



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

SAMIA JÉSSICA DA SILVA TAVARES

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORTIVO ÓSSEO DA
CUMARINA E DA UMBELIFERONA NA PERIODONTITE VIA INIBIÇÃO DE IL-
1 β EM CAMUNDONGOS**

FORTALEZA

2021

SAMIA JÉSSICA DA SILVA TAVARES

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORTIVO ÓSSEO DA CUMARINA E
DA UMBELIFERONA NA PERIODONTITE VIA INIBIÇÃO DE IL-1 β EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Clínica Odontológica.
Linha de Pesquisa: Terapêutica Clínica e Experimental Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Vilma de Lima

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- T233e Tavares, Samia Jéssica da Silva.
Efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da cumarina e da umbeliferona na periodontite via inibição de IL-1 β ; em camundongos / Samia Jéssica da Silva Tavares. – 2021.
136 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Vilma de Lima.
1. Cumarinas. 2. Umbeliferonas. 3. Perda do osso alveolar. 4. Citocina. I. Título.

CDD 617.6

SAMIA JÉSSICA DA SILVA TAVARES

EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORPTIVO ÓSSEO DA CUMARINA E
DA UMBELIFERONA NA PERIODONTITE VIA INIBIÇÃO DE IL-1 β EM
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica. Linha de Pesquisa: Terapêutica Clínica e Experimental Aplicada.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Vilma de Lima (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza

Prof^ª. Dr^ª Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal
Universidade Federal do Ceará (UFC) - Fortaleza

Prof^ª. Dr^ª Deysi Viviana Tenazoa Wong
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)/Hospital Haroldo Juaçaba

Dedico,

À DEUS,

Minha fortaleza.

À SÃO JOSÉ,

Meu intercessor.

À MINHA MÃE,

Sonia Maria da Silva,

Minha base.

AGRADECIMENTOS

À **Profa. Dra. Vilma de Lima** por me receber de braços abertos e com tanto carinho como sua discente. Agradeço pela confiança, empenho, paciência e dedicação na realização desta dissertação. Sou imensamente grata.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia (PPGO)** da Universidade Federal do Ceará (UFC) e a todos os docentes que contribuíram em minha formação.

Aos **prof. Dr. Roberto César Pereira Lima Júnior, Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong, Profa. Dra. Luzia Kalyne Almeida Moreira Leal, Profa. Dra. Iracema Matos de Melo e a Profa. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar**, pela colaboração, disposição para elucidação de dúvidas e estímulo científico.

Ao **Laboratório de Osteofarmacologia (LOF)**, minha segunda casa, onde em tempo integral me dediquei para a realização desta pesquisa, e às estudantes de **Iniciação Científica, Camila Rodrigues Pereira e Roseane Aline Monteiro Fortes**, por contribuírem com todos os passos desta pesquisa, pelo amor e carinho e todos os momentos compartilhados, os dias sempre foram mais leves quando estava na presença de vocês. Sou grata pela amizade e apoio!

Ao **Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Câncer (LAFICA)** e ao **Laboratório de Farmacologia Bioquímica (LFB)** e seus integrantes, pela viabilização e apoio para a execução dos protocolos experimentais relativos ao estudo da inflamação, especialmente aos **discentes Francisco Rafael Alves Santana Cesário, Livia Maria Soares Nobre, Aurilene Gomes Cajado e Gisele de Fátima Pinheiro Rangel**, por aceitarem participar dos experimentos em meio a tantas tarefas diárias.

Ao **Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Prof. Eduardo Torres**, na pessoa do **Prof. Dr. Richard Boarato David** (Coordenador) e **Dr. Wesley Lyeverton Correia Ribeiro** (médico veterinário), por todo o cuidado com o equipamento de manutenção e experimentação animal.

Ao técnico em histologia do **Laboratório de Patologia Bucal da UFC, Alceu Machado de Sousa**, por toda a sua paciência e disponibilidade para comigo, sua expertise foi essencial.

Aos funcionários do **Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)**, por todo o zelo e atenção pela manutenção e limpeza dos laboratórios e segurança dos pesquisadores.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, nº de processo 428380/2016-6; VL), pelo apoio financeiro às atividades de pesquisa científica.

Ao **Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX) da Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP)** (Pronex, nº PR2-0101-00054.01.00/15; NMNA), pelo apoio financeiro às atividades de pesquisa científica.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, nº de processo 88887.476298/2020-00; PPGO-UFC) pela concessão de bolsa de estudos.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Início parafraseando o grande poeta Raul Seixas que sabiamente recitou “sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que sonha junto é realidade”, frase esta que se tornou o prelúdio da minha trajetória, pois nada alcançaria sem o apoio “dos meus” que verdadeiramente e exaustivamente caminharam lado a lado comigo fazendo com o que meu/nosso sonho se tornasse realidade.

Agradeço imensamente a minha mãe **Sonia Maria da Silva**, por seu grande gesto de amor ao abdicar muitas vezes dos seus próprios sonhos para tornar realidade o meu. Minha mãe, seu apoio, incentivo e principalmente sua fé (que hoje é minha fé) sempre será o que me manterá firme.

Ao meu irmão **Jefferson Tavares Pereira Júnior**, por seu imenso apoio, onde genuinamente assumiu o papel de pai na minha vida e generosamente me deu seu apoio financeiro e afetivo, se não fosse a sua generosidade eu não estaria aqui hoje realizando este sonho. Você é o meu verdadeiro exemplo do poder transformador da educação.

Ao meu companheiro **Wisley dos Santos Costa**, por seu amor e carinho, sem dúvida você foi o meu pilar, meu amigo, meu terapeuta e meu amor. Agradeço a sua paciência e seu acalento em todos os momentos.

Aos meus irmãos **Maria Julhianiv da Silva, José Rocha Matos Neto, João Gabriel da Silva Matos e Ana Isabel da Silva Matos**, que me incentivaram com suas palavras de amor. Agradeço por todos os nossos momentos e por entenderem a minha ausência.

Aos **meus avós, tios e primos**, pessoas espetaculares que sempre estiveram ao meu lado durante todo o percurso, vocês são meu porto seguro.

Aos amigos de dentro e fora da Odontologia que me impulsionaram e que verdadeiramente “jogaram a âncora” na minha vida, **Mariana Guimarães, Priscila França, Mateus Plutarco, Amora Menezes, Flávia Yorrana, Letícia Novaes, Lorrana Leandro, Olga Frazão, Dávila Narely, Marcus Vinícius e Williany Santos**. Vocês foram fundamentais.

RESUMO

A periodontite é uma doença crônica, inflamatória e multifatorial, resultante de uma disbiose do biofilme dentário e a desregulação da resposta do hospedeiro. Tal doença exibe alta prevalência, sendo considerada a principal causa de perda dentária em adultos. Embora existam vários tratamentos para periodontite, em alguns pacientes a resposta é insatisfatória, sendo conveniente a busca por abordagens farmacológicas complementares ao tratamento primário. As cumarinas são metabólitos secundários encontrados em espécies naturais e exibem diversas atividades farmacológicas, com destaque a sua ação anti-inflamatória e, mais recentemente, sobre o metabolismo ósseo. O objetivo desta dissertação foi avaliar os efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo da cumarina (CUM) e da umbeliferona (UMB) na reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura. Grupos de camundongos Swiss machos (n=6-7 cada) receberam i.p. CUM (5, 15 e 45 mg/kg), UMB (15, 45 e 135 mg/kg) ou Salina, durante 7 dias. Como controle foram utilizados animais naïve. A reabsorção óssea alveolar (ROA) foi avaliada por macroscopia, seguida de histomorfometria da região de furca e expressão da fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP). A gengiva foi avaliada quanto a atividade da mieloperoxidase (MPO) e quantificação de IL-1 β . Sistemicamente, foram feitas dosagens séricas de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina, e pesagens diárias dos animais. A ligadura nos animais Salina induziu ROA (240%), aumentou a área de furca (219%) e a expressão de TRAP (932%); na gengiva, observou-se aumento da MPO (202%) e da quantificação de IL-1 β (883%), comparados aos naïve. A CUM (5, 15 e 45 mg/kg) reduziu a ROA em 28%, 25% e 22%, respectivamente, em relação ao Salina (p<0,05). Na gengiva, CUM (5 mg/kg) reduziu MPO em 71,6% e nas doses de 5 e 15 mg/kg reduziu a quantificação de IL-1 β em 62,6% e 53%, respectivamente, comparada ao Salina. Sistemicamente, a CUM não alterou os níveis de AST, ureia e creatinina, porém, as duas maiores doses aumentaram a ALT em 100% e 255%, respectivamente, sugerindo-se potencial hepatotóxico. A UMB (15, 45 e 135 mg/kg) reduziu a ROA em 25%, 33% e 25%, respectivamente. UMB (135 mg/kg) reduziu a área de furca em 31%, e a expressão de TRAP em 48,4%, em comparação ao Salina. Na gengiva, a UMB (15, 45 e 135 mg/kg) reduziu a MPO em 71%, 76%, 77% e a quantificação de IL-1 β em 54%, 78%, 50%, respectivamente, quando comparados ao Salina (p<0,05). Sistemicamente, a UMB não alterou quaisquer parâmetros (p>0,05). Em suma, nas doses utilizadas a CUM e a UMB apresentaram perfis anti-inflamatório via inibição de IL-1 β e antirreabsortivo ósseo, sendo a UMB a de melhor padrão de segurança.

Palavras-chaves: Cumarinas; Umbeliferonas; Perda do osso alveolar; Citocina.

