

Elisa Hiromi Shiga

Estudo da influência da secreção cutânea do anfíbio *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*) sobre o processo de formação *in vitro* de osteoclastos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Versão corrigida

São Paulo

2023

Elisa Hiromi Shiga

Estudo da influência da secreção cutânea do anfíbio *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*) sobre o processo de formação *in vitro* de osteoclastos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxinologia do Instituto Butantan, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Irina Kerkis

Versão corrigida

São Paulo

2023

### **Versão corrigida**

Este exemplar foi revisado e alterado em relação a versão original, sob responsabilidade única do autor e com anuência de seu orientador

São Paulo, 13 de julho de 2023



Elisa Hiromi Shiga



Dra Irina Kerkis

### **Catálogo na Publicação Instituto Butantan**

Shiga, Elisa Hiromi

Estudo da influência da secreção cutânea do anfíbio *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*) sobre o processo de formação in vitro de osteoclastos/ Elisa Hiromi Shiga ; orientador (a) Irina Kerkis. – São Paulo, 2023.

65 p. : il. color.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Butantan, Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. Linha de pesquisa: Biologia integrada à toxinologia. Versão corrigida final

1. Osteoclastogênese. 2. *Rhinella schneideri*. 3. *Rhinella diptycha*. 4. Secreção cutânea. I. Kerkis, Irina. II. Instituto Butantan. III. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

Esta monografia foi elaborada com base no **Guia prático para elaboração de trabalho acadêmico** desenvolvido pela Biblioteca do Instituto Butantan, de acordo com as normas da ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas).

## AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO DO TRABALHO

Eu, Elisa Hiromi Shiga, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências - Toxinologia do Instituto Butantan, autorizo a divulgação de minha dissertação por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total desta dissertação após publicação, para fins acadêmicos desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação da dissertação após a data da defesa:

- Imediato  
 06 meses  
 12 meses  
 Não autorizo a divulgação

Justifique:

São Paulo, 02 de maio de 2023.

  
.....  
Aluna: Elisa Hiromi Shiga

De acordo: .....  
Orientadora: Prof. Dra. Irina Kerkis

# PÓS - GRADUAÇÃO



## PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS-TOXINOLOGIA INSTITUTO BUTANTAN

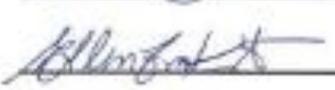
### RESULTADO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO

#### MESTRADO

NOME DA ALUNA: Elisa Hiromi Shiga

DATA DO EXAME: 02/05/2023

BANCA EXAMINADORA: Profs. Drs.

NOME	Assinatura	Aprovada	Reprovada
Irina Kerkis (Presidente)		(X)	( )
Guilherme Rabelo Coelho		(X)	( )
Ellen Emi Kato		(X)	( )

DECISÃO FINAL: APROVADA (X) REPROVADA ( )

#### Comentários da Banca (opcional):

A aluna apresenta domínio do conteúdo e dos resultados, contudo, o manuscrito apresenta a falta de organização da apresentação da aluna.

Sugerimos revisão do manuscrito de maneira geral, baseando nos apontamentos realizados e explicações apresentadas, considerando a aluna aprovada.



INSTITUTO SUEL ABUJAMRA/  
SP



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ISOLAMENTO DE CULTURA PRIMÁRIA DE OSTEOCLASTOS A PARTIR DE SANGUE PERIFÉRICO DE SERES HUMANOS

**Pesquisador:** Irina Kerkis

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 57381316.8.0000.5477

**Instituição Proponente:** Instituto Butantan

**Patrocinador Principal:** Instituto Butantan

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.806.596

#### **Apresentação do Projeto:**

Os osteoclastos são células ósseas críticas na manutenção, reparação e remodelação de ossos do esqueleto. Durante o processo de reabsorção óssea, ocorre a digestão de compostos de proteínas hidratadas e de sais minerais em um nível molecular. Muitas doenças ósseas, incluindo a osteoporose, envolvem alterações na reabsorção óssea por ação dos osteoclastos. Os sinais de Ca (+2) de osteoclastos são cruciais para diversas funções celulares e são de grande importância para a diferenciação dos osteoclastos. Tem sido demonstrado que o ativador do receptor do ligante do NF- $\kappa$ B (RANKL) aumenta a inibição da motilidade celular e a reabsorção de estruturas do citoesqueleto em osteoclastos maduros, resultando na supressão da atividade de reabsorção óssea. Algumas pesquisas recentes indicam que a indução do RANKL está envolvida na liberação do Ca (+2) intracelular dos canais de trifosfato inositol 1, 4, 5 nos sítios de armazenamento de Ca (2+). Os principais alvos envolvidos com liberação intracelular de Ca (2+) a partir do retículo endoplasmático (RE) são os receptores de rianodina (RyRs), receptores de trifosfato inositol (IP3Rs), bem como proteínas, associada: calmodulina (CaM) e calsequestrina (CSQ), e outros canais tipo L de Ca (2+) (Cav1.1 / 1.2). Alterações nas concentrações intracelulares de Ca (2+) por diferentes estímulos (moduladores) também parecem regular a diferenciação e as funções dos osteoclastos e esses moduladores poderiam ser usados como novos compostos terapêuticos envolvidos na

**Endereço:** Rua Tamandaré, 693 - 2º andar, São Paulo, SP

**Bairro:** LIBERDADE

**CEP:** 01.525-001

**UF:** SP

**Município:** SAO PAULO

**Telefone:** (11)3385-8008

**Fax:** (11)3203-0851

**E-mail:** cep.abujamra@yahoo.com.br



INSTITUTO SUEL ABUJAMRA/  
SP



Continuação do Parecer: 1.808.566

remodelação óssea. Os alvos prováveis da crotamina e/ou miotoxina-a são proteínas envolvidas na regulação de  $Ca^{2+}$  intracelular. O objetivo do nosso projeto é investigar a base molecular para a diferenciação e ativação dos osteoclastos usando crotamina / miotoxina-a como uma ferramenta para a detecção de alvos intracelulares relacionados ao  $Ca^{2+}$  nos precursores de osteoclastos e em osteoclastos maduros. Muitas outras perguntas podem ser foco do presente estudo, por exemplo, a modulação e ativação de store-operated channels (SOCs), que são ativados pelo cálcio intracelular, particularmente do retículo endoplasmático rugoso. A grande vantagem da crotamina/ miotoxina-a ser usada como ferramenta para a descoberta de novos alvos intracelulares é a sua capacidade única, que não é típica para outras toxinas, de penetrar no interior das células e de se ligar a diferentes organelas celulares, tais como o núcleo da célula, nucléolo (DNA/ RNA), retículo endoplasmático e mitocôndrias. Assim, esse projeto tem por objetivo investigar as bases moleculares para diferenciação e ativação dos osteoclastos usando a crotamina/miotoxina-a como ferramenta para detecção de novos alvos intracelulares relacionados ao cálcio nos osteoclastos. Para tanto será necessário estabelecer uma linhagem celular de osteoclastos através do isolamento de células da linhagem monocítica/macrofágica de sangue periférico de seres humanos que será utilizada para atender o objetivo principal do projeto.

**Objetivo da Pesquisa:**

Investigação das bases moleculares para diferenciação e ativação dos osteoclastos usando a crotamina/miotoxina-a como ferramenta para detecção de novos alvos intracelulares relacionados ao cálcio nos osteoclastos.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos- A pesquisa acarretará risco mínimo, uma vez que só serão coletadas amostras de sangue periférico. Benefícios - O estudo contribuirá melhor compreender o papel dos osteoclastos nas doenças ósseas humanas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trabalho bem descrito e tema muito interessante.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Folha de rosto preenchida corretamente

TCLE – Colocar que o TCLE foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Suel Abujamra, telefone de contato: (11) 3385 6006 (terças e quintas das 8h00 as 11h00)

**Endereço:** Rua Tamandará, 893 - 9º andar, São Paulo, SP  
**Bairro:** LIBERDADE **CEP:** 01.525-001  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)3385-6006 **Fax:** (11)3203-0851 **E-mail:** cep.sabujamra@yahoo.com.br



INSTITUTO SUEL ABUJAMRA/  
SP



Continuação do Parecer: 1.808.598

**Recomendações:**

Colocar que o TCLE foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Suel Abujamra, telefone de contato: (11) 3385 8006 (terças e quintas das 8h00 as 11h00)

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Aprovado

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_712727.pdf	25/05/2016 17:16:03		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	25/05/2016 17:14:00	Irina Kerkis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetoeticahumana.doc	25/05/2016 17:12:41	Irina Kerkis	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.docx	25/05/2016 17:11:47	Irina Kerkis	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 05 de Novembro de 2016

---

Assinado por:  
MARCIA FERRARI PEREZ  
(Coordenador)

Endereço: Rua Tamandaré, 893 - 9º andar, São Paulo, SP  
Bairro: LIBERDADE CEP: 01.525-001  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)3385-8006 Fax: (11)3203-0851 E-mail: cep.sabujamra@yahoo.com.br

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Irina Kerkis  
Área: Laboratório De Genética

Título da proposta: "Estudo da influencia da secreção cutanea do anfibio rhinella diptycha(R. schneideri) sobre o processo de formação in vitro de osteoclastos".

**Parecer Consubstanciado da CEUA IB**

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, na reunião de 16/06/2023, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.



Luís Roberto de Camargo Gonçalves  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de  
Animais  
Instituto Butantan de São Paulo

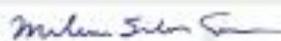
**CERTIFIED**

We certify that the proposal entitled: "Study of the influence of the cutaneous secretion of the amphibian *Rhinella diptycha* (*R. schneideri*) on the process of *in vitro* formation of osteoclasts", protocol number CEUAx 2519090523 (000511), under the responsibility Irina Kerkis, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of Butantan Institute of São Paulo, and was approved in the meeting of day June 16, 2023.

Certificamos que a proposta intitulada: "Estudo da influência da secreção cutânea do anfíbio *Rhinella diptycha* (*R. schneideri*) sobre o processo de formação *in vitro* de osteoclastos", protocolado sob o CEUAx nº 2519090523, sob a responsabilidade de Irina Kerkis, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto Butantan de São Paulo, e foi aprovado na reunião de 16 de junho de 2023.



Luis Roberto de Camargo Gonçalves  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Instituto Butantan de São Paulo



Milene Silva Tino  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de  
Animais  
Instituto Butantan de São Paulo

Dedico esse trabalho a minha mãe, Dona Maria, que já se foi, mas continua sendo minha maior força e inspiração na vida, ao meu pai Takashi por ser esse grande companheiro de bons e maus momentos. As minhas filhas Julia e Livia razões do meu viver e que fazem tudo valer a pena, a minha irmã Vania pela cumplicidade, e a minha tia Lilina, que nos deixou a pouco tempo mas fez muito por mim ao longo da sua vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Dra. Irina Kerkis por ter me recebido de braços e coração abertos no laboratório juntamente com Dr. Álvaro Rossan.

Ao Dr. Waldir Elias, meu querido amigo, pelas conversas, conselhos, apoio e carinho.

A Dra. Ellen Emi Kato minha docente de acompanhamento pela sua dedicação

Aos colegas e amigos da genética Eduardo, Denner, Adriana, Hugo, Giovanna, Mariana, Fernanda, Thais, Vivian, Isabella, Michelle, Anderson, Vitor, Rodrigo, ao pessoal administrativo e técnico, por todo apoio, incentivo e paciência que tiveram comigo ao longo da minha jornada.

Aos colegas e amigos dos outros laboratórios Gabriel, Rodrigo, Danilo, Michelle pela motivação mesmo em frente as minhas dificuldades.

As meninas da secretaria da Pós por me aguentarem

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram na concretização deste trabalho.

Levarei em meu coração todos com quem convivi intensamente durante estes últimos anos, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram desenvolver tanto no mundo acadêmico como no pessoal neste capítulo tão importante de minha vida.

Este trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Este trabalho teve apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP processo 2015/50040-4 (Programa Centros de Pesquisa em Engenharia).

Agradeço a Fundação Butantan e ao Instituto Butantan.

“Se você só fizer o que sabe, nunca será nada além do que já é”

Mestre Shifu - Kung Fu Panda

## RESUMO

SHIGA, Elisa Hiromi. Estudo da influência da secreção cutânea do anfíbio *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*) sobre o processo de formação *in vitro* de osteoclastos. 2023. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências - Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Os osteoclastos (OCs) são células multinucleadas, especializadas em reabsorver a matriz óssea calcificada. OCs se derivam de células precursoras hematopoiéticas e podem ser gerados *in vitro* pela estimulação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) com as citocinas M-CSF e RANKL. Ativação anormal dos OCs ocorre em patologias como osteoporose, artrite reumatoide, osteoartrite, doença periodontal, doença de Paget, cânceres metastáticos e outras, causando morbidade e promovendo limitações físicas. A inflamação crônica leva à secreção de muitas citocinas pró-inflamatórias e RANKL entre elas. Estas citocinas são as principais responsáveis pela ativação dos osteoclastos e subsequente destruição óssea. O envenenamento, causado por diferentes espécies animais (abelhas, rãs, escorpiões, cobras etc.), é conhecido também por induzir um processo inflamatório local e agudo. O efeito dos venenos destes animais na diferenciação, maturação e degeneração dos OCs é desconhecido. Para melhorar a compreensão da fisiologia dos OCs, e de uma possível interferência em seus processos de formação e função, utilizamos um modelo de diferenciação a partir das PBMCs humanas. As PBMCs foram induzidas para diferenciação osteogênica utilizando o protocolo de rotina. Em seguida tratamos as PBMCs com a secreção cutânea do anfíbio *Rhinella dypticha* (*Rhinella schneideri*) para avaliar o seu efeito no processo de diferenciação dos OCs que pode ser dividida em três fases, pré-osteoclastos, OCs e OCs maduros multinucleados. Quando utilizamos a secreção cutânea do anfíbio nas concentrações de 25 ng/mL e 2,5 ng/mL observamos a diminuição estatisticamente significativa na viabilidade dessas células. Adicionalmente mostramos que, as concentrações mais baixas de 0,25 ng/mL e 0,125 ng/mL embora não tenham sido tóxicas induziram a diminuição de formação dos OCs

que foi evidenciado pela Fosfatase Acida Resistente ao Tartarato (TRAP) positivo que é um marcador de OCs maduros. Já com a marcação com Faloidina conjugada, vimos que a concentração de 0,25 ng/mL afetou a formação dos OCs multinucleadas devido a diminuição do número de células de 2 e de 3 - 5 núcleos. Os resultados obtidos sugerem a presença de moléculas na secreção cutânea de *Rhinella diptycha* que influenciam a diferenciação de OCs *in vitro* diminuindo a formação dos OCs TRAP positivas – maduras e afetam o processo de formação das OCs multinucleadas de 2 a 5 núcleos.

Palavras-chave: Osteoclastos. *Rhinella schneideri*. *Rhinella diptycha*. Secreção cutânea. PBMC. Osteoclastogênese.

## ABSTRACT

SHIGA, Elisa Hiromi. Study of the influence of the cutaneous secretion of the amphibian *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*) on the process of *in vitro* formation of osteoclasts. 2023. 65p. Master's thesis (Master's degree in Sciences - Toxinology) – Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

Osteoclasts (OCs) are multinucleated cells, specialized in reabsorbing calcified bone matrix. OCs are derived from hematopoietic precursor cells and can be generated *in vitro* by stimulation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) with the cytokines M-CSF and RANKL. Abnormal activation of OCs occurs in pathologies such as osteoporosis, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, periodontal disease, Paget's disease, metastatic cancers and others, causing morbidity and promoting physical limitations. Chronic inflammation leads to the secretion of many pro-inflammatory cytokines and RANKL among them. These cytokines are primarily responsible for osteoclast activation and subsequent bone destruction. Poisoning, caused by different animal species (bees, frogs, scorpions, snakes, etc.), is also known to induce a local and acute inflammatory process. The effect of the venoms of these animals on the differentiation, maturation and degeneration of OCs is unknown. To improve the understanding of the physiology of OCs, and a possible interference in their formation and function processes, we used a model of differentiation from human PBMCs. PBMCs were induced for osteogenic differentiation using the routine protocol. Then we treated the PBMCs with the cutaneous secretion of the amphibian *Rhinella dypticha* (*Rhinella schneideri*) to evaluate its effect on the OC differentiation process, which can be divided into three stages, pre-osteoclasts, OCs and mature multinucleated OCs. When we used amphibian skin secretion at concentrations of 25 ng/mL and 2.5 ng/mL, we observed a statistically significant decrease in the viability of these cells. Additionally, we showed that the lower concentrations of 0.25 ng/mL and 0.125 ng/mL, although not toxic, induced a decrease in the formation of OCs, which was evidenced by a positive Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP), which is a marker of OCs. mature. With the labeling with Phalloidin conjugated, we saw that the concentration of 0.25 ng/mL affected the formation of multinucleated OCs due to the decrease in the number of

cells with 2 and 3 - 5 nuclei. The results obtained suggest the presence of molecules in the cutaneous secretion of *Rhinella diptycha* that influence the differentiation of OCs in vitro, decreasing the formation of TRAP-positive OCs – mature and affecting the process of formation of multinucleated OCs with 2 to 5 nuclei.

