

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

**EFEITO DO COMPLEXO QUERCETINA-SR<sup>2+</sup> SOBRE A  
OSTEOCLASTOGÊNESE E A PERDA ÓSSEA INDUZIDA POR  
OVARIECTOMIA**

RIBEIRÃO PRETO

2023



## **VERSÃO CORRIGIDA**

**A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)**

LAISA YASMIN DE SOUZA

**Efeito do complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a osteoclastogênese e a perda óssea induzida por ovariectomia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Farmacologia

Orientação: Sandra Yasuyo Fukada Alves

RIBEIRÃO PRETO

2023

**Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.**

### **FICHA CATALOGRÁFICA**

de Souza, Laisa Yasmin

Efeito do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a osteoclastogênese e a perda óssea induzida por ovariectomia – Ribeirão Preto, 2023. 57p

de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Flavonoides. 2. Estrôncio. 3. Osteoporose. 4. Osteoclastos. 5. Reabsorção Óssea.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

### Efeito do complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a osteoclastogênese e a perda óssea induzida por ovariectomia

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área: Farmacologia

Orientação: Sandra Yasuyo Fukada Alves

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*"Foi  
e ainda é  
uma aventura  
tremenda"*

- Matilde Campilho

*Aos meus irmãos, meu pai, minha mãe e todos  
aqueles que me ensinaram sobre a vida.*

# DEDICATÓRIA

---

Dedico este trabalho primeiramente à Deus, que com sua infinita sabedoria e bondade, foi um verdadeiro guia nessa minha jornada.

Aos meus pais, **José Amilton de Souza** e **Adriana Ignácio de Souza**, que sempre me apoiaram durante toda a minha trajetória, me mantendo firme para seguir com os meus sonhos com os pés no chão. Sou muito grata por toda dedicação, amor e pelos esforços. Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Leticia Flaviana de Souza** e **Anderson Alves de Sousa** e **Aline Alves Sousa** (*in memoriam*), que são anjos em minha vida. Boas conversas, risadas e o cuidado sempre serão o que nos mantém próximos.

Ao **meu amor**, por todo apoio e cuidado. Obrigada por sempre estar comigo!

A todos os meus amigos, pela torcida e a cada conquista, pelo apoio e sorrisos.



# AGRADECIMENTO ESPECIAL

---

Agradeço à minha orientadora **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Yasuyo Fukada**, a quem admiro a competência e entusiasmo pela pesquisa, por me acolher como orientanda e por todo ensinamento durante esses dois anos. Muito obrigada pela confiança depositada em mim e por sua dedicação e orientação neste trabalho.

# AGRADECIMENTO

---

À *Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo* e à *Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia* da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. E *aos professores* dessa instituição, por todos os valiosos ensinamentos e auxílio na construção do meu conhecimento. Aos professores *do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID)*, *Prof. Dr. Fernando Queiroz Cunha*, *Prof.*

*Dr. José Carlos Alves Filho* e *Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha* pela cordialidade e pela cooperação durante a realização desta pesquisa.

À *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)* pelo suporte financeiro para que esse projeto fosse executado.

Aos *professores da banca e suplentes*, por terem aceitado o convite e pela atenção dispensada na leitura da dissertação.

Agradeço também aos técnicos e funcionários, em especial à *Mayara Santos Gomes* por todo auxílio e ensinamento durante a realização dos experimentos laboratoriais, pela companhia e conversas descontraídas.

Aos meus amigos de laboratório, os quais não só foram meu braço direito, mas anjos em minha vida e amigos sensacionais, muito obrigada *Thaise Taira*, *Leticia Duffles*, *Lucas Venturini*.

Durante esse período do mestrado o qual veio cercado de mudanças e novidades, fiz grandes amigos que viraram minha família em Ribeirão Preto, a eles agradeço o apoio emocional, momentos de risadas, abraços carinhosos, incentivo e por todo o laço criado o qual espero que perdure. Obrigada *Ayda Schneider*, e *Cesar Speck* por serem tão especiais e presentes em todos os momentos, sejam de alegrias ou difíceis.

Agradeço também a todos os meus amigos de vida, que jamais deixei de carregá-los em meu coração com um carinho e amor que transbordam, *Lorraine Paes*, *Gabrielle Menossi*, *Paulo Henrique* e *Fernanda Caroli*, obrigada por todo apoio imensurável, mesmo de longe, vocês são incríveis!

Por fim, agradeço a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para a concretização deste trabalho e, também, a todos que passaram de alguma forma por minha vida durante esse período. Muito obrigada!

## RESUMO

SOUZA LY. **Efeito do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a osteoclastogênese e a perda óssea induzida por ovariectomia.** Ribeirão Preto, 2023. 58p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A osteoporose é uma condição caracterizada pela redução da densidade mineral óssea e maior susceptibilidade a fraturas. Estudos demonstraram o efeito anti-osteoporótico do Ranelato de estrôncio (SRan) reduzindo o risco de fraturas. Além disso, estudos realizados com compostos flavonoides têm demonstrado ações benéficas contra a osteoporose, onde se ligam aos receptores beta de estrogênio, estimulando *in vitro* a síntese proteica de células da linhagem osteoblástica. No presente estudo avaliamos o efeito sinérgico do Sr<sup>2+</sup> e do flavonóide quercetina (composto quercetina-Sr<sup>2+</sup>) sobre a osteoclastogênese e na proteção contra a progressão da osteoporose. Primeiramente, avaliamos o efeito citotóxico de diferentes concentrações de quercetina, estrôncio e do complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> na diferenciação de osteoclastos. Para isso, macrófagos derivados da medula óssea (BMMs) foram estimulados com M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL) na presença ou ausência dos compostos. A viabilidade celular, foi determinada utilizando o ensaio de MTT, onde as concentrações de cada composto foram selecionadas. Também avaliamos o efeito do complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> e do estrôncio isolado (0,5, 1,5, 5,0 e 15 µM) ou quercetina (5 µM) na osteoclastogênese induzida por RANKL. O complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup>, e o estrôncio isolado ou quercetina mostraram um efeito inibitório na diferenciação de osteoclastos e na expressão de genes marcadores de diferenciação. Além disso, avaliamos o efeito biológico do complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> *in vivo*, analisando seu efeito em um modelo de osteoporose induzida por ovariectomia (OVX). Camundongos fêmeas passaram por ovariectomia e foram tratadas com o complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> por 21 Dias. A microarquitetura óssea dos fêmures foi avaliada por microtomografia. Nossos dados demonstraram que o tratamento por 21 dias com o complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> protege contra a perda óssea induzida pela OVX, como evidenciado pela inibição da perda do volume ósseo (BV), da espessura trabecular (Tb. Th), número de trabéculas (Tb. N) induzida pela OVX. Nossos resultados sugerem uma aplicação farmacológica potencial do complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> no tratamento de doenças associadas à perda óssea excessiva.

Palavras-chave: Osteoporose. Estrôncio. Flavonoides. Osteoclastos. Reabsorção óssea.

## ABSTRACT

SOUZA, LY. **Effect of Quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex on osteoclastogenesis and bone loss induced by ovariectomy**. Ribeirão Preto, 2023. 58p. Dissertation (Master's) – School of Medicina of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Osteoporosis is a specific condition due to reduced bone mineral density and increased susceptibility to fractures. Studies have discovered the anti-osteoporotic effect of Strontium Ranelate (SRan) decreasing the risk of fractures. Furthermore, a study carried out with flavonoid compounds demonstrated beneficial actions against osteoporosis, where they bind to beta estrogen receptors, stimulating *in vitro* protein synthesis in cells of the osteoblastic lineage. No present study evaluates the synergistic effect of Sr<sup>2+</sup> and the flavonoid quercetin (quercetin-Sr<sup>2+</sup> compound) on osteoclastogenesis and protection against the progression of osteoporosis. First, we evaluated the cytotoxic effect of different concentrations of quercetin, strontium and the quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex on osteoclast differentiation. For this, bone marrow-derived macrophages (BMMs) were stimulated with M-CSF (30 ng/mL) and RANKL (10 ng/mL) in the presence or absence of the compounds. Cell solutions were determined using the MTT assay, where the concentrations of each compound were selected. We also evaluated the effect of the quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex and isolated strontium (0,5, 1,5, 5,0 e 15 µM) or quercetin (5 µM) on osteoclastogenesis caused by RANKL. The quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex and isolated strontium or quercetin demonstrated an inhibitory effect on osteoclast differentiation and the expression of differentiation marker genes. Furthermore, we evaluated the biological effect of the quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex *in vivo*, analyzing its effect in a model of osteoporosis caused by ovariectomy (OVX). Female mice underwent ovariectomy and were treated with the quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex for 21 days. The bone microarchitecture of the femurs was evaluated by microtomography. Our data revealed that treatment for 21 days with the quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex protects against bone loss caused by OVX, as evidenced by the benefit of loss of bone volume (BV), trabecular thickness (Tb. Th), number of trabeculae (Also N) caused by OVX. Our results suggest an application of the pharmacological potential of the quercetin-Sr<sup>2+</sup> complex in the treatment of diseases associated with excessive bone loss.

Keywords: Osteoporosis. Strontium. Flavonoids. Osteoclasts. Bone resorption.

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ :	Alfa
$\alpha$ -MEM:	Minimum Essencial Medium Eagle – Alpha Modification
$\beta$ :	Beta
$\mu$ m:	Micrometro (s)
$\mu$ g:	Micrograma (s)
$\mu$ L:	Microlitro (s)
3D:	Tridimensional
ANOVA:	Análise variância
BV:	Bone volume
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementar
CEUA:	Comitê de Ética no Uso de Animais
c-fms:	Macrofage colony stimulating fator receptor
CTAn:	Computed tomography analysis
CtsK:	Catepsina K
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EDTA:	Ethylenediamine Tetracetic Acid
H <sup>+</sup> ATPase:	ATP fosfo-hidrolase
HE:	Hematoxilina e eosina
M-CSF:	Fator estimulador de colônia de macrófagos
Micro-CT:	Microtomografia computadorizada
MTT:	<i>brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio</i>
NaOH:	Hidróxido de sódio
NFAT:	NF of activated T-cell
NFkB:	Fator de transcrição nuclear kappa B
NH <sub>4</sub> Cl:	Cloreto de amônio
OPG:	Osteoprotegerina
P/S:	Penicilina e estreptomicina
PBS:	Tampão fosfato salina
pH:	Potencial hidrogênico
qPCR:	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RANK:	Receptor ativador de NF-kB

RANKL: Ligante do receptor de NF-kB  
RNA: Ácido ribonucleico  
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro  
Runx2: Runt-related transcription fator 2  
Rpm: Rotação por minuto  
SrRan: Ranelato de estrôncio  
TNF-a: Fator-alfa de necrose tumoral  
TRAP: Fostatase ácida resistente ao tartarato

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1. Avaliação da viabilidade celular do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup>.** Pré-osteoclastos obtidos a partir de células de medula óssea de camundongos foram cultivadas na presença de Quercetina, Sr<sup>2+</sup> e Quercetina- Sr<sup>2+</sup> nas concentrações de 0,5µM, 1,5µM, 5,0µM e 15µM. A influência do veículo (DMSO 0,1%) foi avaliada. A análise estatística foi realizada pelo teste One-way ANOVA. \*p<0.05.

**Figura 2. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de Quercetina.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por 4 dias, estimulados com Quercetina nas concentrações de 0,5µM, 1,5µM e 5,0µM e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 10x. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAP-positivas por poço. A barra indica média ± desvio padrão da média (n=5). Foi utilizado o One-Way ANOVA para comparação entre os grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni \*P<0.05. Os dados são representativos de um experimento independente.

**Figura 3. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de Sr<sup>2+</sup>.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por 4 dias, estimulados com Sr<sup>2+</sup> nas concentrações de 0,5µM, 1,5µM, 5,0µM e 15µM e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 10x. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAP-positivas por poço. A barra indica média ± desvio padrão da média (n=5). Foi utilizado o One-Way ANOVA para comparação entre os grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni \*P<0.05. Os dados são representativos de um experimento independente.

**Figura 4. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de Quercetina-Sr<sup>2+</sup>.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por 4 dias, estimulados com Quercetina-Sr<sup>2+</sup> nas concentrações de 0,5µM, 1,5µM, 5,0µM e 15µM e

coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 10x. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAPpositivas por poço. A barra indica média  $\pm$  desvio padrão da média (n=5). Foi utilizado o One-Way ANOVA para comparação entre os grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni \*P<0.05. Os dados são representativos de um experimento independente.

**Figura 5. Quercetina-Sr<sup>2+</sup> controla a expressão gênica de marcadores de fusão *in vitro*.** Avaliação da expressão gênica de *Nfatc1*, *Trap* e *Mgst1* após 48 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo. A barra indica média desvio padrão da média (n=3) de uma representação de um experimento independente. \*P<0,05, indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

**Figura 6. Fotos representativas do fêmur direito em 3D.** Fêmures representativos na posição transversal dos grupos (A) Sham, (B) Veículo, (C) Quercetina-Sr<sup>2+</sup> (n=4) por microtomografia computadorizada.

