expressão de Ki67 em osteoblastos murinos (OFCOL II) após 24h de incubação. Os núcleos apresentam-se corados com DAPI (azul) e as células ki 67 positivas, coradas com alexia 488 (verde). Grupo DMEM (células com o meio de cultura); Grupo CL-P2 (2,5 $\mu$ M) (composto diluído em meio) e Grupo CL-P2a (10 $\mu$ M) (composto diluído em meio). As imagens foram obtidas no aumento de 200x.

### 3.2 Ativação da atividade celular

#### 3.2.1 Atividade de Fosfatase Alcalina no meio de cultura

A figura 7 ilustra a quantificação, por ELISA, da atividade de fosfatase alcalina óssea (FAO), no meio de cultura de osteoblastos incubados com os compostos CL-P2 e CL-P2a, nas concentrações de 2,5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente, por 24 horas, 48 horas, 72 horas, 5 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias. A atividade aumentada da FAO, em relação ao grupo controle DMEM, foi observada após 48 horas de cultivo celular. A partir de 48 horas observou-se um aumento significativo (\*\*P<0,01) da atividade de FAO nos grupos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-

P2a (10 $\mu$ M), perdurando até 21 dias de incubação quando comparado ao grupo controle (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,001). (Figura 4)



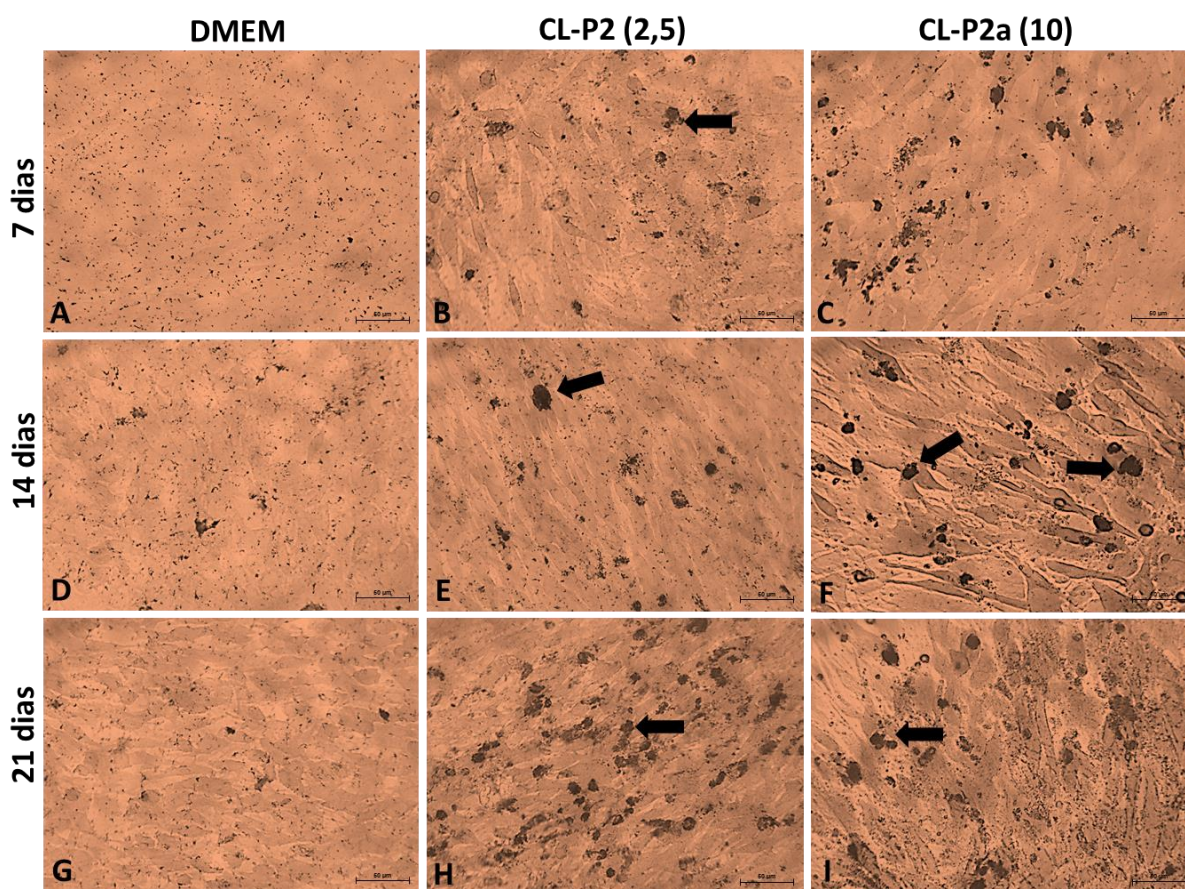
**FIGURA 4.** Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) nos níveis de Fosfatase Alcalina óssea em cultura de osteoblastos murinos (OFCOL II) durante 24 horas (A), 48 horas (B), 72 horas (C), 5 dias, 7 dias, 14 dias e 21 dias. Análise da atividade de fosfatase alcalina óssea (FAO) no cultivo de osteoblastos em diferentes tempos de incubação. O grupo DMEM corresponde ao controle. Os compostos CL-P2 e CL-P2a foram incubados nas concentrações de 2,5 $\mu$ M e 10  $\mu$ M, respectivamente. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01 (comparados ao grupo controle). ANOVA, Bonferroni.

### 3.2.2 Mineralização por Von Kossa

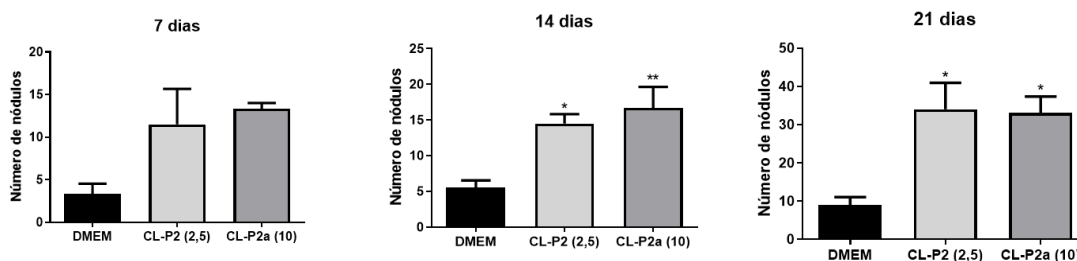
O ensaio de mineralização pelo método de Von Kossa demonstrou que a incubação de osteoblastos resultou no aumento dos nódulos de minerais com os compostos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) em nos tempos de 7,14 e 21 dias. As figuras 5, 6 e 7 ilustram os nódulos de mineralização (identificados por setas), a contagem dos nódulos e a porcentagem de área por nódulo.