ABSTRACT

Periodontitis is a chronic, inflammatory and multifactorial disease resulting from dysbiosis of the dental biofilm and dysregulation of the host response. This disease has a high prevalence, being considered the main cause of tooth loss in adults. Although there are several treatments for periodontitis, in some patients the response is unsatisfactory, and it is convenient to search for pharmacological approaches that complement the primary treatment. Coumarins are secondary metabolites found in natural species and exhibit several pharmacological activities, with emphasis on their anti-inflammatory action and, more recently, on bone metabolism. The aim of this dissertation was to verify whether coumarins have pharmacological potential as an adjunct treatment in lytic bone diseases. To this aim, we systematically reviewed the scientific literature to understand the mechanisms of action of coumarins on bone markers. The aim of this dissertation was to evaluate the anti-inflammatory and bone antiresorptive effects of coumarin (CUM) and umbelliferone (UMB) in a ligature-induced alveolar bone resorption model. Groups of male Swiss mice (n=7/each) received i.p. CUM (5, 15 and 45 mg/kg), UMB (15, 45 and 135 mg/kg) or Saline for 7d. As control, naïve animals were used. Alveolar bone resorption (ABR) was evaluated by macroscopy, followed by histomorphometry of the furcation region and expression of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The gingiva was evaluated for myeloperoxidase (MPO) activity and IL-1 β expression. Systemically, serum dosages of aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), urea and creatinine, and daily weighing of the animals were performed. Ligature in Salina animals induced ABR (240%), and increased furcation area (219%) and TRAP expression (932%); in the gingiva, there was an increase in the MPO activity (202%) and expression of IL-1 β (883%), compared to naïve. CUM (5, 15 and 45 mg/kg) reduced ABR by 28%, 25% and 22%, respectively, compared to Saline (p<0.05). In the gingiva, CUM (5 mg/kg) reduced MPO by 71.6%, and at doses of 5 and 15 mg/kg CUM reduced IL-1 β expression by 62.6% and 53%, respectively, compared to Saline. Systemically, CUM did not change AST, urea, and creatinine levels, however, the two highest doses increased ALT by 100% and 255%, respectively, suggesting hepatotoxic potential. UMB (15, 45 and 135 mg/kg) reduced ABR by 25%, 33% and 25%, respectively, and the highest dose reduced the furcation area by 31%, compared to Saline (p<0.05). Corroborating these findings, UMB (135 mg/kg) decreased TRAP expression by 48.4%. In the gingiva, UMB (15, 45 and 135 mg/kg) reduced MPO activity by 71%, 76%, 77% and IL-1 β expression by 54%, 78%, 50%, respectively, when compared to saline (p<0.05). Systemically, UMB did not change any parameters (p>0.05). In short, with the doses used, CUM and UMB showed anti-inflammatory profiles via inhibition of IL-1 β , and bone anti-resorptive, with UMB being the best safety standard.

Keywords: Coumarins; Umbelliferones; Alveolar bone loss; Cytokine.

LISTA DE ABREVIATURAS

3-OHC	3-hidroxycumarina
7-OHC	7-hidroxycoumarina
7-OHCG	7-hidroxycumarina-glicuronídeo
ALT	Transaminase Hepática Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
AST	Transaminase Hepática Aspartato Aminotransferase
BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas (do inglês: Bone Morphogenetic Proteins)
BSA	Albumina Bovina Sérica
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CTSK	Catepsina K
CUM	Cumarina
CYP2A6	Citocromo P450 2A6
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos (do inglês: Fibroblast Growth Factor)
HMGB1	Proteínas do Grupo de Alta Mobilidade 1 (do inglês: High Mobility Group Box 1)
IFN- γ	Interferon Gama
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina1 (do inglês: Insulin-Like Growth Factor1)
IL	Interleucina
IP	Intra Peritoneal
JCE	Junção Cimento Esmalte
LPS	Lipossacarídeo
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos (do inglês: Macrophage Colony-Stimulating)
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9
MPO	Mieloperoxidase
NFATc1	Fator Nuclear de Ativação de Células T Citoplasmático 1 (do inglês: Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic 1)
NF- κ b	Fator Nuclear Kapp B (do inglês: Nuclear Factor Kappa B)
OPG	Osteoprotegerina

PBS	Tampão Fosfato Salino
PDGF	Fator De Crescimento Derivado De Plaquetas (do inglês: Platelet-Growth Factor)
PGE2	Prostaglandina E2
PGs	Prostaglandinas
pH	Potencial Hidrogênico
PICS	Práticas Integrativas e Complementares à Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas e Complementares
PTH	Paratormônio
RANK	Receptor Ativador do Fator Nuclear (NF) kappa B (do inglês: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-Beta)
RANKL	Ligante do Receptor Ativador do Fator Nuclear (NF) kappa B (do inglês: Ligand of Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-Beta)
RENISUS	Registro Nacional de Plantas de Interesse do Sistema Único de Saúde
ROA	Reabsorção Óssea Alveolar
RUNX2	Fator de Transcrição Relacionado ao Runt 2 (do inglês: Runt-related Transcription Factor 2)
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF-β	Fator Transformador de Crescimento Beta (do inglês: Transforming Growth Factor beta)
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa (do inglês: Tumor Necrosis Factor Alpha)
TRAP	Fosfatase Ácida Resistente a Tartarato (do inglês: Tartrate-resistant Acid Phosphatase)
UMB	Umbeliferona
VO	Via Oral

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da cumarina	29
Figura 2 – Metabolismo da cumarina	31
Figura 3 – Estrutura química da umbeliferona	32
Figura 4 – Protocolo de indução da periodontite em camundongos	38
Figura 5 – Esquema do protocolo experimental.....	39
Figura 6 – Ilustração da mensuração da área compreendida entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) dos molares em camundongos.....	41
Figura 7 – Efeito da cumarina na reabsorção óssea alveolar em camundongos	46
Figura 8 – Aspecto macroscópico do efeito da cumarina na reabsorção óssea alveolar em camundongos	47
Figura 9 – Efeitos da cumarina sobre a atividade de MPO em tecido gengival em camundongos	48
Figura 10 – Efeitos da cumarina sobre os níveis de IL-1 β em tecido gengival em camundongos	49
Figura 11 – Efeitos da cumarina na variação de massa corpórea de camundongos submetidos a periodontite durante 7 dias.....	52
Figura 12 – Efeito da umbeliferona na reabsorção óssea alveolar em camundongos	53
Figura 13 – Aspectos macroscópicos do efeito da umbeliferona na reabsorção óssea alveolar em camundongos	54
Figura 14 – Efeitos da umbeliferona sobre os aspectos microscópicos do periodonto de camundongos submetidos à ligadura durante 7 dias	55
Figura 15 – Fotomicrografias do periodonto íntegro e submetidos à ligadura durante 7 dias em camundongos	56
Figura 16 – Efeitos da umbeliferona sobre a atividade de MPO em tecido gengival em camundongos	57
Figura 17 – Efeitos da umbeliferona sobre os níveis de IL-1 β em tecido gengival em camundongos	58
Figura 18 – Efeito da umbeliferona sobre a imunomarcção para TRAP no periodonto em camundongos	59
Figura 19 – Fotomicrografias da imunocoloração para TRAP em camundongos	60
Figura 20 – Efeitos da umbeliferona na variação de massa corpórea de camundongos submetidos a periodontite durante 7 dias	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da cumarina sobre os parâmetros sistêmicos de camundongos submetidos à ligadura durante 7 dias.....	51
Tabela 2 – Efeitos da umbeliferona sobre os parâmetros sistêmicos de camundongos submetidos à ligadura durante 7 dias.....	62

PREFÁCIO

É com grande satisfação que apresento esta dissertação acerca do papel de metabólitos secundários de plantas medicinais, com especial enfoque aos estudos da osteoimunofarmacologia e das doenças periodontais.

A motivação para o presente estudo veio ao encontro da minha trajetória profissional enquanto cirurgiã-dentista junto ao Serviço Único de Saúde (SUS), onde, com frequência, atendi pacientes portadores de graves comprometimentos de saúde bucal em decorrência da periodontite, uma doença crônica inflamatória óssea multifatorial, caracterizada por sangramentos gengivais, infiltração de leucócitos e reabsorções ósseas e cementárias. Além dos danos locais, a periodontite pode apresentar repercussões sistêmicas importantes e consequente diminuição da qualidade de vida dos pacientes.

Apesar de existir uma variedade de abordagens para o tratamento da periodontite, eventualmente alguns pacientes não respondem aos cuidados não cirúrgicos. Nestes casos, as abordagens farmacológicas capazes de modular a resposta inflamatória do hospedeiro podem ser úteis para o tratamento adjunto à doença periodontal.

Os estudos de metabólitos secundários de plantas vêm se desenvolvendo aceleradamente nos últimos anos e representam uma importante fonte para o desenvolvimento de substâncias farmacologicamente ativas, com resultados promissores de muitos destes agentes sobre modelos de perda óssea inflamatória. Tal observação nos incentiva a estudar metabólitos secundários de plantas para as quais ainda não existe um consenso de seus efeitos sobre o metabolismo ósseo, com destaque às cumarinas.

Iniciando por um estudo crítico da literatura, buscamos responder os seguintes questionamentos: As cumarinas reduzem a formação e ativação de osteoclastos? Se sim, quais vias de sinalização intracelulares são moduladas pelas cumarinas? Esta fase foi necessária para reconhecer quais cumarinas merecem ser melhor exploradas concernentes aos efeitos destes metabólitos sobre as vias intracelulares osteoclastogênicas. A resposta para esses questionamentos resultou na redação de uma revisão sistemática da literatura sobre o mecanismo de ação de cumarinas sobre o processo de formação e ativação de osteoclastos em modelos de estudo *in vitro*, a qual se encontra publicado no periódico Fitoterapia, sob o título “*Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream cellular signaling: a systematic review of the literature*”, adicionada como apêndice da presente dissertação.