Keywords: Osteoclasts. *Rhinella schneideri*. *Rhinella diptycha*. Skin secretion. PBMC. Osteoclastogenesis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura - 1 Representação grafica da osteoclastogenese .	16
Figura - 2 <i>Rhinella diptycha</i> ( <i>Rhinella schneideri</i> ).	18
Figura - 3 Gladulas parotoides de anfibios	19
Figura - 4 Protocolo de diferenciação.....	30
Figura - 5 Teste de viabilidade das PBMCs cultivadas durante 24 horas.	34
Figura - 6 Teste de viabilidade celular no 15º dia de diferenciação.	35
Figura - 7 Fotomicrografia de osteoclastos após marcação com coloração de TRAP..	36
Figura - 8 Grafico do número de osteoclastos pós tratamento	37
Figura - 9 Fotomicrografia de osteoclastos após marcação com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488	38
Figura - 10 Contagem de células referente ao número de núcleos	39
Figura - 11 Morfologia do osteoclasto com presença de colageno	40
Figura - 12 Morfologia da PBMC na diferenciação com e sem dexametasona	42
Figura - 13 Perfis cromatográficos das secreções bruta, hidrofílica e hidrofóbica e perfil comparativo entre as cromatografias	43

# SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>1.1 Osteoclastos</b> .....	<b>32</b>
<b>1.2 <i>Rhinella diptycha</i> (<i>Rhinella schneideri</i>)</b> .....	<b>36</b>
<b>1.3 Considerações gerais</b> .....	<b>40</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>2.1 Objetivos gerais</b> .....	<b>41</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>41</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1 Isolamento e diferenciação de PBMCs</b> .....	<b>42</b>
<b>3.2 Secreção cutânea de <i>Rhinella diptycha</i></b> .....	<b>45</b>
3.2.1 Secreção cutânea bruta .....	45
3.2.2 Frações hidrofílica e hidrofóbica da secreção cutânea .....	45
<b>3.3 Teste de viabilidade celular (CCK8)</b> .....	<b>45</b>
<b>3.4 Detecção de anel de F-actina</b> .....	<b>46</b>
<b>3.5 Coloração de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato)</b> .....	<b>46</b>
<b>3.6 Análise estatística</b> .....	<b>47</b>
<b>3.7 Fracionamento da secreção cutânea de <i>Rhinella diptycha</i></b> .....	<b>47</b>
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
<b>4.1 Efeitos <i>in vitro</i> da secreção cutânea sobre a viabilidade celular</b> .....	<b>48</b>
<b>4.2 Efeitos da secreção cutânea sobre o número e morfologia do osteoclasto</b>	<b>51</b>
<b>4.3 Efeitos da secreção cutânea sobre os anéis de F-actina</b> .....	<b>53</b>
<b>4.4 Efeitos da secreção cutânea sobre o número de núcleos</b> .....	<b>55</b>
<b>4.5 Influência da camada de colágeno sobre a morfologia do osteoclasto.</b> .....	<b>56</b>
<b>4.6 Efeito da ausência de Dexametasona no meio de diferenciação dos osteoclastos</b> .....	<b>58</b>
<b>4.7 Fracionamento da secreção cutânea de <i>Rhinella diptycha</i></b> .....	<b>59</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>

**6. CONCLUSÃO .....65**

**REFERÊNCIAS<sup>1</sup> .....66**

## INTRODUÇÃO

Em dez anos a parcela de pessoas com 60 anos ou mais passou de 11,3% para 14,7% da população, sendo observado assim um crescimento de 39,8% do contingente dessa faixa etária no período. Entre os idosos, destaca-se a expansão da participação daqueles de 65 anos ou mais, que atingiu 10,2% da população total em 2021 (IBGE, 2012/2021). Com esse aumento da expectativa de vida do brasileiro, doenças como a osteoporose tornam-se mais prevalentes (YAVROPOULOU; YOVOS, 2008), não só ela mas também a Doença de Paget, osteoartrite e outras mais. Estas doenças são debilitantes e acometem os ossos que é um tecido responsável pela sustentação e movimentação do nosso corpo, proteção dos nossos órgãos e regulação homeostática de íons como cálcio e fósforo. O tecido ósseo é um tipo especializado de tecido conjuntivo, formado por células responsáveis pela sua manutenção (osteoblasto, osteoclasto e osteócito) e por uma matriz óssea constituída por uma parte orgânica (colágeno) e uma inorgânica (hidroxiapatita de Cálcio). Sendo o osteoclasto uma das principais células associadas a estas doenças, a elegemos como nossa célula de estudo.

### 1.1 Osteoclastos

Osteoclastos (OC) são células ósseas, classificadas morfológicamente como células gigantes e multinucleadas, são especializadas em promover absorção de cálcio e remodelamento ósseo cujos precursores fisiológicos são células tronco hematopoiéticas, monócitos/macrófagos e células dendríticas que se diferenciam mediante a ação de fatores tais como de estimulação de colônia de macrófagos (em inglês *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) e ligante do receptor ativador do fator nuclear  $\kappa$ B (em inglês *receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand* (RANKL) e atuam na remodelação do tecido ósseo (ARAI *et al.*, 1999; CHEN *et al.*, 2014; WEISSMAN; ANDERSON; GAGE, 2001).

Controlado por fatores sistêmicos como os hormônios, e fatores locais, como os fatores de crescimento e citocinas, o tecido ósseo exerce funções básicas tais como proteção, locomoção e suporte (KATCHBURIAN; ARANA, 2004). Os ossos sofrem um dinâmico processo chamado de remodelação, que consiste na reabsorção e síntese óssea. Isto ocorre em todo o esqueleto, em microescala, durante toda vida do indivíduo, regulando a função e a estrutura dos ossos (CHAMBERS, 2000; TEITELBAUM, 2000). A homeostase e o bom funcionamento do sistema esquelético, depende do equilíbrio entre a atividade dos osteoblastos (OBs), que são células mononucleadas, de origem mesenquimal, responsáveis pela produção da matriz orgânica do osso bem como pela sua mineralização (ANDIA, 2006; MACKIE, 2003), e osteoclastos (OCs), células de reabsorção óssea (TAKAYANAGI, 2005). Os osteoclastos reabsorvem a matriz esquelética através de um microambiente ácido, formado entre a célula e a superfície óssea, com secreção de enzimas, íons de hidrogênio e cloreto transportados para essa junção, que irão liberar os minerais da matriz óssea. Com esse processo, a matriz orgânica óssea que se constitui principalmente de colágeno tipo 1, ficará exposta e posteriormente será degradada pela catepsina K (TEITELBAUM, 2011), uma protease que possui a característica de clivar a tripla hélice do colágeno tipo I e também os telopeptídeos de colágeno nos terminais N e C, resultando na degradação completa do colágeno insolúvel do osso. (GARNERO *et al* 1998)

Estima-se que cerca de 10% da massa óssea humana é remodelada a cada ano de vida (NARDUCCI; BAREGGI; NICOLIN, 2011) para isso, as vias de sinalização celulares, regidas pelas citocinas, regulam formação, reabsorção óssea e comunicação entre os sistemas esqueléticos e imunológicos, fazendo com que doenças ósseas sejam decorrentes da desregulação fisiopatológica destes componentes (AMASSEKARA; YU; RHO, 2015). Dentro desta rede de citocinas temos as que favorecem a formação dos osteoclastos as interleucinas (IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-34) juntamente com o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e, as que controlam negativamente a osteoclastogênese (IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, IL-27 e IL-33) e os interferons (IFN) - $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$  (AMASSEKARA; YU; RHO, 2015).

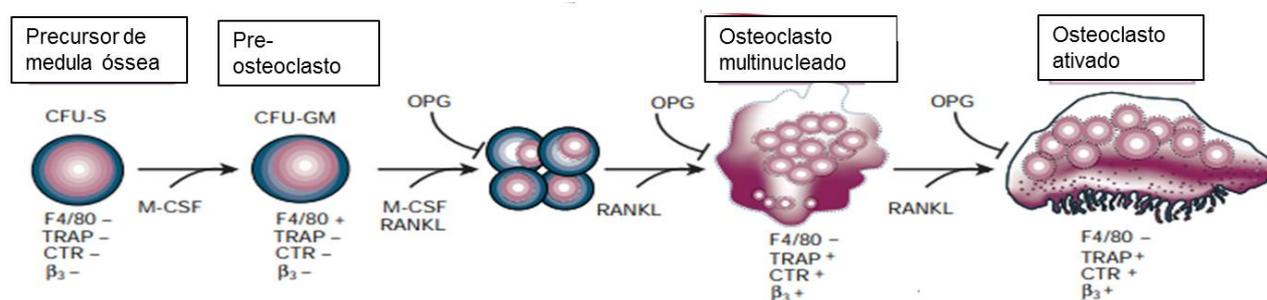
Há uma significativa ação hormonal do estrogênio estimulando a apoptose dos OCs (FALONI *et al* 2007), impedindo através da regulação das citocinas pro e antiosteoclastogênicas a formação de OCs (CENCI, 2000) e, indiretamente, inibindo a

reabsorção óssea sobre a via RANK/RANKL/OPG (Receptor Ativador de Fator Nuclear- $\kappa\beta$ /ligante de RANK/Osteoprotegerina, respectivamente) (VAANANEN, 2005) suprimindo a produção de RANKL por osteoblastos, células T e B (EGHBALI-FATOURECHI, et al.2003) e aumentando produção de osteoprotegerina(OPG) que é receptor chamariz para RANKL, (HOFBAUER, *et al.* 1999)( KHOSLA, S. *et al.* 2001).

A osteoclastogênese humana (Figura 1) tem início a partir do estímulo do M-CSF agindo na regulação da sobrevivência celular, proliferação e diferenciação dos monócitos (HORIGUCHI; WARREN; KUFÉ, 1987).

Em resposta ao estímulo de RANK, uma proteína transmembranar membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR) expressa nas células progenitoras dos OCs, células T, células B, células dendríticas e nas células epiteliais da glândula mamária (LEE, K. *et al.*, 2016), ocorre a formação de pré-osteoclastos (células binucleadas). Dando seguimento ao processo de fusão celular, haverá formação de células multinucleadas com cerca de 40 micrómetros de diâmetro. RANKL, junto com M-CSF são necessários para a diferenciação de osteoclastos e no final da osteoclastogênese serão expressos genes responsáveis pela codificação de Fosfatase Ácida Resistente a Tartarato (TRAP), catepsina K (CTK), calcitonina e a integrina  $\alpha\beta_3$ , (VÄÄNÄNEN; ZHAO; MULARI; HALLEEN, 2000).

**Figura 1** - Representação gráfica da osteoclastogênese



Fonte: Adaptado de William J. Boyle, William S Simonet, David L. Lacey, 2003.

A maturação ocorre a partir de células mononucleares do sangue periférico com traços da linhagem de macrófagos. M-CSF (CSF-1) e RANKL são essenciais para a osteoclastogênese. A OPG pode ligar e neutralizar o RANKL e regular negativamente tanto a osteoclastogênese quanto a ativação de osteoclastos maduros.

TRAP (CE 3.1.3.2) é uma enzima que contém ferro e é encontrada em ossos e no sistema imunológico (MINKIN C. 1982) tem cerca de 36kDa e o pH ótimo para sua atividade é entre 4,9 e 6,0 (PRICE *et al.*, 1995). Os osteoclastos apresentam uma forte coloração para TRAP e por isso tem sido usado em imunoenaios específicos como um marcador histoquímico padrão de atividade osteoclástica (BURSTONE M.S., 1959) (HALLEEN, J.M. *et al* 1998) TRAP originada de osteoclastos é um forte marcador de reabsorção óssea, utilizada como diagnóstico ou controle da doença, pois já se observou a atividade aumentada do TRAP no soro em pacientes com hiperparatireoidismo, doença de Paget, carcinomas ósseos e osteoporose, e correlacionada também com cross-links de colágeno, concentração de hidroxiprolina, e densidade mineral óssea (BULL *et al.*, 1999, PRICE *et al.* 1995;)

No início da diferenciação os OCs maduros apresentam organização específica (prolongamentos irregulares) de suas estruturas citoesqueléticas mais proeminentes, denominadas podossomos, e têm sua superfície ativa, voltada para a matriz óssea, esses podossomas aglomerados evoluem para anéis dinâmicos (clusters) que se estabilizam na periferia da célula formando um cinturão (anéis) pela ação dos microtúbulos acetilados. Quando os osteoclastos estão aderidos em superfícies contendo cristais de apatita, eles formam uma zona de vedação necessária para a reabsorção óssea sendo esse local de adesão do OCs, classificado como zona de selagem constituída por uma região citoplasmática clara, pobre em organelas porém com muitos filamentos de actina (VÄÄNÄNEN; ZHAO; MULARI; HALLEEN, 2000) (JURDIC, P. *et al.* 2006). A zona da selagem é um microambiente fechado, ácido (H<sup>+</sup>), que contém colagenase responsável pela despolimerização do colágeno, e outras hidrolases que atuam localmente digerindo a matriz orgânica e dissolvendo os cristais de sais de cálcio (BLAIR; TEITELBAUM; GHISELLI; GLUCK, 1989; VÄÄNÄNEN *et al.*, 1990)

Os osteoblastos podem regular negativamente a osteoclastogênese através da secreção de osteoprotegerina (OPG), membro da superfamília dos receptores do fator de necrose tumoral (TNFR), que se liga competitivamente ao RANK-L inibindo a formação e ativação dos osteoclastos pela interrupção da ligação RANK-RANKL (SODEK; GANSS; MCKEE, 2000; LACEY *et al.*, 1998; LEE, K. *et al.*, 2016).

O desequilíbrio entre osteoclastos e osteoblastos, relacionado ao aumento do número e/ou atividade de osteoclastos, está envolvido na maioria das doenças ósseas

e articulares anteriormente citadas (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; RODAN; MARTIN, 2000). O Ministério da Saúde alerta que cerca de 50% das mulheres e 20% dos homens com idade igual ou superior a 50 anos sofrerão uma fratura osteoporótica ao longo da vida (BRASIL, 2022). Outra importante enfermidade é a doença de Paget, sendo a segunda doença óssea mais incidente na população brasileira. Trata-se de uma doença deformante, assintomática e de difícil diagnóstico que acomete, majoritariamente, indivíduos do sexo masculino com idade superior aos 55 anos (MACIEL, 2018; REID, 2012).

Ainda relacionada as enfermidades, temos as metástases ósseas associadas aos tumores como, próstata e mama, e frequentemente em neoplasias malignas do rim, tireoide e pulmão. Além de terem o pior prognóstico, os doentes sofrem também com uma péssima qualidade de vida, e ocorrem eventos como dor óssea e fraturas sendo necessária uma forte atuação para prevenção da evolução desta doença e uma melhor qualidade de vida dos doentes (QUINN *et al.*, 2014).

## 1.2 *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*)

O Brasil detém, especialmente na Amazônia uma grande diversidade de anfíbios identificados de um total prevalente nos trópicos, entre essas espécies, a *Rhinella diptycha* (figura 2) antes denominada como *Rhinella schneideri*, também já denominada como *Bufo paracnemis*, é a espécie mais comumente encontrada. Ele um anfíbio noturno e terrestre que apresenta pele seca e áspera, possui hábitos de escavação e suas atividades noturnas permitem que *R. diptycha* viva em regiões mais secas da América do Sul (AMPHIBIA WEB, 2000; LAVILLA; BRUSQUETTI; 2018; NORMAN, 1994; FROST, 2021; MACIEL; COLLEVATTI; COLLI; SCHWARTZ, 2010). Alguns exemplares de *Rhinella diptycha* foram capturados na região do cerrado e após análise de sua secreção cutânea foram detectados alguns bufadienólídeos (um esteroide de origem animal, que é produzido por diversos bufonídeos em forma de veneno), e essas moléculas também estão presentes no Chan-Su (um medicamento tradicional chinês usado como anestésico tópico e medicação cardíaca) (CUNHA-FILHO *et al.*, 2010).