Observou-se uma maior formação de nódulos no grupos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M), nos períodos de 7 (Figuras 8B e 8C), 14 (Figuras 8E e 8F) e 21 dias (Figuras 8H e 8I),

quando comparado aos respectivos grupos controles (\* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,001$ ). (Figuras 8A, 8D E 8G )

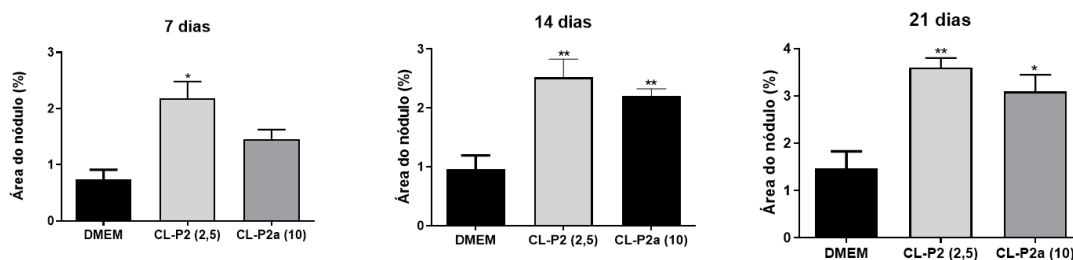


**FIGURA 5. Imagens representativas do ensaio de mineralização descrito por Von Kossa.** A mineralização é observada a partir da presença de pontos negros apontados por setas nos tempos de 7, 14 e 21 dias. Observamos um aumento do número de nódulos nos compostos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) a partir de 7 dias, comparados ao grupo controle. DMEM consiste de células incubadas com o meio de cultura. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.



**FIGURA 6. Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) no processo de mineralização, evidenciado pelo por coloração de Von Kossa em osteoblastos murinos (OFCOL II) após o período de 7, 14 e 21 dias de incubação.** A mineralização é observada a partir da presença de pontos negros. Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas apenas com o meio de cultura. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$  (comparados ao grupo controle). ANOVA, Bonferroni.



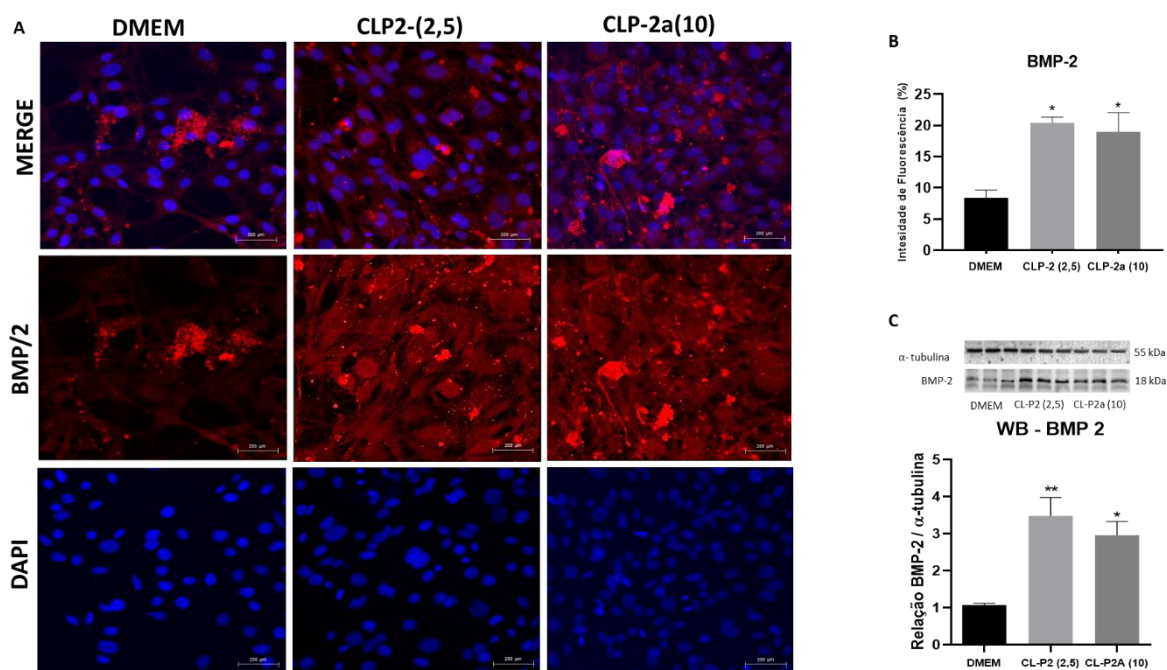


**FIGURA 7.. Quantificação dos depósitos de cálcio evidenciados por Von Kossa em osteoblastos (OFCOL II) após o período de 7, 14 e 21 dias de incubação.** O resultado é expresso como percentual de área de ocupação pelos nódulos minerais. Grupo DMEM (células cultivadas sem biomaterial). Valores expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (comparados ao grupo controle). ANOVA, Bonferroni.

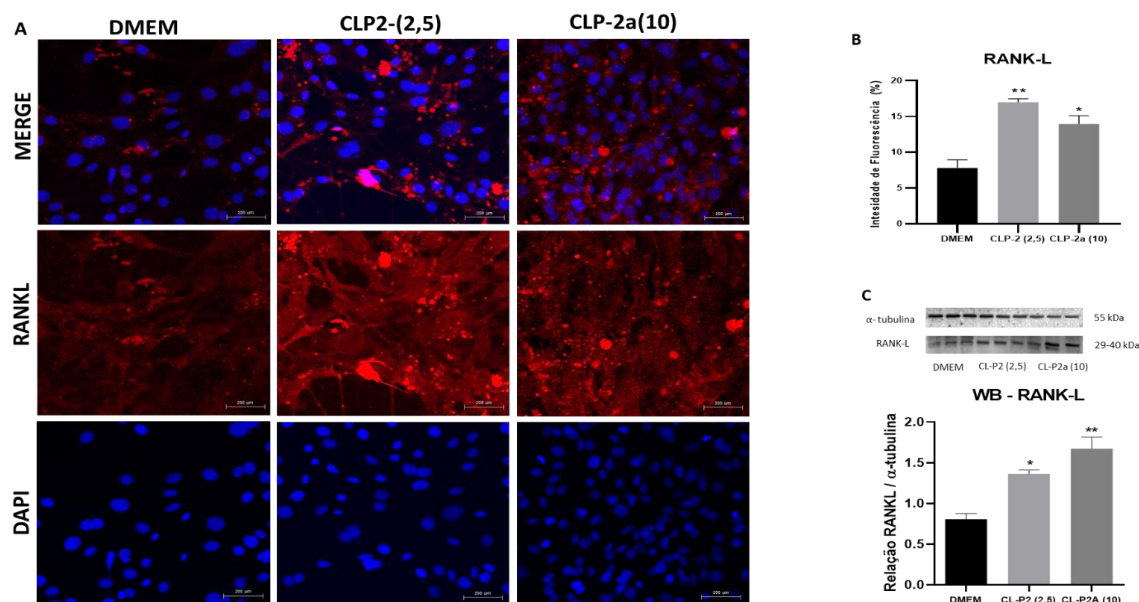
### 3.3 Mecanismos de ação na ativação celular