Em posse destas informações, através de uma pesquisa não clínica *in vivo*, avaliamos os efeitos da cumarina (1,2-benzopirona) e da umbeliferona (7-hidroxicumarina) na inflamação e na reabsorção óssea alveolar em camundongos.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Metabolismo ósseo	18
1.2 Periodontite	21
1.3 Plantas medicinais do bioma brasileiro ricas em cumarinas	25
<i>1.3.1 Classes das cumarinas</i>	<i>27</i>
<i>1.3.2 Cumarina</i>	<i>28</i>
<i>1.3.3 Umbeliferona</i>	<i>32</i>
<i>1.3.4 Cumarinas e metabolismo ósseo</i>	<i>33</i>
2 PROPOSIÇÃO	35
2.1 Geral	35
2.2 Específicos	35
3 METODOLOGIA	36
3.1 Tipo de estudo e animais	36
3.2 Fármacos utilizados	36
<i>3.2.1 Cumarina e Umbeliferona</i>	<i>36</i>
3.3 Protocolo experimental	37
<i>3.3.1 Modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos</i>	<i>37</i>
3.4 Grupos experimentais	39
<i>3.4.1 Grupo Naïve</i>	<i>39</i>
<i>3.4.2 Grupos não tratados</i>	<i>39</i>
<i>3.4.3 Grupos Cumarina</i>	<i>40</i>
<i>3.4.4 Grupos Umbeliferona</i>	<i>40</i>
3.5 Parâmetros de avaliação	40
<i>3.5.1 Reabsorção óssea alveolar</i>	<i>40</i>
<i>3.5.2 Dosagem da mieloperoxidase de tecido gengival</i>	<i>41</i>
<i>3.5.3 Histologia/histomorfometria</i>	<i>42</i>
<i>3.5.4 Análise da expressão de IL-1β</i>	<i>43</i>
<i>3.5.5 Imunohistoquímica</i>	<i>43</i>
<i>3.5.6 Análises dos parâmetros sistêmicos</i>	<i>44</i>
<i>3.5.7 Análises Estatísticas</i>	<i>45</i>
4 RESULTADOS	46

4.1 Aspectos macroscópicos do efeito da cumarina na reabsorção óssea alveolar	46
4.2 Efeito da cumarina sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido gengival	48
4.3 Efeito da cumarina sobre os níveis de IL-1β em tecido gengival	48
4.4 Efeitos sistêmicos da cumarina.....	49
4.5 Aspectos macroscópicos do efeito da umbeliferona na reabsorção óssea alveolar.....	53
4.6 Efeitos da umbeliferona sobre os aspectos microscópicos da reabsorção óssea alveolar	55
4.7 Efeito da umbeliferona sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido gengival.....	57
4.8 Efeito da umbeliferona sobre os níveis de IL-1β em tecido gengival.....	58
4.9 Efeito da umbeliferona sobre imunomarcção para TRAP	58
4.10 Efeitos sistêmicos da umbeliferona	61
5 DISCUSSÃO	64
6 CONCLUSÃO.....	72
REFERÊNCIAS	73
APÊNDICE	89
ANEXO	134

1 INTRODUÇÃO

1.1 Metabolismo ósseo

O osso, o principal constituinte do esqueleto, é um tecido conjuntivo especializado e mineralizado, o qual desempenha funções tanto mecânicas, como metabólicas. A unidade óssea é formada por múltiplas células, como os osteoclastos, os osteoblastos e osteócitos, que representam cerca de 10% da totalidade desse órgão. Cerca de 20% a 40% são constituídos pela matriz orgânica, correspondente à matriz colágena (colágeno tipo 1) e à substância não fundamental, constituída por osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fosfatase alcalina, colagenase, lipoproteínas, glicoproteínas e fatores de crescimento. Por fim, cerca de 50% a 70% deste tecido são formados pelos minerais cálcio e fosfato, que juntos formam a hidroxiapatita cristalina (ANSARI; SIMS, 2020).

Os osteoclastos são células derivadas de células-tronco hematopoiéticas e possuem como precursores a linhagem de monócitos/macrófagos, os quais devem passar para o estágio maduro, multinucleado (ONO; NAKASHIMA; 2018). Tais células estão localizadas na superfície óssea e apresentam formato discoide. Esta disposição permite que haja um espaço selado sob o qual ocorrerá a liberação de produtos que diminuam o pH do microambiente ósseo, onde, por meio da dissolução dos minerais ósseos e o colapso do osteóide ocorre a formação de uma depressão na superfície do osso, iniciando-se, conseqüentemente, a reabsorção óssea (FREEMONT, 1993; ONO; NAKASHIMA; 2018).

Os osteoblastos são células de origem mesenquimal e representam cerca de 4% a 6% da totalidade de células residentes no tecido ósseo, possuem como finalidade a secreção da matriz óssea, como o colágeno tipo I e as proteínas não colágenas. Ocorre ainda a liberação de grandes quantidades de fosfatase alcalina óssea, um forte marcador dos osteoblastos envolvidos no processo da mineralização óssea (NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

Os osteócitos são as células mais abundantes do tecido ósseo (cerca de 90% - 95%) e estão localizados dentro da matriz óssea. Este grupamento celular é caracterizado por ser derivado de osteoblastos maduros e exerce um papel de grande importância no contexto da remodelação óssea, uma vez que essas células regulam ação tanto dos osteoblastos, como dos osteoclastos (ANSARI; SIMS, 2020). A função dos osteócitos relaciona-se a mecanossensibilidade e a mecanotransdução, sendo considerado um regulador da mineralização e responsável pela produção de esclerostina, um mediador capaz de reduzir a formação óssea (KOIDE; KOBAYASHI, 2019). É importante salientar que estas células estão

associadas à expressão da glicoproteína 130 (Gp 130) que atua como um correceptor de sinalização para a ação celular de citocinas, especialmente, a IL-6 (McGREGOR *et al.*, 2019; MURAKAMI *et al.*, 1993).

A osteoclastogênese é mediada pelo fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), o ligante do receptor ativador do fator nuclear (NF) κ B (RANKL) e a osteoprotegerina (OPG). De modo geral, quando ocorre a ligação RANKL ao seu receptor ativador do fator nuclear (NF) κ B (RANK), inicia-se o processo de diferenciação de osteoclastos, a partir da ativação de várias vias de transdução de sinais intracelular (PARK *et al.*, 2017). A OPG atenua a osteoclastogênese ao competir com RANK pelo RANKL (SIMONET *et al.*, 1997). Enquanto o M-CSF promove a proliferação e a sobrevivência das células precursoras de osteoclastos (LAGASSE; WEISSMAN, 1997), o RANKL é responsável por controlar diretamente a diferenciação destas células (YASUDA *et al.*, 1998).

A osteoblastogênese inicia-se através da proliferação de células progenitoras mesenquimais, as quais se diferenciam em pré-osteoblastos e, por fim, em osteoblastos maduros. Este mecanismo é mediado pela ação do fator de transcrição relacionado ao Runt 2 (RUNX2), expresso por diversos mecanismos decorrentes da ação das proteínas do tipo SMADs (1, 5 e 8), onde em conjunto com a proteína morfogenética óssea (BMP), são fosforilados e ativados. Além disso, a formação de osteoblastos relaciona-se ainda à presença de glicoproteínas secretadas por células estromais da medula óssea e hematopoiéticas, conhecidas como WNT (REDLICH; SMOLEN, 2012).

Existe uma forte interação entre os osteoblastos e osteoclastos por meio do contato célula-célula e da secreção de proteínas. Neste sentido, o controle da osteoblastogênese é dependente da secreção de fatores solúveis, como a semaforina 4D a partir dos osteoclastos, enquanto o controle da osteoclastogênese é altamente dependente de proteínas secretadas pelos osteoblastos, como o M-CSF, RANKL e a OPG (KIM *et al.*, 2020).

A homeostasia do tecido ósseo envolve dois processos principais: a modelação e a remodelação. O primeiro é necessário para que os ossos mudem seu formato em resposta às influências fisiológicas ou às forças mecânicas que incidem sobre o mesmo. Neste, a ação dos osteoclastos e os osteoblastos não estão necessariamente acopladas anatomicamente ou temporalmente como é o caso na remodelação óssea, ou seja, para que os ossos mudem de formato não é necessária a reabsorção prévia (ALLEN; BURR, 2014).

A remodelação óssea é um processo contínuo, dinâmico e fundamental para a reparação tecidual, onde os osteoclastos e os osteoblastos atuam, de maneira coordenada no mesmo local, mas em momentos diferentes, resultando em renovação do osso e a consequente manutenção

da resistência óssea e da homeostase mineral (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). A remodelação envolve uma complexa rede de sinalização endógena programada por eventos genéticos regulados por hormônios, fatores de crescimento e citocinas, os quais são responsáveis pelos processos proliferativos e de diferenciação celular do estroma (GRABOWSKI, 2015; NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003). Os principais hormônios envolvidos nesse processo são: paratormônio (PTH), estrógeno, calcitonina, membros da família da vitamina D, junto ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e ao fator transformador de crescimento beta (TGF- β), além de citocinas implicadas no processo de remodelação óssea como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e as interleucinas (IL)-1 β , IL-6 e IL-17 (AMARASEKARA *et al.*, 2018; BADO *et al.*, 2017; NAOT; MUSSON; CORNISH, 2019; SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016; WEIN; KRONENBERG, 2018). Estes fatores endógenos são capazes de modular o eixo RANKL/RANK-OPG, considerada a principal via envolvida no metabolismo ósseo (GRABOWSKI, 2015; NAKASHIMA; CROMBRUGGHE, 2003).