**Figura 7. Quercetina-Sr<sup>2+</sup> regula a perda óssea *in vivo*.** Avaliação da microarquitetura óssea de fêmures direitos na posição transversal (n=4) por microtomografia  $\mu$ CT. (A) Volume ósseo (BV), (B) Espessura trabecular (Tb.Th), (C) Separação de trabéculas (Tb.sp), (D) Número de trabéculas (Tb.n). A barra média indica  $\pm$  desvio padrão da média, de uma representação de um experimento independente. \*P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Bonferroni.

**Figura 8. Quercetina-Sr<sup>2+</sup> regula a osteoclastogênese *in vivo*.** (A) fotos representativas das células TRAP positivas indicadas pelas setas amarelas na medula óssea de fêmur do grupo Veículo e Quercetina-Sr<sup>2+</sup> (n=5) de animais com 16 semanas. As peças foram fotografadas no aumento de 10x e 20x. (B) Quantificação das células TRAP positivas. A barra indica média desvio padrão na média (n=5), de uma representação de 2 experimentos independentes. \*P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.1 Biologia óssea: osteoclastogênese e reabsorção óssea</b> .....	19
<b>1.2 Osteócitos</b> .....	19
<b>1.2.1 Osteoblastos</b> .....	20
<b>1.2.2 Osteoclastos</b> .....	21
<b>1.3 Fisiopatologia da osteoporose pós-menopáusia</b> .....	22
<b>1.4 Tratamentos convencionais</b> .....	25
<b>1.4.1 Compostos Flavonoides e potencial atividade antirreabsortiva</b> .....	26
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	30
<b>3. OBJETIVO PRINCIPAL</b> .....	32
<b>3.1 Objetivos específicos</b> .....	32
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>4.1 Animais</b> .....	34
<b>4.2 Síntese do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup></b> .....	34
<b>4.3 Cultura de Osteoclastos</b> .....	34
<b>4.4 Viabilidade celular</b> .....	35
<b>4.5 Coloração de TRAcP</b> .....	35
<b>4.6 Avaliação da expressão de genes marcadores de diferenciação de osteoclastos</b> .....	35
<b>4.6.1 Modelo experimental de osteoporose induzida por ovariectomia</b> .....	36
<b>4.6.2 Tratamentos</b> .....	37
<b>4.6.3 Avaliação por microtomografia computadorizada (Micro-CT)</b> .....	37
<b>4.6.4 Histologia</b> .....	38
<b>4.7 Análise estatística</b> .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	40
<b>5.1 Avaliação <i>in vitro</i> do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a osteoclastogênese</b> .....	40
<b>5.1.1 Efeito do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a viabilidade celular</b> .....	40
<b>5.2 O complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> inibe a diferenciação dos osteoclastos</b> .....	41
<b>5.3 Quercetina-Sr<sup>2+</sup> inibe a expressão gênica dos marcadores de diferenciação dos osteoclastos <i>in vitro</i></b> .....	44
<b>5.3 Avaliação <i>in vivo</i> da Quercetina-Sr<sup>2+</sup> na osteoclastogênese</b> <b>5.2.1 Quercetina-Sr<sup>2+</sup> regula a perda óssea em animais ovariectomizados</b> .....	45
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	58

## INTRODUÇÃO

---

## **1.INTRODUÇÃO**

### **1.1Biologia óssea: osteoclastogênese e reabsorção óssea**

O sistema esquelético é uma estrutura complexa composta principalmente de ossos, medula óssea e outros tecidos conjuntivos. Esse sistema desempenha uma ampla gama de funções essenciais, integrando-se com as articulações para formar um sistema de alavanca que fornece suporte estrutural aos tecidos moles do corpo. Além disso, ele desempenha um papel fundamental na proteção da medula óssea, que, por sua vez, contribui para a produção de células sanguíneas em um processo conhecido como hematopoiese, bem como, desempenha um papel na regulação endócrina (Ding *et al.* em 2022).

A fim de cumprir suas diversas funções e manter a estabilidade interna, o tecido ósseo depende de um processo contínuo de renovação da matriz, que é conhecido como remodelação óssea. Essa atividade é minuciosamente regulada por meio da interação entre vários tipos de células, incluindo osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos desempenham um papel crucial na formação da matriz óssea, enquanto os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção dessa matriz (Clark, 2008). Paralelamente, os osteócitos, que residem na matriz óssea, exercem funções de sensores mecânicos e coordenadores da remodelação óssea, como elucidado por Bonewald (2011).

É importante notar que um espectro diverso de doenças que ocasionam o enfraquecimento dos ossos, tais como diabetes, osteoartrite e osteoporose, surge como consequência do aumento na atividade dos osteoclastos, da redução na atividade dos osteoblastos, ou da combinação desses fatores, (Raggatti, 2010). Portanto, a investigação minuciosa das condições que predisõem a desequilíbrios na atividade dessas células é de extrema relevância para a compreensão e o desenvolvimento de alvos terapêuticos futuros para essas enfermidades.

### **1.2 Osteócitos**

Os osteócitos constituem a grande maioria das células que compõem o tecido ósseo, representando aproximadamente de 90% a 95% de todas as células ósseas. Estas células possuem uma longa vida e desempenham um papel de extrema relevância na resposta a estímulos mecânicos e influências hormonais, desempenhando, assim, um papel fundamental na regulação da estabilidade

óssea, conforme destacado por Zhang *et al.* em 2019. Os osteócitos demonstram características notáveis de resposta tanto no âmbito mecânico quanto endócrino, sendo capazes de perceber e reagir a estímulos tanto locais como sistêmicos. Como resultado, eles liberam moléculas que afetam as células presentes no ambiente ósseo, assim como as encontradas na medula óssea e em órgãos distantes, atuando de maneira parácrina e endócrina, respectivamente (Delgado-Calle e Bellido, 2022)

Devido a processos de envelhecimento amplamente documentados, que englobam disfunções no sistema endócrino global e na resposta mecânica do esqueleto, presume-se que os osteócitos desempenhem um papel crucial no processo de envelhecimento do tecido ósseo (Van Den Beld *et al.*, em 2018).

### 1.2.1 Osteoblastos

Os osteoblastos têm um papel anabólico significativo, impulsionando a formação do tecido ósseo. Eles são responsáveis por produzir os componentes orgânicos do osso e participar na mineralização (Gallagher e Sai 2010). A atividade osteoblástica intensa resulta em morfologia cúbica com citoplasma fortemente basofílico, enquanto uma fase menos ativa leva a uma forma achatada com reduzida basofilia citoplasmática (Qiu *et al.*, 2019).

Os osteoblastos desempenham um papel crucial na coordenação do processo de remodelação óssea, controlando a diferenciação e função dos osteoclastos responsáveis pela reabsorção óssea. Isso se dá através da produção de duas citocinas fundamentais: o ligante ativador do receptor do fato nuclear kappa B (RANKL) e o fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF) (Amarasekara *et al.*, 2018). Quando o RANKL e o M-CSF se ligam aos seus receptores, RANK e c-fms, presentes na superfície dos precursores dos osteoclastos, dá início a várias vias de sinalização que, por fim, ativam o fator nuclear de células T ativadas c1. Esse fator é um regulador-chave da osteoclastogênese, promovendo maior diferenciação, proliferação e sobrevivência dos osteoclastos (Amarasekara *et al.*, 2018). Além disso, os osteoblastos secretam a osteoprotegerina (OPG), um importante regulador negativo da osteoclastogênese, que se liga ao RANKL, dificultando a interação entre o RANKL e o RANK. Isso, por sua vez, contribui para manter o equilíbrio na homeostase óssea ao regular o eixo RANK/RANKL/OPG (Boyce *et al.*, 2008).

### 1.2.2 Osteoclastos

Os osteoclastos são células multinucleadas que se originam da fusão de progenitores hematopoiéticos da linhagem mieloide. A diferenciação dessas células, conhecida como osteoclastogênese, é um processo complexo que envolve várias fases, desde a transformação de monócitos ou macrófagos em precursores de osteoclastos (fase inicial) até a formação de células gigantes e multinucleadas (fase final) resultantes da proliferação, migração e fusão dos macrófagos (Silvestre, 2009). A regulação da osteoclastogênese é fortemente influenciada por duas citocinas chave: o Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (M-CSF) e o Ligante do Receptor Ativador do NF-Kb (RANKL).

O M-CSF, também conhecido como CSF-1, age através do receptor c-fms (CSF1R/MCSFR) expresso em monócitos e macrófagos desencadeando não apenas vias de sinalização que determinam a sobrevivência e a proliferação celular, mas também regulando a expressão do receptor RANK na superfície celular (Hattersley *et al.*, 2000). O RANKL, uma citocina afiliada à superfamília do TNF, liga-se ao receptor RANK presente em monócitos, macrófagos e precursores de osteoclastos, ativando diversas vias de sinalização intracelular, incluindo vias clássicas e alternativas do NF-Kb, c-Fos, fosfolipase C, MITF e NFATc1, que desempenham papéis cruciais na diferenciação dos osteoclastos (Lancey *et al.*, 1998).

O fator de transcrição NFATc1 desempenha um papel fundamental na regulação da diferenciação dos osteoclastos, e a expressão exacerbada do NFATc1 em células precursoras pode desencadear a formação de osteoclastos, independentemente da presença de RANKL. O NFATc1 regula uma variedade de genes associados à diferenciação e fusão dos osteoclastos, incluindo o receptor de calcitonina (CTR), o receptor associado aos osteoclastos (OSCAR), a proteína transmembrana específica de células dendríticas (DC-STAMP) e a isoforma D2 da ATPase vacuolar (Atp6v0d2) (Asagiri, 2007). Além disso, o NFATc1 também controla genes envolvidos na ativação das células, como a fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) e a catepsina K (CtsK) (Yovos, 2008).

Os osteoclastos maduros desempenham um papel fundamental na reabsorção óssea, mantendo o equilíbrio do tecido ósseo. Para que o processo de reabsorção óssea ocorra, os osteoclastos maduros passam por um rearranjo

citoesquelético, polarização da membrana plasmática, redistribuição de transportadores e organelas, juntamente com um intenso fluxo endossomal (Pavlos, 2019). Isso começa com a formação de uma zona de selamento entre os osteoclastos e a matriz óssea, mediada pela integrina- $\alpha$ v $\beta$ 3, gerando cavidades de reabsorção. A manutenção de um pH ácido nessas cavidades é fundamental e é assegurada pelas H<sup>+</sup>ATPases vacuolares, potencializando a atividade das enzimas proteolíticas liberadas a partir de vesículas, como TRAP, catepsina K e matriz metaloproteinase-9 (MMP-9) (Ruccl; Teti, 2016). A combinação desses fatores culmina na degradação do colágeno e na desmineralização da hidroxiapatita. Essa compreensão aprofundada dos mecanismos envolvidos na formação e atividade dos osteoclastos é crucial para avançar no entendimento da homeostase óssea e desenvolver estratégias terapêuticas para doenças relacionadas ao metabolismo ósseo (Kalervo- Vaananen *et al.*, 2008).

### **1.3 Fisiopatologia da osteoporose pós-menopáusicas**

A homeostasia do tecido ósseo é mantida por meio da coordenação dos processos de formação e reabsorção óssea. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio, com a taxa de reabsorção óssea superando a taxa de formação, surge a condição conhecida como osteoporose. Essa enfermidade resulta na fragilidade e aumenta a suscetibilidade a fraturas (O'Connell, 2006).

A osteoporose é categorizada em duas principais formas: primária e secundária. A osteoporose primária, a variante mais prevalente, está associada à diminuição da densidade óssea relacionada ao envelhecimento natural e, particularmente em mulheres, à menopausa. A crescente longevidade da população torna essa condição óssea um desafio significativo em saúde pública. Por outro lado, a osteoporose secundária é uma consequência de condições patológicas subjacentes ou do uso prolongado de medicamentos como glicocorticoides, que impactam negativamente o metabolismo ósseo (Lau e Guo, 2011).

A osteoporose representa uma ameaça considerável à saúde pública, resultando em uma morbidade e mortalidade significativas. Em 2000, ocorreram cerca de 9 milhões de fraturas atribuíveis à osteoporose globalmente, incluindo aproximadamente 1,6 milhão de fraturas do colo do fêmur. Esses números tendem a aumentar, com previsões apontando para 2,6 milhões de fraturas de colo de

fêmur em 2025 e 6,25 milhões em 2050 (Burlet e Reginster, 2006). Além dos desafios de saúde pública que a osteoporose representa em termos de morbidade e mortalidade, ela também implica custos substanciais (Canhão, Fonseca e Queiroz, 2005).

Na osteoporose, observa-se a formação de extensos canais de reabsorção nos ossos, o que resulta em uma redução na resistência óssea (Silveira et al., 2006). As propriedades mecânicas dos ossos derivam da composição da matriz de colágeno e do grau de mineralização, que é determinado pela quantidade de cristais de hidroxiapatita incorporados nas fibras de colágeno.