#### 3.3.1 Ativação da via BMP-2, OPG, RANKL

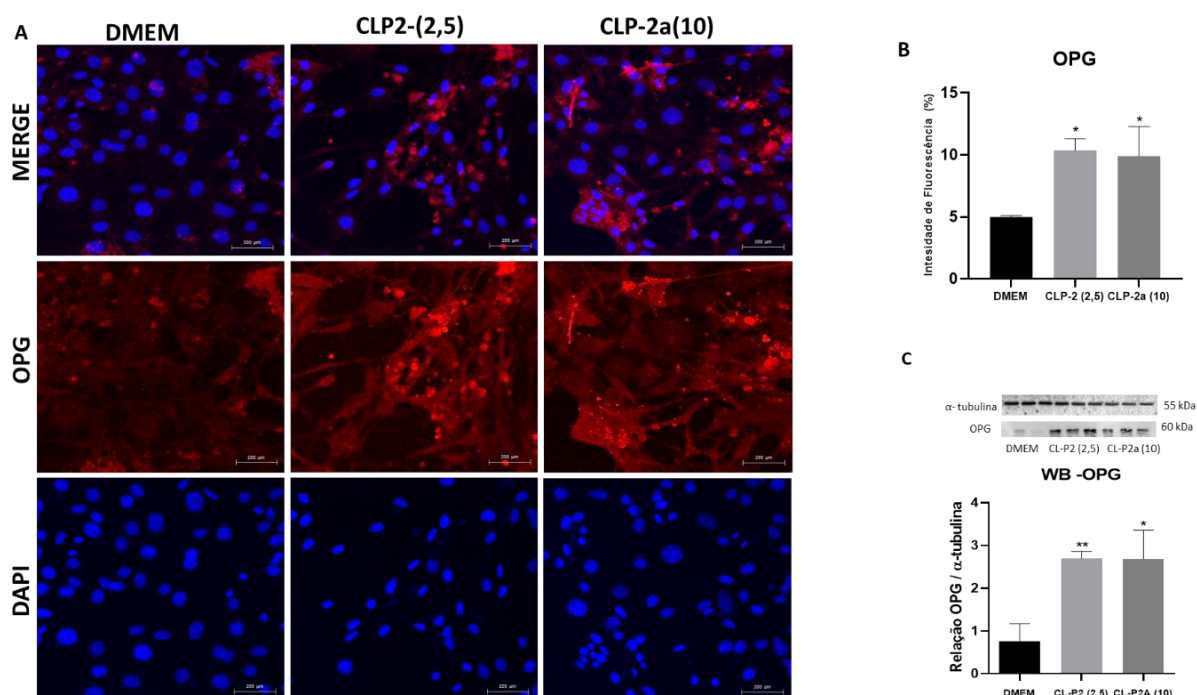
Os marcadores BMP-2, OPG, RANKL são proteínas do metabolismo ósseo e estão encontradas no citoplasma celular. As expressões de BMP-2, OPG, RANKL foram estudadas em cultura de osteoblastos murinos incubados com CL-P2 e CL-P2a, nas concentrações de 2,5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente, através dos ensaios de imunofluorescência e Western Blot, por 24 horas. Nas figura 8, 9 e 10, observamos um aumento significativo da expressão proteica da via óssea BMP-2, RANKL E OPG nos grupos CL-P2 (2,5) e CL-P2a (10), tanto na imunofluorescência com no Western Blot, comparados ao grupo controle ( $p < 0.05$ ;  $p < 0.01$ ).



**FIGURA 8. Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) na expressão proteica de BMP-2 após 24 horas de incubação.** Após 24 horas de incubação aumentou a expressão de BMP-2 nos ensaios de imunofluorescência (A e B) e Western Blot (C), comparados ao grupo controle (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01). Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01. ANOVA, Bonferroni. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.



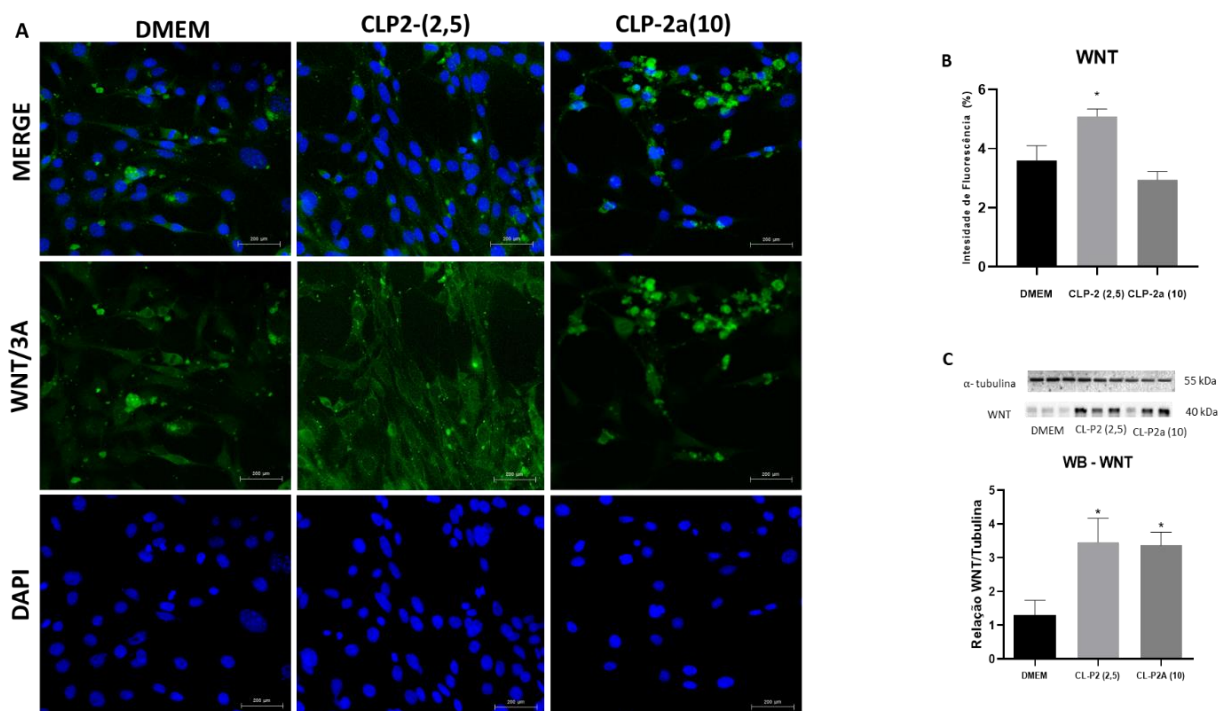
**FIGURA 9. Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) na expressão proteica de RANKL, 24 horas de incubação.** Após 24 horas de incubação aumentou a expressão de RANKL nos ensaios de imunofluorescência (A e B) e Western Blot (C), comparados ao grupo controle (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01). Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01. ANOVA, Bonferroni. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.



**FIGURA 10. Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) na expressão proteica de OPG, 24 horas de incubação.** Após 24 horas de incubação aumentou a expressão de OPG nos ensaios de imunofluorescência (A e B) e Western Blot (C), comparados ao grupo controle (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01). Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01. ANOVA, Bonferroni. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.