O RANK é uma proteína transmembrana do tipo I pertencente à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), presente em membranas das células progenitoras de osteoclastos. O RANKL é encontrado em células como osteoblastos, fibroblastos e células T. Quando acoplado ao seu receptor RANK induz vias de sinalização relacionadas com o crescimento e a diferenciação celulares, especialmente, da osteoclastogênese. Por fim, a OPG é uma molécula produzida por muitos tipos celulares, principalmente pelas células B e osteoblastos. A função da OPG é inibir competitivamente a ligação do RANKL ao RANK, impedindo, assim, a formação de osteoclastos (PACIFICI, 2010; UDAGAWA *et al.*, 2021).

O ciclo de remodelação óssea é composto por quatro fases sequenciais: a ativação, a reabsorção, a reversão e a formação (KENKRE; BASSETT, 2018). A ativação envolve o recrutamento e a estimulação de precursores mononucleares de osteoclastos da circulação, sendo necessário o processo de fusão de múltiplas células mononucleares para formar pré-osteoclastos multinucleados (UDAGAWA *et al.*, 2021).

A reabsorção óssea se inicia quando os osteoclastos secretam íons de hidrogênio com consequente redução do pH, o que auxilia na mobilização de minerais ósseos. A secreção da fosfatase ácida resistente a tartarato (TRAP) (HABERMANN *et al.*, 2007), da catepsina K e da metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9), entre outros, possuem a finalidade de digerir a matriz orgânica, resultando na formação de lacunas de Howship no osso trabecular e Canais de Havers em osso cortical (DELAISSE *et al.*, 2003).

Durante a fase de reversão, as cavidades de reabsorção contêm uma variedade de células mononucleares, incluindo monócitos, osteócitos e pré-osteoblastos que iniciam a fase de formação óssea. Os sinais de acoplamento desta fase estão associados ao TGF- β , IGF-1, BMPs, fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (BONEWALD; MUNDY, 1990; KENKRE; BASSETT, 2018; PENG *et al.*, 2020).

A fase de formação óssea leva cerca de 4 a 6 meses para ser concluída, sendo dividida em três subfases sucessivas: a produção da matriz osteoide, a sua subsequente maturação, seguida da mineralização da matriz. Os osteoblastos sintetizam a nova matriz orgânica e regulam sua mineralização. Ao final do processo, os osteoblastos sofrem apoptose ou tornam-se osteócitos (KENKRE; BASSETT, 2018).

O equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é fundamental para a homeostase óssea (SIDDIQUI; PARTRIDGE, 2016). As alterações na atividade de osteoclastos, osteoblastos e osteócitos, na qualidade da formação da matriz colágena e na mineralização óssea podem causar condições e doenças ósseas de grande impacto clínico, como a osteoporose, a osteogênese imperfeita, a doença de Paget, a artrite reumatoide e a periodontite (JONHSTON; DAGAR, 2020; NAQVI *et al.*, 2019; PAPAPANOU; SUSIN, 2017; ROSSI; LEE; MAROM, 2019; VALENZUELA; PIETSCHMANN, 2017).

1.2 Periodontite

A periodontite é uma doença inflamatória crônica e multifatorial caracterizada por infiltração de leucócitos e reabsorções ósseas e cementárias. Clinicamente pode-se observar o sangramento gengival, a formação de bolsa periodontal, a recessão gengival, a lesão de furca e a mobilidade dental (PAPAPANOU *et al.*, 2018).

A periodontite exhibe alta prevalência, onde cerca de 10% da população mundial é afetada com a forma mais grave da doença, considerada a principal causa de perda dentária em adultos (FRENCKEN *et al.*, 2017; TONETI *et al.*, 2017). No Brasil, segundo a pesquisa nacional de saúde bucal realizada em 2010, a prevalência de sangramento gengival começa a aumentar durante a adolescência, por volta dos 12 anos, acompanhando o indivíduo até a vida adulta e decrescendo nos idosos. A presença de cálculo dentário, essencial como fator retentivo de biofilme dentário, atinge cerca de 64% dos adultos, declinando durante a terceira idade. Como um fator complicador, na faixa etária de 35 a 44 anos apenas 17,8% dos indivíduos avaliados apresentavam todos os sextantes hígidos (sem a presença de sangramento, cálculo ou bolsa periodontal), denotando um alto índice de perda dentária (BRASIL, 2012).

A patogênese da doença envolve uma disbiose entre os periodontopatógenos e a desregulação da resposta inflamatória do hospedeiro (PAPAPANOU *et al.*, 2018). Sabe-se que diversos microrganismos fazem parte do microbioma oral e a interação entre as espécies é fundamental para a manutenção da homeostase oral. Para tal, os microrganismos tendem a se organizar em comunidades inseridas dentro de uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares, conhecida como biofilme. No entanto, em condições particulares, como a inflamação, a interação hospedeiro-comunidade torna-se disbiótica favorecendo a seleção de uma comunidade de microrganismos especializados, como a *T. denticola*, *P. gingivalis* e *T. forsythia*, bactérias que apresentam um elevado potencial patológico, proporcionando um ambiente adequado para o desenvolvimento das doenças periodontais (CURTIS; DIAZ; DYKE, 2020).

O processo inflamatório periodontal relaciona-se a intensa infiltração de leucócitos. Em resposta à ação de produtos bacterianos, os neutrófilos, os linfócitos e os macrófagos contribuem para a expressão de citocinas e quimiocinas, dentre outros mediadores químicos da inflamação (LI; ZHANG; WANG, 2020). Assim, na ativação da imunidade inata, além de citocinas pró-inflamatórias (SUZUKI *et al.*, 2019), as prostaglandinas (PGs) (BAGE *et al.*, 2011), as enzimas líticas (CUI; HU; KHALIL, 2017) e diversos fatores de transcrição (ZHAO *et al.*, 2011) são responsáveis pela perpetuação da inflamação e a destruição do osso alveolar adjacente (LIMA *et al.*, 2008; YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013).

A ativação dos monócitos/macrófagos pelos produtos microbianos do biofilme dentário consegue produzir substâncias, como a prostaglandina E2 (PGE2), o interferon gama (IFN- γ), as citocinas TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17, as metaloproteinases de matriz (MMPs), dentre outros mediadores (LIMA *et al.*, 2008; SUZUKI *et al.*, 2019; YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013; ZHAO *et al.*, 2011). No processo inflamatório as PGs contribuem aumentando a permeabilidade vascular e a vasodilatação na microcirculação. As MMPs são responsáveis pela perda progressiva dos constituintes da matriz, principalmente colágeno, levando à perda óssea em condições inflamatórias (CUI; HU; KHALIL, 2017; YUCEL-LINDBERG; BAGE, 2013). As citocinas, especialmente o TNF- α e a IL-1 β , atuam de forma relevante no processo de osteoclastogênese (AMARASEKARA *et al.*, 2018).

O TNF- α desempenha um papel fundamental na formação de osteoclastos. Na presença do M-CSF e do RANKL o TNF- α é capaz de induzir o processo de diferenciação osteoclástica e estimular a sinalização de NF- κ B (AZUMA *et al.*, 2000; LUO *et al.*, 2018; TEITELBAUM *et al.*, 2006), importante fator de transcrição de vários genes inflamatórios (WARA-ASWAPATI *et al.*, 2007). A IL-1 β estimula diretamente a expressão de RANKL, além de estar envolvida

com a regulação positiva da atividade de TNF- α , dentre outras ações (REDLICH; SMOLEN, 2012; RUSCITTI *et al.*, 2015). Ademais, outras citocinas participam da perda óssea inflamatória, tais como: IL-6, IL-7, IL-11, IL-15, IL-17, IL-23 e IL-34, onde participam ativamente do processo de reabsorção óssea, através da transdução de sinais por mecanismos autócrinos, parácrinos e endócrinos capazes de afetar a osteoclastogênese (AMARASEKARA *et al.*, 2018).

É importante destacar que eventos celulares ocorrem a partir da interação entre os antígenos bacterianos e as células T virgens, fazendo com que as mesmas se diferenciem em linfócitos T helper (Th) Th1, Th2, Th17 e células T reguladoras (OHLRICH *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2011). As células Th1 amplificam a resposta inflamatória ao produzirem interferon- γ (IFN- γ), molécula responsável por ativar macrófagos intensamente (JÄGER *et al.*, 2009), enquanto as células Th2 produzem mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, L-10, IL-13, além do TGF- β (ZHENG *et al.*, 2020). As células Th17 secretam as interleucinas IL-17, IL-23, IL-22, IL-6 e o TNF- α quando estão presentes as IL-1 β e IL-6 (OHLRICH *et al.*, 2009). Por fim, as células T reguladoras são responsáveis pela homeostase do sistema imunológico (OHLRICH *et al.*, 2009).

O aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias está relacionado com a inibição de OPG e a indução da expressão de RANKL, o que favorece a ligação RANKL-RANK. Com o aumento da ativação deste eixo ocorre a ativação de várias vias de transdução de sinais e a indução de fatores de transcrição, como o fator nuclear de ativação de células T citoplasmático 1 (NFATc1), regulador chave da osteoclastogênese (NAKASHIMA; HAYASHI; TAKAYANAGI, 2012; PACIFICI, 2010; REDLICH; SMOLEN, 2012; SONG *et al.*, 2009) e, consequentemente, um aumento da diferenciação de osteoclastos e a reabsorção óssea inerente à periodontite.