Ao longo do ciclo de vida, as mulheres passam por diversas fases de variação hormonal, que começam na puberdade, com a chegada da menarca, e continuam até a menopausa, que marca o fim da atividade menstrual cíclica. A liberação de hormônios femininos pelos ovários, em resposta à estimulação da hipófise, controla os diferentes estágios do ciclo hormonal feminino. O estrogênio e a progesterona desempenham papéis cruciais nas várias etapas do ciclo biológico da mulher, influenciando o desenvolvimento de características sexuais secundárias, a liberação de óvulos, a manutenção da gravidez e o comportamento feminino (Jensen, Jacobson, Walf e Frye, 2010).

Durante o climatério, que é a fase de transição entre o período reprodutivo e o não reprodutivo, ocorre o gradual esgotamento dos folículos ovarianos e uma progressiva deficiência de estrogênio. Essa fase está associada aos sintomas da menopausa e tem início após a última menstruação, marcando o término do período reprodutivo (Graef, Locatelli e Santos, 2012). Com a falência ovariana que ocorre na menopausa, inicia-se um novo ciclo, trazendo consigo importantes mudanças fisiológicas.

Dentre as alterações fisiológicas resultantes da menopausa, destaca-se a diminuição nos níveis de estrogênio, o que leva à supressão do paratormônio (PTH). O PTH desempenha um papel fundamental na produção de vitamina D3 e na absorção intestinal de cálcio (Cerri e Faloni, 2007). Os principais alvos do PTH são os túbulos renais e os ossos. O efeito biológico do PTH é elevar os níveis de cálcio e diminuir os níveis de fósforo no sangue. Nos rins, o PTH promove o aumento da excreção de fósforo, devido à redução de sua reabsorção nos túbulos proximais, enquanto simultaneamente aumenta a reabsorção de cálcio nos túbulos distais.

Ademais, os efeitos do estrogênio são observados em duas dimensões: a redução na quantidade de osteoclastos e sua influência na atividade e sobrevivência dessas células. O estrogênio exerce sua influência na redução do número de osteoclastos por meio de uma variedade de mecanismos. Em primeiro lugar, ele afeta as células osteoprogenitoras, reduzindo os níveis de RANKL (um fator que promove a formação de osteoclastos) e aumentando os níveis de OPG (um inibidor natural de RANKL). Isso cria um ambiente inibitório que impede a formação de pré-osteoclastos e, por conseguinte, osteoclastos. Em segundo lugar, o estrogênio impacta as células T, diminuindo os níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , MCSF e RANKL, resultando na redução da formação de pré-osteoclastos e osteoclastos. Por fim, o estrogênio também atua sobre os monócitos, reduzindo os níveis de TNF- $\alpha$  e IL-1, que são substâncias estimuladoras da formação de osteoclastos, levando assim a uma menor formação de pré-osteoclastos e osteoclastos. Esses mecanismos, em conjunto, contribuem para a redução do número de osteoclastos no osso (Cerri e Faloni, 2007).

No que se refere à regulação da atividade e sobrevivência dos osteoclastos, o estrogênio desencadeia diversos efeitos notáveis. Primeiramente, ele reduz os níveis de citocinas inflamatórias, como o TNF- $\alpha$  e o IL-1, através de sua influência sobre células T e monócitos. Isso resulta na inibição da atividade osteoclástica, seja de forma indireta, ao promover a atividade osteoblástica, ou de maneira direta, afetando os próprios osteoclastos (Riggs, 2000). Além disso, o estrogênio, ao se ligar aos receptores de estrogênio presentes nos osteoblastos, estimula a liberação do fator de crescimento- $\beta$  transformante (TGF- $\beta$ ), o qual, por sua vez, induz a apoptose dos osteoclastos (Sambrook e Cooper, 2006). Essa ação não se limita apenas aos osteoblastos, uma vez que o estrogênio também se conecta a receptores de estrogênio nos próprios osteoclastos, onde modula proteases como a catepsina K e a metaloproteinase-9 (MMP-9), inibindo, assim, a atividade de reabsorção dos osteoclastos e favorecendo sua apoptose (Parikka et al., 2001). Esses mecanismos de regulação desempenham um papel fundamental na manutenção da saúde óssea.



#### 1.4 Tratamentos convencionais

A estratégia farmacológica adotada no tratamento da osteoporose envolve a administração de agentes antirreabsortivos, substâncias anabólicas, calcitonina e terapias hormonais (Tella *et al.*, 2014). Entre as alternativas disponíveis, o Ranelato de Estrôncio (SrRan), um medicamento que não pertence à classe dos bisfosfonatos, foi considerado uma opção viável para a prevenção de fraturas em pacientes com osteoporose até aproximadamente meados de 2017, quando foi retirado do mercado. Estudos anteriores sugeriram que o estrôncio exerce influência sobre os processos de reabsorção e formação óssea, uma vez que ele pode ser incorporado pelas células ósseas, aumentando a densidade óssea e reduzindo o risco de osteoporose. Isso resulta em um incremento na densidade tanto do osso cortical quanto trabecular, promovido pelo processo de formação óssea e pela melhoria da microarquitetura, contribuindo, assim, para a prevenção da perda óssea e o reforço da resistência mecânica (Doublier *et al.*, 2011).

Devido à semelhança físico-química entre o estrôncio e o cálcio, o estrôncio também pode substituir o cálcio em alguns processos fisiológicos, como a contração muscular, coagulação sanguínea e secreção de determinados hormônios (Tan *et al.*, 2014). Analogamente, os mecanismos de interação entre o íon estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) e o tecido ósseo são fundamentados em processos que ocorrem naturalmente com a participação do cálcio. No entanto, embora o tratamento com SrRan tenha demonstrado eficácia no contexto da osteoporose, a Agência Europeia de Medicamentos revisou suas diretrizes para o uso desse tratamento, incluindo uma contraindicação para pacientes com doenças cardiovasculares. A semelhança físico-química entre o estrôncio e o cálcio motivou a progressiva descontinuação do uso do SrRan, devido às potenciais implicações adversas na saúde cardíaca dos pacientes (Nota da Agência Europeia de Medicamentos, 2014).

Alguns estudos relataram a síntese de compostos flavonoides com metais alcalinos-terrosos, conforme documentado na literatura (SILVA *et al.*, 2020). Essas substâncias demonstraram propriedades antioxidantes, uma vez que a redutibilidade dos flavonoides aumentou quando associada a metais, tornando-os mais suscetíveis à oxidação por radicais livres. Nesse contexto, uma perspectiva promissora envolve a aplicação do íon estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) na produção de compostos que contenham esse elemento. Essa abordagem tem despertado interesse devido

aos efeitos diversos que o estrôncio pode exercer sobre o tecido ósseo. Além disso, a pesquisa contínua na criação de novas plataformas que permitam a liberação controlada do íon estrôncio em locais específicos, com o objetivo de desenvolver terapias para o tratamento da osteoporose, está em andamento.

#### **1.4.1 Compostos Flavonoides e potencial atividade antirreabsortiva**

Os flavonoides constituem uma classe de compostos polifenólicos naturalmente presentes em plantas e vegetais, sendo caracterizados por uma ampla gama de aplicações, abrangendo setores que vão desde a indústria cosmética até a agricultura (Muscietti *et al.*, 2007). Na área farmacêutica, muitos compostos sintéticos foram gradualmente substituídos por essas moléculas naturais, em virtude de suas propriedades anti-inflamatórias, hipotensoras, antitumorais, hipocolesterolêmicas, bem como sua ação como agentes antiparasitários (Chen *et al.*, 2013). Devido à sua capacidade anti-inflamatória e sua influência na proliferação celular, que pode ser revertida ou retardada, os flavonoides têm se tornado alvo de extensas investigações científicas. Diversos flavonoides naturais já foram identificados, e a literatura científica tem sido enriquecida por estudos que abordam os efeitos desses compostos no processo de perda de densidade óssea, conhecido como osteoclastogênese (Cruz *et al.* 2019).

Pesquisas científicas têm demonstrado que vários flavonoides têm a capacidade de influenciar a diferenciação *in vitro* de osteoblastos e reduzir a perda óssea *in vivo* (Stupski *et al.*, 2021). Portanto, a síntese e a análise das propriedades farmacológicas de compostos derivados de flavonoides e do íon estrôncio ( $\text{Sr}^{2+}$ ) surgem como alternativas promissoras ao uso do Ranelato de Estrôncio (SrRan) na terapia da osteoporose. Nesse contexto, um exemplo notável é a quercetina, um flavonoide de interesse. Estudos recentes têm destacado a morina, outro flavonoide, que exerce um efeito benéfico no metabolismo ósseo por si só, mas cuja combinação com o íon  $\text{Sr}^{2+}$  poderia ampliar esses efeitos positivos (Cruz *et al.*, 2021).

Com base nos efeitos favoráveis dos flavonoides e do íon  $\text{Sr}^{2+}$  no tecido ósseo, um grupo de pesquisa liderado pela Professora Ana Paula Ramos da FFCLRP-USP realizou um estudo que resultou na síntese de complexos contendo

flavonoides e  $\text{Sr}^{2+}$ . Inicialmente, a morina foi escolhida como o flavonoide para criar o complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$ . No estudo publicado, a morina demonstrou uma sinergia com as propriedades osteogênicas previamente associadas aos íons  $\text{Sr}^{2+}$ , combinando-se com os efeitos benéficos osteogênicos do flavonoide. Os efeitos osteogênicos do complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$  foram vinculados ao aumento da expressão gênica da enzima fosfatase alcalina (ALP), que desempenha um papel fundamental na síntese de fosfato inorgânico *in vivo* e estimula a atividade mineralizadora (Cruz *et al.*, 2019). Além disso, o estudo também evidenciou a capacidade do complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$  de inibir a osteoclastogênese *in vitro*. Vale ressaltar que os efeitos benéficos dos íons  $\text{Sr}^{2+}$  na regulação das atividades das células osteogênicas e no aumento da densidade óssea têm sido associados a concentrações elevadas desse íon, o que pode resultar em efeitos colaterais. Portanto, os resultados obtidos sugerem que concentrações menores do complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$ , em comparação com o medicamento SrRan, mostraram-se eficazes na ativação dos osteoblastos e no aumento da capacidade mineralizadora. No entanto, é importante mencionar que a compreensão completa dos mecanismos regulatórios envolvendo osteoblastos e osteoclastos em resposta aos íons  $\text{Sr}^{2+}$  ainda requer investigações adicionais.

Além da morina, a literatura também descreve a influência da quercetina na osteoclastogênese. Efeitos como a redução da apoptose de osteoblastos, a promoção da diferenciação de osteoblastos, a inibição da formação de osteoclastos e a diminuição do estresse oxidativo foram documentados na literatura. A quercetina demonstrou a capacidade de inibir a diferenciação de precursores de osteoclastos, agindo por meio da inibição da atividade do complexo proteico. Além disso, há evidências que sugerem que a quercetina, em concentrações específicas, pode aumentar o número de osteoblastos, a atividade da fosfatase alcalina (ALP), a expressão do fator Runx-2 e induzir a mineralização (Chen *et al.*, 2013).

Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi explorar potenciais alternativas eficazes em relação a complexos contendo estrôncio para o tratamento da perda óssea. Nossos colaboradores sintetizaram o complexo quercetina- $\text{Sr}^{2+}$ , um outro complexo flavonoide, cujos efeitos sobre osteoclastos e osteoblastos ainda carecem de investigações mais aprofundadas. Esta proposta busca integrar aspectos relacionados à composição e estrutura dos complexos

flavonoides-Sr<sup>2+</sup>, utilizando a quercetina como uma base para avaliar seu potencial osteogênico.

**JUSTIFICATIVA**

---

## 2.JUSTIFICATIVA

A intenção deste estudo foi investigar possíveis alternativas eficazes de complexos que contenham estrôncio para o tratamento da perda óssea. Foi sintetizado o complexo quercetina-Sr<sup>2+</sup> por nossos colaboradores, um outro complexo flavonoide cujos efeitos sobre osteoclastos e osteoblastos carecem de investigações mais aprofundadas. Esta proposta visa integrar aspectos relacionados à composição e estrutura dos complexos flavonoides-Sr<sup>2+</sup>, utilizando a quercetina como base para avaliar seu potencial osteogênico. A utilização de compostos naturais com propriedades protetoras ósseas, minimizando efeitos colaterais, emerge como uma alternativa promissora para superar as limitações dos tratamentos de patologias associadas à perda óssea.

## OBJETIVOS

---

### **3.OBJETIVO PRINCIPAL**

Avaliar o efeito da Quercerina-Sr<sup>2+</sup> na diferenciação e função dos osteoclastos, bem como no remodelamento ósseo fisiológico e na perda óssea em modelo de osteoporose induzida por ovariectomia em camundongos.