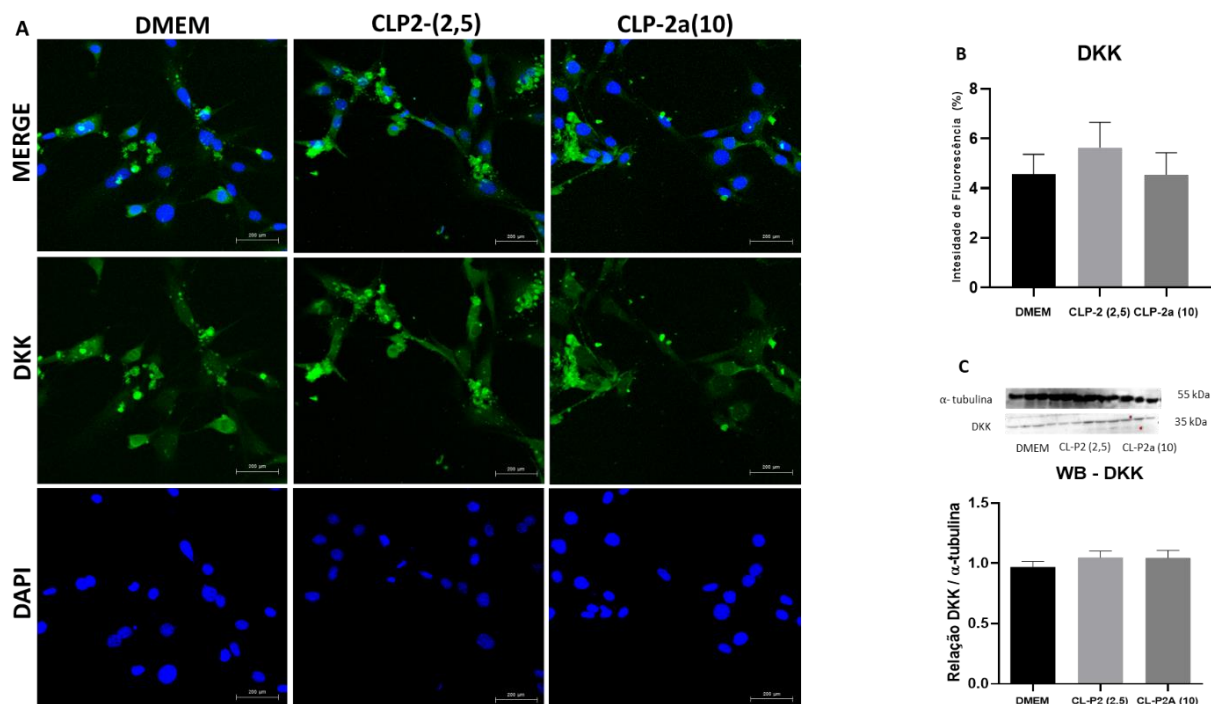
### 3.3.2 Participação da via de proliferação celular WNT, $\beta$ -CATENINA e DKK

A via Wnt/ $\beta$ -catenina é conhecida por estimular a função dos osteoblastos. A expressão proteica de WNT e  $\beta$ -catenina apresentou-se aumentada no grupo dos compostos Os CL-P2 (2,5) e CL-P2a (10), representados nas Figuras 11 e 12 ( $p$ <0.05). Não houve resultados significativos na expressão proteica do inibidor da via DKK, representado na Figura 13.

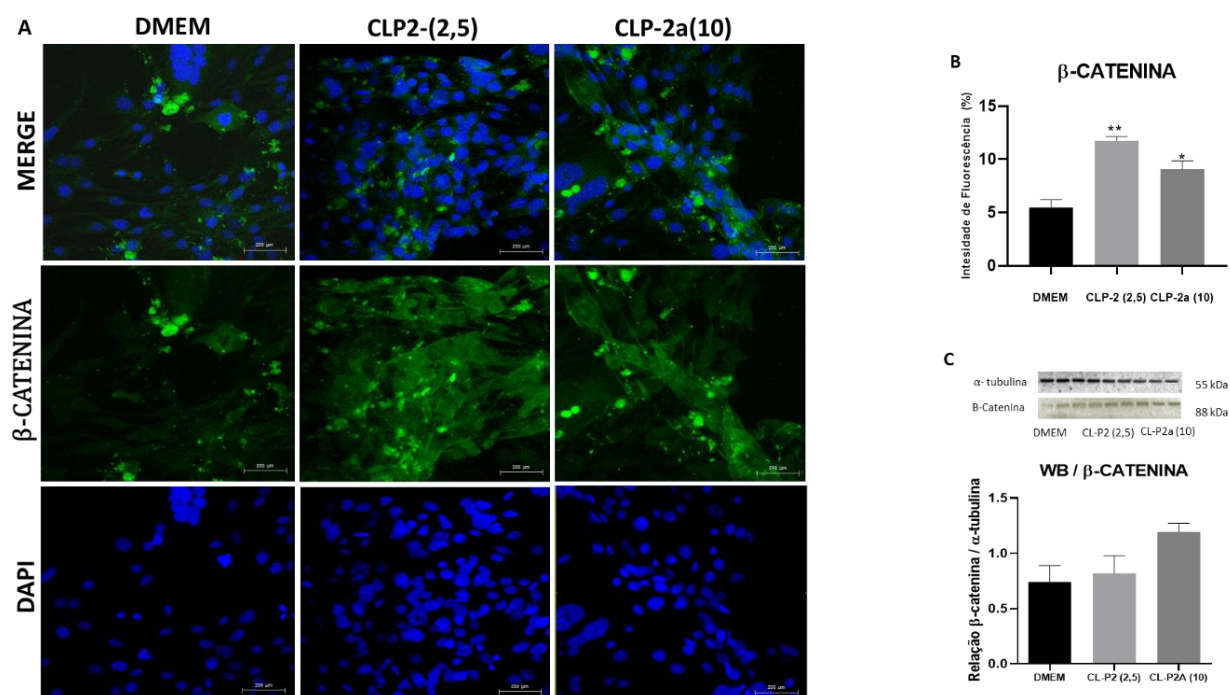


**FIGURA 11. Efeito do CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) na expressão proteica de OPG, 24 horas de incubação.** Após 24 horas de incubação aumentou a expressão de OPG nos ensaios de imunofluorescência (A e B) e Western Blot (C), comparados ao grupo controle (\* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01). Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p$ <0,05; \*\* $p$ <0,01. ANOVA, Bonferroni. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.





**FIGURA 12. Efeito do CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) na expressão proteica de OPG, 24 horas de incubação.** Após 24 horas de incubação aumentou a expressão de OPG nos ensaios de imunofluorescência (A e B) e Western Blot (C), comparados ao grupo controle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas com o meio de cultura sem a adição dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . ANOVA, Bonferroni. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.