A terapia periodontal básica consiste em remoção mecânica da placa e do cálculo supra e/ou subgingival através da utilização de curetas periodontais e/ou dispositivos ultrassônicos (GRAZIANI *et al.*, 2017). Apesar desta terapia mecânica ser efetiva geralmente, alguns pacientes podem não responder adequadamente a este tratamento. Além disso, a disbiose observada na periodontite leva ao aumento e desregulação da resposta do hospedeiro. No entanto, a presença de patógenos periodontais é insuficiente para o início da doença. De fato, dados atuais sugerem que a inflamação excessiva associada à periodontite também se deve a uma falha na resolução das vias inflamatórias (VAN DYKE, 2017). Logo, para auxiliar no tratamento básico da doença, eventualmente empregam-se terapias farmacológicas baseadas em antimicrobianos ou substâncias anti-inflamatórias (GRAZIANI *et al.*, 2017).

O uso de fármacos para o tratamento da periodontite como anti-inflamatórios (BEZERRA *et al.*, 2000) e antimicrobianos (PARK *et al.*, 2017) tem se mostrado efetivo em reduzir a perda óssea alveolar em estudos não clínicos. Clinicamente, o tratamento com o diclofenaco de potássio (50 mg/kg) duas vezes ao dia, associado a terapia mecânica resultou em redução de PGE2 e ganho de inserção clínica (ODUNCUOGLU *et al.*, 2018). A terapia com antimicrobianos sistêmicos como a associação de amoxicilina e metronidazol (ambos 500 mg/kg), três vezes ao dia, durante 3 ou 7 dias em combinação com a terapia mecânica, resultou em uma melhoria significativa dos parâmetros periodontais microbiológicos, inflamatórios e clínicos (COSGAREA *et al.*, 2020). Contudo, sabe-se que tais classes de fármacos, quando utilizadas a longo prazo, conseguem causar efeitos adversos como distúrbios gástricos (BJARNASON *et al.*, 2018) e aumento do risco de ataque cardíaco (GROSSER; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2017), ou resistência bacteriana (CHOWDHURY *et al.*, 2019), respectivamente.

Neste contexto, o incentivo para a adoção de abordagens integrativas e complementares tem aumentado e, conseqüentemente, um maior uso de plantas medicinais e de fitoterápicos (BRASIL, 2006a; 2006b). O Ministério da Saúde, em 2006, aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), objetivando a difusão e a aplicação destes importantes recursos terapêuticos (dentre eles a Fitoterapia), sendo a habilitação de prescrição pelo cirurgião-dentista regulamentada a partir da Resolução 82/2008 do Conselho Federal de Odontologia, que a reconheceu como Práticas Integrativas e Complementares à Saúde (PICS) bucal.

Apesar de regulamentada, a fitoterapia na odontologia não é uma prática comum. Isso se deve a diversos fatores, dentre eles a “crenças limitantes” em relação à eficácia de fitoterápicos (MONTEIRO, 2014). Logo, as ações educativas e as pesquisas científicas nesta área podem contribuir para a modificação desta percepção (MACIEL *et al.*, 2002).

Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa evidenciaram o potencial de extratos secos de plantas medicinais de uso popular no Brasil, como a *Matricaria recutita* (camomila) e a *Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) para o tratamento de doenças ósseas. Nestas pesquisas, os extratos utilizados apresentaram efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo na periodontite experimental em ratos (GUIMARÃES *et al.*, 2016; LIMA *et al.*, 2020). Assim, as cumarinas, substâncias encontradas em várias espécies naturais de apelo popular e que apresentam propriedades anti-inflamatórias (LEAL *et al.*, 2000; 2003; LIMA *et al.*, 2006), podem ser de interesse para a periodontia.

1.3 Plantas medicinais do bioma brasileiro ricas em cumarinas

As infusões e os extratos líquidos e secos de diversas plantas medicinais são utilizados como terapia alternativa no Sistema Único de Saúde (SUS) devido às suas propriedades preventivas e curativas. Neste contexto, para promover a difusão do uso de plantas medicinais e ressaltar a representatividade da medicina popular, bem como a promoção da segurança, da eficácia e da qualidade das plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, o Ministério da Saúde, pactuou o Registro Nacional de Plantas de Interesse do Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009).

As famílias botânicas tradicionalmente usadas na América do Sul, como a *Acanthaceae* e a *Fabaceae*, apresentam diversas atividades biológicas, por exemplo, a *Justicia pectoralis* Jacq., var. *stenophylla*, a *Amburana cearensis* Fr. All. (*Torresea cearensis*) e a *Dipteryx odorata*, pertencente à família da *Acanthaceae* e da *Fabaceae*, respectivamente, são conhecidas por apresentarem ações ansiolítica, anticonceptiva e anti-inflamatória (LEAL *et al.*, 1999, 2000, 2003; LEAL *et al.*, 2017). Tais famílias botânicas apresentam as cumarinas como metabólitos secundários majoritários.

A *Justicia pectoralis* Jacq., var. *stenophylla*, popularmente conhecida como “chambá”, “anador” ou “trevo- cumaru”, é uma planta pertencente à família da *Acanthaceae* e encontrada em vários países do continente americano (DANIEL, 2000; LEAL; SILVA; VIANA, 2017; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; SILVA, 2018). O Brasil é considerado um dos países que exibe grande diversidade do gênero *Justicia*, havendo registros dessa espécie nas regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste do país (PROFICE *et al.*, 2015).

A *J. pectoralis* apresenta diversas atividades biológicas (LEAL *et al.*, 2017), como alívio de sintomatologias dolorosas na inflamação, na asma, na bronquite (LEAL *et al.*, 2000; LINO *et al.*, 1997; MOURA *et al.*, 2017), em problemas de próstata (LANS, 2007), na menopausa e na dismenorreia (LOCKLEARA *et al.*, 2010), bem como ansiolítico, hipoglicemiante, hipotensivo, sedativo, dentre outras (CORRÊA; ALCÂNTARA, 2012; VENÂNCIO *et al.*, 2011).

Foi verificado que o extrato de *J. pectoralis* é composto por cumarinas, flavonoides, esteroides, triterpenoides, saponinas e alcaloides (LEAL *et al.*, 2000; ARAÚJO *et al.*, 2014; OLIVEIRA; ANDRADE, 2000). No que se refere às cumarinas foram identificadas as presenças da cumarina (1,2 benzopirona) e a umbeliferona (7-hidroxicumarina), sugerindo-as serem as principais responsáveis pela atividade fitoterápica do chambá, o que explica seu odor adocicado exalado (OLIVEIRA; ANDRADE, 2000; CORRÊA; ALCÂNTARA, 2012).

A *Amburana cearensis* AC Smith (sin.: *Torresea cearensis* Fr. All.), popularmente conhecida como "cumaru" ou "imburana-de-cheiro", é uma árvore nativa do Nordeste brasileiro, pertencente à família da *Fabaceae* (ALMEIDA *et al.*, 2010). Tradicionalmente a *Amburana cearensis* é empregada como chá para o tratamento de condições inflamatórias, como a asma e a bronquite (LORENZI; MATOS, 2002). Estudos mostraram que a administração dos extratos da *Amburana cearensis* resultou em ações analgésica, anti-inflamatória, broncodilatadoras e neuroprotetoras em roedores (LEAL *et al.*, 2003, 2009; LOPES *et al.*, 2013; PIERDONÁ *et al.*, 2014). Tais efeitos devem-se à presença dos compostos químicos como a cumarina, o isocampferídio, os amburosídeo A e B, dentre outros (BRAVO *et al.*, 1999; CANUTO, 2002; LEAL *et al.*, 2003).

A *Dipteryx odorata*, pertencente à família da *Fabacea*, outra espécie arbórea de destaque encontrada nas regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste do Brasil, conhecida popularmente como "cumaru-ferro" no Acre e no Pará; "cumaru-do-amazonas" ou "cumaru-da-folha-grande", no Amazonas; no Maranhão é conhecido como "cumari" e, nos estados de Mato Grosso, Pernambuco e Rondônia, apenas como "cumaru" (CARVALHO, 2009). Internacionalmente, as sementes da *Dipteryx odorata* também são conhecidas como *Tonka Beans* (Fava tonka) (CARVALHO; LIMA; CARDOSO, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020).

As cascas do cumaru-do-amazonas são utilizadas para a confecção de um xarope utilizado popularmente para o tratamento da tosse, gripes e resfriados, bem como outras desordens pulmonares (CARVALHO, 2009). Além disso, é empregada pela população feminina do Brasil para prevenir os desagradáveis sintomas da menopausa (RODRIGUES *et al.*, 2018). As sementes do cumaru-do-amazonas quando maceradas em água são utilizadas como antiespasmódico, diaforético e contra problemas cardíacos e menstruais. Os frutos usados topicamente são eficazes no alívio da inflamação de ouvidos e úlcera bucal (DI STASI; HIRUMALIMA, 2002; RÊGO *et al.*, 2017).

A *Dipteryx odorata* apresenta como composto majoritário a cumarina, além de isoflavonas (VOGEL, 1820; JANG *et al.*, 2003; JANUÁRIO *et al.*, 2005). Foi demonstrado que a utilização do óleo da *Dipteryx odorata* apresentou efeito fungistático superior ao efeito do Itraconazol (DIAS, 2019). Além disso, apresenta potencial para quimioprevenção do câncer (JANG *et al.*, 2003).