**Figura 1** - *Rhinella diptycha* (*Rhinella schneideri*).



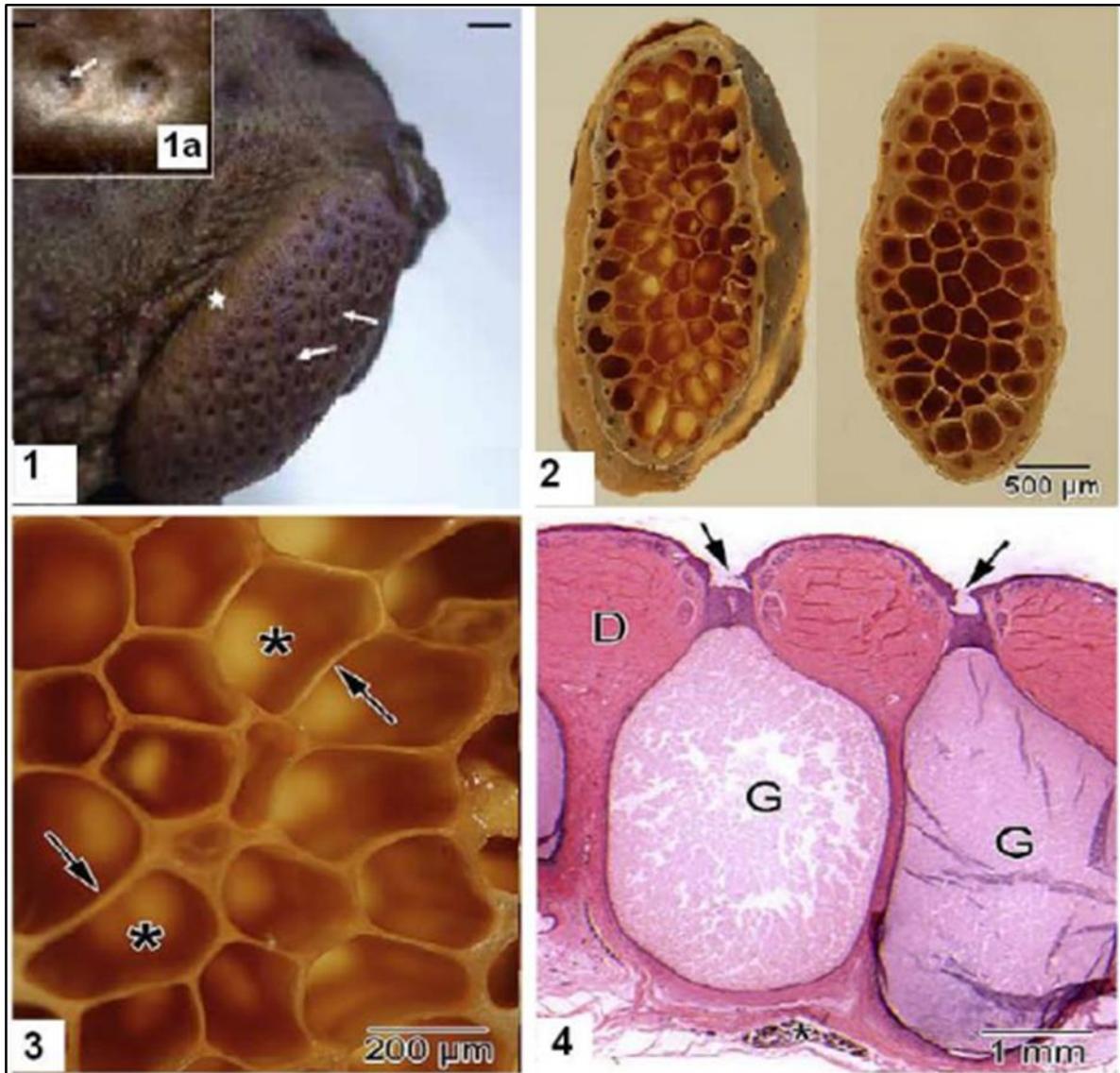
Fonte: imagem do autor 2023.  
Imagem representativa do anfíbio do gênero *Rhinella* sp.

O Chan-su, desenvolvido a partir da pele e das glândulas parotoídes do sapo asiático *Bufo gargarizans* ou do *Bufo melanostictus schneider*, ambos da família Bufonidae e cujo principal componente é a Bufalina, também chamado de Senso, é um fármaco, usado há muitos anos na China, e em outros países asiáticos, por promover efeito cardiotônico, diurético, anódino, agente hemostático, anti-inflamatório, anestésico e antineoplásico (QI et al., 2011; CHEN; KOVARÍKOVÁ, 1967).( GOWDA, R. M.; COHEN, R. A.; KHAN, I. A, 2003).

A escolha da secreção do anfíbio foi baseada nas informações em que existem semelhanças das moléculas encontradas na secreção cutânea da *R. diptycha* com as presentes no Chan-su, entendemos então que as secreções cutâneas de anfíbios são fontes valiosas de informação para a biofarmacologia, podendo-se sintetizar novas substâncias quimioativas para possível uso em humanos (MONTI; CARDELLO, 1994).

Baseados em estudos que demonstram semelhança morfológica entre Bufonídeos (RIBEIRO; EGITO; HADDAD, 2005 apud SOUSA et al., 2006), utilizamos aqui imagens de glândulas parotoídes de *Rhinella jimi* para uma melhor compreensão anatômica (figura 3).

**Figura 2** - Glândulas parotóides de anfíbios.



Fonte: Adaptado de Jared et al., 2009, e Almeida et al., 2007.

(1) Visão macroscópica de uma das glândulas parotóides de *Rhinella jimi*. (1a) Micrografia estereoscópica com detalhes da glândula; (2) Glândula parotóide seccionada no plano frontal; (3) Alta magnitude do alvéolo mostrando a parede (setas) e fundo (asteriscos) de cada glândula; (4) Secção longitudinal da glândula parotóide, as setas indicam os poros onde encontramos um “tampão epitelial”, a letra G as glândulas de veneno, e a letra D a derme que modela as paredes da glândula (parafina; HE).

A secreção das glândulas granulares, ou glândulas parotóides, (situadas atrás do ouvido no dorso) defende o animal, passivamente, contra predadores (BRAZIL; VELLARD, 1950) isso ocorre quando o animal se sente ameaçado, então ele infla o corpo fazendo com que as glândulas parotóides pareçam maiores e atuem

como airbags contra ataques de predadores (JARED et al., 2009; REGIS-ALVES et al., 2017). Já a secreção de glândulas mucosas mantém a hidratação e auxiliam nas trocas gasosas, garantindo sua sobrevivência em ambientes mais rudes. Essas glândulas estão localizadas ao longo de todo o corpo do animal (BRAZIL; VELLARD, 1926)

As glândulas da pele produzem muco, peptídeos, aminas biogênicas, esteróides (moléculas hidrofóbicas) e alcalóides (moléculas hidrofílicas) que, farmacologicamente, podem ser substâncias neurotóxicas, cardiotoxícas, hemotóxicas ou miotóxicas e podem provocar anestesia, hipotensão e/ou efeitos hipertensivos (SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000). Estudo utilizando zebrafish demonstrou que componentes hidrofílicos presentes na secreção cutânea do sapo *Bufo bufo gargarizans Cantor* e *Bufo melanostictus Schneider*, foram os principais responsáveis por atividade anti inflamatória induzida (ZHANG, Yu et al. 2018) também foi verificada neurotoxicidade causada por uma fração isolada do extrato metanoico do veneno, observou-se efeitos de facilitação e bloqueio neuromuscular em pintainhos e apenas facilitação em camundongos. (ROSTELATO F.S., 2011)

A composição do conteúdo glandular sofre influência direta da alimentação do animal assim como do metabolismo de bactérias que colonizam as glândulas, conferindo transformações que contribuem com a diversidade estrutural de metabólitos, produzindo moléculas como bufadienolides, por exemplo que é uma molécula denominada de glicosídeo cardíaco com atividade inibitória da enzima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (HAYES et al. 2009; STEYN; HEERDEN, 1998) Em um estudo que foi associado análise de RNA-seq com sequenciamento de proteínas, foi observado a presença de proteínas e peptídeos antimicrobianos como brevininas, peroniinas, buforinas, PLA 2, lectinas e galectinas, sendo a maioria dos transcritos relacionada a função de limpeza. (SHIBAO, P.Y.T. et al, 2018).

### 1.3 Considerações gerais

O processo de formação dos OCs está inserido no contexto de formação óssea que é muito complexo, portanto podemos definir o OC como um modelo de estudo interessante para realizar busca de alvos terapêuticos moleculares tendo em vista relação direta dessa célula com diversas patologias ósseas supra citadas, e também pelos efeitos adversos variados causados por fármacos utilizados em caso de doenças ósseas que comprometem outros sistemas metabólicos, sendo necessário o desenvolvimento de novas moléculas para vias mais específicas (Bl *et al.*, 2017).

Os bifosfonatos estão entre os medicamentos mais comumente utilizados atualmente em patologias onde existe excesso de reabsorção óssea sendo este o grupo de fármacos mais conhecido com atividade sobre osteoclastos (DRAKE; CLARKE; KHOSLA, 2008). A osteonecrose em maxilares induzida por bifosfonatos (ONMB) foi identificada em 2003, em pacientes usuários de pamidronato ou zoledronato, descrevendo as lesões como efeito adverso grave decorrente do uso. Desde então, a ONMB é considerada um efeito adverso de impacto entre os pacientes que fazem uso destes medicamentos (MARX, 2003).

O nosso grupo estabeleceu e validou protocolo de diferenciação de pré OCs a partir das células humanas mononucleares do sangue periférico (PBMCs do inglês *peripheral blood mononuclear cells*). Este modelo tem sido utilizado para estudos sobre o efeito de venenos e secreções cutâneas de animais na busca de novos alvos terapêuticos em doenças articulares e ósseas. Este modelo apresenta uma grande vantagem sobre outros modelos celulares por ser um modelo fisiológico uma vez que, a diferenciação dos OCs ocorre na presença dos outros tipos celulares, como linfócito por exemplo. Nos permite analisar o efeito de substâncias ao longo da diferenciação de OCs e seus pontos críticos, que são: geração do precursor de OCs do dia zero até o quarto dia, formação de policariontes fundidos imaturos do quarto dia até aproximadamente o sexto dia e formação / maturação de OCs multinucleados do dia seis até o décimo quinto dia (REEDY; ROODMAN, 1998).

Utilizando este mesmo modelo de cultivo fisiológico o nosso grupo de pesquisa já demonstrou com o veneno bruto de *B. moojeni* que as concentrações de 5,0 µg/mL, 0,5 µg/mL, 0,05 µg/mL, e suas frações LMM (*Low Molecular Mass*) e HMM (*High*

*Molecular Mass*), foram capazes de reduzir a formação de OCs maduros, sem interferir na viabilidade celular (D'AMÉLIO *et al.*, 2021).

O presente projeto utiliza o modelo experimental de osteoclastogênese para avaliação dos efeitos das secreções cutâneas de *Rhinella diptycha* no processo de formação dos OCs *in vitro*. Esse projeto é derivado do Programa FAPESP de Centros de Pesquisa em Engenharia/Centros de Pesquisa Aplicada (processo 2015/50040-4), que usa o modelo bem-sucedido do Programa Especial CEPID (Centros de Pesquisa, Inovação e Difusão), no qual há uma empresa parceira co-financiadora da pesquisa (GlaxoSmithKline – GSK), fortemente motivada para participar da definição dos temas focais a serem investigados, a participar ativamente dos projetos de pesquisa, e para usar os resultados obtidos com o centro

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivos gerais

Investigar a influência da secreção cutânea bruta do anfíbio *Rhinella diptycha* e suas frações hidrofílica e hidrofóbica no processo de osteoclastogênese do OC.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade celular pós interferência de diversas concentrações de secreção cutânea e de suas frações tanto em 24 horas (PBMCs) quanto 15 dias (osteoclastos) de cultivo.
- Quantificar o número dos OCs sob influência da secreção de *Rhinella diptycha*, ou frações.
- Avaliar a multinuclearidade dos OCs classificando-os em células com dois, de três a cinco e com mais do que cinco núcleos.
- Verificar a formação de anéis de F-actina (característica fenotípica dos osteoclastos)
- Fracionamento da secreção bruta em fases hidrofílica e hidrofóbica

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Isolamento e diferenciação de PBMCs

As PBMCs foram isoladas por método de centrifugação em gradiente de densidade por histopaque (densidade 1,077 g/ml – Sigma Adrich). Para isso, foram coletados aproximadamente 20 mL de sangue em seringas com heparina sódica (Hemofol 5.000UI/mL – Cristalia) por meio de punção venosa na fossa cubital de voluntários saudáveis do sexo masculino com idade entre 25 e 40 anos (Plataforma Brasil/CEP 1.806.596). O sangue foi diluído em tampão fosfato-salino (do inglês, *Phosphate Buffered Saline* – PBS) pH 7,4, na proporção de 1:1. Em seguida, o sangue foi acondicionado em tubo cônico contendo histopaque, na proporção 1:3. Esse material foi centrifugado a 400 x g por 20 minutos (Sorvall Legend X1R Centrifuge-ThermoFischer Scientific). Posteriormente, as células foram lavadas 2x em Tampão fosfato-salino pH 7,4 e ressuspendidas em 1 mL de meio de diferenciação:  $\alpha$ -MEM, pH 7.4(MEM Alpha 1x L-Glutamina[+]), 10% soro fetal bovino (SFB Gibco – Standard Brasil) - Suplementado com: 25 ng/ml de M-CSF humano (R&D Systems >97% purity - Mineapolis-USA), 50 ng/ml de RANKL humano(TRANCE,R&D Systems >90% Mineapolis-USA) 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano(R&D Systems >97% Mineapolis-USA) e 1  $\mu$ M de dexametasona(Sigma-Aldrich D4902-25mg, Aldrich Brasil). Uma alíquota da suspensão de células foi diluída na proporção 1:10 em solução de Turk para contagem de células viáveis em microscópio óptico (Nikon Eclipse Ts2R) com auxílio da câmara de Neubauer. Para os testes de diferenciação de osteoclastos, foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200 $\mu$ L de meio de diferenciação com as concentrações da secreção em placas de 96 poços transparente fundo chato (Corning Incorporated – Maine USA), sendo a manutenção realizada duas vezes por semana com substituição de 50% do volume do meio durante 15 dias. No grupo controle, as células foram mantidas exclusivamente em meio de diferenciação já descrito acima.

### **Condições Experimentais:**

Em uma primeira fase testamos a secreção cutânea bruta de *Rhinella diptycha*, diluída em soro fisiológico a 0,9%, que foi adicionada a cultura celular no 4º, 7º, 11º e 14º dias após a indução da diferenciação, nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL, todos com réplica técnica.

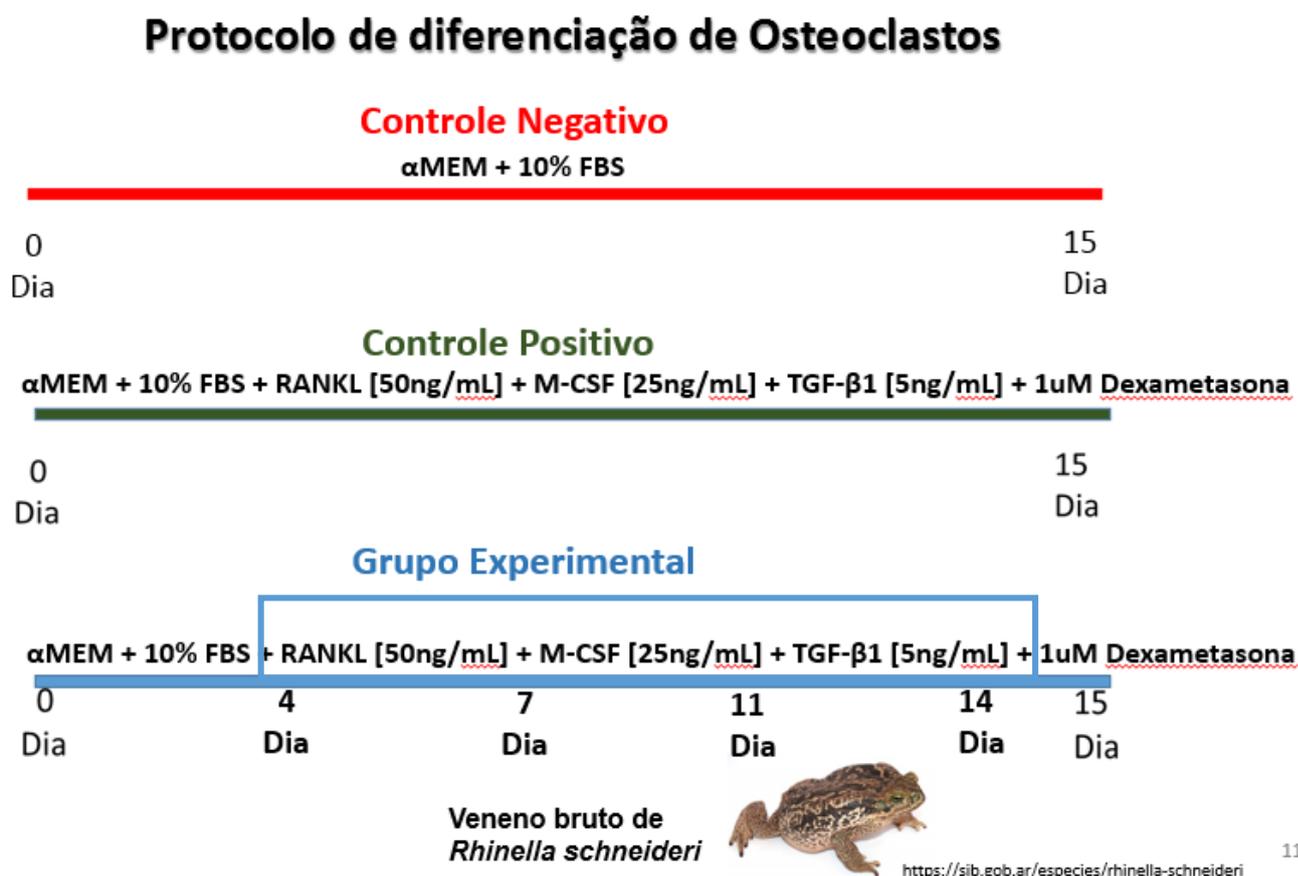
Dando continuidade ao projeto testamos as frações hidrofóbica e hidrofílica obtidas da secreção bruta. Seguimos o mesmo protocolo de diferenciação e estímulo e mantivemos as concentrações da secreção bruta.