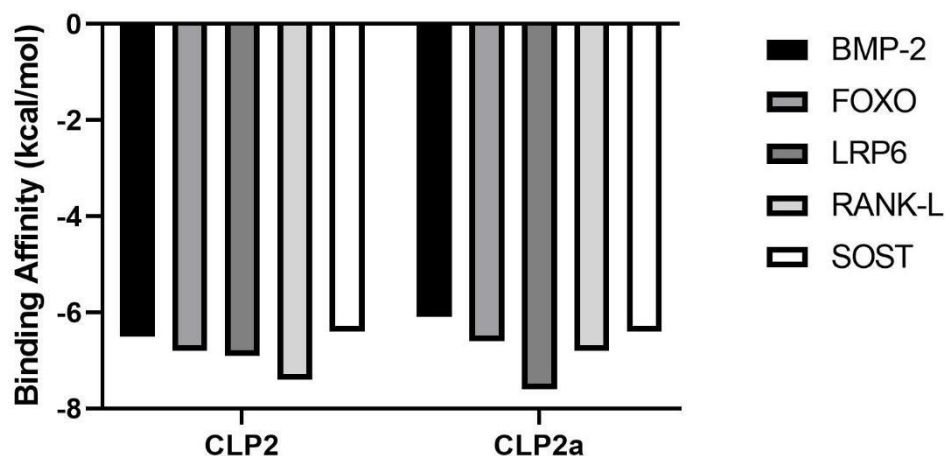
**FIGURA 13. Efeito do CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) na expressão proteica de OPG, 24 horas de incubação.** Após 24 horas de incubação aumentou a expressão de OPG nos ensaios de imunofluorescência (A e B) e Western Blot (C), comparados ao grupo controle (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ). Grupo controle (DMEM) consiste de células incubadas com

o meio de cultura sem a adição dos compostos. Os resultados foram expressos como porcentagem média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ . ANOVA, Bonferroni. As imagens foram obtidas no aumento de 200x.

### 3.4 Docking molecular

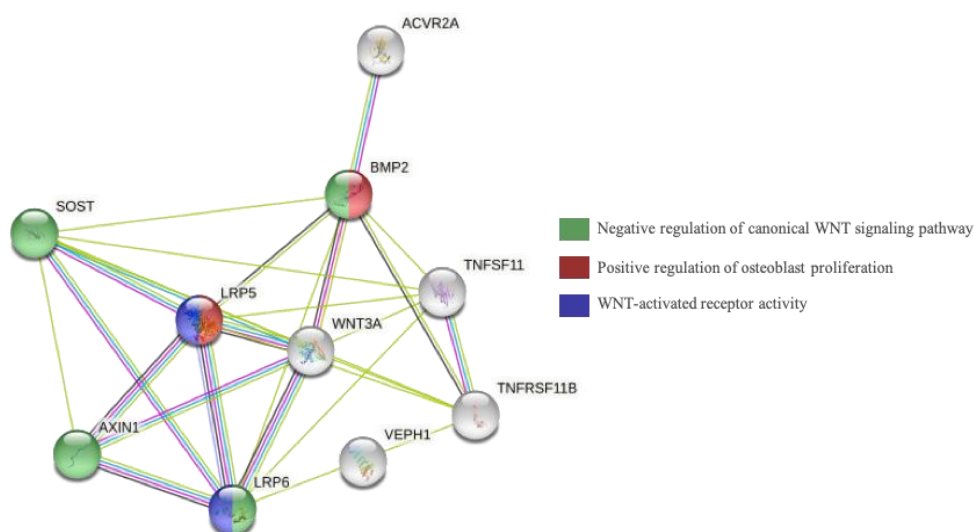
Observou-se que as interações moleculares apresentaram dados com valores abaixo de -6,0 kcal/mol, onde pode-se interpretar que ocorreram ligações firmes. Os valores de afinidade de ligação entre CLP2 com BMP-2, FOXO, LRP6, RANK-L, SOST foram respectivamente -6.5, -6.8, -6.9, -7.4, -6.4 kcal/mol. Nas interações com CLP2a e com BMP-2, FOXO, LRP6, RANK-L, SOST foram respectivamente -6.1, -6.6, -7.6, -6.8, -6.4 kcal/mol. A figura 1 mostra o resultado da simulação.

**Figura 14:** Resultado do docking molecular em afinidade de ligação (kcal/mol) nas interações entre CLP2 e CLP2a com os alvos BMP-2, FOXO, LRP6, RANK-L, SOST.



**Figura 15** - Rede IPP de alguns principais processos biológicos da formação óssea.





Fonte: Adaptado pelo autor.

No interactoma é exibido às interações diretas com LRP5/LRP6, estruturas que são componentes do complexo Wnt-Fzd-LRP5-LRP6 que desencadeia a sinalização de beta-catenina através da indução de agregação de complexos receptor-ligante em sinais do tamanho de ribossomos. Corredor de superfície celular da sinalização Wnt/beta-catenina, que desempenha um papel fundamental na formação óssea (JOHNSON *et al.*, 2017). É observado interações da esclerostina, uma estrutura que atua como regulador negativo do crescimento ósseo que atua através da inibição da sinalização Wnt e formação óssea (Semenov *et al.*, 2005). Além disso vê-se um grande número de interações na Proteína morfogenética óssea (BMP-2); proteína que induz a formação de cartilagem e osso. Estimula a diferenciação de mioblastos em osteoblastos através da via EIF2AK3-EIF2A-ATF4. A ativação de BMP2 de EIF2AK3 estimula a fosforilação de EIF2A que leva ao aumento da expressão de ATF4 que desempenha um papel central na diferenciação de osteoblastos (PICKE *et al.*, 2016). Por fim, é visto que essas proteínas apresentam grande importância na formação óssea, assim como problemas associados a mesma. Os dados mostram a motivação pela escolha nas simulações do docking molecular.

#### 4. Discussão

No presente estudo foi avaliado o efeito de dois compostos semissintéticos isolados a partir do triterpeno 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -tri-hidroxilup20(29)-eno (CL-1). Os ensaios foram realizados *in silico* e *in vitro*: investigando os alguns alvos do metabolismo ósseo; níveis de proliferação e viabilidade celular, ativação da atividade óssea (através dos níveis de fosfatase alcalina) e formação de cristais ósseos e investigação das vias de metabolismo ósseo. Foi comprovando a atividade do composto no processo fisiológico de neoformação óssea.

Os resultados deste trabalho demonstram, pela primeira vez, o potencial que os compostos semissintéticos CL-P2 e CL-P2a, isolados a partir do triterpeno CL-1 exercem sobre osteoblastos murinos. Demonstramos que: os alvos do metabolismo ósseo selecionados na docagem molecular apresentaram interação com os compostos; não houve citotoxicidade no cultivo de osteoblastos; houve um aumento da viabilidade e proliferação celular; houve ativação do metabolismo celular e aumento na expressão das proteínas que participam do metabolismo ósseo.

Produtos naturais são a base para diversos insumos biotecnológicos. De fato, estes são compostos biologicamente ativos com grande potencial terapêutico que formam bases moleculares para muitas drogas em uso clínico. O uso empírico das plantas medicinais como única opção terapêutica de algumas populações e conhecimento produzido serviu de base científica para a investigação e produção racional de medicamentos baseados em moléculas extraídas de produtos naturais. Os estudos farmacológicos com extratos e compostos isolados de diferentes partes da espécie *Combretum leprosum* sugerem diversas atividades biológicas, como: efeitos anticolinesterásico, antiulcerogênico, anticonceptivo, anti-inflamatório e antiproliferativo (FACUNDO et al., 2005; NUNES et al., 2009; LONGHI-BALBINOT et al., 2012; HORINOUCI et al., 2013).