#### **3.1 Objetivos específicos**

- a) Avaliar se o composto Flavonoide-Sr<sup>2+</sup> - Quercetina-Sr<sup>2+</sup> - interfere na diferenciação e função de osteoclastos *in vitro*.
- b) Avaliar a efetividade do tratamento com a Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a perda óssea induzida em modelo experimental de osteoporose.



## MATERIAIS E MÉTODOS

---

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 wild type (WT), com idades entre 6 e 8 semanas e pesos variando de 20 a 25 g, foram empregados neste estudo. Os animais foram adquiridos no Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) e alojados em caixas individuais, contendo até 5 animais por caixa, nas instalações do biotério da referida instituição. Os minis isoladores utilizados foram revestidos com maravalha e dispostos em estantes ventiladas dotadas de sistemas independentes de insuflamento e exaustão de ar, mantendo a temperatura controlada a  $24^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ , com ciclo de claro/escuro a cada 12 horas. A alimentação dos animais consistiu em ração disponível ad libitum, complementada com água filtrada, em conformidade com os protocolos estabelecidos segundo as diretrizes éticas e aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (Protocolo: 21.1.502.60.2) (Anexo 1).

### **4.2 Síntese do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup>**

O composto quercetina-Sr<sup>2+</sup> foi sintetizado pelo grupo de pesquisa liderado pela Prof.<sup>a</sup> Ana Paula Ramos da FFCLRP-USP, seguindo o protocolo descrito por Pimenta *et al.*, 2023.

### **4.3 Cultura de Osteoclastos**

Os ossos longos de camundongos foram dissecados e imersos em meio de cultura  $\alpha$ -MEM (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, EUA), adicionado de 1% de penicilina/estreptomicina (P/S – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Em ambiente de fluxo laminar, os ossos foram submetidos à limpeza com álcool 70%, seguida por lavagem em  $\alpha$ -MEM contendo 1% de P/S e 10% de soro fetal bovino (SFB – GIBCO, Life Technologies, Carlsbad, EUA), visando à subsequente extração das células da medula óssea. Para este fim, uma das extremidades dos fêmures e das tíbias foi tratada com tampão de lise para remoção de hemácias, e as células resultantes foram

ressuspendidas em  $\alpha$ -MEM suplementado para a contagem celular. A contagem foi conduzida em uma câmara de Neubauer em quatro quadrantes, utilizando Azul de Trypan a 0,5%. Posteriormente,  $13 \times 10^6$  células foram plaqueadas em placas de Petri (Corning, Nova York, EUA) contendo 13 mL de  $\alpha$ -MEM suplementado e 30 ng/mL de M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, EUA) ao longo de 3 dias. Após este período, as células não aderentes foram removidas, os pré-osteoclastos foram lavados, coletados com PBS, contados e replaqueados na presença de M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL) (R&D Systems, Minneapolis, EUA) para indução da diferenciação osteoclástica. Em ensaios específicos, diferentes concentrações de Quercetina-Sr<sup>2+</sup>, Quercetina e Sr<sup>2+</sup> (0,5  $\mu$ M, 1,5  $\mu$ M, 5,0  $\mu$ M e 15  $\mu$ M) foram adicionadas conforme o protocolo experimental.

#### **4.4 Viabilidade celular**

Pré-osteoclastos foram semeados em uma placa de 96 poços e cultivados na presença de M-CSF (30 ng/mL) e RANKL (10 ng/mL). A avaliação da viabilidade celular foi conduzida através do ensaio MTT (*brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio*) clássico, após um período de 72 horas, utilizando o protocolo adaptado conforme descrito por Faria *et al.* (2015).

#### **4.5 Coloração de TRAcP**

Após o período de diferenciação dos osteoclastos, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixadas utilizando paraformaldeído a 4% e metanol, e subsequentemente coradas utilizando um kit comercial de TRAcP, conforme as instruções do fabricante (Kit 387<sup>a</sup>, Sigma-Aldrich, Merck, St. Louis, EUA). Após a coloração, as células foram documentadas por meio de um microscópio Leica DMIRB 6000B (Leica Microsystems, Inc, Richmond Hill, ON) com uma objetiva de 10x. As células positivas para TRAcP, contendo mais de dois núcleos, foram identificadas e consideradas como osteoclastos.

#### **4.6 Avaliação da expressão de genes marcadores de diferenciação de osteoclastos**

Avaliou-se a expressão de genes marcadores de osteoclastos e da enzima antioxidante MGST1 por meio de PCR em tempo real. Pré-osteoclastos foram cultivados com Quercetina (5  $\mu$ M), Sr<sup>2+</sup> ( $\mu$ M) e o complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> (15  $\mu$ M) por 48 horas. As amostras foram então submetidas à extração de ácido ribonucleico total utilizando o reagente Trizol (Incitrogen, Carlsbad, CA), seguindo as instruções do fabricante. Após a diluição das amostras em água, o cDNA foi sintetizado a partir de 2  $\mu$ g de RNA por meio de uma reação de transcriptase reversa. A análise quantitativa da expressão do RNA mensageiro foi conduzida utilizando o ABI Prism 5700 Sequence Detection System, empregando SYBR-green como corante fluorescente para a quantificação dos produtos de amplificação. As condições de reação de PCR consistiram em uma desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida por 40 ciclos de amplificação a 94°C (1 minuto), 65°C (1 minuto) e 72°C (2 minutos), complementados por uma curva padrão de desnaturação.

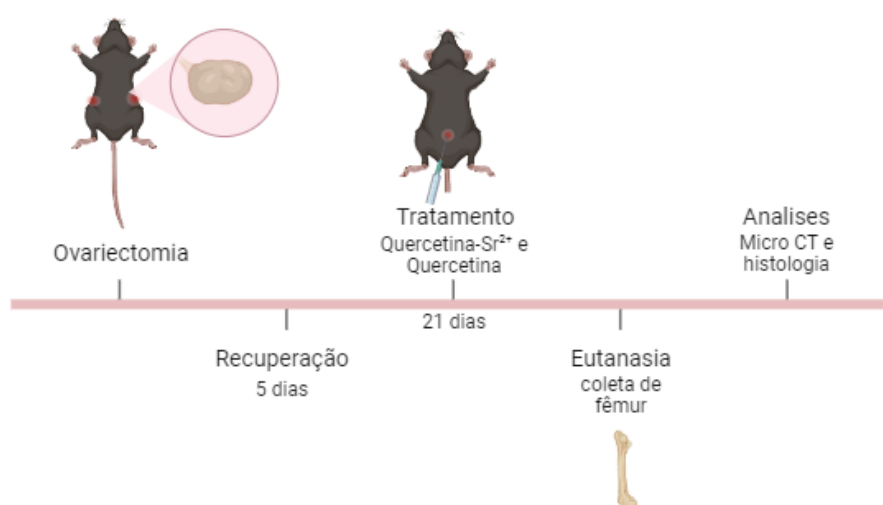
As condições de reação para o PCR de cada gene de interesse foram refinadas considerando a concentração adequada de primers, a prevenção da formação de dímeros e a maximização da eficiência de amplificação do gene alvo. Utilizou-se SYBR Green PCR Master Mix, 400nM dos primers específicos e 2,5 ng de cDNA em cada reação. O limiar para determinar a positividade da reação de Real-Time-PCR foi estabelecido com base nos controles negativos. O cálculo para determinar o nível relativo de expressão do gene de interesse foi executado conforme as orientações do fabricante. A média dos valores de Ct, obtida a partir de duplicatas, foi empregada como referência para os valores do gene alvo em uma amostra controle, possibilitando o cálculo do aumento relativo de expressão.

#### **4.6.1 Modelo experimental de osteoporose induzida por ovariectomia**

Os animais foram submetidos à anestesia, seguida pela realização de incisões em ambos os flancos (direito e esquerdo). Após a identificação dos ovários, procedeu-se à ligadura de seus pedúnculos, seguida pela ressecção dos tecidos ovarianos. A parede abdominal foi fechada em dois planos por meio de sutura contínua utilizando fio de seda 4.0. Como grupo de controle, fêmeas submetidas a procedimentos semelhantes foram incluídas, contudo, sem a ressecção do tecido ovariano (grupo Sham). Após um período de 26 dias, os animais foram submetidos à eutanásia e amostras foram coletadas, incluindo sangue, fêmur e tíbia.

#### 4.6.2 Tratamentos

Os animais foram diariamente submetidos à administração intraperitoneal de 600  $\mu\text{g}/\text{kg}$  do composto Quercetina- $\text{Sr}^{2+}$  ou do veículo correspondente. O tratamento teve início após cinco dias de ovariectomia e foi implementado de forma diária ao longo de um período de 21 dias, culminando no dia da coleta. Após 26 dias a partir da realização da ovariectomia, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo os fêmures bilaterais coletados para análises subsequentes.



#### 4.6.3 Avaliação por microtomografia computadorizada (Micro-CT)

Para a avaliação quantitativa tridimensional dos parâmetros ósseos trabeculares dos fêmures, os ossos foram dissecados e fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digitalização utilizando o microtomógrafo computadorizado Micro-CT Sky Scan 1172 (Bruker Corporation, Billerica, EUA). Para a visualização, as imagens de projeção tridimensional (3D) foram reconstruídas através do software NRecon. Em seguida, foram selecionados cortes transversais de um segmento localizado a 1 mm abaixo da diáfise média para as análises dos parâmetros ósseos trabeculares, tais como volume ósseo trabecular (BV), espessura trabecular (Tb.Th), número de trabéculas (Tb.N) e separação de trabéculas (Tb.Sp). Essas análises foram realizadas utilizando os programas de imagens Data Viewer e CTAn.

#### **4.6.4 Histologia**

As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, posteriormente, descalcificadas utilizando uma solução à base de EDTA a 10% por aproximadamente 30 dias. Em seguida, as amostras foram desidratadas sequencialmente em álcoois de concentrações crescentes (70%, 80%, 95% e 100%) e diafanizadas em xilol. As tíbias foram submersas em parafina fundida (56 a 60°C) e incluídas em blocos de parafina. Posteriormente, os blocos de parafina contendo as tíbias foram seccionados em cortes finos utilizando um micrótomo. Os cortes de cada grupo experimental foram submetidos à reação de TRAP (tartrato-resistente à fosfatase ácida) e, em seguida, contra-corados com Hematoxilina. Os osteoclastos, identificados pela coloração avermelhada, foram quantificados. Cortes representativos de TRAP foram capturados por uma câmera AxioCam MRc5 acoplada ao microscópio Axio Imager.M1.

#### **4.7 Análise estatística**

A análise dos resultados foi conduzida por meio do método de análise de variância a um critério (ONE-way ANOVA), seguido por pós-teste, conforme apropriado e de acordo com as variáveis e grupos comparados. As diferenças foram consideradas significativas para valores de  $P < 0,05$  e foram determinadas utilizando o software GraphPad 5.0 (GraphPad Prism; GraphPad Software, San Diego).

## RESULTADOS

---

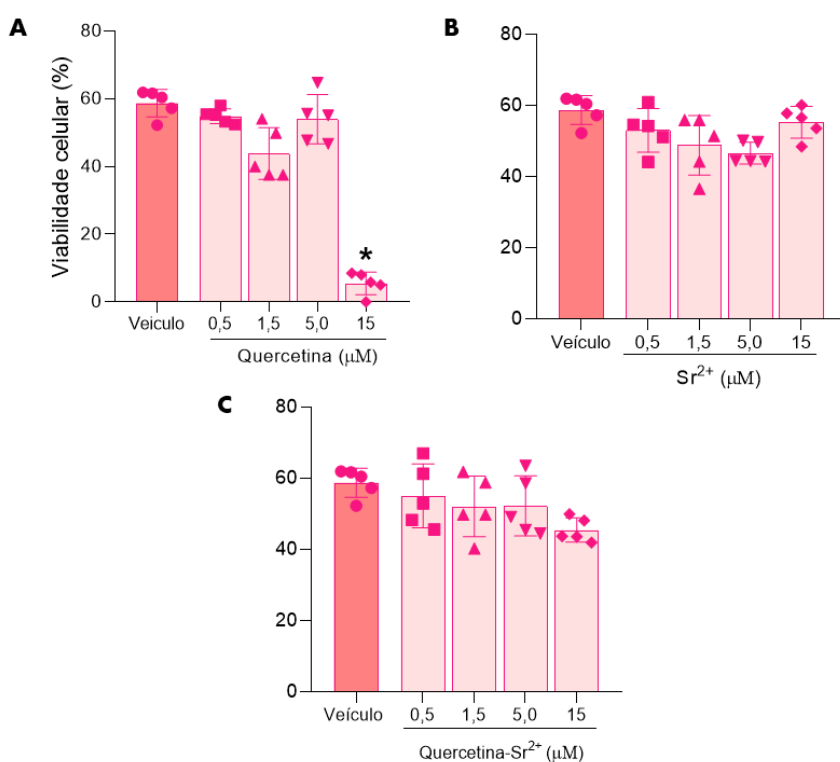
## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação *in vitro* do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a osteoclastogênese

#### 5.1.1 Efeito do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> sobre a viabilidade celular

No âmbito deste estudo, o método de ensaio MTT foi empregado com o objetivo de avaliar a citotoxicidade em relação aos compostos Quercetina, Sr<sup>2+</sup> isoladamente e o complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup>. Inicialmente, concentrações de 0,5 µM, 1,5 µM, 5,0 µM e 15 µM foram utilizadas para o experimento. As conclusões extraídas do ensaio de viabilidade e taxa de proliferação celular foram representadas graficamente na Figura 1.