**Controle:** PBMCs mantidas em meio de cultura, com 10% SFB e fatores de diferenciação para osteoclastos durante 15 dias, com substituição de 50% do volume do meio de cultura 2 vezes por semana.

**Grupos Testados:** PBMCs mantidas em meio de cultura com 10% SFB e fatores de diferenciação durante 15 dias, com substituição de 50% do volume do meio de cultura 2 vezes por semana. Sendo as interferências realizadas com secreção bruta de *Rhinella diptycha* nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05ng/mL ou suas frações, realizadas em todos os dias de troca do meio de cultura, para a manutenção das concentrações estabelecidas para a realização desse estudo.

**Controle Negativo:** PBMCs mantidas em meio de cultura, com 10% de SFB, SEM fatores de diferenciação durante 15 dias, com substituição de 50% do volume do meio de cultura 2 vezes por semana. Dessa maneira, não promovemos a diferenciação celular, porém mantemos a viabilidade das células em cultura.

Figura 4 – Protocolo de diferenciação.



Esquema representativo do protocolo de diferenciação utilizado no experimento  
Fonte: Próprio autor, 2023.

**Revestimento com colágeno:** Objetivando uma melhor imagem fotográfica, foi testado o cultivo celular sobre uma camada de colágeno onde pipetamos 100 $\mu$ L por poço de solução de colágeno na concentração de 10  $\mu$ M em placa de 96 poços, colocamos em estufa 37° C com 5% CO<sub>2</sub> por 1 hora, lavamos duas vezes e mantivemos com tampão Phosphate Buffered Saline (PBS) até a hora do cultivo. Não observamos diferença morfológica que justificasse acrescentar mais essa etapa.

**Dexametasona:** classificada como glicocorticoide, importante mediador da resposta ao estresse, regulando tanto a homeostasia da glicose quanto o sistema imune é amplamente aplicada na clínica como anti-inflamatório, inibe a liberação de citocinas e, portanto, diminui a ação das interleucinas 1, 2 e 6, e do TNF- $\alpha$ . A regulação local da liberação de citocinas é de suma importância para o recrutamento e a ativação dos leucócitos e a ruptura desse processo de sinalização inibe acentuadamente a função imune. (GOLAN *et al.*, 2009; pág. 465). Foi testado experimentos com meio de

cultivo sem a presença da Dexametasona para analisarmos uma possível interferência na ação da secreção hidrofóbica.

### **3.2 Secreção cutânea de *Rhinella diptycha***

A secreção cutânea da espécie *Rhinella diptycha* foi cedida pela Polícia Federal, analisada e identificada no Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan pela equipe do Prof. Dr. Daniel Carvalho Pimenta (BARROS, 2017).

#### **3.2.1 Secreção cutânea bruta**

A secreção cutânea liofilizada, foi reconstituída com solução fisiológica 0,9% estéril e apirogênica, na concentração de 1 mg/mL.

#### **3.2.2 Frações hidrofílica e hidrofóbica da secreção cutânea**

Fracionamos a secreção bruta através da técnica de partição líquido-líquido com água ultrapura e Diclorometano (DCM), e denominamos as fases em hidrofóbica e hidrofílica [1mg/mL], que foram congeladas e mantidas liofilizadas até seu uso. Para testar hidratamos com solução fisiológica 0,9%.

### **3.3 Teste de viabilidade celular (CCK8)**

O ensaio foi realizado utilizando o reagente Cell Counting Kit-8 (Merck) em placa de 96 poços onde o sobrenadante da cultura celular foi substituído por uma solução composta por meio de cultura e 10% SFB contendo o reagente na proporção de 1:10. Neste procedimento o reagente é biorreduzido por desidrogenases celulares em formazan conferindo cor laranja ao meio de cultura de células. A quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis.

Após 2 horas de incubação a 37°C em ambiente umidificado, foi possível inferir a viabilidade celular, através determinação da densidade ótica em espectrofotômetro com comprimento de onda de 450nm em espectrofotômetro (Infinite M. Plex –

Tecan.RChisto). Este ensaio foi realizado nos prazos de 24 horas e 15 dias após o plaqueamento de PBMCs.

### **3.4 Detecção de anel de F-actina**

A fim de verificar a formação dessa característica estrutural dos osteoclastos, foi realizada marcação com Faloidina associada ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Sigma-aldrich)(*Life Technologies*, EUA), uma micotoxina do grupo das *phallotoxins*, produzida pelos cogumelos *Amanita phalloides*, cuja estrutura apresenta afinidade por filamentos de actina (COOPER, 1987). No 15º dia de cultivo, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído [3,7%] (Sigma) por 20 minutos, e posteriormente lavadas com tampão PBS pH 7,4 e permeabilizadas com solução Triton X-100 [0,1%] (Sigma-Aldrich) por 5 minutos. Após lavagens, foi realizada marcação com Faloidina [25mM] por 30 minutos e marcação com DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Vectashield), que emite fluorescência azul ao se ligar às regiões AT do DNA, pelo tempo de 5 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz. A detecção da fluorescência e a captura de imagens foi possível utilizando microscópio de fluorescência TSi Nikon.

### **3.5 Coloração de TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato)**

Com a conclusão do período de diferenciação, o meio de cultivo foi aspirado e as células foram lavadas 3x com PBS. A fixação das células foi realizada adicionando a solução contendo 25,5% de solução Citrato (Ácido Cítrico 18 mM, Citrato de sódio 9 mM, Cloreto de sódio 12 mM e surfactante pH 3,6 ± 0.1), 66.3% de acetona e 2.9% de formaldeído por 30 segundos em temperatura ambiente. Previamente foi preparada a solução TRAP (de acordo com as instruções do fabricante Kit Sigma-Aldrich) e aquecida a 37° C. Após a fixação as células foram lavadas suavemente 3x com PBS e incubadas em solução TRAP por 1 hora a 37 °C. A solução TRAP foi aspirada e as células novamente lavadas 3x com água deionizada pré-aquecida a 37°C e os núcleos corados com Solução de Hematoxilina de Gill nº 3, por 1-2 minutos em temperatura ambiente. O processo de coloração foi finalizado lavando as células com água

alcalina, evidenciando a contra coloração, permitindo a análise de células diferenciadas em microscopia de luz.

### **3.6 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste One way ANOVA com teste Tukey's post-hoc, usando o software the GraphPad® Prism 7.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Valores de  $p < 0,05$  são considerados estatisticamente significantes.

### **3.7 Fracionamento da secreção cutânea de *Rhinella diptycha***

O uso de amostras purificadas ou fracionadas a partir do extrato bruto original é uma estratégia eficaz para triagem considerando a complexidade molecular do extrato original, assim como pode diminuir o tempo para um futuro isolamento de princípio ativo. (ELDRIDGE *et al.*, 2002; ABEL *et al.*, 2002).

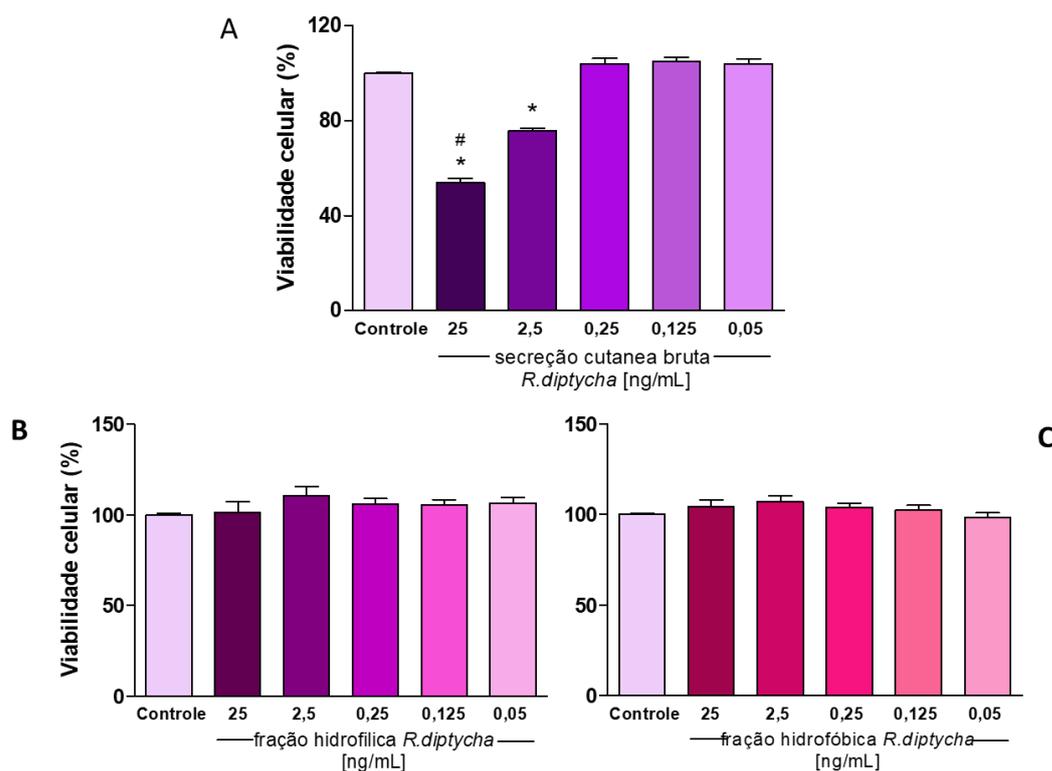
Esse processo foi executado em RP-HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa de sistema binário (20A Prominence, Shimadzu Co. Japan) onde as amostras foram analisadas em coluna C18 (Gemini 5 $\mu$ m C18 110 Å LC Column 250 X 4,6 mm), com solvente (A) ácido trifluoroacético / H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) ácido trifluoroacético / acetonitrila / H<sub>2</sub>O (1:900:100) em fluxo de 1 mL/min a 40° C, e gradiente de 0 a 100% de solvente B em 35 minutos para solução em H<sub>2</sub>O.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeitos *in vitro* da secreção cutânea sobre a viabilidade celular.

A avaliação da possível citotoxicidade em PBMCs foi realizada, utilizando o método CCK8, em culturas expostas por 24 horas a diferentes concentrações das frações e da própria secreção cutânea bruta de *Rhinella diptycha* e foi possível constatar que a secreção bruta promoveu redução estatística da viabilidade celular nas concentrações de 25 ng/mL e 2,5 ng/mL em 46,15% e 24,40% respectivamente em relação ao grupo controle (Figura 05).

**Figura 5** - Teste de viabilidade das PBMCs cultivadas durante 24 horas.



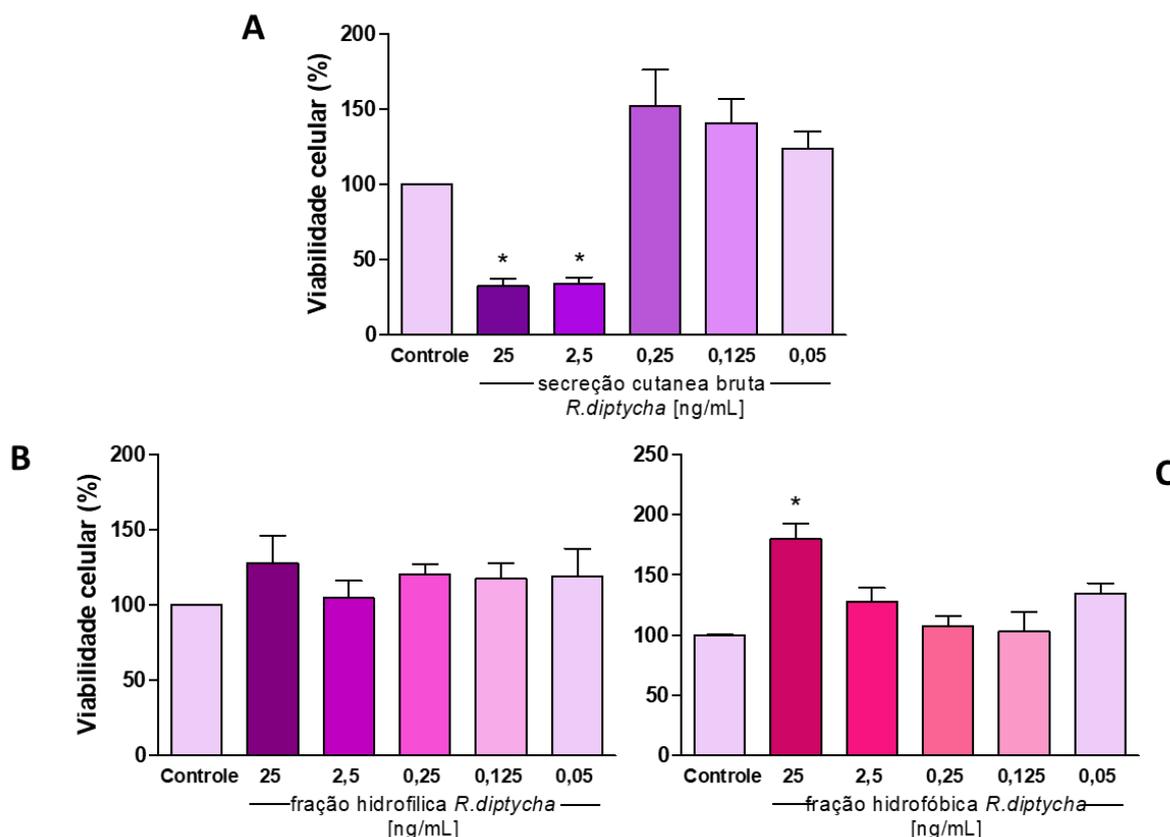
**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Efeito da secreção cutânea bruta e frações hidrofílica e hidrofóbica na viabilidade celular das PBMCs cultivadas por 24 horas avaliado por ensaio de CCK8. Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200  $\mu$ L de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e 1  $\mu$ M de dexametasona) em diferentes concentrações das secreções cutâneas bruta, hidrofílica e hidrofóbica em placas de 96 poços. As células do grupo controle foram cultivadas somente com o meio de diferenciação, sem estímulo da secreção cutânea e suas frações. **(A)** Viabilidade celular do estímulo com secreção Bruta

as concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. **(B)** Viabilidade celular do estímulo da fração hidrofílica nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. **(C)** Viabilidade celular da fração hidrofóbica nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. Dados referentes a média obtida em N=3 da viabilidade celular onde \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle e #\* $p < 0,05$  em relação ao grupo experimental secreção cutânea bruta [25ng/mL], analisados por One way ANOVA com teste Tukey's post-hoc.

Para verificar o possível efeito tóxico das concentrações estudadas, sobre osteoclastos *in vitro*, induzimos a diferenciação das PBMCs com fatores de diferenciação adicionados ao meio basal, e seguimos adicionando secreção cutânea de *Rhinella diptycha*, ou frações da secreção, nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05ng/mL, nos dias correspondentes a manutenção do meio de cultura celular (4<sup>o</sup>, 7<sup>o</sup>, 11<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias a partir do plaqueamento). Ao final de 15 dias, as células foram submetidas ao protocolo CCK8 sendo realizada avaliação de viabilidade celular, nas mesmas condições, onde foi possível confirmar os efeitos citotóxicos da secreção cutânea bruta pela redução significativa da viabilidade celular nas concentrações de 25 ng/mL e 2,5 ng/mL também nesse tipo celular, sendo que a concentração de 25 ng/mL apresentou um decréscimo de 67,51% e em 2,5 ng/mL a redução foi de 65,95%. (Figura 06).