Dentre os compostos encontrados em *C. leprosum*, o triterpeno 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -tri-hidroxilup20(29)-eno (CL-1) foi descrito por Facundo e colaboradores (1993). A partir deste composto, diferentes moléculas puderam ser sintetizadas. Recentemente foi realizado o isolamento deste metabólito e obtenção de seis derivados semissintéticos (hidrogenado - CL-P5, desidratado - CL-P1, diacilado - CL-P2A, triacilado - CL-P2, oxidado - CL-P3, hidrazona - CL-P6 e oxima - CL-P9) (SILVA FILHO, 2020). Recentemente pesquisadores realizaram estudos com os compostos semi-sintéticos CL-P2 e CL-P2a derivados do triterpeno CL-1, obtido das flores do *Combretum leprosum* mart. Para ambos os compostos foi demonstrado a ausência de toxicidade em fibroblastos murinos (L929) e em queratinócitos humanos (HaCaT),

atividade antinociceptiva em camundongos e a capacidade de exercer ações proliferativas e ativadoras do metabolismo celular (ASSIS, 2015; PASSOS, 2020).

Os estudos farmacológicos com extratos e compostos isolados a partir de diferentes partes do *C. leprosum* sugerem atividades biológicas como: efeito proliferativo, anti-nociceptivo, anti-colinesterase, anti-ulcerosa e pró-cicatrizante. (FACUNDO et al., 2005; NUNES et al., 2009) Embora o “mofumbo” seja usado popularmente como planta medicinal para cicatrização de feridas, alguns trabalhos apontam resultados promissores sobre os efeitos de cicatrização, angiogênese e estímulo do reparo de lesões cutâneas (LONGHI-BALBINOT et al., 2012; ASSIS, 2015; HORINOUCI et al., 2013; PASSOS, 2020).

Atualmente, a classe dos triterpenos vem sendo amplamente estudada e utilizada pela indústria farmacêutica (SILVA et al., 2020). Estudos realizados com o tripteno bioativo CLF-1 de *C. leprosum* comprovaram a viabilidade em fibroblastos saudáveis, induzindo a proliferação dose-dependente em modelo de cicatrização *in vitro*.

Apesar das propriedades do *C. leprosum* evidenciadas na literatura, não há relatos de trabalhos investigando a ação desses compostos no metabolismo ósseo. Diante disso, levantou-se a hipótese da importância do estudo com os compostos na perspectiva de investigação e desenvolvimento de fármacos que possam atuar como bioativadores e reguladores do metabolismo ósseo.

A biocompatibilidade dos compostos isolados CL-P2 e CL-P2a foi demonstrada por Passos (2020), em culturas de fibroblastos murinos e queratinócitos humanos. Nossos resultados de viabilidade e proliferação celular através do método direto MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), corroboram que esses estudos, uma vez que os osteoblastos murinos incubados com os compostos CL-P2 e CL-P2a apresentaram-se viáveis, sem indícios de toxicidade nos diferentes intervalos de tempo e concentrações estudados. Com as concentrações do composto CL-P2 (2,5µM), apresentando melhores resultados nos tempos de 24 e 48 horas, e a concentração do composto CL-P2a (10µM) apresentando melhores resultados nos tempos de 24, 48 e 72 horas, ambos comparados com as outras concentrações dos mesmos compostos inicialmente selecionadas para o estudo.

Os resultados achados com o ensaio de MTT apontaram que as concentrações de CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM) como mais viáveis e biocompatíveis. A fim de confirmar estes achados relacionados com a proliferação celular, realizamos o ensaio de imunomarcagem para Ki-67, um marcador estabelecido de proliferação celular, em osteoblastos incubados por 24 horas com compostos CL-P2 (2,5µM) e CL-P2a (10µM). Os resultados obtidos confirmam o efeito proliferativo de ambas as concentrações, tanto nas análises qualitativa como

quantitativas, após os resultados apresentados, selecionamos as concentrações de CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) para prosseguir com próximos ensaios.

A fim de avaliar os efeitos dos compostos de CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) na ativação de osteoblastos, o presente estudo investigou seu efeito na expressão proteica de fosfatase alcalina óssea (FAO), além de dosar, por ELISA, os níveis desta proteína no meio de cultura. A FAO, marcador da atividade de osteoblastos, é uma enzima importante no processo de mineralização óssea e está envolvida, principalmente, na primeira fase desse processo (WITTKOWSKE et al. 2016). Essa enzima é extremamente importante no processo de mineralização extracelular, uma vez que ela libera fosfato inorgânico a partir de pirofosfato inorgânico presente no meio extracelular (GOLUB & BOESZE-BATTAGLIA, 2007; ORIMO, 2010; MILLÁN & WHYTE, 2016). Observamos que a incubação de osteoblastos com CL-P2 e CL-P2a, nas concentrações de 2,5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M, respectivamente, resultou no aumento significativo dos níveis de FAO no meio de cultura, a partir de 48 h de incubação. Não houve um resultado significativo no tempo de 24 horas, supomos que este tempo não foi suficiente para que ocorra o contato e sinalização entre os osteoblastos e consequente ativação das células.

A maior atividade dos osteoblastos foi confirmada no presente estudo através da coloração histológica de Von Kossa, usada para quantificar a mineralização em culturas de células ou cortes histológicos. Observamos que ambos os grupos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) desenvolveram mais nódulos de mineralização quando comparados ao grupo controle. Esse aumento ocorre principalmente no número de nódulos. Realizamos a mensuração tanto por número de nódulos como por área ocupada por cada nódulo. Na avaliação por área os compostos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) apresentou resultados mais promissores quando comparado com o grupo CL-P2a (10 $\mu$ M). Isso significa que os osteoblastos estão ativos quando incubados com os biomateriais e exercendo sua função biológica (WENNBERG et al., 2000).

Nossos resultados demonstraram que os compostos CL-P2 (2,5 $\mu$ M) e CL-P2a (10 $\mu$ M) atuam como potenciais ativadores dos osteoblastos murinos. Buscando entender os mecanismos moleculares que atuam sobre a ativação dessas células, realizamos os ensaios de imunofluorescência e Western Blot para via óssea BMP-2/OPG/RANKL e para via WNT/  $\beta$ -CATENINA.

O estudo mostrou o aumento da expressão proteica de BMP-2, RANKL, OPG, WNT e  $\beta$ -catenina, enquanto não há alteração na expressão de DKK. Esses achados nos leva a entender que aumento da proliferação e ativação celular pode está associado ao aumento da expressão da via Wnt/ $\beta$ -catenina, esta via quando ativada permite que as Wnts entregue seu sinal ligando-se ao receptor FZD e LRP5/6 (GRUBER et al., 2016). Esta interação resulta na

inativação do complexo de destruição de  $\beta$ -catenina. Consequentemente a  $\beta$ -catenina se acumula no citoplasma, e então é translocada para o núcleo onde associa-se com fatores de transcrição para ativar genes alvo, como BMP-2, estimulando a osteoblastogênese e ativando da células osteogênicas. (GRUBER et al., 2016).