Observou-se que a concentração de 15 µM no grupo tratado com Quercetina (Figura 1A) resultou em uma redução significativa no número de células viáveis ( $p < 0,05$ ), quando comparada com o grupo veículo. Por outro lado, não foram identificadas diminuições na viabilidade celular nas concentrações avaliadas para Sr<sup>2+</sup> (Figura 1B) e Quercetina-Sr<sup>2+</sup> (Figura 1C), em comparação com o grupo veículo. Esses resultados indicam que a concentração de 15 µM do composto Quercetina apresentou um efeito tóxico sobre as células, induzindo à apoptose. Como resultado, esta concentração foi excluída das etapas experimentais subsequentes.



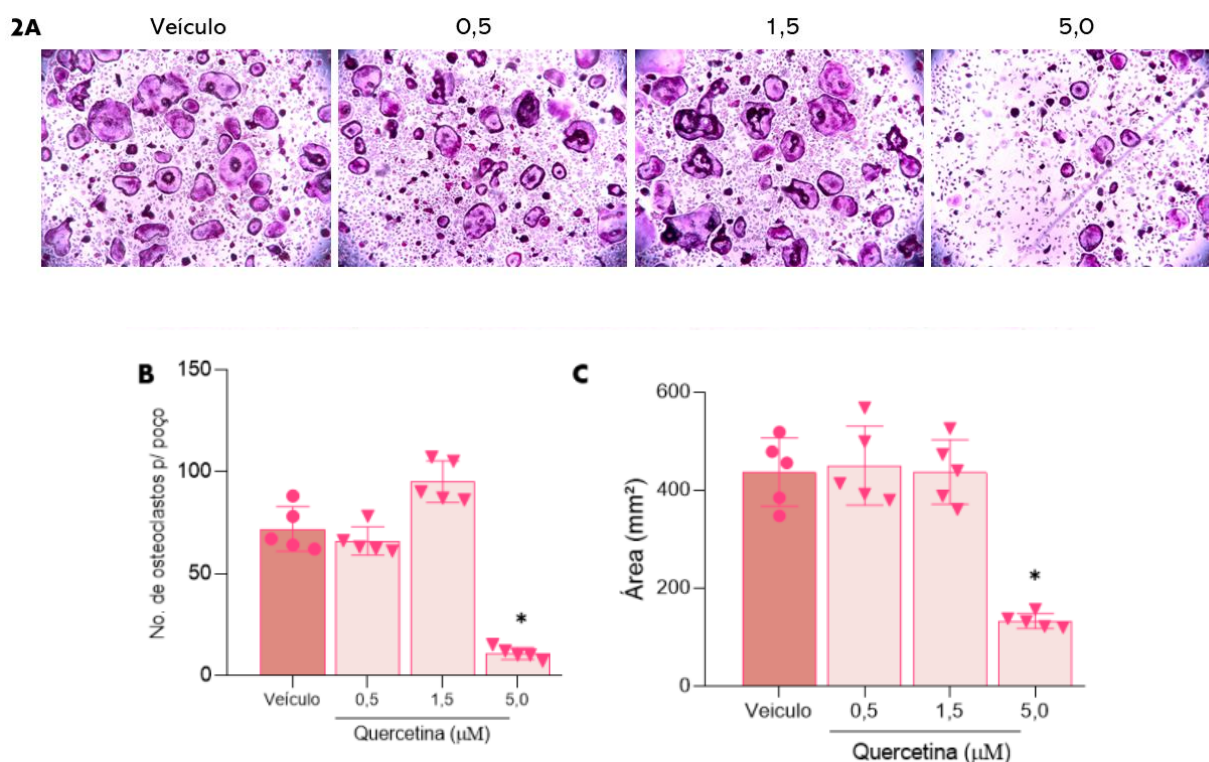


**Figura 1. Avaliação da viabilidade celular da Quercetina, Sr<sup>2+</sup> isolados e do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup>.** Pré-osteoclastos obtidos a partir de células de medula óssea de camundongos foram cultivadas na presença de Quercetina, Sr<sup>2+</sup> e do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> nas concentrações de 0,5µM, 1,5µM, 5,0µM e 15µM. A influência do veículo (DMSO 0,1%) foi avaliada. A análise estatística foi realizada pelo teste One-way ANOVA \*p<0.05.

## 5.2 O complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> inibe a diferenciação dos osteoclastos

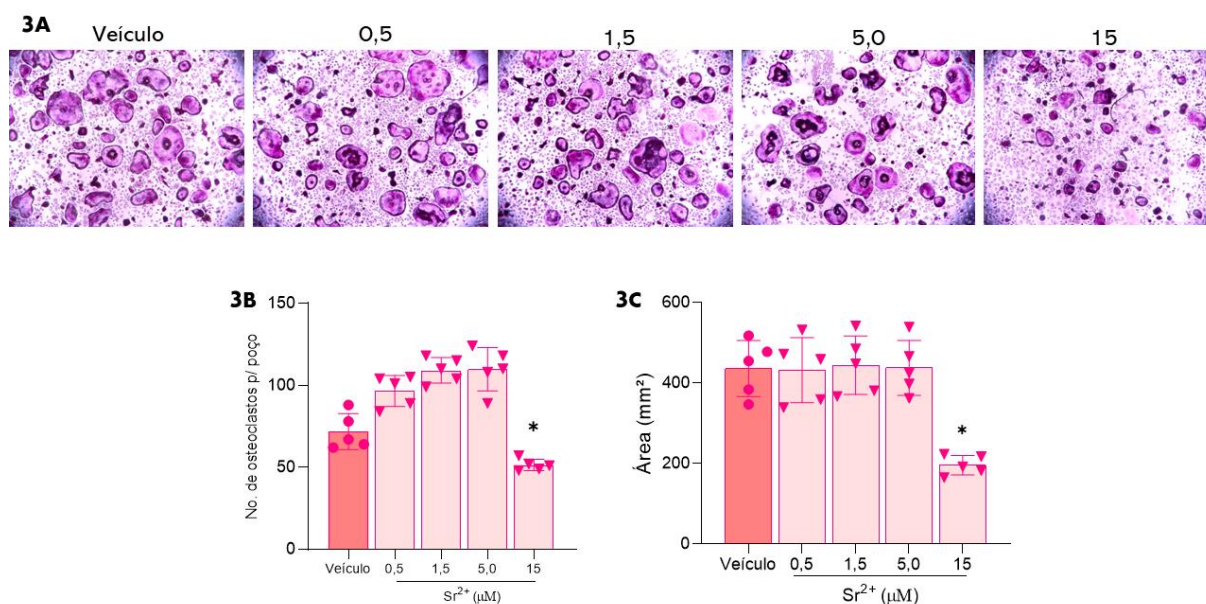
Realizamos uma avaliação do impacto do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> na cultura de osteoclastos. Para tal fim, conduzimos uma cultura primária de osteoclastos na presença dos compostos isoladamente, nomeadamente Quercetina, Sr<sup>2+</sup> e Quercetina-Sr<sup>2+</sup>. Os referidos compostos foram introduzidos no dia inicial da cultura em quatro concentrações distintas (0,5µM, 1,5µM, 5,0µM e 15µM) para o grupo Sr e Quercetina-Sr, enquanto o grupo tratado com Quercetina foi exposto a três concentrações distintas (0,5µM, 1,5µM, 5,0µM). Após um período de quatro dias de cultivo, as células foram fixadas e submetidas à coloração com TRAP para identificação e quantificação dos osteoclastos.

Evidencia-se uma diminuição na quantidade de osteoclastos no grupo submetido ao tratamento com Quercetina, particularmente na concentração de 5µM (FIGURA 2A). A análise quantitativa das células TRAP positivas corroborou a redução significativa no número de osteoclastos na concentração de 5,0 µM em comparação com o grupo controle (FIGURA 2B). Adicionalmente, na avaliação da área dos osteoclastos formados, constatou-se que o flavonoide isolado inibiu a fusão entre os pré-osteoclastos/osteoclastos, uma vez que a área foi significativamente menor em relação ao grupo veículo (FIGURA 2C).



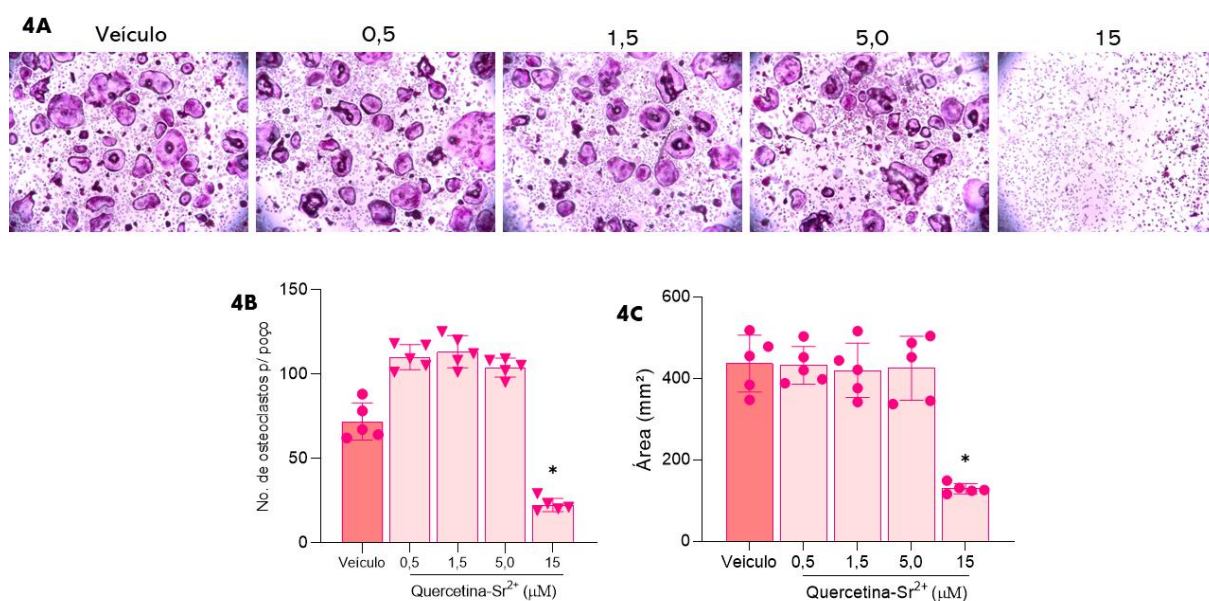
**Figura 2. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de Quercetina.**(A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por 4 dias, estimulados com Quercetina nas concentrações de 0,5 μM, 1,5 μM, 5,0 μM e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 10x. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAP-positivas por poço. A barra indica média ± desvio padrão da média (n=5). Foi utilizado o One-Way ANOVA para comparação entre os grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido de pós teste de Bonferroni \*P<0.05. Os dados são representativos de um experimento independente.

Os pré-osteoclastos foram submetidos à cultura na presença de diversas concentrações de Sr<sup>2+</sup>. Evidencia-se uma inibição na diferenciação de osteoclastos (Figura 3A), confirmando-se quando se analisou o número de osteoclastos formados. Notavelmente, o número de osteoclastos foi significativamente reduzido quando cultivados na presença de 15μM de Sr<sup>2+</sup> em comparação com o grupo controle, uma observação não reproduzida ao avaliar a área das células.



**Figura 3. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de Sr<sup>2+</sup>.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por 4 dias, estimulados com Sr<sup>2+</sup> nas concentrações de 0,5μM, 1,5μM, 5,0μM e 15μM e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 10x. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAP-positivas por poço. A barra indica média ± desvio padrão da média (n=5). Foi utilizado o One-Way ANOVA para comparação entre os grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One- Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni \*P<0.05. Os dados são representativos de um experimento independente.

Quando os pré-osteoclastos foram cultivados na presença do complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup>, observa-se uma inibição da osteoclastogênese (FIGURA 4A). Ao analisar o número de osteoclastos, constatou-se uma diminuição significativa no grupo submetido ao tratamento com Quercetina-Sr<sup>2+</sup> na concentração de 15μM, conforme ilustrado na FIGURA 4B. A análise quantitativa das células TRAP, juntamente com a avaliação da área dos osteoclastos (FIGURA 4B, 4C), também indicou uma inibição na diferenciação dos osteoclastos.