Devido ao grande potencial terapêutico da *J. pectoralis* e da *Amburana cearensis*, no Brasil, estas plantas já são produzidas e distribuídas como xarope para o tratamento da asma e bronquite, através do programa Farmácias Vivas, um programa multidisciplinar criado pela

Universidade do Ceará que estuda, produz e distribui plantas medicinais e fitoterápicos a população sem acesso a serviços de saúde (MATOS, 2002; PEREIRA *et al.*, 2015).

Dada a importância das plantas medicinais e seus diversos usos etnofarmacológicos, são fontes ricas de compostos biologicamente ativos que podem ser bases para o desenvolvimento de medicamentos. Mais recentemente revisamos que diversos derivados cumarínicos apresentam potencial para o tratamento de doenças ósseas líticas, dada a inibição da formação e da função de osteoclastos (TAVARES; LIMA, 2021). Considerando que entre as espécies botânicas listadas no RENISUS e no projeto Farmácias Vivas, muitas destas plantas apresentam cumarinas como compostos majoritários (BRASIL, 2009; MATOS, 2002; PEREIRA *et al.*, 2015), particularmente, duas cumarinas, a cumarina e a umbeliferona carecem de mais estudos no campo da osteoimunologia.

1.3.1 Classes das cumarinas

As cumarinas são compostos pertencentes à família das benzopironas, encontradas em várias espécies naturais. Trata-se de um composto que estruturalmente apresenta anéis fundidos de benzeno e α -pirona. Observa-se que substituições na estrutura química básica da cumarina são capazes de fornecer vários derivados que apresentam diversas propriedades farmacológicas (PENTA, 2015). Salienta-se que plantas amplamente utilizadas na medicina popular nordestina, para o tratamento de doenças inflamatórias crônicas, como a *Amburana cearensis* Fr. All. (*Torresea cearensis*) e *Justicia pectoralis* Jacq., var. *stenophylla*, *Acanthaceae* (Chambá), possuem a cumarina (1,2-benzopirona) como um dos seus princípios ativos (ALMEIDA *et al.*, 2010; LEAL; SILVA; VIANA, 2017; LINO *et al.*, 1997; VENÂNCIO *et al.*, 2011).

Em geral, tais compostos são lactonas do ácido o-hidroxicinâmico, onde a cumarina é o representante mais simples, considerado o esqueleto básico de todos os outros derivados. Além disso, as cumarinas são categorizadas em seis tipos diferentes, como cumarinas simples, furanocumarinas, dihidrofuranocumarinas, piranocumarinas, fenilcumarinas e biscumarinas (VENUGUPALA; RASHIMI; ODHAV, 2013).

As cumarinas simples consistem em vários compostos que podem apresentar diversos radicais, como o hidróxi, alcóxi e alquil, dentre outros, como a própria cumarina e a umbeliferona. As furanocumarinas apresentam um anel furano condensado ao núcleo cumarínico, por exemplo, o psoraleno. As dihidrofuranocumarinas são compostos análogos a cumarina que apresentam em sua estrutura química o anel oxaciclobutano, como a felamidina. As piranocumarinas são compostos análogos às furanocumarinas, porém apresentam um anel

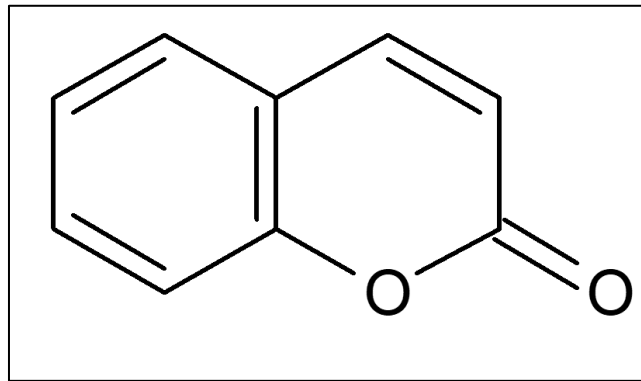
pirano; a seselina é um representante da classe. As fenilcumarinas geralmente apresentam anel aromático ligado no núcleo cumarínico, por exemplo, a 3-fenilcumarina, e por fim, as biscumarinas, são cumarinas diméricas como o dicumarol (BOURGAUD *et al.*, 2006; VENUGUPALA; RASHIMI; ODHAV, 2013).

As atividades farmacológicas das cumarinas são altamente dependentes de sua estrutura molecular central, a qual varia conforme o tipo de cumarina empregada. Assim, a estrutura química peculiar e as propriedades físico-químicas do anel oxa-heterocíclico exibidas por esta classe são as responsáveis pelas suas ações, devido a ligações aos distintos alvos farmacológicos. As cumarinas exibem uma ampla gama de atividades e aplicações biológicas, dadas suas fortes interações com aminoácidos carregados positivamente; capacidade de realizar ligações polares, decorrentes da presença do grupo lactona e, ainda, as interações não covalentes com muitas enzimas e receptores alvos (STEFANACHI *et al.*, 2018).

A classe das cumarinas exhibe, portanto, propriedades farmacológicas interessantes, com atividades biológicas úteis em fotoquimioterapia e terapia antitumoral (KANDIL; WESTWELL; MCGUIGAN, 2016; MUTHU; SELVARAJ; VAIYAPURI, 2016; ZHU *et al.*, 2017), como antioxidante (ZHANG *et al.*, 2017), anti-inflamatória (LEAL *et al.*, 1997, 2000), antinociceptiva (LEAL *et al.*, 1997, 2000; LIMA *et al.*, 2006), anticoagulante (WADELIUS; PIRMOHAMED, 2007) e estimuladores do sistema nervoso central (CHUNHUA *et al.*, 2016).

1.3.2 Cumarina

A cumarina (1,2-benzopirona) foi isolada pela primeira vez em 1820 por Vogel (Figura 1). Tal composto químico foi encontrado em abundância na fava tonka a semente da *Dipteryx odorata*, popularmente conhecida como cumaru (VOGEL, 1820). A cumarina pode ser encontrada em várias especiarias naturais de uso doméstico, como canela (BLAHOVÁ; SVOBODOVÁ, 2012). Além disso, a cumarina é usada como aditivo na cosmética, especialmente em perfumes, sendo relatado que a exposição cutânea em humanos nestes produtos é cerca de 0,04 mg/kg (LAKE, 1999). Na indústria farmacêutica a cumarina é utilizada no tratamento de problemas venosos e dos vasos linfáticos (JAMAL; CASLEY-SMITH; CASLEY-SMITH, 1989; CASLEY-SMITH; MORGAN; PILLER, 1993; CHANG *et al.*, 1996), e foi utilizada para o tratamento de carcinoma da próstata (MARSHALL *et al.*, 1993).

Figura 1 – Estrutura química da cumarina

Fonte: Elaborada pelo autor.

O metabolismo da cumarina relaciona-se ao citocromo P450, especialmente pela ação da CYP2A6 e CYP2A13, acarretando uma hidroxilação nas posições 7 ou 3 para produzir umbeliferona (7-hidroxicumarina [7-OHC]) ou 3-hidroxicumarina (3-OHC), havendo ainda a formação do conjugado de glicuronídeo, na fase II. A saber, o 3-OHC ainda pode sofrer divisão do anel formando dois outros produtos, o ácido 0-hidroxifenilático e ácido 0-hidroxifenilacético (SHILLING; CRAMPTON; LONGLAND, 1969; RITSCHER *et al.*, 1977) e o ácido *o*-cumárico (GASPARETTO *et al.*, 2015). Entretanto, é importante salientar que há variações quantitativas no que se refere ao metabolismo deste composto (EGAN *et al.*, 1990; WU *et al.*, 2009).

Assim, foi relatado que o metabolismo da cumarina em camundongos e humanos é distinto, visto que no primeiro ocorre a formação dos compostos dos ácidos 0-hidroxifenilacético e 0-hidroxifenilático, e no segundo a 7-OHC (SHILLING; CRAMPTON, LONGLAND, 1969). Mais recentemente, devido às modernas ferramentas bioanalíticas foram encontrados mais 12 metabólitos da cumarina na urina humana (LEONART *et al.*, 2017).