Corroborando com esses achados, Rodda & McMahon (2006) demonstraram que a sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina estimula osteoblastogênese, promovendo comprometimento e diferenciação de células-tronco mesenquimais pluripotentes em direção a linhagem osteoblástica, ao mesmo tempo em que suprime o comprometimento com a linhagem condrogênica e adipogênica. Acreditamos que o provável aumento da expressão de BMP-2, nos grupos de CL-P2 e CL-P2a, esteja contribuindo para manutenção da viabilidade e ativação celular. Supomos que os mecanismo ligados ao aumento de BMP-2 esteja associado a via canônica de Wnt/ $\beta$ -catenina. Essa hipótese é fortalecida nos achados de Almeida, *et al.* (2005) que a sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina promove a um aumento do osteoblastos produtores de osso. Além disso, as Wnts previne a apoptose de osteoblastos maduros e prolongando sua vida útil. No tecido ósseo, a via Wnt regula a osteogênese e parece estar envolvida no processo de reparo ósseo (KRISHNAN et al., 2006).

A via canônica Wnt afeta toda a linhagem osteoblástica, estimulando o comprometimento e diferenciação de células tronco mesenquimais em osteoblastos. A ativação da via Wnt em osteoblastos promove expressão de OPG, que através do eixo RANKL/OPG, diminui a diferenciação de osteoclastos e consequentemente redução da reabsorção óssea (BARON & KNEISSEL, 2013). Durante o reparo ósseo, a via Wnt melhora a massa óssea, pois promove osteoblastogênese e contribui para função do osteoblasto sendo considerada, portanto, osteoindutora (KRISHNAN et al., 2006; MAJIDINIA et al., 2017).

Dentro dos processos de concepção de um novo fármaco, os estudos *in silico* visam a otimização dos compostos em relação às suas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas, avaliando os parâmetros relacionados a forma de administração, o comportamento e a distribuição dos candidatos a fármacos no organismo humano e sua eliminação, otimizando-se então a avaliação ampla do potencial farmacológico das substâncias e a identificação dos possíveis alvos (MIGNANI et al., 2016).

Nos resultados de docagem molecular, evidenciamos a interação dos compostos CL-P2 e CL-P2a sob as vias de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina e a via RANK-L/OPG. O estudo

de Docking molecular mostra as interações diretas com LRP5/LRP6, estruturas que são componentes do complexo Wnt-Fzd-LRP5-LRP6 que desencadeia a sinalização de  $\beta$ -catenina através da indução de agregação de complexos receptor-ligante em sinais do tamanho de ribossomos. Correceptor de superfície celular da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, que desempenha um papel fundamental na formação óssea (JOHNSON et al., 2017). Além disso, vê-se um grande número de interações na Proteína morfogenética óssea (BMP-2); proteína que induz a formação de cartilagem e osso e estimula a diferenciação de mioblastos em osteoblastos, através da via EIF2AK3-EIF2A-ATF4. A ativação de BMP2 de EIF2AK3 estimula a fosforilação de EIF2A que leva ao aumento da expressão de ATF4 que desempenha um papel central na diferenciação de osteoblastos (PICKE et al., 2016). Por fim, sugerimos que a interação dos compostos CL-P2 e CL-P2a com as proteínas que participam do metabolismo de neoformação óssea abre perspectivas para mais estudos que possam elucidar os mecanismos biológicos e moleculares envolvidos nessas.

## 5. CONCLUSÕES

Os compostos CL-P2 e CL-P2A apresentam baixa citotoxicidade em osteoblastos murinos;

Os compostos CL-P2 e CL-P2A ativam a atividade óssea em osteoblastos murinos;

Os compostos CL-P2 e CL-P2A aumentam a expressão da via Wnt/ $\beta$ -catenina;

Os compostos CL-P2 e CL-P2A possuem alvos farmacodinâmicos diretamente relacionados às proteínas do metabolismo ósseo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. *et al.* Wnt Proteins Prevent Apoptosis of Both Uncommitted Osteoblast Progenitors and Differentiated Osteoblasts by  $\beta$ -Catenin-dependent and -independent Signaling Cascades Involving Src/ERK and Phosphatidylinositol 3-Kinase/AKT\*, *Journal of Biological Chemistry*, Volume 280, Issue 50, 2005, Pages 41342-41351,

ASSIS, L. C. Avaliação da atividade cicatrizante do extrato etanólico e do Triterpeno 3, 6, 16 Trihidroxilup-20 (29) - Eno provenientes de folhas de *Combretum leprosum* mart. no tratamento de lesões cutâneas induzidas em camundongos. 2015. 65 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

BEZERRA, A. V. Efeito do ranelato de estrôncio na proliferação, viabilidade e ativação de osteoblastos murinos in vitro. 55 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017.

BIOVIA, Dassault Systèmes, BIOVIA Workbook, Release 2020.

BONEWALD, L.F. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res*, v. 26, p. 229-238, 2011.doi:10.1002/jbmr.320

CASTROGIOVANNI *et al.* The importance of physical activity in osteoporosis. From the molecular pathways to clinical evidence. *Histology and hytopathology*, p.1183-94,2016.doi: 10.14670/HH-11-793.

CHIARITO, M. *et al.* Role of Wnt-signaling inhibitors DKK-1 and sclerostin in bone fragility associated with Turner syndrome. *Journal of Endocrinological Investigation*, p. 1-9, 2022.

CLARKE, B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 Nov;3 Suppl 3(Suppl 3):S131-9.

CLEVERS, H., NUSSE, Roel. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and disease. *Cell*, v. 149, n. 6, p. 1192-1205, 2012.

COUTINHO, M.R. *et al.*, OLIVEIRA, L.S., EVARISTO, F. F. V., MARINHO, M. M., MARINHO, E.M., TEIXEIRA, E.H., TEIXEIRA, A. M. R., MARINHO, E.S., SANTOS, H.S. Pharmacological potential of the triterpene 3 $\beta$ ,6 $\beta$ ,16 $\beta$ -trihidroxilup-20 (29)-ene isolated from *Combretum leprosum*: A literature review. *Fundam Clin Pharmacol*, p. 2022. doi: 10.1111/fcp.12753.

CROCKETT, J.C., MELLIS, D.J., SCOTT, D.I., HELFRICH, M.H. New knowledge on critical osteoclast formation and activation pathways from study of rare genetic diseases of osteoclasts: focus on the RANK/RANKL axis. *Osteoporosis International*. 2011;22(1):1–20.

CRUCIAT, C. M., NIEHRS, C. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 5, n. 32013.



DAY, T.F., GUO, X., GARRETT-BEAL, L., YANG, Y. Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Dev Cell*, v.8, n. 5, p.739-750, 2005.

DONGSU, P., JOEL, A., SPENCER, B. I. K., TATSUYA, K., JOJI, F., THOMAS, L. C., CHARLES, P. L., HENRY, M. K., DAVID, T. S. Endogenous Bone Marrow MSCs Are Dynamic, Fate-Restricted Participants in Bone Maintenance and Regeneration, *Cell Stem Cell*, Volume 10, Issue 3, 2012, Pages 259-272,

DUTRA, C. S. Investigação da participação da via WNT no reparo ósseo em camundongos e a influência da Diabetes Mellitus tipo 1 no reparo e remodelação óssea. 2021. 63 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021

FACUNDO, V. A. Triterpenes and flavonoids from *Combretum leprosum*. *Phytochemistry*, v. 32, n 2, p. 411-415, 1993.