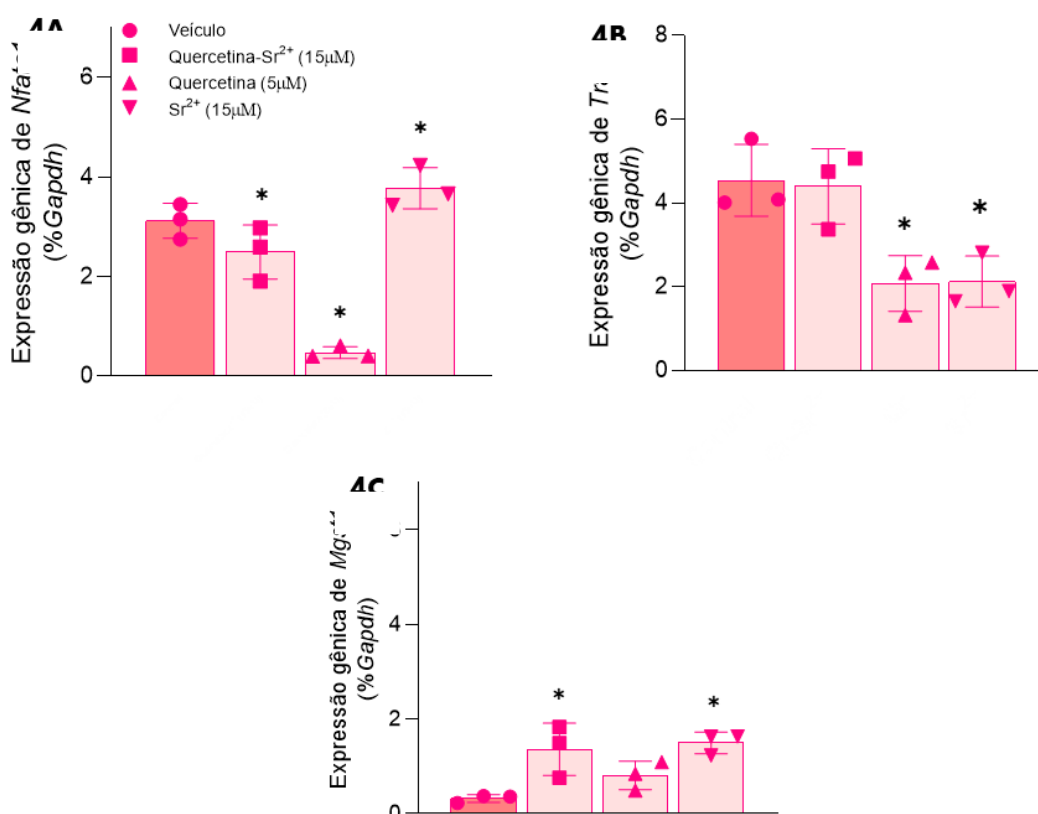
**Figura 4. Avaliação da diferenciação dos osteoclastos na presença de Quercetina-Sr<sup>2+</sup>.** (A) Imagens representativas de osteoclastos cultivados com meio osteoclastogênico (M-CSF + RANKL) por 4 dias, estimulados com Quercetina-Sr<sup>2+</sup> nas concentrações de 0,5μM, 1,5μM, 5,0μM e 15μM e coradas com TRAP. Estas imagens foram obtidas no aumento de 10x. (B) O gráfico representa a contagem do número total de células TRAPpositivas por poço. A barra indica média ± desvio padrão da média (n=5). Foi utilizado o One-Way ANOVA para comparação entre os grupos. (C) Gráfico indicando a média da área dos osteoclastos formados, avaliados estatisticamente por One-Way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni \*P<0.05. Os dados são representativos de um experimento independente.

### 5.3 Quercetina-Sr<sup>2+</sup> inibe a expressão gênica dos marcadores de diferenciação dos osteoclastos *in vitro*

O fator de transcrição NFATc1 desempenha um papel crucial como principal regulador no processo de osteoclastogênese. Quando ativado, este fator desencadeia a transcrição e síntese de proteínas fundamentais para a fusão celular, incluindo a β-integrina (Bertini *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2012). Diante disso, o passo subsequente consistiu em investigar o impacto dos compostos Quercetina-Sr<sup>2+</sup>, Quercetina e Sr<sup>2+</sup> no mencionado fator de transcrição, bem como nos marcadores de formação de osteoclastos, além da enzima *Mgst1* responsável pela defesa antioxidante, após um período de 48 horas de diferenciação.

A expressão de *Nfatc1* foi reduzida nos osteoclastos que foram incubados com Quercetina,  $Sr^{2+}$  e Quercetina- $Sr^{2+}$ , enquanto, inversamente, o  $Sr^{2+}$  induziu um aumento na expressão de *Nfatc1* (Figura 5A). A expressão de *Trap* não apresentou alterações significativas em resposta a nenhum dos compostos testados (Figura 5B).

Os resultados obtidos neste experimento indicam que os osteoclastos do grupo tratado com Quercetina- $Sr^{2+}$  e do grupo tratado com  $Sr^{2+}$  apresentaram uma expressão gênica mais elevada de *Mgst1* em comparação com o grupo controle (Figura 5C).



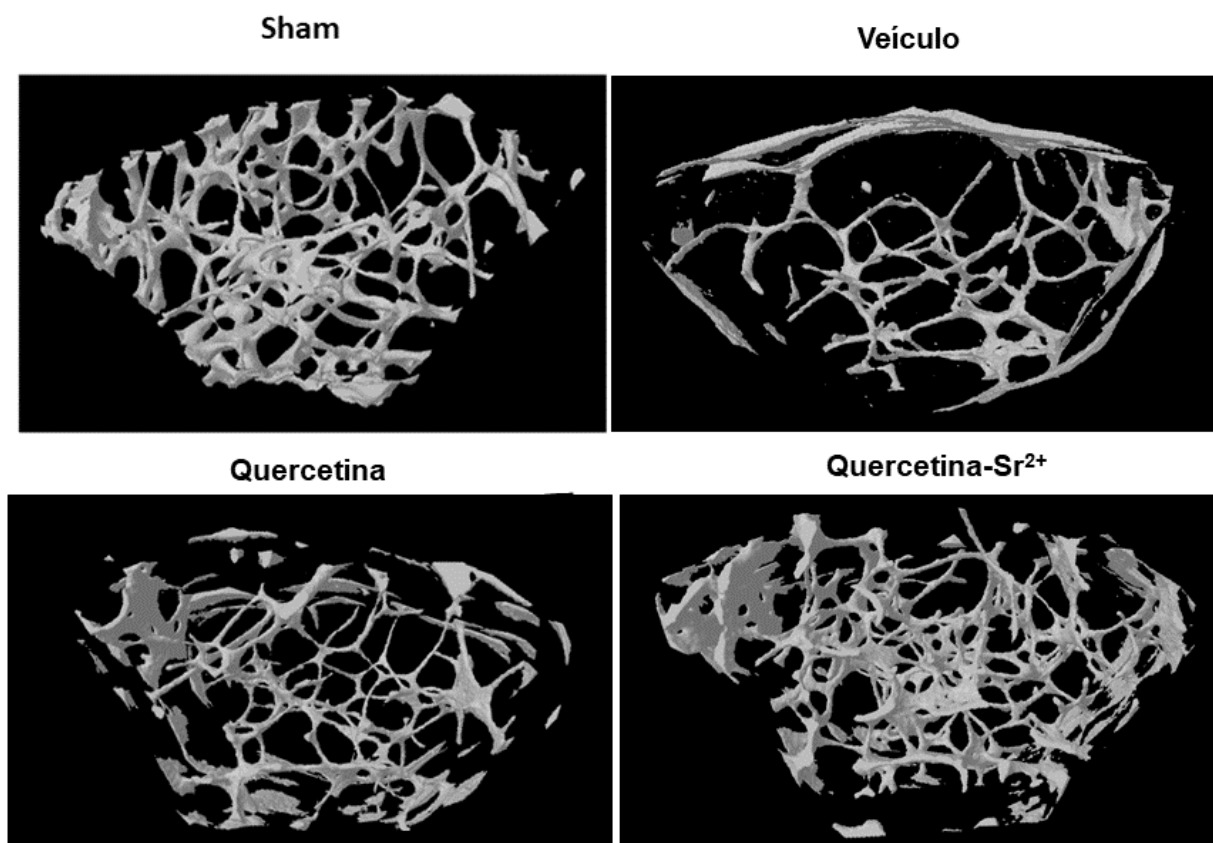
**Figura 5. Quercetina- $Sr^{2+}$  e Quercetina controlam a expressão gênica de marcadores de fusão *in vitro*.** Avaliação da expressão gênica de *Nfatc1*, *Trap* e *Mgst1* após 48 horas de cultivo dos osteoclastos do grupo. A barra indica média desvio padrão da média (n=3) de uma representação de um experimento independente. \*P<0,05, indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.

### 5.3 Avaliação *in vivo* da Quercetina- $Sr^{2+}$ na osteoclastogênese

#### 5.2.1 Quercetina- $Sr^{2+}$ regula a perda óssea em animais ovariectomizados

Tendo em vista a capacidade do complexo Quercetina- $Sr^{2+}$  de exercer um efeito regulador sobre a formação de osteoclastos *in vitro*, procedemos à etapa subsequente, que consistiu em avaliar se o tratamento com esse composto *in vivo*

influenciaria o remodelamento ósseo. A figura 6 são imagens representativas da microestrutura óssea provenientes de animais ovariectomizados e sujeitos ao tratamento com os diferentes compostos testados. Observa-se uma redução no osso trabecular do grupo que sofreu ovariectomia e foi tratado com veículo. Os grupos tratados com quercetina ou quercetina  $\text{Sr}^{2+}$  apresentaram uma semelhança na estrutura óssea com relação ao grupo sham (Figura 6).

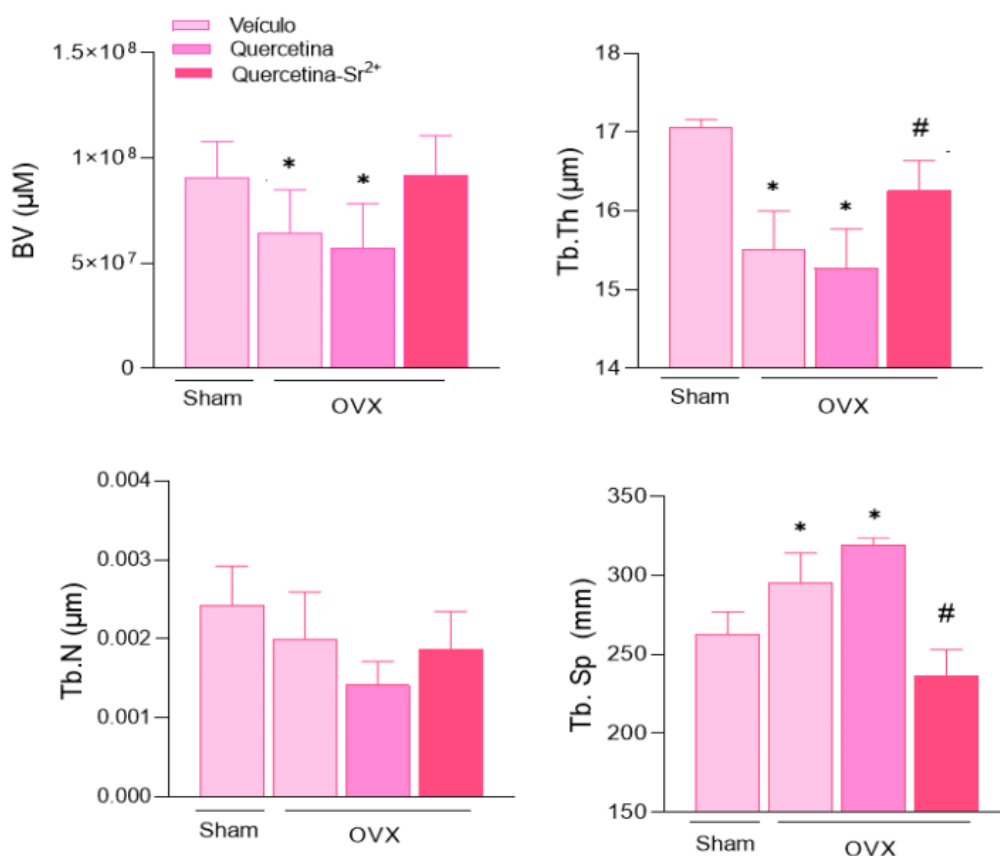


**FIGURA 6.** Fotos representativas do fêmur direito em 3D. Fêmures representativos na posição transversal dos grupos (A) sham (B) Veículo, (C) Grupo Quercetina e (D) Grupo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> (n=6) por microtomografia computadorizada.