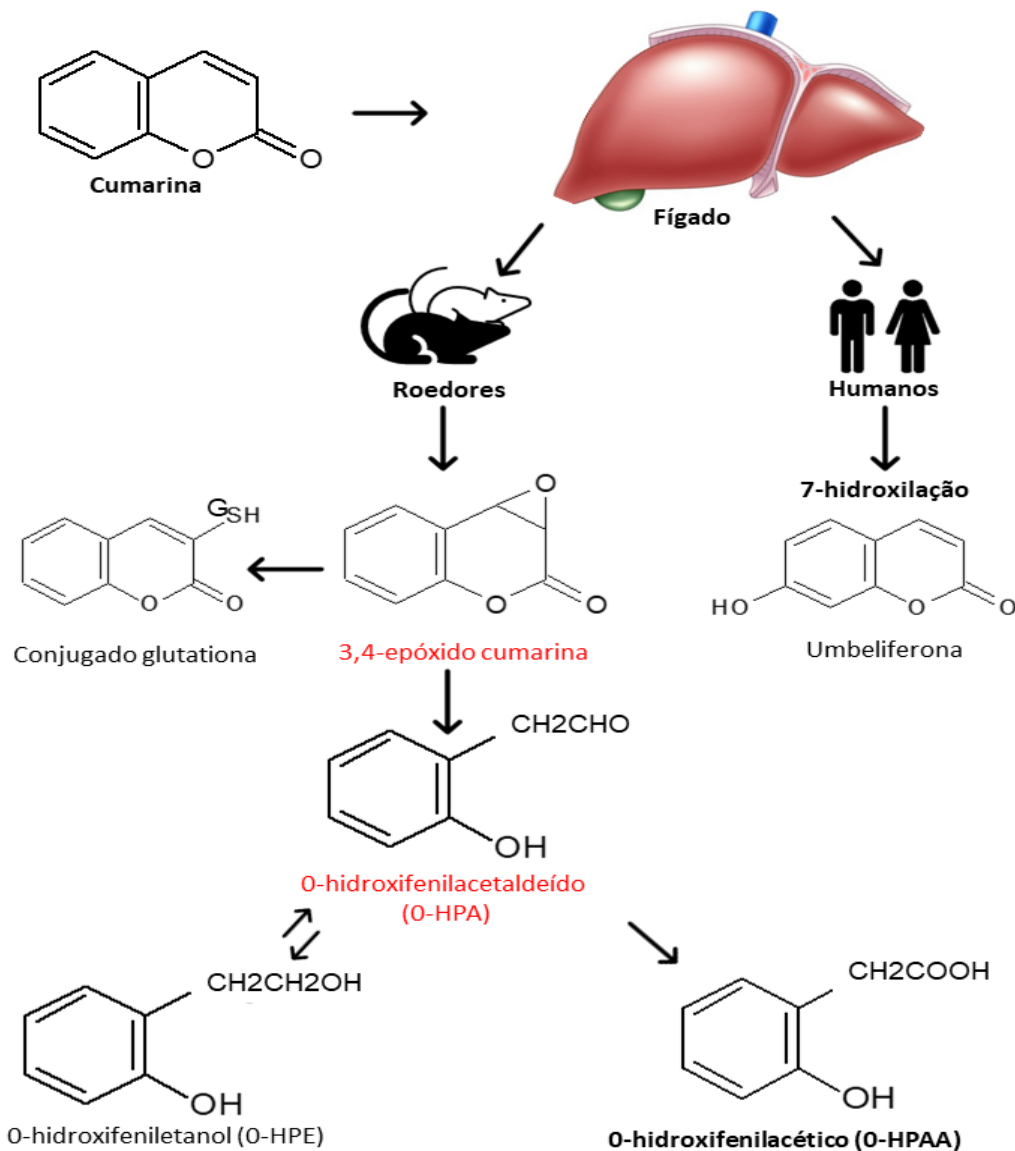
Embora a cumarina apresente efeitos biológicos promissores, tal composto, pode exibir efeitos hepatotóxicos, estes que ocorrem possivelmente em virtude da ação de citocromos, especialmente o CYP2A6, onde uma ação reduzida do mesmo pode favorecer o desenvolvimento de vias metabólicas alternativas da cumarina, estimulando a produção de um metabólito citotóxico responsável pela toxicidade desta classe (EGAN *et al.*, 1990; WU *et al.*, 2009). Todavia, a metabolização difere entre os distintos tipos de camundongos, sendo que a dose letal de cumarina para camundongos seria acima de 350mg/kg (ENDELL; SEIDEL, 1978).

No que tange às vias de administração, esta não afeta, de modo significativo, a meia vida biológica da cumarina e da 7-hidroxicumarina-glicuronídeo (7-OHCG), onde a

administração pelas vias intravenosa e oral produzem uma meia vida que varia de 1 a 1,5 horas (COHEN, 1979). Destaca-se ainda que a cumarina sofre extenso metabolismo de primeira passagem para formar 7-OHC (cerca de 97%) e 7-OHCG no intestino, com posterior excreção renal. Ademais, alguns autores chegam a considerar a cumarina como um pró-fármaco em decorrência da grande formação do metabólito 7-OHC (EGAN *et al.*, 1990).

Entretanto, é importante salientar que os casos de hepatotoxicidade em humanos são variáveis e altamente dependentes do padrão de metabolização, o qual difere entre humanos e roedores. Neste ponto, pode-se inferir que a principal via do metabolismo hepático da cumarina em humanos é a 7-hidroilação, altamente dependente da CYP2A6 e a via secundária é o metabolismo do anel de lactona formando o metabólito 3,4-epóxido de cumarina, considerado hepatóxico, sendo catalisada predominantemente pelas enzimas CYP1A e CYP2E (BORN *et al.*, 2002), esta é a via observada prevalentemente em roedores (LAKE *et al.*, 1994). A formação do epóxido de cumarina não é catalisada pela enzima epóxido hidrolase, desse modo, existem dois destinos possíveis para o 3,4-epóxido de cumarina, ele pode ser conjugado com GSH ou pode formar o-hidroxifenilacetaldeído (o-HPA), o-hidroxifeniletanol (o-HPE) ou o-hidroxifenilacético (o-HPAA), este último é resultado da oxidação adicional na molécula de o-HPA, sendo considerada a via de desintoxicação do aldeído o-HPA. Portanto, extremo cuidado deve ser exercido ao correlacionar estudos entre humanos e animais (EGAN *et al.*, 1990). O esquema do metabolismo da cumarina pode ser visualizado na figura 2, abaixo.

Figura 2 – Metabolismo da cumarina



Fonte: Elaborada pelo autor, baseado em Felter *et al.*, 2006.

A cumarina exibe uma importante ação anti-inflamatória, sendo que esta ação pode estar relacionada ao controle da proteólise, ao aumentar a atividade da protease natural de macrófagos no local da lesão, reduzindo consequentemente o edema (CASLEY-SMITH, 1992; KNIGHT *et al.*, 1989), por isso que tal substância é utilizada na clínica para o tratamento do linfedema (CLODIUS; DEAK; PILLER, 1976).

Ainda ao avaliar o efeito antinociceptivo e anti edematogênico do extrato hidroalcoólico (EHA) e da cumarina da *Amburana cearensis*, Leal e colaboradores (1997) observaram uma

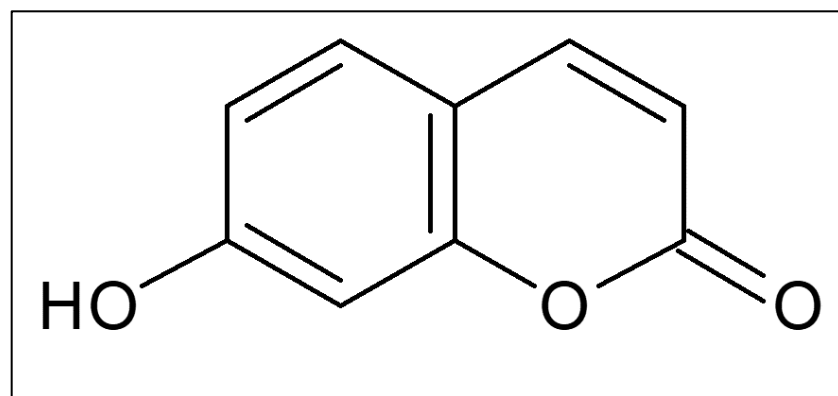
redução dose-dependente da nocicepção e aumento do tempo de latência para o estímulo térmico e uma inibição significativa do edema induzido por carragenina em ratos.

Mais recentemente, a atividade antialérgica da cumarina foi avaliada usando um modelo de alergia alimentar de camundongo e um modelo *in vitro* de mastócitos. A cumarina aliviou os sintomas alérgicos. Além disso, a cumarina reduziu os níveis de histamina e proteinases de mastócitos de camundongo (LIU *et al.*, 2019).

1.3.3 Umbeliferona

A umbeliferona é uma cumarina simples que apresenta um grupamento hidroxila ligado na posição 7 do anel aromático da cumarina (Figura 3). É um dos principais metabólitos secundários de plantas da família *Apiaceae* (Umbelíferas), como, Angélica (ZHAO *et al.*, 2012).

Figura 3 – Estrutura química da umbeliferona



Fonte: Elaborada pelo autor.

A estrutura química da umbeliferona devido a sua simplicidade dá origem a compostos mais complexos, tanto, que a umbeliferona é considerada o composto original das furanocumarinas e lineares. A biossíntese da umbeliferona envolve a síntese do ácido cinâmico ou hidroxilações *para* e *orto*, isomerização *trans-cis* da ligação dupla e, lactonização (MAZIMBA, 2017).

O metabolismo da umbeliferona sofre extensa glucuronidação e sulfatação, sendo a glucuronidação observada extensamente em humanos, macacos e camundongos em modelos de hepatócitos, microsomas hepáticos e em frações S9 do fígado (WANG *et al.*, 2005). A umbeliferona é excretada em parte como um conjugado ou conjugados, embora um também foi

detectada uma pequena quantidade de composto inalterado, sendo observado ainda a presença do ácido 2,4-di-hidroxifenilpropiónico na fração não conjugada (INDAHL; SCHELIN, 1971).

Dentre os diversos derivados cumarínicos, a umbeliferona é a que exibe um número importante de atividades farmacológicas, tais como: ação antioxidante (AL-MAJEDY *et al.*, 2016); analgésica (BARROS *et al.*, 2010); antidiabética (KUMAR *et al.*, 2013); antitumoral (MUTHU; SELVARAJ; VAIYAPURI, 2016; VIJAYALAKSHMI; SINDHU, 2017); anti-inflamatória (MUTHU; SELVARAJ; VAIYAPURI, 2016; SIM *et al.*, 2015; YIN *et al.*, 2018), dentre outras.