FAIENZA, M. F. Mechanisms of enhanced osteoclastogenesis in girls and young women with Turner's Syndrome. *Bone*, v. 81, p. 228-236, 2015.

FARIAS, R. R. S. P., CHAVES, H., FARIAS, C., A. Prospecção científica e tecnológica das espécies de *Combretum duarteanum*, *Cambess E.*, *Combretum mellifluum Eichler*. *Revista Gestão Inovação e Tecnologias*, v.5, p. 1606-1616, 2015. 10.7198/S2237-0722201500010001.

GLASS, I.I., DONALD, A. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Developmental cell*, v. 8, n. 5, p. 751-764, 2005.

GONG, Y. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, v. 107, n. 4, p. 513-523, 2001.

GREGORY, C. A. How Wnt signaling affects bone repair by mesenchymal stem cells from the bone marrow. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1049, n. 1, p. 97-106, 2005.

HORINOUCI, C.D. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. *J. Ethnopharmacol.* v.145, p. 311-319, 2013

JING, A.N. *et al.* Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption. **International immunopharmacology**, v. 36, p. 118-131, 2016.

JOHNSON, M.L., RECKER, R.R. Exploiting the WNT Signaling Pathway for Clinical Purposes. *Curr Osteoporos Rep*, v. 15, n.3, p.153-161, 2017. doi: 10.1007/s11914-017-0357-0.

KARNER, C. M., LONG, F.. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 74, n. 9, p. 1649-1657, 2017.

KIKUCHI, A., YAMAMOTO, H., SATO, A. Selective activation mechanisms of Wnt signaling pathways. *Trends in cell biology*, v. 19, n. 3, p. 119-129, 2009.

LACEY, D.L., TIMMS, E., TAN, H. L., Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, v. 93(2), p.165-176, 1998. doi:10.1016/s0092-8674(00)81569-x

LERNER, U. H. Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research*, v. 85, n. 7, p. 584-595, 2006.

LONG, F.. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 13, n. 1, p. 27-38, 2012.

LONGHI-BALBINOT, D.T. Anti-inflammatory effect of triterpene 3-beta, 6-beta, 16- beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum Mart & Eich* in mice. *J. Ethnopharmacol*, v. 142, p. 59-64. 2012.

MANOLAGAS, Stavros C. Wnt signaling and osteoporosis. *Maturitas*, v. 78, n. 3, p. 233-237, 2014.

MARCUS, D. H., DONALD, E. C., DAVID, C. L., TIM, V., EVA, Z. AND GEOFFREY, R. H. An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform” *Journal of Cheminformatics*, v., p. 8-17, 2012.

MIGNANI, S.; HUBER. S.; TOMAS, H.; RODRIGUES, J.; MAJORAL, J. P. Compound highquality criteria: a new vision to guide the development of drugs, current situation. *Drug Discovery Today*, 21(4), 573-584, 2016.

MORRIS, G.M.,HUEY, R. L. W., SANNER, M.F., BELEW, R.K., GOODSELL, D.S., OLSON, A.J. Automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem*, v. 30, p.2785- 2791, 2009. doi: 10.1002/jcc.21256.

ORYAN, A, MONAZZAH, S, BIGHAM-SADEGH, A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci*. 2015 Jan;28(1):57-71.

PORWAL, K., PAL, S., DEV, K. CHINA, S.P., KUMAR, Y., SINGH, C., BARBHUYAN, T., SINHA, N., SANYAL, S., TRIVEDI, A.K., MAURYA, R., CHATTOPADHYAY, N. Guava fruit extract and its triterpene constituents have osteoanabolic effect: Stimulation of osteoblast differentiation by activation of mitochondrial respiration via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Nutr Biochem*, v,44, p.22-34, 2017. doi: 10.1016/j.jnutbio.2017.02.011.

PASSOS, M. J. Análise in vitro, in silico e in vivo dos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios de dois triterpenos semissintéticos (CL-P2 e CL-P2A). 2020. 156 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal do Ceará, Sobral, 2020.

PICKE, A.K., SALBACH-HIRSCH, J. HINTZE, V. ROTHER, S., RAUNER, M., KASCHOLKE, C., MÖLLER, S., BERNHARDT, R., RAMMELT, S., PISABARRO, M.T., RUIZ-GÓMEZ, G., SCHNABELRAUCH, M., SCHULZ-SIEGMUND, M., HACKER, M.C., SCHARNWEBER, D., HOFBAUER, C., HOFBAUER, L.C. Sulfated hyaluronan improves bone regeneration of diabetic rats by binding sclerostin and enhancing osteoblast function. *Biomaterials*. p. 11-23, 2016. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.04.013.

Rodda SJ, McMahon AP. Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors. *Development*. 2006;133(16):3231-3244. doi:10.1242/dev.02480

SALENTIN, S., SCHREIBER, S., HAUPT, V.J., ADASME, M.F., SCHROEDER, M. PLIP: PLIP: fully automated protein-ligand interaction profiler. *Nucleic Acids Res*, v. 43, p.443-447, 2015. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv315>.

SEMËNOV M, TAMAI K, HE X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem*, v. 280, p. 26770-5, 2005. doi: 10.1074/jbc.M504308200.

SILVA FILHO,C.J.A. Transformação química de produtos naturais como estratégia de produção de compostos bioativos: triterpeno $3\beta,6\beta,16\beta$ -tri-hidroxilup-20(29)-eno isolado de *Combretum leprosum*. 123f. (Dissertação Mestrado em Química) Universidade Federal do Ceará, 2020.

TRIVEDI, R., GOSWAMI, R., CHATTOPADHYAY, N. Investigational anabolic therapies for osteoporosis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, v. 19, n. 8, p. 995-1005, 2010.

TROTT, O.,OLSON, A.J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem*, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010. doi:10.1002/jcc.21334

VERAS, M. O. V. Avaliação de fitas de magnésio, com ou sem revestimento de fosfato de cálcio, e sua influência na viabilidade, proliferação e ativação de osteoblastos murinos, além da biocompatibilidade em dorso de ratos wistar. 2021 70 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

WEI, W. Biphasic and dosage-dependent regulation of osteoclastogenesis by  $\beta$ -catenin. *Molecular and cellular biology*, v. 31, n. 23, p. 4706-4719, 2011.

XIONG, Jinhua et al. Matrix-embedded cells control osteoclast formation. *Nature medicine*, v. 17, n. 10, p. 1235-1241, 2011.

YÑIGEZ-GUTIERREZ, A.E.; BACHMANN, B.O. Fixing the Unfixable: The Art of Optimizing Natural Products for Human Medicine. Department of Chemistry. *J. Med. Chem.* Nashville. v.62, n.18. p.8412–8428. bril, 2019.

ZEBAZE, R.M., GHASEM-ZADEH, A. BOHTE, A. Intracortical remodelling and porosity in the distal radius and post-mortem femurs of women: a cross-sectional study. *Lancet*, v. 375, p. 1729-1736, 2010. doi:10.1016/S0140-6736(10)60320-0

ZHANG, R., OYAJOB, B.O., HARRIS, S.E.,CHEN, D., TSAO, C., DENG, HW signaling activates bone morphogenetic protein 2 expression in osteoblasts. *Bone*. 2013;52:145-56.