Considerando a importância dos parâmetros ósseos na detecção da perda óssea in vivo, procedeu-se à quantificação do osso trabecular nos grupos sham, ovariectomizados e tratados com veículo ou os compostos testados. Foram examinados os parâmetros relacionados ao volume ósseo (BV) (FIGURA 7A), à espessura das trabéculas (Tb.Th) (FIGURA 7 B), à separação entre as trabéculas (Tb.Sp) (FIGURA 7C) e ao número de trabéculas (Tb.N) (FIGURA 7D). Analisando os



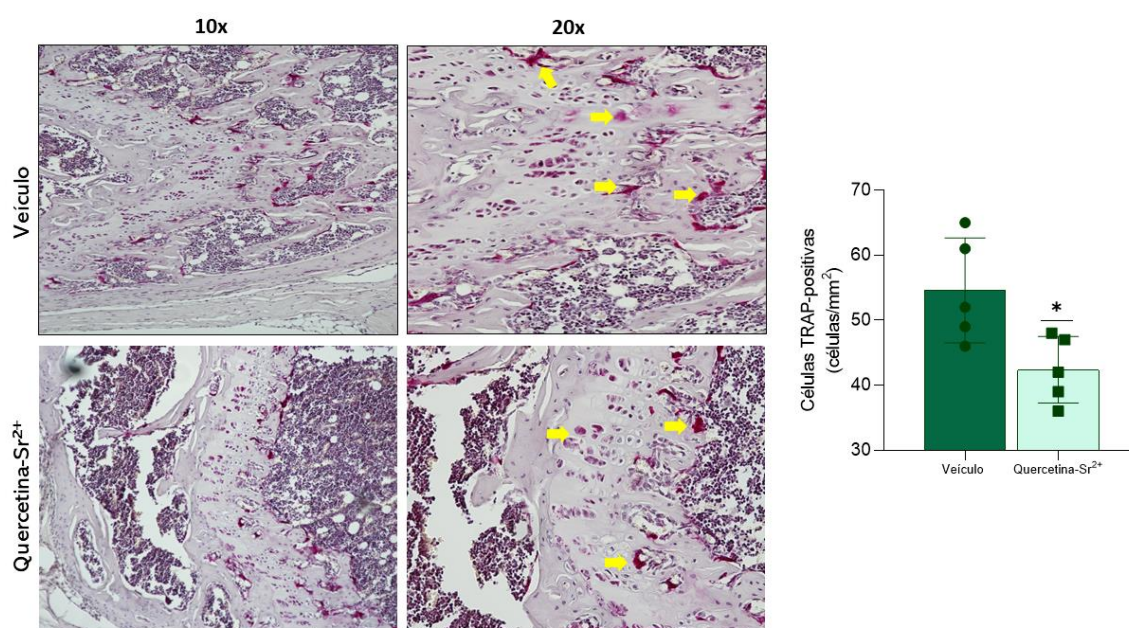
resultados obtidos no Volume Ósseo (BV), nota-se uma redução significativa nos grupos ovariectomizados tratados com veículo ou Quercetina. Já em relação a espessura de trabéculas (Tb.Th) os grupos ovariectomizados tratados com veículo ou Quercetina apresentaram uma redução significativa quando comparados ao grupo sham. Já grupo ovariectomizados e tratado com o complexo Quercetina-Sr<sup>2+</sup> demonstrou um aumento significativo quando comparado ao grupo ovariectomizados tratado com veículo. Após a análise da separação trabecular (Tb.Sp) observou-se um aumento na separação de trabéculas dos grupos ovariectomizados tratados com veículo ou quercetina em comparação com o grupo sham, e uma diminuição da separação trabecular no grupo ovariectomizado tratado com Quercetina-Sr<sup>2+</sup> em comparação com o grupo ovariectomizado tratado com veículo.



**Figura 7. Quercetina-Sr<sup>2+</sup> regula a perda óssea *in vivo*.** Avaliação da microarquitetura óssea de fêmures direitos na posição transversal (n=6) por microtomografia µCT. (A) Volume ósseo (BV), (B) Espessura trabecular (Tb.Th), (C) Separação de trabéculas (Tb.sp), (D) Número de trabéculas (Tb.n). As barras indicam média ± desvio padrão da média, de uma representação de um experimento (n=6). Foi utilizado o teste One-Way ANOVA, seguida do pós teste de Bonferroni, \*p <0,05 indica diferença em relação ao grupo sham, # p<0,05 indica diferença em relação ao grupo veículo.

### 5.3.1 Quercetina-Sr<sup>2+</sup> regula a osteoclastogênese *in vivo*

Conforme evidenciado nos experimentos anteriores, a Quercetina-Sr<sup>2+</sup> reduziu a osteoclastogênese *in vitro* e inibiu a perda óssea *in vivo*. O próximo passo envolveu a investigação do potencial do composto em modular o número de células TRAP positivas *in vivo*. Com esse objetivo, realizou-se coloração de TRAP em lâminas histológicas de tibia para identificar os osteoclastos. Os resultados indicam claramente uma diminuição significativa no número de osteoclastos no grupo ovariectomizado e tratado com o composto Quercetina-Sr<sup>2+</sup> em comparação ao grupo ovariectomizado tratado com veículo. Essas constatações sugerem que a Quercetina-Sr<sup>2+</sup> desempenha um papel protetor na perda óssea *in vivo*, corroborando sua influência na inibição das células osteoclásticas também *in vitro*.



**Figura 8. Quercetina-Sr<sup>2+</sup> regula a osteoclastogênese *in vivo*.** (A) fotos representativas das células TRAP positivas indicadas pelas setas amarelas na região de crescimento da tíbia do grupo Veículo e Quercetina-Sr<sup>2+</sup> (n=5) de animais com 16 semanas. As peças foram fotografadas no aumento de 10x e 20x. (B) Quantificação das células TRAP positivas. A barra indica  $\pm$  média desvio padrão na média (n=5), de uma representação de 2 experimentos independentes. \*P<0,05 indica diferença estatisticamente significativa, avaliados por teste t de Student.



## DISCUSSÃO

---

## 6. DISCUSSÃO

A osteoporose é uma condição caracterizada pela redução da densidade mineral dos ossos e pela deterioração de sua estrutura, resultando em fragilidade e susceptibilidade a fraturas (Rocha, 2011). Esta condição é mais prevalente em indivíduos idosos, especialmente mulheres pós-menopausa, devido à diminuição dos níveis hormonais, como o estrogênio, essencial para a integridade óssea. A etiologia da osteoporose envolve fatores genéticos, hormonais, nutricionais e ambientais (Miller, 2006), que perturbam o equilíbrio entre a formação e reabsorção óssea. Na osteoporose pós-menopausa, a diminuição dos níveis de estrogênio intensifica a atividade osteoclástica e resulta na morte de osteoblastos, ocasionando uma rápida perda de massa óssea. Vias de sinalização críticas, como a do fator de crescimento transformador beta (TGF- $\beta$ ) e a via Wnt, são comprometidas, contribuindo para a redução da formação óssea (Kessel, 2011). Inflamação crônica e estresse oxidativo também desempenham papéis significativos na osteoporose pós-menopausa (Deo Rio *et al.*, 2005).

O tratamento da osteoporose tem como objetivo reduzir o risco de fraturas, promover densidade óssea saudável e prevenir a perda de massa óssea (Rossouw *et al.*, 2002). A abordagem terapêutica atual inclui medicamentos antirreabsortivos, agentes anabolizantes e suplementos de cálcio e vitamina D. O ranelato de estrôncio, inicialmente utilizado devido à sua eficácia na redução do risco de fraturas, foi descontinuado devido a eventos cardíacos adversos (Doublier, 2011).

Os flavonoides, compostos naturais presentes em uma variedade de alimentos vegetais, conhecidos por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Havsteen, 2002), têm sido objeto de estudos *in vitro* utilizando a linhagem celular MC3T3-E1, revelando sua capacidade de influenciar a diferenciação dos osteoblastos (Liu *et al.*, 2009). Estudos *in vivo* também indicaram resultados promissores, sugerindo uma redução na perda de tecido ósseo (Eghbali *et al.*, 2003). Assim, a análise aprofundada das propriedades farmacológicas de compostos derivados de flavonoides e estrôncio emerge como uma perspectiva promissora para investigar alternativas ao ranelato de estrôncio. Dentro desse conjunto de compostos, a

quercetina destaca-se notavelmente, sendo objeto de amplos estudos devido ao seu potencial no tratamento da osteoporose (Yuan *et al.*, 2018).

A quercetina demonstra uma influência significativa na osteogênese, com efeitos descritos na literatura, tais como a redução da apoptose de osteoblastos, indução do aumento da diferenciação de osteoblastos, inibição da osteoclastogênese e diminuição do estresse oxidativo (Yuan *et al.*, 2018). A síntese de compostos de quercetina com metais alcalinos-terrosos tem sido objeto de estudo, sendo reportadas propriedades antioxidantes, uma vez que a redutibilidade da quercetina é aumentada quando associada a metais, facilitando sua oxidação por radicais livres (Silva *et al.*, 2020). Essas descobertas suscitam interesse e abrem possibilidades de investigação sobre o comportamento biológico de fitoquímicos associados a metais.

Considerando os impactos positivos dos flavonoides e do íon  $\text{Sr}^{2+}$  na saúde óssea, nosso grupo de pesquisa, sob a liderança da Professora Ana Paula Ramos da FFCLRP-USP, dedicou-se à síntese de complexos de flavonoides- $\text{Sr}^{2+}$ . A morina foi escolhida inicialmente, reconhecida por seus diversos benefícios à saúde (Arriagada *et al.*, 2016), como o flavonoide para formar o complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$ . O estudo revelou uma sinergia entre as propriedades osteogênicas associadas ao íon Sr e os efeitos benéficos osteogênicos do flavonoide no complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$  (Cruz *et al.*, 2019). Os efeitos positivos incluíram um aumento na expressão gênica da enzima fosfatase alcalina, responsável pela produção de fosfato inorgânico no corpo, e um aumento na atividade mineralizadora. Notavelmente, concentrações menores do complexo morina-Sr foram suficientes para estimular os osteoblastos e intensificar sua capacidade de mineralização, em comparação com o medicamento Ranelato de Estrôncio (Cruz *et al.*, 2019). Até o momento, os resultados indicam que o complexo morina- $\text{Sr}^{2+}$  possui um potencial promissor para terapias ósseas, embora ainda haja muito a compreender sobre como os íons  $\text{Sr}^{2+}$  regulam as atividades dos osteoblastos e osteoclastos.

Nesse contexto, nossa pesquisa concentrou-se na análise do complexo Quercetina- $\text{Sr}^{2+}$  e seu efeito na cultura de osteoclastos, células fundamentais para a homeostase óssea. Para o experimento, foram selecionadas concentrações 0,5, 1,5, 5,0 e 15  $\mu\text{M}$ . A viabilidade celular indicou que a concentração de 15  $\mu\text{M}$  de Quercetina no grupo tratado resultou em uma significativa diminuição na viabilidade celular, indicando um efeito prejudicial do flavonoide nas células, associado a uma redução

notável em sua viabilidade. No entanto, não foram observadas reduções na viabilidade celular nas concentrações testadas para  $\text{Sr}^{2+}$  e Quercetina- $\text{Sr}^{2+}$  quando comparadas ao grupo controle. Assim, os resultados sugerem que a combinação do flavonoide com o estrôncio reduz a toxicidade, visto que o complexo Quercetina- $\text{Sr}^{2+}$  não demonstrou citotoxicidade nas concentrações avaliadas.

O próximo estágio envolveu uma cultura primária de osteoclastos na presença dos compostos Quercetina,  $\text{Sr}^{2+}$  e Quercetina-  $\text{Sr}^{2+}$ , destacando o potencial inibitório da Quercetina (5,0 $\mu\text{M}$ ) e Quercetina-  $\text{Sr}^{2+}$  (15 $\mu\text{M}$ ). Além da contagem convencional de osteoclastos, as análises foram estendidas para considerar parâmetros como a área dos osteoclastos formados. Estes dados adicionais revelaram que a Quercetina-  $\text{Sr}^{2+}$  teve um impacto significativo na inibição da fusão entre pré-osteoclastos/osteoclastos, indicando que a combinação de Quercetina com  $\text{Sr}^{2+}$  pode inibir a formação, atividade e fusão dos osteoclastos. Este resultado vai de acordo com o estudo conduzido por Cruz e colaboradores (2019), que observou a capacidade do complexo flavonoide- $\text{Sr}^{2+}$  de suprimir a formação de osteoclastos. Esta influência pode ser benéfica para a homeostase óssea, uma vez que a atividade excessiva dos osteoclastos está associada à reabsorção óssea exacerbada (Eriksen, 2010).

Entretanto, é importante observar que os mecanismos subjacentes a essas observações demandam investigações mais aprofundadas, envolvendo estudos moleculares e análises das vias de sinalização envolvidas. A regulação gênica desempenha um papel central no processo complexo da osteoclastogênese, no qual o fator de transcrição NFATc1 (Fator de Ativação de Linfócitos T Nucleares tipo c1) emerge como um regulador chave (Winslow *et al.*, 2006). Quando ativado, esse fator de transcrição desempenha um papel crucial na transcrição e síntese de proteínas essenciais para a fusão celular, destacando sua importância no desenvolvimento de osteoclastos maduros (Bertini *et al.*, 2001; Xing *et al.*, 2012). Investigamos o impacto dos compostos - Quercetina-  $\text{Sr}^{2+}$ , Quercetina e  $\text{Sr}^{2+}$  - em dois marcadores de transcrição e fusão dos osteoclastos, assim como na expressão da enzima MGST1, responsável pela defesa antioxidante. Essa análise foi conduzida após um período de 48 horas de diferenciação, permitindo avaliar as respostas celulares em um estágio crítico de desenvolvimento.