**Figura 6 - Teste de viabilidade celular no 15° de diferenciação**



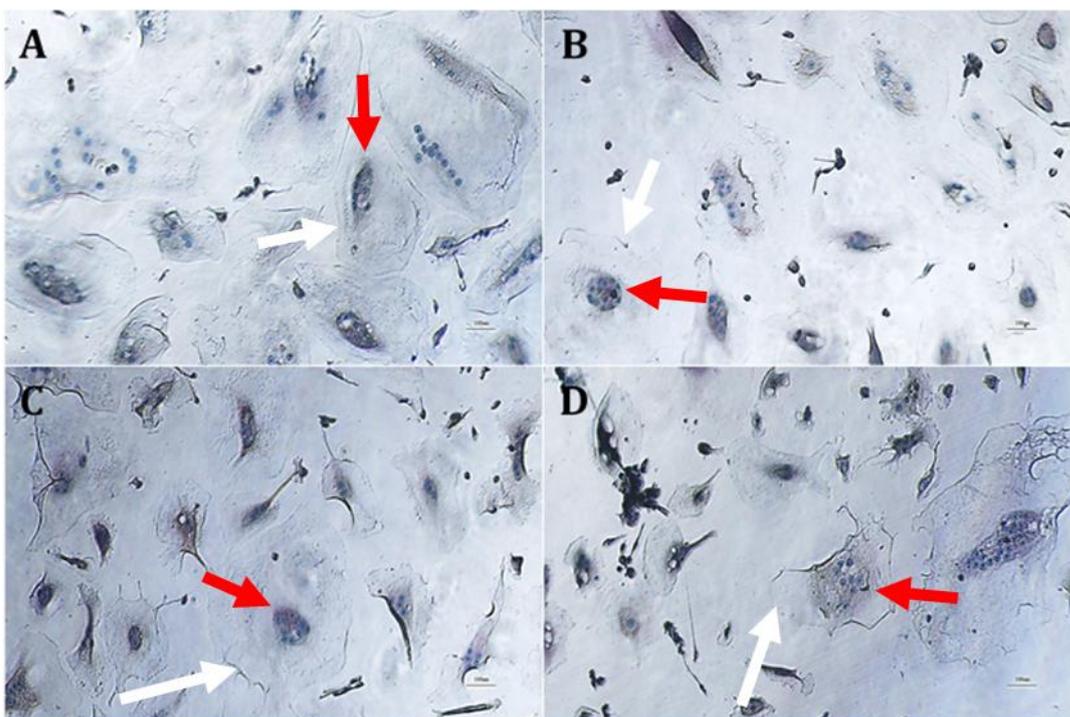
**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Efeito da secreção cutânea bruta e frações hidrofílica e hidrofóbica na viabilidade celular no 15° dia de cultivo avaliado por ensaio de CCK8. Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200  $\mu$ L de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e 1  $\mu$ M de dexametasona) em diferentes concentrações das secreções cutâneas bruta, hidrofílica e hidrofóbica em placas de 96 poços. As células do grupo controle foram cultivadas somente com o meio de diferenciação, sem estímulo da secreção cutânea e suas frações. **(A)** Viabilidade celular do estímulo com secreção cutânea Bruta nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. **(B)** Viabilidade celular do estímulo da fração hidrofílica nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. **(C)** Viabilidade celular da fração hidrofóbica nas concentrações de 25 ng/mL, 2,5 ng/mL, 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. Dados obtidos da média de N=3 onde \* $p < 0,05$  e analisados por One way ANOVA com teste Tukey's post-hoc.

## 4.2 Efeitos da secreção cutânea sobre o número e morfologia do osteoclasto

No osteoclasto ativo o TRAP está em vesículas transcitóticas envolvidas no transporte de produtos de degradação da matriz através da célula, é proposto então que as espécies reativas de oxigênio produzidos pela TRAP ajudam a destruir o colágeno e outras proteínas nessas vesículas (HALLEN *et al.* 1999). Na figura 07 podemos observar essa marcação presente em OCs.

**Figura 7** – Fotomicrografia de osteoclastos após marcação com coloração de TRAP

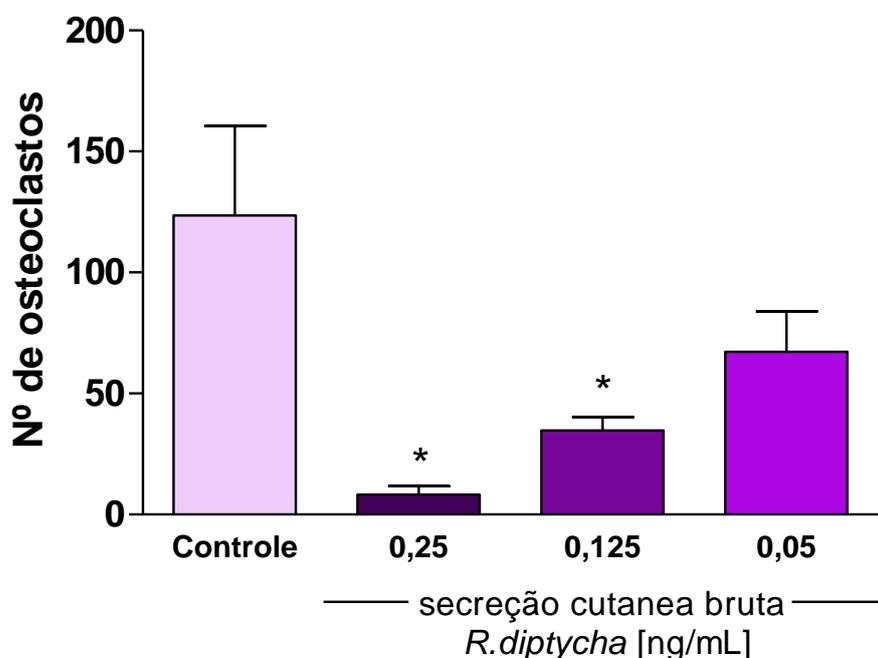


**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200  $\mu$ L de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e 1  $\mu$ M de dexametasona) em placas de 96 poços. Após o 15<sup>o</sup> dia foi realizada marcação com TRAP, onde observamos **(A)** Celulas do poço controle cultivadas apenas com meio de diferenciação. **(B)** Celulas do poço cultivadas com meio de diferenciação na concentração de 0,05 ng/mL de secreção bruta. **(C)** Celulas do poço cultivadas com meio de diferenciação na concentração de 0,125ng/mL de secreção bruta. **(D)** Celulas do poço cultivadas com meio de diferenciação na concentração de 0,25 ng/mL de secreção bruta. As setas brancas indicam os osteoclastos. As setas vermelhas indicam os núcleos dos osteoclastos  
Barra de escala = 100  $\mu$ m.

Canonicamente, OCs são classificados como células gigantes, com três ou mais núcleos e resistentes a coloração TRAP. Através do método de coloração diferencial, foi possível observar o prejuízo significativo no processo de osteoclastogênese, inclusive em concentrações não citotóxicas da secreção cutânea, com redução do número de osteoclastos frente as concentrações de 0,25 ng/mL (93,32%), 0,125 ng/mL (71,87%) e 0,05 ng/mL (42,25%) em relação ao grupo controle (figura 08).

**Figura 8** – Gráfico do número de osteoclastos pós tratamento



**Fonte:** Próprio autor, 2023.

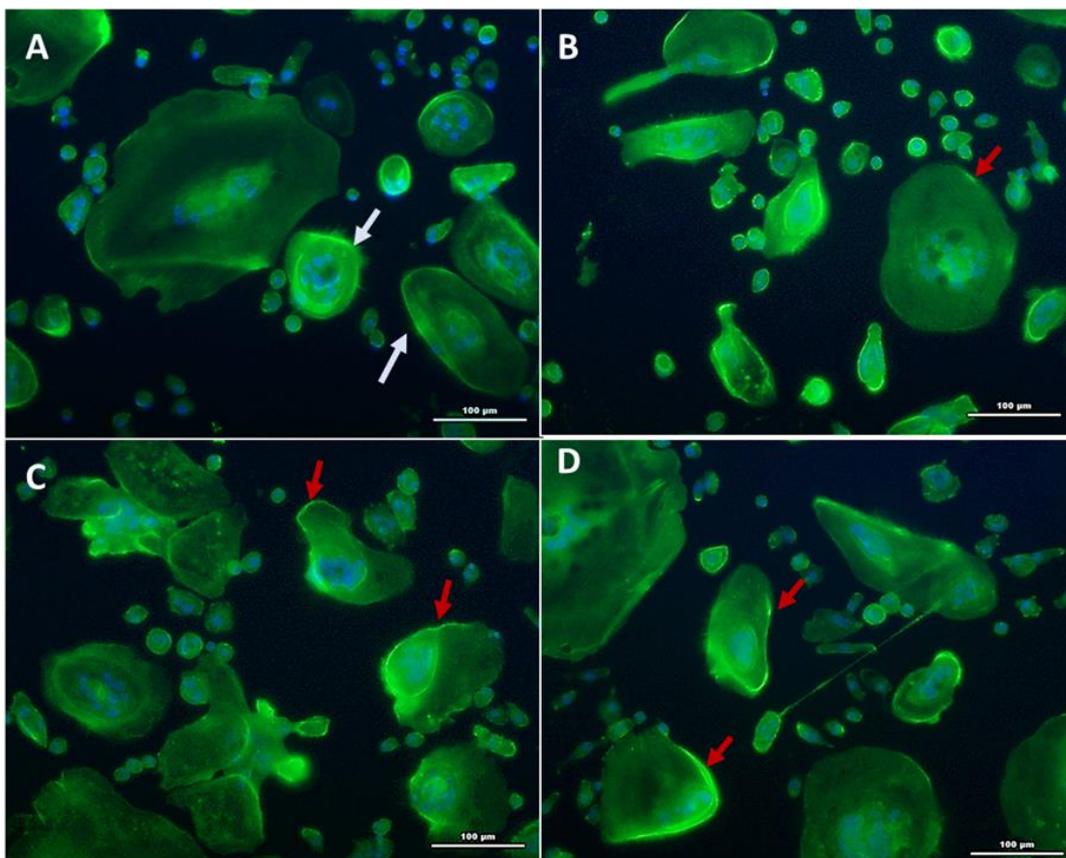
Efeito da secreção cutânea bruta na contagem celular dos osteoclastos TRAP+. Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200  $\mu$ L de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e 1  $\mu$ M de dexametasona) nas concentrações da secreção bruta de 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL em placas de 96 poços e após 15<sup>o</sup> dia de cultivo marcadas com a coloração de TRAP. As células do grupo controle foram cultivadas somente com o meio de diferenciação, sem estímulo da secreção cutânea bruta. Dados obtidos da média de N=3 onde \* $p < 0,05$  e analisados por One way ANOVA com teste Tukey's post-hoc.

### 4.3 Efeitos da secreção cutânea sobre os anéis de F-actina

A F-actina é consistentemente observada em OCs e leva a alterações no citoesqueleto, como a formação do anel de F-actina, encontrado no bordo em escova da célula (apud KANEHISA J. *et al* 1990) (AKISAKA *et al.*, 2001). Essas estruturas desempenham um papel significativo na integridade celular, forma, motilidade e adesão e absorção. (AKISAKA *et al.*, 2001).

Observamos a integridade do anel da actina no controle (Figura 09A) e também nas células tratadas com a secreção cutânea nas concentrações de 0,05 ng/mL; 0,125 ng/mL; 0,25 ng/mL (Figura 09B-C-D), apesar da diminuição do número de OCs estimulados com secreção cutânea [0,125 ng/mL e 0,25 ng/mL] em relação ao controle, visto no gráfico anterior (Figura 07).

**Figura 9** – Fotomicrografia de osteoclastos após marcação com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488.



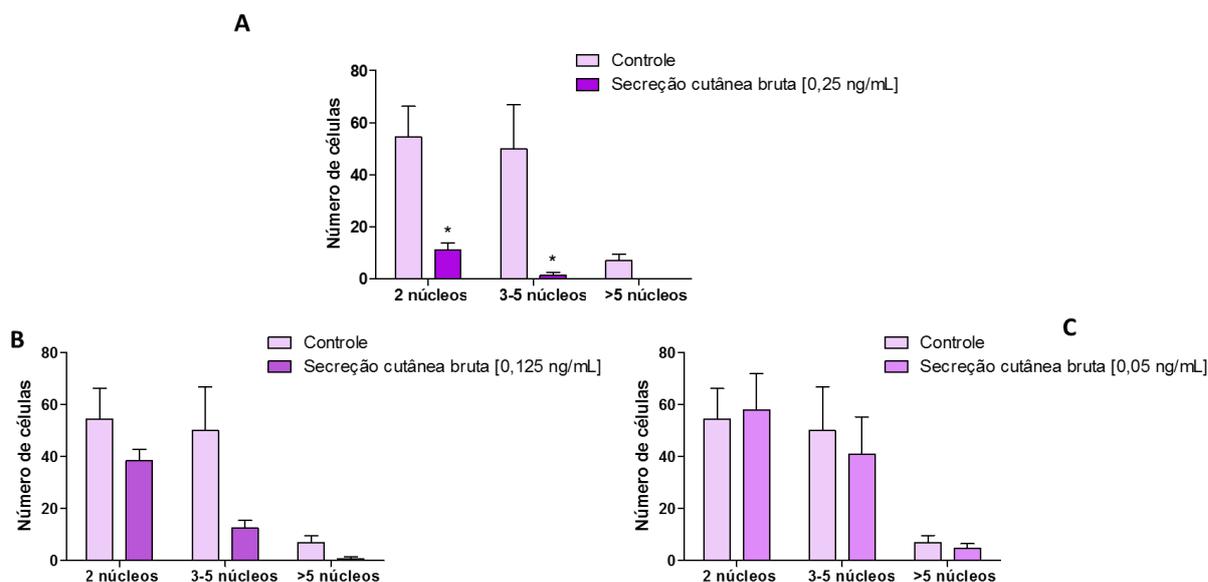
**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/ $1,9 \text{ cm}^2$  e cultivadas em  $200 \mu\text{L}$  de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e  $1 \mu\text{M}$  de dexametasona) em placas de 96 poços. Após o 15<sup>o</sup> dia de diferenciação foi realizada marcação com Faloidina [25mM] conjugada com Alexa Fluor 488, onde observamos **(A)** Células do poço controle cultivadas apenas com meio de diferenciação **(B)** Células do poço cultivadas com meio de diferenciação na concentração de 0,05 ng/mL de secreção bruta **(C)** Células do poço cultivadas com meio de diferenciação na concentração de 0,125ng/mL de secreção bruta **(D)** Células do poço cultivadas com meio de diferenciação na concentração de 0,25 ng/mL de secreção bruta As setas brancas indicam o anel de F-actina. As setas vermelhas indicam trechos de deposição de F-actina.

#### 4.4 Efeitos da secreção cutânea sobre o número de núcleos

A adesão dos pré OCs é necessária para aumentar seu volume melhorando assim sua função reabsortiva (RIES; GONG; GUNSOLLEY, 1987), uma vez estabelecido que existe uma correlação entre o número de núcleos e a lacuna de Howship (lacunas cavadas na matriz óssea pelos OCs), entendemos então que a multinuclearidade é uma expressão morfológica da capacidade funcional dos OCs (PIPER;BOYDE;JONES, 1992; BOISSY *et al* 2002; RIES; GONG; GUNSOLLERY, 1987; ROENNFELDT *et al* 1998; BOISSY *et al* 2002). Na doença de Paget, foram descritos OCs com mais de 100 núcleos (GD; WINDLE, 2005).

Pudemos demonstrar que dentre as concentrações, não citotóxicas, testadas a secreção bruta [0,25 ng/mL] promoveu redução estatisticamente significativa da formação de osteoclastos e essa redução foi proporcional quando levado em consideração o número de núcleos dessas células (Figura 10).

**Figura 10 – Contagem de células referente ao número de núcleos**

**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Efeito da secreção cutânea bruta na quantificação e classificação de osteoclastos considerando o número de núcleos. Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200  $\mu$ L de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e 1  $\mu$ M de dexametasona) nas concentrações da secreção bruta de **(A)** 0,25 ng/mL, **(B)** 0,125 ng/mL e **(C)** 0,05 ng/mL em placas de 96 poços e após 15<sup>o</sup> dia de cultivo marcadas com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488. As células do grupo controle foram cultivadas somente com o meio de diferenciação, sem estímulo da secreção cutânea bruta. Dados obtidos através da contagem celular onde foram agrupadas pelo número de núcleos (2, 2-5 >5) da média de N=3 onde \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle e analisados por One way ANOVA com teste Tukey's post-hoc.

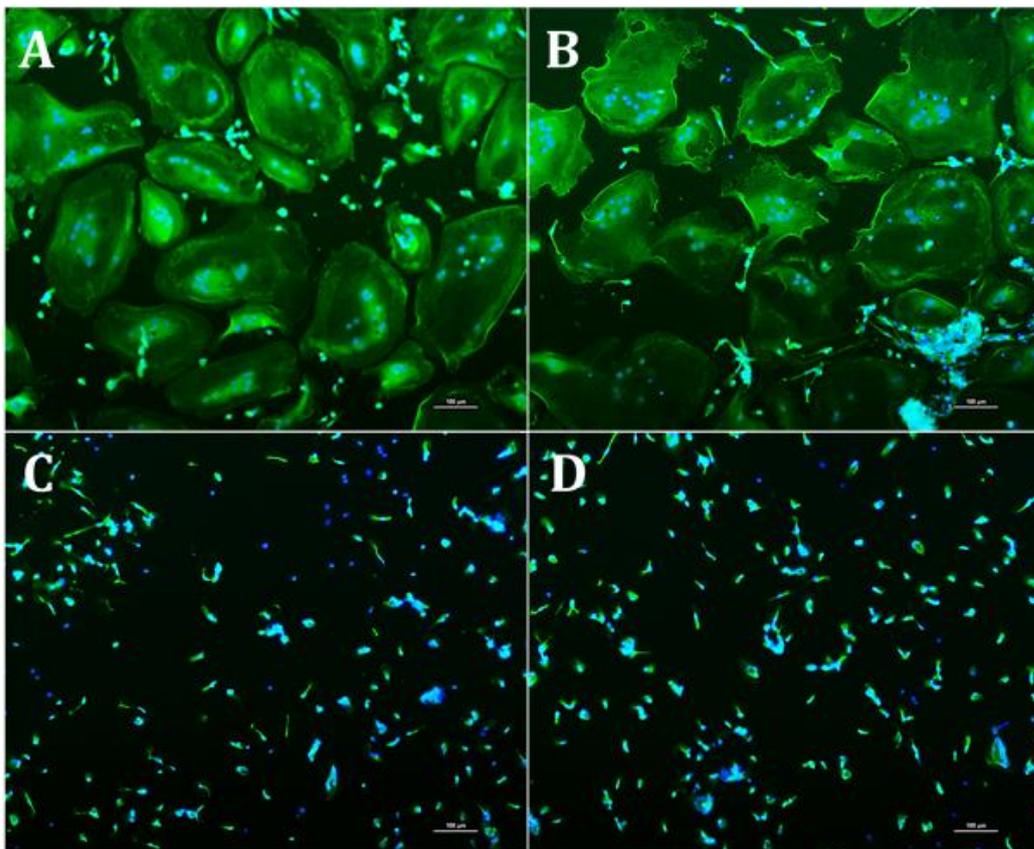
As contagens foram agrupadas pelo número de núcleos considerando 2 núcleos, 3-5 núcleos e 5 ou mais núcleos. ANOVA e Tukey ( $p < 0,05$ ).

#### 4.5 Influência da camada de colágeno sobre a morfologia do osteoclasto.

Em busca de uma imagem 3D dos osteoclastos e conseqüentemente uma observação mais definida de sua morfologia, foram realizados experimentos em placa cujos poços foram revestidos com *coating* de colágeno na intenção de proporcionar a célula uma condição mais próxima a fisiológica, pois o colágeno tipo I é amplamente distribuído e é a principal proteína estrutural do osso, onde representa 90% da matriz proteica. (ZHAO; JIA; XAO,2009).

Realizado o experimento, não houve diferença entre as imagens das culturas com e sem colágeno que justificasse aumentarmos mais uma passagem na preparação, seguimos então com o protocolo padrão (Figura 11).

**Figura 11** - Morfologia do osteoclasto com presença de colágeno



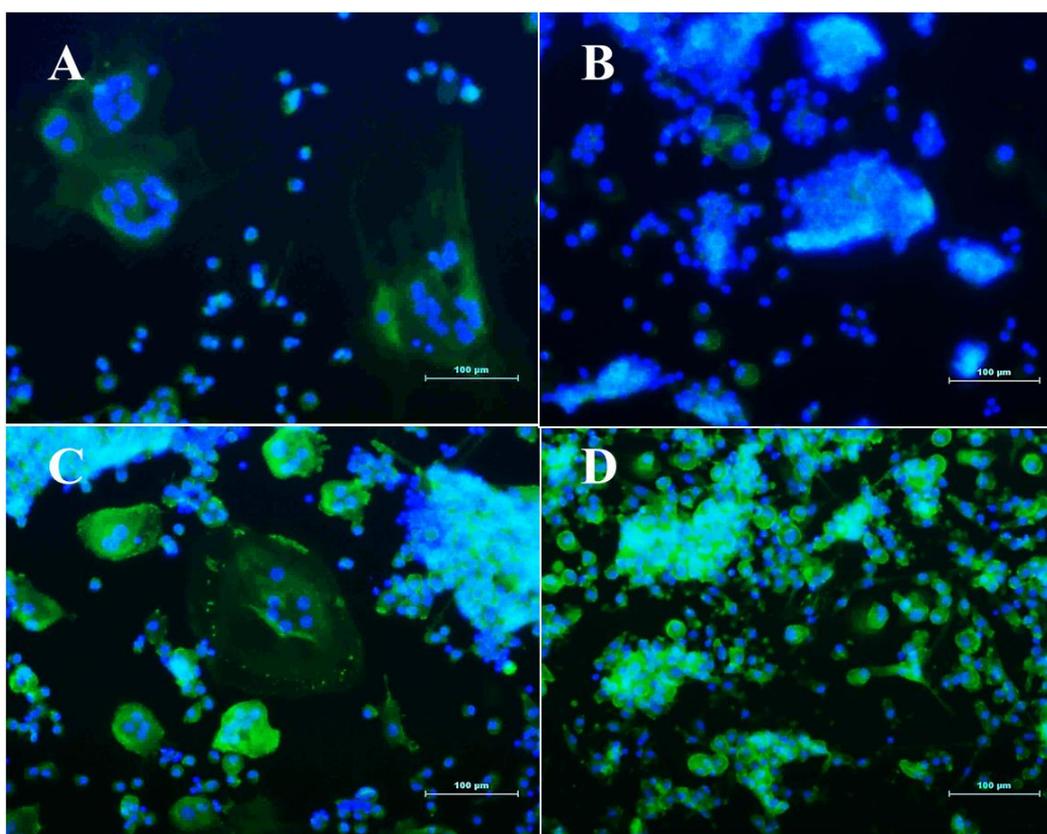
**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Fotomicrografia de osteoclastos cultivados em placa com e sem revestimento de colágeno após marcação com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488. Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/ $1,9 \text{ cm}^2$  e cultivadas em  $200 \mu\text{L}$  de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano e 1  $\mu\text{M}$  de dexametasona) em placas de 96 poços com e sem revestimento de colágeno. Após o 15<sup>o</sup> dia de diferenciação foi realizada marcação com Faloidina [25mM] conjugada com Alexa Fluor 488, onde observamos (A) Células do poço controle cultivadas apenas com meio de diferenciação (B) Células do poço controle cultivadas com meio de diferenciação em placa com coating de colágeno aderida no fundo. (C) Células do poço controle cultivadas apenas com meio de cultura sem fatores de diferenciação. (D) Células do poço controle cultivadas com meio de cultura sem fatores de diferenciação com coating de colágeno aderida ao fundo.

#### 4.6 Efeito da ausência de Dexametasona no meio de diferenciação dos osteoclastos

De acordo com protocolo estabelecido, a dexametasona é um importante mediador no processo de osteoclastogênese *in vitro*. Para avaliarmos alterações nos parâmetros estudados, por possível associação de componentes da secreção de *Rhinella diptycha* com dexametasona, foram realizadas culturas de PBMCs com privação desse elemento. Assim, pudemos comprovar que na ausência de dexametasona, e sem ação correspondente de possíveis componentes da secreção cutânea, não foi possível a diferenciação dos precursores em osteoclastos, inviabilizando o estudo de osteoclastogênese *in vitro* (figura 12).

**Figura 12** – Morfologia da PBMC na diferenciação com e sem dexametasona.



**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Fotomicrografia de osteoclastos cultivados em placa com e sem adição de dexametasona no meio de cultura com diferenciadores para osteoclasto após marcação com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 e DAPI. Foram plaqueadas  $6 \times 10^5$  PBMCs/1,9 cm<sup>2</sup> e cultivadas em 200 µL de meio de diferenciação ( $\alpha$ -MEM, pH 7.4, 10% soro fetal bovino (SFB) + 25 ng/ml de M-CSF humano, 50 ng/ml de RANKL humano, 5 ng/ml de TGF- $\beta$ 1 humano com e sem 1  $\mu$ M de dexametasona) em placas de 96 poços. Após o 15º dia de diferenciação foi realizada marcação com Faloidina conjugada com Alexa Fluor 488 e DAPI, onde observamos **(A)** Células do poço controle cultivadas apenas com meio de diferenciação

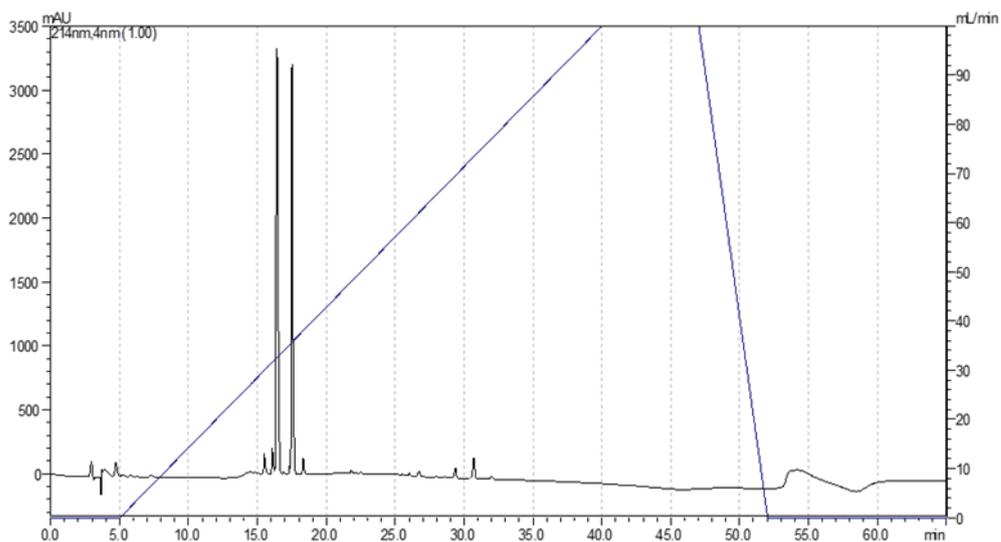
com Dexametasona. **(B)** Células do poço controle cultivadas apenas com meio de diferenciação sem Dexametasona. **(C)** Células do poço cultivadas com meio de diferenciação com Dexametasona na concentração de 0,25 ng/mL da fração hidrofóbica da secreção cutânea da *R. diptycha* **(D)** Células do poço cultivadas com meio de diferenciação sem Dexametasona na concentração de 0,25 ng/mL da fração hidrofóbica da secreção cutânea da *R. diptycha*

#### **4.7 Fracionamento da secreção cutânea de *Rhinella diptycha***

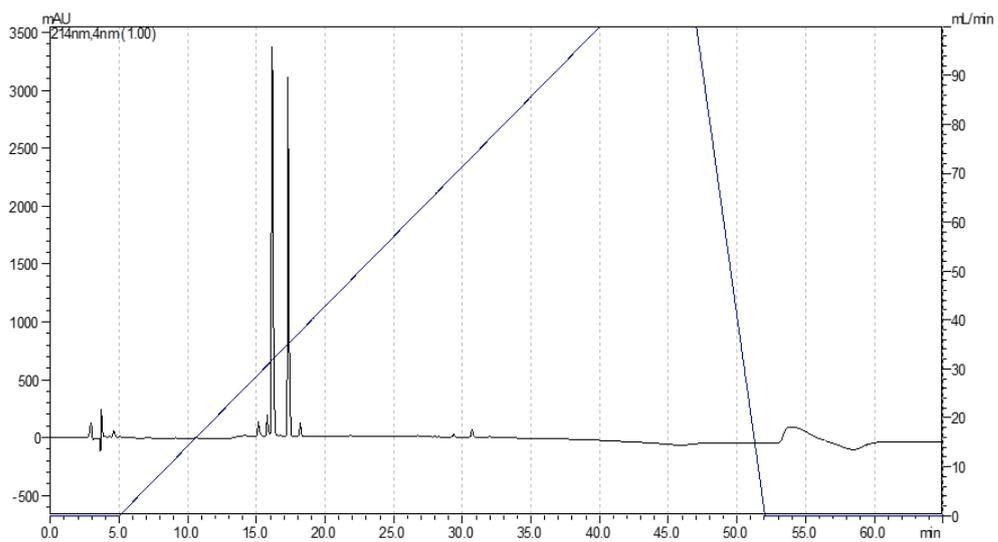
O maior benefício do RP-HPLC é a possibilidade da utilização de diferentes tipos de fases estacionárias e fases móveis. Presentes em várias amostras biológicas, o esteroides demandam técnicas analíticas de alta sensibilidade para quantificação e detecção onde as técnicas cromatográficas se encaixam perfeitamente bem (JEVRIĆ, *et al* 2017) Para melhor compreender os componentes da secreção cutânea assim como tentar refinar os estudos buscando a fração que poderia ser responsável pelos efeitos registrados no estudo da secreção bruta, utilizamos a técnica de RP-HPLC para confirmar o protocolo de separação líquido-líquido dos componentes da secreção cutânea bruta, em fração hidrofílica que corresponde a 24% da secreção bruta, e, fração hidrofóbica que corresponde a 3% do total da secreção bruta(Figura 13)

**Figura 13** - Perfis cromatográficos das secreções cutâneas bruta, hidrofílica e hidrofóbica e perfil comparativo entre as cromatografias.

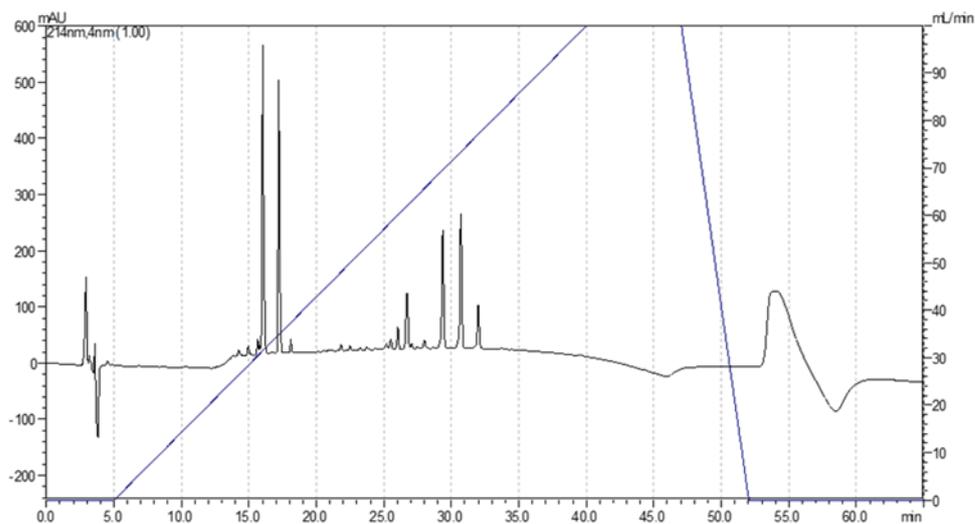
**A**



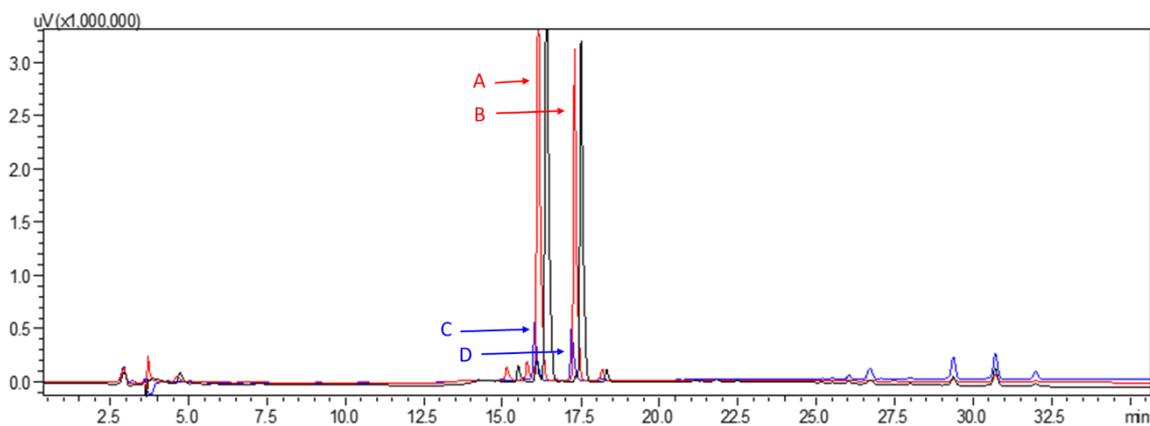
**B**



C



D



**Fonte:** Próprio autor, 2023.

Perfil cromatográfico da secreção cutânea bruta (A), fração hidrofílica (B), fração hidrofóbica (C) analisada em coluna C18 (Gemini 5 $\mu$ m C18 110 Å LC Column 250 X 4,6 mm), com solvente (A) ácido trifluoroacético / H<sub>2</sub>O (1:1000) e (B) ácido trifluoroacético / acetonitrila / H<sub>2</sub>O (1:900:100) em fluxo de 1 mL/min a 40° C, e gradiente de 0 a 100% de solvente B em 35 minutos para solução em H<sub>2</sub>O, em RP-HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa de sistema binário (20A Prominence, Shimadzu Co. Japan). (D) Perfil comparativo entre as cromatografias da secreção bruta (preto), fração hidrofílica com picos em destaque A e B (em vermelho) e fração hidrofóbica com pico em destaque C e D (em azul).