O estudo observou uma redução na expressão gênica do *Nfatc1* nos grupos tratados com Quercetina-  $\text{Sr}^{2+}$  e Quercetina. Essa diminuição na expressão de *Nfatc1*

pode ter implicações na eficiência do processo de diferenciação dos osteoclastos, possivelmente influenciando o equilíbrio entre reabsorção e formação óssea. Além disso, os resultados revelam que os grupos Quercetina- Sr<sup>2+</sup> e Sr<sup>2+</sup> apresentam uma expressão gênica mais proeminente da enzima *MGST1* em comparação com o grupo veículo. Isso pode sugerir um efeito potencialmente positivo na defesa antioxidante, indicando uma possível contribuição desses compostos para mitigar o estresse oxidativo, um fator contribuinte na disfunção osteoclastogênica.

Em conjunto, os resultados apresentados sugerem que o composto Quercetina- Sr<sup>2+</sup> pode impedir os processos de diferenciação dos osteoclastos, com efeito na expressão gênica do marcador chave. Contudo, é crucial considerar que as vias de sinalização são complexas, e o impacto desses compostos pode ser mediado por múltiplos fatores e interações.

A aplicação de resultados obtidos *in vitro* para contextos *in vivo* é essencial na avaliação da eficácia e relevância clínica de intervenções terapêuticas. Nesse sentido, o presente estudo progrediu para investigar a capacidade do complexo Quercetina- Sr<sup>2+</sup> em modular a microestrutura óssea *in vivo*, buscando compreender se as observações feitas *in vitro* podem ser traduzidas para um modelo mais complexo e biologicamente relevante. A microestrutura óssea, visualizada por meio de microtomografia computadorizada (micro-CT), é uma representação visual do arranjo e densidade do osso trabecular, desempenhando um papel crucial na determinação da força e resistência óssea.

Camundongos OVX tratados com o composto Quercetina- Sr<sup>2+</sup> em uma dosagem específica (600µg/kg) apresentaram uma ampliação da quantidade de osso trabecular quando comparados aos grupos sham tratados com veículo. O osso trabecular, intimamente associado à resistência e força óssea, foi avaliado quanto aos parâmetros relacionados ao volume ósseo (BV), espessura das trabéculas (Tb.Th), separação entre as trabéculas (Tb.Sp) e número de trabéculas (Tb.N), proporcionando uma compreensão mais abrangente dos efeitos do tratamento com o complexo Quercetina- Sr<sup>2+</sup> sobre a saúde óssea.

Os resultados derivados dessa avaliação revelam uma descoberta notável: os parâmetros BV e Tb.Th demonstraram valores significativamente superiores no grupo tratado com o complexo Quercetina- Sr<sup>2+</sup> em comparação aos grupos sham e

ovariectomizado tratados com veículo, sugerindo que o composto Quercetina-Sr<sup>2+</sup> influencia positivamente a densidade óssea trabecular. Estes parâmetros, representativos de aspectos fundamentais da densidade e arquitetura óssea, são frequentemente considerados indicativos da saúde óssea, indicando que o tratamento está associado a uma redução na perda óssea. Essas conclusões são consistentes com achados prévios que demonstraram os efeitos positivos da Quercetina- Sr<sup>2+</sup> na microestrutura óssea in vivo e podem ser atribuídas à influência benéfica do composto na regulação das atividades dos osteoclastos, bem como na modulação de vias de sinalização relacionadas à diferenciação e atividade osteoclástica, indicando um potencial efeito inibidor sobre a perda óssea durante a menopausa.

CONCLUSÃO

---

## 7. CONCLUSÃO

O presente estudo mostra evidências que o composto Quercetina-Sr<sup>2+</sup> inibe a diferenciação de osteoclastos e influencia positivamente a densidade óssea trabecular em modelo experimental de perda óssea.



## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- ARRIAGADA, F.; CORREA, O.; GUNTHER, G.; NONELL, S.; MURA, F.; OLEA AZAR, C.; MORALES, J. Morin Flavonoid Adsorbed on Mesoporous Silica, a Novel Antioxidant Nanomaterial. *Plos One*, v. 11, n. 11, p. e0164507, 2016.
- ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*, v. 40, n. 2, p. 251–264, 2007.
- BECKER, C. Pathophysiology and clinical manifestations of osteoporosis. *Clin Cornerstone*, v. 8, n. 1, pp. 19-27, 2006.
- BONEWALD, L. F. The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 26, n. 2, p. 229–238, 2011.
- BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Diferenciação e ativação de osteoclastos. *Nature*, v. 423, n. 6937, p. 337-342, 2003.
- BURLET, N.; REGINSTER, J. Y. Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone*, v. 38, n. 2 Suppl 1, p. S4-9, 2006.
- CANHÃO, H.; FONSECA, J. E.; QUEIROZ, J. V. Epidemiologia da osteoporose, mecanismos de remodelação óssea e fatores protetores do osso. *Acta Reum Port*, v. 30, p. 225-240, 2005.
- CAPULLI, M.; PAONE, R.; RUCCI, N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 561, p. 3–12, 2014.
- CHEN, L. R.; KO, N. Y.; CHEN, K. H. Isoflavone Supplements for Menopausal Women: A Systematic Review. *Nutrients*, v. 11, n. 11, p. 2649, 2019.
- CHRISCHILLES, E.; SHIREMAN, T. E.; WALLACE, R. Costs and health effects of osteoporotic fractures. *Bone*, v. 15, p. 337-386, 1994.
- CLARKE, B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, v. 3, p. 131-139, 2008.
- CRUZ, M. A. E.; SOARES, M. P. R.; PAZIN, W.; ITO, A. S.; FUKADA, S. Y.; CIANCAGLINI, P.; RAMOS, A. P. Interface-driven Sr-morin complexation at Langmuir monolayers for bioactive coating design. *Colloids Surf B Biointerfaces*, v. 181, p. 856-863, 2019.
- CUNHA, R.; BALESTRA, C.; PRIMER, L. Osteoporosis and the Different Types of Physical Exercise: A Review. Disponível em <<http://www.efdeportes.com/>>. *Revista Digital Buenos Aires - Año 13 - Nº 119*, 2008.
- DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, v. 15, n. 4, p. 316–328, 2005.
- DOUBLIER, A.; FARLAY, D.; KHEBBAB, M. T.; JAURAND, X.; MEUNIER, P. J.; BOIVIN, G. Distribution of Strontium and Mineralization in Iliac Bone Biopsies from Osteoporotic. *Eur J Endocrinol*, v. 165, n. 3, p. 469-476, 2011.
- ERIKSEN, E. F. Cellular Mechanism of Bone Remodeling. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, v. 11, p. 219-227, 2010. doi: 10.1007/s11154-010-9153-1. European Medicines Agency. PRAC recommends suspending use of Protelos/Osseor (strontium ranelate). 10 January 2014.

FALONI, P. S.; CERRI, P. S. Mecanismos celulares e moleculares do estrógeno na reabsorção óssea. *Revista de Odontologia da UNESP*, v. 36, n. 2, p. 181-188, 2007.

GALLAGHER, J. C.; SAI, A. J. Molecular biology of bone remodeling: implications for new therapeutic targets for osteoporosis. *Maturitas*, v. 65, n. 4, p. 301-307, 2010.

GRIGORIADIS, A. E.; HEERSCHE, J. N.; AUBIN, J. E. Differentiation of muscle, fat, cartilage, and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *The Journal of Cell Biology*, v. 106, n. 6, p. 2139–2151, 1988.

HATTERSLEY, G.; OWENS, J.; FLANAGAN, A. M.; CHAMBERS, T. J. Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) is essential for osteoclast formation in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 177, n. 1, p. 526-531, 1991.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 96, n. 2-3, p. 67-202, 2002.

KALERVO-VAANANEN, H.; LAITALA-LEINONEN, T. Osteoclast lineage and function. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 473, n. 2, p. 132–138, 2008.

KIM, Y.; KEOGH, J. B.; CLIFTON, P. M. Polyphenols and Glycemic Control. *Nutrients*, v. 8, p. 17, 2016.

KLING, J. M.; CLARKE, B. L.; SANDHU, N. P. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. *Journal of Women's Health (2002)*, v. 23, n. 7, p. 563–572, 2014.

LACEY, D. L.; TIMMS, E.; TAN, H. L.; KELLEY, M. J.; DUNSTAN, C. R.; BURGESS, T.; ELLIOTT, R.; COLOMBERO, A.; ELLIOTT, G.; SCULLY, S.; HSU, H.; SULLIVAN, J.; HAWKINS, N.; DAVY, E.; CAPPARELLI, C.; ELI, A.; QIAN, Y. X.; KAUFMAN, S.; SAROSI, I.; SHALHOUB, V.; BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, v. 93, n. 2, p. 165–176, 1998.

LAU, R. Y.; GUO, X. A Review on Current Osteoporosis Research: with Special Focus on Disuse Bone Loss. *Journal of Osteoporosis*, 2011, p. 1-7, 2011.

LIU, H. et al. MECC determination of oleonic acid and urosolic acid isomers in *Ligustrum Lucidum* Ait. *Pharm Biomed Anal.*, v. 32, p. 479-485, 2003.

LUCHIN, A.; SUCHTING, S.; MERSON, T.; ROSOL, T. J.; HUME, D. A.; CASSADY, A. I.; OSTROWSKI, M. C. Genetic and Physical Interactions between Microphthalmia Transcription Factor and PU.1 Are Necessary for Osteoclast Gene Expression and Differentiation. *J. Biol. Chemistry*, v. 276, p. 36703–36713, 2001.

MILLER, R. Osteoporose pós-menopáusia. *Geiatrics*, v. 2, p. 42-52, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55–63, 1983.

NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; YANO, K.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 253, n. 2, p. 395–400, 1998. doi.org/10.1006/bbrc.1998.9788.

NATIONAL OSTEOPOROSIS FOUNDATION. *Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis*. Washington, DC: National Osteoporosis Foundation, 2010.

NGUYEN, T.; HOWARD, G.; KELLY, P.; EISMAN, J. Bone Mass, Lean Mass, and Fat Mass: Same Genes or Same Environments?. *American Journal of Epidemiology*, v. 147, n. 1, p. 1-14, 1998.

- O'CONNELL, M.B. Prescription drug therapies for prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *J Manag Care Pharm*, v. 12, n. 6 Suppl A, p. S10-9; quiz S26-8.I, 2006.
- PARIKKA, V., et al. Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts. *Endocrinology*, v. 142, p. 5371-5378, 2001.
- PATRÍCIO, JP., et al. Osteoporose induzida por corticóides. *Arquivos de Medicina*, v. 20, n. 6, p. 173-178, 2006.
- RAGGATT, L.J.; PARTRIDGE, NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 33, 2010.
- ROSSOUW, J. E., et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, v. 288, n. 3, p. 321–333, 2002.
- RUCCI, N., & TETI, A. The "love-hate" relationship between osteoclasts and bone matrix. *Matrix Biology: Journal of the International Society for Matrix Biology*, v. 52-54, p. 176–190, 2016.
- SEGOVIA-SILVESTRE, T., et al. Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations. *Human Genetics*, v. 124, n. 6, p. 561–577, 2009.
- SILVEIRA, V., AMADEI, S., PEREIRA, A., CARVALHO, Y., ROCHA, RO. Effect of estrogen deficiency on bone turnover and bone repair. *J. Bras. Patol. Med. Lab.*, v. 42, n. 1, 2006.
- SŁUPSKI, W., JAWIEŃ, P., NOWAK, B. Botanicals in Postmenopausal Osteoporosis. *Nutrients*, v. 13, n. 5, p. 1609, 2021.
- TAKAYANAGI, H., KIM, S., MATSUO, K., SUZUKI, H., SUZUKI, T., SATO, K., YOKOCHI, T., ODA, H., NAKAMURA, K., IDA, N., WAGNER, E. F., & TANIGUCHI, T. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature*, v. 416, n. 6882, p. 744–749, 2002.
- TAN, S., ZHANG, B., ZHU, X., AO, P., GUO, H., YI, W., ZHOU, GQ. Deregulation of bone forming cells in bone diseases and anabolic effects of strontium-containing agents and biomaterials. *BioMed Research International*, 2014, 814057, 2014.
- TELLA, SH., GALLAGHER, JC. Prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v. 142, p. 155-170, 2014.
- WINSLOW, MM., PAN, M., STARBUCK, M., GALLO, EM., DENG, L., KARSENTY, G., CRABTREE, GR. Calcineurin/NFAT signaling in osteoblasts regulates bone mass. *Developmental Cell*, v. 10, n. 6, p. 771–782, 2006.
- YAVROPOULOU, MP., YOVOS, JG. Osteoclastogenesis - current knowledge and future perspectives. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, v. 8, n. 3, p. 204-216, 2008.