## 5. DISCUSSÃO

A extensa revisão da literatura existente sobre toxinas produzidas por esta família revelou que duas espécies comuns de sapos asiáticos, *Bufo gargarizans* e *Duttaphrynus melanostictus*, produzem os remédios anticancerígenos conhecidos como Chan Su e Senso e seus principais componentes químicos biologicamente ativos são glicosídeos cardíacos esteroidais, tais como bufalina, resibufogenina, cinobufagina, cinobufotalina, marinobufagina, bufotalin, e alcalóides indólicos (bufotenina, bufotenidina, cinobufotenina e serotonina) (SU et al, 2003). (CHAO; DANG; WEI; HUI 2013). Outra preparação usada para tratar câncer e hepatite, Huachansu ou Cinobufacini, é regulamentada pela Chinese State Food and Drug Administration (SFDA) (ISO90020), (QI, et al 2010). No Brasil é comum a prática de protocolos etnoveterinários como o uso de intestinos de *Rhinella schneideri* em equinos para tratar o parasita *Habronema muscae* (SOUTO et al 2011). Apenas uma pequena proporção das mais de 580 espécies da família Bufonidae foi examinada pelos cientistas. A maioria dos produtos químicos produzidos na pele de sapos os protege contra predadores (RODRIGUES et al 2017).

As secreções cutâneas são uma importante fonte de moléculas bioativas. Por exemplo, as secreções pertencentes aos gêneros *Xenopus*, *Silurana*, *Hymenochirus* e *Pseudhymenochirus* da família Pipidae são uma rica fonte de peptídeos de defesa do Hospedeiro com vários graus de atividade antimicrobiana e citotoxicidade para células de mamíferos (CONLON, MECHKARSKA 2014).

A remodelação óssea que ocorre ao longo da vida é um processo fisiológico e necessário para renovação do esqueleto mantendo e até melhorando a resistência óssea. A interrupção da remodelação óssea por doenças como a osteoporose resulta de um desequilíbrio entre a formação óssea pelos osteoblastos e a reabsorção pelos osteoclastos (BOYCE et al 2012). Portanto um modelo que permita simular a remodelação óssea in vitro é de grande importância para prosseguirmos os estudos sobre atividade dos OCs (SUSA et al 2004). Os inibidores dos OCs, por exemplo,

podem reduzir significativamente a frequência e retardar o tempo até o início de eventos relacionados ao esqueleto em pacientes com metástases ósseas de uma ampla variedade de câncer. O principal mecanismo de formação de OCs é o processo de diferenciação que inclui geração de pré-osteoclastos a partir de precursores mieloides, formação de osteoclastos competentes por fusão de pré-osteoclastos e formação das células multinucleadas seguida pela maturação, polarização dos osteoclastos (Hobolt-Pedersen *et al.*, 2013; Søre *et al.*, 2020). Portanto, escolhemos a multinuclearidade como um dos parâmetros morfológicos para avaliar o efeito da secreção bruta na morfologia dos OCs.

Neste projeto visamos avaliar a capacidade de atividade da secreção cutânea bruta e suas frações (hidrofílica e hidrofóbica) da *Rhinella diptycha* na modulação da osteoclastogênese utilizando o modelo dos OCs humanos obtidos a partir de PBMC. As drogas são desenvolvidas a partir de compostos complexos, por isso partimos da testagem da secreção bruta e suas frações, seguido da purificação dos compostos complexos que por fim permitirá isolar a molécula que possui atividade sobre Ocs, que é nosso objetivo de longo prazo.

Os principais resultados obtidos até agora foram em relação a concentração utilizada no modelo de osteoclastos, inibição da diferenciação, contagem de células TRAP+, morfologia dos osteoclastos e análise da multinuclearidade dos osteoclastos.

Primeiramente buscamos as concentrações não tóxicas para precursores de OCs e para OCs maduros, mas que induziram algum efeito na osteogênese. Demonstramos que as concentrações de 25 ng/mL e 2,5 ng/mL da secreção cutânea bruta induziram a toxicidade em PBMC após 24 horas e 15 dias de cultivo, resultados obtidos pelo método CCK8. Dando seguimento, foram realizados novos experimentos com concentrações menores 0,25 ng/mL, 0,125 ng/mL e 0,05 ng/mL. Em seguida utilizando estas mesmas concentrações avaliamos a formação dos núcleos multinucleados e a maturidade dos OCs tratados com a secreção bruta utilizando a coloração TRAP, que é uma enzima da família das fosfatases ácidas e se localiza intracelularmente dentro do compartimento lisossomal de osteoclasto, macrófagos e células dendríticas, e é utilizada como um marcador histoquímico da atividade osteoclástica (HABERMANN *et al.*, 2007).

Realizamos ainda a contagem do número de núcleos dos OCs que foram marcados com DAPI para coloração de ácido nucleico e observação da morfologia

dos OCs através da marcação por Faloidina associada a Alexa Flúor 488 (*Life Technologies*, EUA). Esta marcação permite identificar estruturas únicas de actina formadas pelos OCs localizadas na periferia da célula onde se organizam em forma de anel durante sua maturação terminal, estando envolvida diretamente com a capacidade de reabsorção óssea (JURDIC; SALTEL; CHABADEL; DESTAING, 2006).

Como hipótese do efeito causado pela secreção cutânea, o que observamos em nosso modelo, está embasado em estudos já publicados que apresentam ensaios com compostos similares às da secreção testada, como por exemplo, a espécie *Sinomenium acutum* (Menispermaceae), uma planta trepadeira caducifólia nativa da Coreia, Japão e China, usada na medicina chinesa. É conhecida na literatura, a ação anti osteoclastogênica de alcaloides de extrato de rizoma de *Sinomenium acutum* em osteoclastos derivados de macrófagos de medula óssea de camundongo (LEE, J. Y. *et al.*, 2016). E também, que a Harmina, um alcaloide  $\beta$ -carbolina presente em várias plantas, como a *Peganum harmala* (arruda síria) e *Passiflora incarnata* (passiflora), que são muito comumente usados em medicamentos populares (ALLEN; HOLMSTEDT, 1980; CAO *et al.*, 2007) que inibem a osteoclastogênese suprimindo as expressões de c-Fos e NFATc1 induzidas por RANKL prevenindo a reabsorção óssea em culturas de células RAW264.7 e órgãos de camundongos ovariectomizados (LEE, J.-W. *et al.*, 2010).

A secreção cutânea do sapo *Rhinella diptycha* possui duas classes majoritárias de moléculas em sua composição, as aminas biogênicas e os esteroides (TOLEDO; JARED 1995). A comparação dos cromatogramas nos permitiu confirmar a eficácia da técnica de partição líquido-líquido, pelo aumento da intensidade dos picos de moléculas hidrofílicas na fração hidrofílica (água) e aumento da intensidade dos picos de moléculas hidrofóbicas na fração hidrofóbica (Diclorometano), pois na composição da secreção cutânea e secreção da glândula parotoide dos anfíbios podemos encontrar aminas biogênicas, alcaloides, esteroides e peptídeos (CLARK 1997) e moléculas que possuem algum grau de caráter hidrofóbico, como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, podem ser separados por cromatografia de fase reversa com excelente recuperação e resolução (RENLUND *et al* 1993).

## 6. CONCLUSÃO

Analisando os resultados dos nossos experimentos podemos concluir que:

- ✚ Utilizando o método CCK8, detectamos que as [25ng/mL e 2,5ng/mL] da secreção bruta diminuíram a viabilidade das PBMC e também da população de células no 15º dia de diferenciação.
- ✚ Curiosamente as frações hidrofílica e hidrofóbica da secreção bruta nestas mesmas concentrações [25ng/mL e 2,5ng/mL] não houve diminuição da viabilidade das PBMC e das células no 15º dia de diferenciação.
- ✚ A fração hidrofóbica [25ng/mL] favoreceu significativamente a formação de osteoclastos.
- ✚ Relembrando que a multinuclearidade é uma característica dos osteoclastos, observamos que a quantidade dos osteoclastos multinucleados diminuiu com a interferência da secreção bruta [0,25ng/mL]
- ✚ Utilizando a coloração de TRAP, que é um marcador bioquímico de função dos osteoclastos, verificamos que a secreção bruta [0,25ng/mL e 0,125ng/mL] diminuiu o número de osteoclastos enzimaticamente ativos.
- ✚ Não observamos melhor significativa de imagem da célula com adição de Coating de colágeno, e na ausência de Dexametasona não houve diferenciação das PBMCs em osteoclastos.
- ✚ A coloração dos anéis de Actina não foi decisiva em apontar alguma evidencia nos grupos experimentais, o que nos leva a utilização de mais métodos conclusivos.

Nossa pesquisa é baseada em trabalhos onde a secreção e suas frações já são utilizadas, em outros modelos e inclusive em terapias humanas (SCHMEDA-HIRSCHMANN, *et al.*, 2014; PATWARDHAN *et al* 2005) nos dando subsídios para estudos e desenvolvimento para inovações nessa área.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

- Agencia de notícias IBGE <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/34438-populacao-cresce-mas-numero-de-pessoas-com-menos-de-30-anos-cai-5-4-de-2012-a-2021>
- AKISAKA, Toshitaka *et al.* Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 16, n. 7, p. 1248-1255, 2001.
- ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R. The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, Stockholm, v. 19, n. 8, p. 1573-1582, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)83773-5](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)83773-5).
- ALMEIDA, P. G. *et al.* Morphological re-evaluation of the parotoid glands of *Bufo ictericus* (Amphibia, Anura, Bufonidae). **Contrib. Zool.**, [s. l.], v. 76, n. 3, p. 145-152, 2007.
- ALVES, Rômulo RN; ALVES, Humberto N. The faunal drugstore: Animal-based remedies used in traditional medicines in Latin America. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**, v. 7, p. 1-43, 2011.
- AMASSEKARA, D. S.; YU, J., RHO, J. Bone loss triggered by the cytokine network in inflammatory autoimmune diseases. **J. Immunol. Res.**, [s. l.], v. 2015, ID 832127, p. 1-12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1155/2015/832127>.
- AMPHIBIA WEB. Amphibian species by the numbers. Information on amphibian biology and conservation. **Amphibian Species**, [s. l.], 2000. Disponível em: <http://www.amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>. Acesso em: 27 set. 2021.
- ANDIA, D. C. **Características morfológicas do osso alveolar de ratos tratados com ciclosporina-A ou tracolimus**. 2006. 116 f. Dissertação (Mestrado em Periodontia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.
- ARAI, F. *et al.* Commitment and differentiation of osteoclast precursor cells by the sequential expression of c-Fms and receptor activator of nuclear factor kappaB (Rank) receptors. **J. Exp. Med.**, [s. l.], v. 190, n. 12, p. 1741-1754, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1084/jem.190.12.1741>.
- BARROS, H. V. de. **Efeitos antirrâbicos *in vitro* e *in vivo* da bufotenina: mecanismo, toxicologia e biodistribuição**. 2017. Tese (Doutorado em Toxinologia) – Instituto Butantan, São Paulo, 2017.

BICK, Roger J. et al. Effects of Chan Su, a traditional Chinese medicine, on the calcium transients of isolated cardiomyocytes: cardiotoxicity due to more than Na, K-ATPase blocking. **Life sciences**, v. 72, n. 6, p. 699-709, 2002.

BI, H. *et al.* Key triggers of osteoclast-related diseases and available strategies for targeted therapies: a review. **Front. Med.**, v. 4, n. 234, p. 1-10, Dec. 2017. DOI: <https://dx.doi.org/10.3389%2Ffmed.2017.00234>.

BLAIR, H. C.; TEITELBAUM, S. L.; GHISELLI, R.; GLUCK, S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. **Science**, New York, v. 245, n. 4920, p. 855-857, Aug. 1989. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.2528207>.

BOISSY, Patrice *et al.* Transcriptional activity of nuclei in multinucleated osteoclasts and its modulation by calcitonin. **Endocrinology**, v. 143, n. 5, p. 1913-1921, 2002.

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

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature**, [s. l.], v. 423, n. 6937, p. 337-342, May 2003. ISSN 0028-0836.

BRASIL disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2022/outubro/osteoporose-e-uma-das-principais-causas-de-morbidade-e-mortalidade-em-idosos>

BRAZIL, V.; VELLARD, J. A. Contribuição aos estudos de batrachios. **Mem. Inst. But.**, [s. l.], v. 3, p. 7-70, 1926.

BRAZIL, V.; VELLARD, J. A. Contribution to the study of venom of toads of genus Bufo. **An. Paul. Med. Cir.**, [s. l.], v. 60, n. 5, p. 525-536, Nov. 1950.

BURSTONE, M. S. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 7, n. 1, p. 39-41, 1959.

BULL, H. et al. Desmistified Acid phosphatases. **Mol Path.**, p. 65-72, 1999

CAO, R. *et al.*  $\beta$ -Carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Curr. Med. Chem.**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 479-500, 2007. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986707779940998>.

CEN, Wanjing *et al.* A Simple Pit Assay Protocol to Visualize and Quantify Osteoclastic Resorption In Vitro. **Journal of Visualized Experiments: Jove**, n. 184, 2022.

CHAMBERS, T. J. Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. **J. Pathol.**, [s. l.], v. 192, n. 1, p. 4-13, 2000.

CHAO, Xu; DANG, Lin; WEI, Min Hui. The effect and mechanism of Apoptosis induced by Desacetylcinobufotalin (DEBF) in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. In: *Applied Mechanics and Materials*. Trans Tech Publications Ltd, 2013. p. 587-590.

CHEN, K. K.; KOVARÍKOVÁ, A. Pharmacology and toxicology of toad venom. **J. Pharm. Sci.**, [s. l.], v. 56, n. 12, p. 1535-1541, Dec. 1967. DOI: <https://doi.org/10.1002/jps.2600561202>.

CHEN, M. *et al.* Emerging therapeutic targets for osteoporosis treatment. **Expert Opin. Ther. Targets**, [s. l.], v. 18, n. 7, p. 817-831, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1517/14728222.2014.912632>.

CLARKE, Barry T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. *Biological Reviews*, 1997, 72.3: 365-379.

CONLON, J. Michael; MECHKARSKA, Milena. Host-defense peptides with therapeutic potential from skin secretions of frogs from the family Pipidae. **Pharmaceuticals**, v. 7, n. 1, p. 58-77, 2014.

CUNHA-FILHO, G. A. *et al.* Cytotoxic profile of natural and some modified bufadienolides from toad *Rhinella schneideri* parotoid gland secretion, **Toxicon**, [s. l.], v. 56, n. 3, p. 339-348, Sep. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.021>.

DALY, John W. *et al.* First occurrence of tetrodotoxin in a dendrobatid frog (*Colostethus inguinalis*), with further reports for the bufonid genus *Atelopus*. **Toxicon**, v. 32, n. 3, p. 279-285, 1994.

DALY, John W. The nature and origin of amphibian alkaloids. In: **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. Academic Press, 1998. p. 141-169.

DALY, John W. *et al.* Indolizidine 239Q and quinolizidine 275I. Major alkaloids in two Argentinian bufonid toads (*Melanophryniscus*). **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 858-870, 2008.

D'AMÉLIO, F. *et al.* Bothrops moojeni Venom and Its Components Strongly Affect Osteoclasts' Maturation and Protein Patterns. **Toxins**, [s. l.], v. 13, n. 7, p. 459, Jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins13070459>.

DRAKE, M. T.; CLARKE, B. L.; KHOSLA, S. Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. **Mayo Clin. Proc.**, [s. l.], v. 83, n. 9, p. 1032-1045, Sep. 2008. DOI: <https://doi.org/10.4065/83.9.1032>.

EGHBALI-FATOURECHI, Guitty *et al.* Role of RANK ligand in mediating increased bone resorption in early postmenopausal women. **The Journal of clinical investigation**, v. 111, n. 8, p. 1221-1230, 2003.

FALONI, A. P. S. et al. Decrease in the number and apoptosis of alveolar bone osteoclasts in estrogen-treated rats. **Journal of periodontal research**, v. 42, n. 3, p. 193-201, 2007.

FROST, D. **Amphibian species of the world: an online reference**. Version 6.1. [New York], 2021. Disponível em: <https://amphibiansoftheworld.amnh.org/>. Acesso em: 28 set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.5531/db.vz.0001>.

FUHRMAN, Frederick A.; FUHRMAN, Geraldine J.; MOSHER, Harry S. Toxin from skin of frogs of the genus *Atelopus*: differentiation from dendrobatid toxins. **Science**, v. 165, n. 3900, p. 1376-1377, 1969.

GARNERO, Patrick et al. The collagenolytic activity of cathepsin K is unique among mammalian proteinases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 48, p. 32347-32352, 1998.

GD, Roodman. Windle JJ. Paget disease of bone. **J Clin Invest**, v. 115, p. 200-08, 2005.

GOWDA, R. M.; COHEN, R. A.; KHAN, I. A. Toad venom poisoning: resemblance to digoxin toxicity and therapeutic implications. **Heart**, v. 89, n. 4, p. e14-e14, 2003.

GOLAN D. E., Tashjian A. H., Armstrong E. J., Armstrong A. W. **Princípios da Farmacologia**. 2009. 882 p

HABERMANN, B. *et al.* Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) as a marker of osteoclast activity in the early phase after cementless total hip replacement. **Acta Orthop.**, [s. l.], v. 78, n. 2, p. 221-225, Apr. 2007. Disponível: <https://doi.org/10.1080/17453670710013717>.

HALLEEN, J. M. *et al.* Osteoclast-derived tartrate-resistant acid phosphatase isoenzyme 5b as a serum marker of bone resorption rate. **Bone**, v. 23, n. Suppl. 1, p. F432, 1998

HALEEN, J. M. *et al.* Intracellular fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. **J. Biol. Chem.**, [s. l.], v. 274, n. 33, p. 22907-22910, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22907>.

HAYES, R. A., Piggott, A. M., Dalle, K., & Capon, R. J. (2009). Microbial Biotransformation as a source of chemical diversity in cane toad steroid toxins. **Bioorg Med Chem Lett**, 19, 1790–2.

HOBOLT-PEDERSEN, Anne-Sofie; DELAISSÉ, Jean-Marie; SØE, Kent. Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. **Calcified tissue international**, v. 95, p. 73-82, 2014.

HOFBAUER, Lorenz C. et al. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. **Endocrinology**, v. 140, n. 9, p. 4367-4370, 1999.

HORIGUCHI, J.; WARREN, M. K.; KUFÉ, D. Expression of the macrophage-specific colony-stimulating factor in human monocytes treated with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, [s. l.], v. 69, n. 4, p. 1259-1261, Apr. 1987. DOI: <https://doi.org/10.1182/blood.V69.4.1259.1259>.

IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Pesquisas por Amostra de Domicílios, Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios Contínua 2012/2021. [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101957\\_informativo.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101957_informativo.pdf)

JARED, C. et al. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 197-207, 2009.

JEVRIĆ, Lidija R. et al. Lipophilicity estimation and characterization of selected steroid derivatives of biomedical importance applying RP HPLC. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 134, p. 27-35, 2017.

JURDIC, Pierre et al. Podosome and sealing zone: specificity of the osteoclast model. **European journal of cell biology**, v. 85, n. 3-4, p. 195-202, 2006.

KANEHISA, J. et al. A band of F-actin containing podosomes is involved in bone resorption by osteoclasts. **Bone**, v. 11, n. 4, p. 287-293, 1990.

KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. **Histologia e embriologia oral**. Texto-Atlas-Correlações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KHARE, Tushar et al. Exploring phytochemicals for combating antibiotic resistance in microbial pathogens. **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 720726, 2021.

KIM HJ, Zhao H, Kitaura H, Bhattacharyya JURDIC, P.; SALTEL, F.; CHABADEL, A.; DESTAING, O. Podosome and sealing S, Brewer JA, Muglia LJ, Patrick Ross F, Teitelbaum SL. Glucocorticoids and the osteoclast. *Ann NY Acad Sci*. 2007;1116:335–9. doi:10.1196/annals.1402.057.

KIM, Yong H. et al. Tetrodotoxin: Occurrence in atelopid frogs of Costa Rica. **Science**, v. 189, n. 4197, p. 151-152, 1975.

KIMBLE, R. B. et al. Estrogen deficiency increases the ability of stromal cells to support murine osteoclastogenesis via an interleukin-1- and tumor necrosis factor-mediated stimulation of macrophage colony-stimulating factor production. **J. Biol. Chem.**, [s. l.], v. 271, n. 46, p. 28890-28897, Nov. 1996. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.271.46.28890>.

KHOSLA, S. et al. Estrogen and testosterone have opposite effects on circulating OPG levels following induction of hypogonadism and aromatase inhibition in normal elderly men: Potential mechanism for differential effects of estrogen versus

testosterone on bone resorption. In: JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH. 2025 M ST, NW, STE 800, WASHINGTON, DC 20036-3309 USA: AMER SOC BONE & MINERAL RES, 2001. p. S146-S146. LACEY, D. L. *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell.**, [s. l.], v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81569-x](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81569-x).

LAVILLA, Esteban Orlando; BRUSQUETTI, Francisco. On the identity of *Bufo diptychus cope*, 1862 (anura: Bufonidae). 2018.

LEE, J.-W. *et al.* Alisol-B, a novel phyto-steroid, suppresses the RANKL-induced osteoclast formation and prevents bone loss in mice. **Biochem. Pharmacol.**, [s. l.], v. 80, n. 3, p. 352-361, Aug. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.04.014>.

LEE, J. Y. *et al.* Anti-osteoclastogenic effects of isoquinoline alkaloids from the rhizome extract of *Sinomenium acutum*. **Arch. Pharm. Res.**, [s. l.], v. 39, n. 5, p. 713-720, May 2016.

LEE, K. *et al.* Selective Regulation of MAPK Signaling Mediates RANKL-dependent Osteoclast Differentiation. **Int J Biol Sci.**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 235-245, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.13814>.

MACIEL, N. M.; COLLEVATTI, R. G.; COLLI, G. R.; SCHWARTZ, E. F. Late Miocene diversification and phylogenetic relationships of the huge toads in the *Rhinella marina* (Linnaeus, 1758) species group (*Anura: Bufonidae*). **Mol. Phylogenet. Evol.**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 787-797, Nov. 2010.

MACIEL, V. Pessoas que vivem com Doença de Paget terão novo medicamento no SUS. **Portal do Ministério da Saúde**, Brasília, 27 dez. 2018. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/pessoas-que-vivem-com-doenca-de-paget-terao-novo-medicamento-no-sus>. Acesso em: 28 set. 2021.

MACKIE, E. J. Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.**, [s. l.], v. 35, n. 9, p. 1301-1305, Sep. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00107-9](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00107-9).

MARX, R. E. Pamidronate (Aredia) and zoledronate (Zometa) induced avascular necrosis of the jaws: a growing epidemic. **J. Oral. Maxillofac. Surg.**, [s. l.], v. 61, n. 9, p. 1115-1117, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0278-2391\(03\)00720-1](https://doi.org/10.1016/s0278-2391(03)00720-1).

MEBS, Dietrich *et al.* Further report of the occurrence of tetrodotoxin in *Atelopus* species (family: Bufonidae). **Toxicon**, v. 33, n. 2, p. 246-249, 1995.

MINKIN, Cedric. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. **Calcified tissue international**, v. 34, p. 285-290, 1982.

MONTI, R.; CARDELLO, L. Bioquímica do Veneno de Anfíbios. *In*: BARRAVIERA, B. (Ed.). **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: EPUC, 1994. p. 225-232.

NARDUCCI, P.; BAREGGI, R.; NICOLIN, V. Receptor Activator for Nuclear Factor kappa B Ligand (RANKL) as an osteoimmune key regulator in bone physiology and pathology. **Acta. Histochem.**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 73-81, Feb. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2009.10.003>.

NORMAN, D. R. **Anfibios y Reptiles del Chaco Paraguayo**, Tomo 1. (Amphibians and Reptiles of the Paraguayan Chaco, Volume 1.). San José (Costa Rica): [s. n.], 1994.

PATWARDHAN, Bhushan et al. Ayurveda and traditional Chinese medicine: a comparative overview. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2, n. 4, p. 465-473, 2005.

PEREIRA RM, Delany AM, Canalis E. Cortisol inhibits the differentiation and apoptosis of osteoblasts in culture. *Bone*. 2001;28(5):484–90. doi:10.1016/s8756-3282(01)00422-7.

PIPER, Kim; BOYDE, Alan; JONES, Sheila J. The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro. **Anatomy and embryology**, v. 186, p. 291-299, 1992.

PRICE, Christopher P.; KIRWAN, A.; VADER, Christian. Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of bone resorption. **Clinical chemistry**, v. 41, n. 5, p. 641-643, 1995.

QI, Fanghua, et al. Cinobufacini, an aqueous extract from *Bufo bufo gargarizans* Cantor, induces apoptosis through a mitochondria-mediated pathway in human hepatocellular carcinoma cells. *Journal of ethnopharmacology*, 2010, 128.3: 654-661.

QI, F. *et al.* Antitumor activity of extracts and compounds from the skin of the toad *Bufo bufo gargarizans* Cantor. **Int. Immunopharmacol.**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 342-349, Mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2010.12.007>.

QUINN, R. H. *et al.* Contemporary management of metastatic bone disease: tips and tools of the trade for general practitioners **Instr. Course Lect.**, [s. l.], v. 63, p. 431-441, 2014.

REDDY, Sakamuri V.; ROODMAN, G. David. Control of osteoclast differentiation. **Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expression**, v. 8, n. 1, 1998.

REGIS-ALVES, E. *et al.* Structural cutaneous adaptations for defense in toad (*Rhinella icterica*) parotoid macroglands. **Toxicon**, [s. l.], v. 137, p. 128-134, 2017.

REID, I. R. Pharmacotherapy of Paget's disease of bone. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 13, n. 5, p. 637-646, Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1517/14656566.2012.662486>.

RENLUND, Staffan, et al. Micropurification and amino acid sequence of  $\beta$ -casomorphin-8 in milk from a woman with postpartum psychosis. *Peptides*, 1993, 14.6: 1125-1132.

RIBEIRO, R. da S.; EGITO, G. T. do; HADDAD, C. F. B. Chave de identificação: anfíbios anuros da vertente de Jundiá da Serra do Japi, estado de São Paulo. **Biota Neotrop.**, Campinas, v. 5, n. 2, p. 235-247, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032005000300017>.

RIES, William L.; GONG, Joseph K.; GUNSOLLEY, John C. The distribution and kinetics of nuclei in rat osteoclasts. **Cell Proliferation**, v. 20, n. 1, p. 1-14, 1987.

RODAN, G. A.; MARTIN, T. J. Therapeutic approaches to bone diseases. **Science**, New York, v. 289, n. 5484, p. 1508-1514, 2000. ISSN 0036-8075. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1508>.

RODRÍGUEZ, Candelario et al. Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). **Journal of ethnopharmacology**, v. 198, p. 235-254, 2017.

ROENNFELDT, Narelle *et al.* Nucleolar organizer regions (Ag-NORs) in multinuclear osteoclasts. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 16, p. 227-233, 1998.

ROSTELATO-FERREIRA, Sandro et al. Presynaptic effect of a methanolic extract of toad (*Rhinella schneideri*) poison in avian neuromuscular preparation. **Journal of Venom Research**, v. 2, p. 32, 2011.

SAKATE, M.; LUCAS DE OLIVEIRA, P. C. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **J. Venom. Anim. Toxins**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 52-62, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000100003>.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, Guillermo et al. Antiproliferative activity and new argininylyl bufadienolide esters from the "cururú" toad *Rhinella* (*Bufo*) *schneideri*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 155, n. 2, p. 1076-1085, 2014.

SHIBAO, Priscila Yumi Tanaka et al. Deep sequencing analysis of toad *Rhinella schneideri* skin glands and partial biochemical characterization of its cutaneous secretion. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, 2018.

SHIMADA, KAZUTAKE; SATO, YOSHIHIRO; NAMBARA, TOSHIO. Occurrence of marinobufotoxin and telocinobufotoxin homologs in the skin of *Bufo bankorensis* BORBOUR. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 35, n. 6, p. 2300-2304, 1987.

SILVA, P. R. F. da; JARDIM, E. C.; FRANÇA, L. R.; LEMES, A. G.; SILVA, P. C. Tratamento de cães envenenados experimentalmente por bufadienólídeos (substâncias encontradas na secreção das glândulas paratíreas dos sapos do gênero bufo). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 8, n. 1, p. 114–120, 2007. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/pat/article/view/2318>. Acesso em: 3 mar. 2023.

SILVA, P.; JUDAS, F. O papel do osteoclasto na fisiopatologia de doenças do aparelho locomotor e na condição de alvo terapêutico. Coimbra: Clínica Universitária de Ortopedia, CHUC, 2013.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M. D. Osteopontin. **Crit. Rev. Oral. Biol. Med.**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 279-303, 2000.

DOI: <https://doi.org/10.1177%2F10454411000110030101>.

SØE, Kent. Osteoclast Fusion: Physiological Regulation of Multinucleation through Heterogeneity—Potential Implications for Drug Sensitivity. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 20, p. 7717, 2020.

SOUSA, J. C. *et al.* Histologia da glândula paratírea de anuros da espécie *Rhinella schneideri* (Amphibia: Bufonidae). **Biotemas**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 111-118, 2015.

DOI: <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2015v28n2p111>.

SOUTO, Wedson MS *et al.* Medicinal animals used in ethnoveterinary practices of the 'Cariri Paraibano', NE Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 7, p. 1-20, 2011.

STEYN, O. S.; HEERDEN, F. R. van. Bufanolides of plant and animal origin. **Nat. Prod. Rep.**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 397-413, Aug. 1998. DOI:

<https://doi.org/10.1039/a815397y>.

SU, Y., HUANG, X., ZHANG, D., ZHANG, Y., XIE, J., & LING, C. (1992). HPLC separation and determination of bufadienolide in cinobufacini injection. *Chinese Traditional Patent Medicine*.

SUSA, Mira *et al.* Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. **Journal of translational medicine**, v. 2, p. 1-12, 2004.

TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. **J. Periodontal Res.**, [s. l.], v. 40, p. 287-293, Aug. 2005. DOI:

<https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2005.00814.x>.

TEITELBAUM, S. L. Bone resorption by Osteoclasts. **Science**, New York, v. 289, n. 5484, p. 1504-1508, Sep. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.289.5484.1504>.

TEITELBAUM, S. L. The osteoclast and its unique cytoskeleton. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v. 1240, p. 14-17, Dec. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06283.x>.

TOLEDO, R. C.; JARED, C. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol. Part A Physiol.**, [s. l.], v. 111, n. 1, p. 1-29, May 1995.

VÄÄNÄNEN, H. K. *et al.* Evidence for the presence of a proton pump of the vacuolar H (+)-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. **J. Cell Biol.**, [s. l.], v. 111, n. 3, p. 1305-1311, Sep. 1990. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.111.3.1305>.

VÄÄNÄNEN, H. K.; ZHAO, H.; MULARI, M.; HALLEEN, J. M. The cell biology of osteoclast function. **J. Cell Sci.**, [s. l.], v. 113, n. 3, p. 377-381, Feb. 2000.

WEISSMAN, I. L.; ANDERSON, D. J.; GAGE, F. Stem and Progenitor Cells: Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, [s. l.], v. 17, n. 1, p. 387-403, Nov. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.387>.

WOITGE, H. W. *et al.* Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. **J. Bone Miner. Res.**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 792-801, May 1999.

WULF, E. *et al.* Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proceedings of the national academy of sciences*, v. 76, n. 9, p. 4498-4502, 1979.

YAVROPOULOU, M. P.; YOVOS, J. G. Osteoclastogenesis--current knowledge and future perspectives. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v. 8, n. 3, p. 204-216, 2008.

YOTSU-YAMASHITA, Mari; MEBS, Dietrich; YASUMOTO, Takeshi. Tetrodotoxin and its analogues in extracts from the toad *Atelopus oxyrhynchus* (family: Bufonidae). **Toxicon**, v. 30, n. 11, p. 1489-1492, 1992.

YOTSU-YAMASHITA, Mari *et al.* The structure of zetekitoxin AB, a saxitoxin analog from the Panamanian golden frog *Atelopus zeteki*: A potent sodium-channel blocker. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 13, p. 4346-4351, 2004.

ZHAO, Qingxiao; JIA, Yanping; XIAO, Yongtao. Cathepsin K: a therapeutic target for bone diseases. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 380, n. 4, p. 721-723, 2009.

ZHANG, Yu *et al.* Comparative analysis of hydrophilic ingredients in toad skin and toad venom using the UHPLC-HR-MS/MS and UPLC-QqQ-MS/MS methods together with the anti-inflammatory evaluation of indolealkylamines. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 86, 2018.

ZIRNGIBL R. A.; VORONOV, I. The Role of mTOR in Osteoclasts. *In*: TURKSEN, K. (Eds.). **Autophagy in Health and Disease**. Stem Cell Biology and Regenerative

Medicine. Cham (Switzerland): Humana Press, 2018. p. 71-85. DOI:  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-98146-8\\_5](https://doi.org/10.1007/978-3-319-98146-8_5).

<sup>1</sup>De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NBR 6023:  
Informação e documentação-referências-elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018