Condizente com a literatura, o extrato do chambá apresenta atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antiespasmódica em modelos de formalina, carragenina e dextrano (LINO *et al.*, 1997). De forma similar, Leal *et al.* (2000) observaram uma grande atividade broncodilatadora da *J. pectoralis*. Além disso, foi demonstrado que a *J. pectoralis* reduz os níveis de IL-1 β e TNF- α em condições inflamatórias no sistema respiratório (MOURA *et al.*, 2017).

Em relação à inflamação foi demonstrado que umbeliferona consegue reduzir in vivo os níveis de TNF- α e IL-6 e aumentar os níveis de IL-10 (SIM *et al.*, 2015), conseguindo inibir por regulação negativa, a expressão de proteínas do grupo de alta mobilidade 1 (HMGB1) e receptor Toll-like (TLR4, NF- κ B e I κ B) e reduziu o dano oxidativo no fígado, através da ativação da via de sinalização induzida pelo fator nuclear derivado de eritróide 2 em um modelo de lesão hepática em camundongos diabéticos (YIN *et al.*, 2018).

1.3.4 Cumarinas e metabolismo ósseo

Dada a íntima relação entre processos inflamatórios crônicos e a perda óssea, pelo envolvimento de vários mecanismos locais e sistêmicos (ADAMOPOULOS *et al.*, 2018), substâncias que apresentam a capacidade de modular estes mecanismos, especialmente citocinas inflamatórias tornam-se alvos de estudos na osteoimunologia.

Neste contexto, em relação à saúde óssea vários estudos envolvendo cumarinas têm demonstrado resultados promissores em diferentes metodologias de perda óssea, como: induzidas por LPS (KONG *et al.*, 2017; KWAK *et al.*, 2019), por partículas (LV *et al.*, 2016), por ovariectomia (HAM *et al.*, 2017; ZHAI *et al.*, 2018), por inoculação de bactérias (DA CUNHA *et al.*, 2017), bem como modelo de artrite (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013). De modo geral, os estudos demonstraram que as cumarinas reduzem a formação de osteoclastos (DA CUNHA *et al.*, 2017; HAM *et al.*, 2017; HEMSHEKHAR *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2017;

KWAK *et al.*, 2019; LV *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2018) e a expressão de RANK e a relação RANKL/OPG (KONG *et al.*, 2017).

Nestes estudos, as cumarinas eficientemente reduziram a expressão de COX-2 (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013), PGE₂ (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013), IL-1 β (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013), IL-6 (HAM *et al.*, 2017; HEMSHEKHAR *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2017; LV *et al.*, 2016;) e TNF- α (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2017; LV *et al.*, 2016) e ainda diminuíram a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HEMSHEKHAR *et al.*, 2013), condizente com a redução da reabsorção óssea (DA CUNHA *et al.*, 2017; HAM *et al.*, 2017; HEMSHEKHAR *et al.*, 2013; KONG *et al.*, 2017; KWAK *et al.*, 2019; LV *et al.*, 2016; ZHAI *et al.*, 2018).

A relação estrutura-atividade pode desempenhar um papel importante para os efeitos farmacológicos envolvidos na osteoclastogênese e reabsorção óssea em decorrência dos padrões de substituição na estrutura química das cumarinas (STEFANACHI *et al.*, 2018). Por exemplo, a presença do grupo 8-prenil da molécula do osthole (um cumarina) está relacionado com efeitos antiosteoclastogênicos e antirreabsortivos ósseos mais potentes quando comparado à 7-metoxicumarina, que não contém o grupo 8-prenil (ZHAI *et al.*, 2014). Assim, tendo em vista que a cumarina é considerada a estrutura química “mãe” para todos os seus derivados e apresenta importantes efeitos anti-inflamatórios (LEAL *et al.*, 2000, 2003), o estudo desta substância em um modelo de perda óssea inflamatória pode auxiliar para uma melhor compreensão da relação estrutura-atividade visto que poucos são os relatos sobre o seu potencial antirreabsortivo ósseo. Em relação à umbeliferona, esta cumarina é um dos principais derivados da 1,2 benzopirona, sendo capaz de reduzir marcadores inflamatórios (OUYANG *et al.*, 2019) e ósseos (KWAK *et al.*, 2019), contudo, na periodontite os trabalhos são escassos.

A periodontite é caracterizada por um processo inflamatório maciço mediado especialmente por citocinas, culminando em perda óssea alveolar. Apesar da literatura demonstrar que as cumarinas potencialmente afetem o metabolismo ósseo, não existe um consenso quanto a seu uso em doenças ósseas líticas, em virtude da pouca compreensão de mecanismos intrínsecos das cumarinas nesse campo. Neste contexto, a investigação dos efeitos da cumarina e da umbeliferona, dois metabólitos secundários encontrados em várias espécies do bioma brasileiro, em um modelo de perda óssea induzida por ligadura, pode nos trazer maiores esclarecimentos acerca desse potencial terapêutico na periodontite.

2 PROPOSIÇÃO

2.1 Geral

Avaliar os efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo da cumarina e da umbeliferona na periodontite em camundongos.

2.2 Específicos

- Avaliação dos efeitos da cumarina e da umbeliferona nos tecidos periodontais quanto à reabsorção óssea alveolar por meio de macroscopia, à histomorfometria e à expressão de TRAP.
- Avaliação dos efeitos da cumarina e da umbeliferona nos tecidos gengivais quanto à inflamação por meio da presença neutrofílica e quantificação de citocina pró-inflamatória.
- Análise da repercussão sistêmica da cumarina e da umbeliferona em níveis hepáticos, renais e massa corpórea de animais com periodontite.

3 METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo e animais

A presente pesquisa trata-se de um estudo experimental *in vivo* (FERREIRA; FERREIRA, 2003). Para tal, foram utilizados 224 camundongos Swiss, machos, com peso médio de 20-25 g, fornecidos pelo Biotério Central do Campus do Pici-UFC, e mantidos no Biotério Setorial do Campus Porangabuçu - Prof. Eduardo Augusto Torres da Silva, vinculado ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia da FAMED. Os animais foram mantidos em gaiolas apropriadas, em número máximo de seis animais em cada uma delas, sob as mesmas condições ambientais com controles de ciclos claro/escuro e térmico adequados. Os camundongos receberam água e ração comercial balanceada à vontade durante todo o experimento.

Os protocolos experimentais foram executados seguindo as recomendações de criação e de uso de animais para ensino e pesquisa científica contidas na lei 11.794, de 8 de outubro de 2008 (Lei Arouca). Todos os esforços foram envidados no sentido de se reduzir ao mínimo necessário o número de animais e o sofrimento dos mesmos. Para tanto, os protocolos de execução foram submetidos e aprovados à Comissão de Ética para Uso de Animais (CEUA) da UFC sob número de protocolo nº 9597020519 (ANEXO I).

3.2 Fármacos utilizados

3.2.1 *Cumarina e Umbeliferona*

Foram utilizadas a cumarina (1,2-benzopirona), pureza $\geq 99\%$ (HPLC), lote (SLCC5853), e a umbeliferona (7-hidróxicumarina), pureza 99% (HPLC), lote (BCBZ4431), ambas adquiridas junto à Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA. Informações mais detalhadas das substâncias utilizadas podem ser observadas no quadro 1 a seguir:

Quadro 1 - Especificações técnicas da cumarina e umbeliferona

	Cumarina	Umbeliferona
Fórmula Empírica	C ₉ H ₆ O ₂	C ₉ H ₆ O ₃
Peso molecular	146,14	162,14
Número CAS	91-64-5	93-35-6

Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/brazil.html> (Acesso em: 27 de janeiro de 2021).

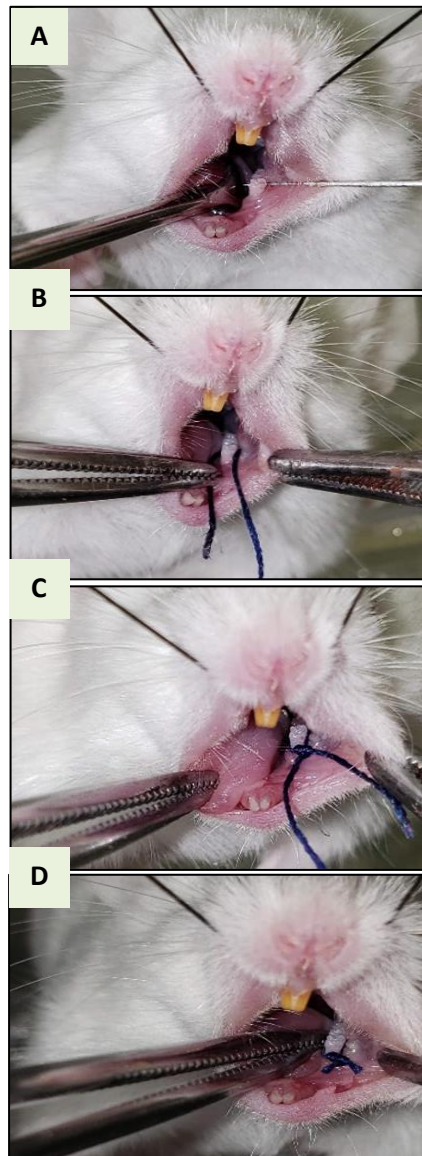
3.3 Protocolo experimental

3.3.1 Modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos

Foi utilizado o modelo de indução de periodontite por ligadura em camundongos. A escolha destes animais foi decorrente das semelhanças anatômicas e histológicas a molares de seres humanos, compatível com a boa reprodutibilidade da doença periodontal (OZ; PULEO, 2011; ABE; HAJISHENGALLIS, 2013).

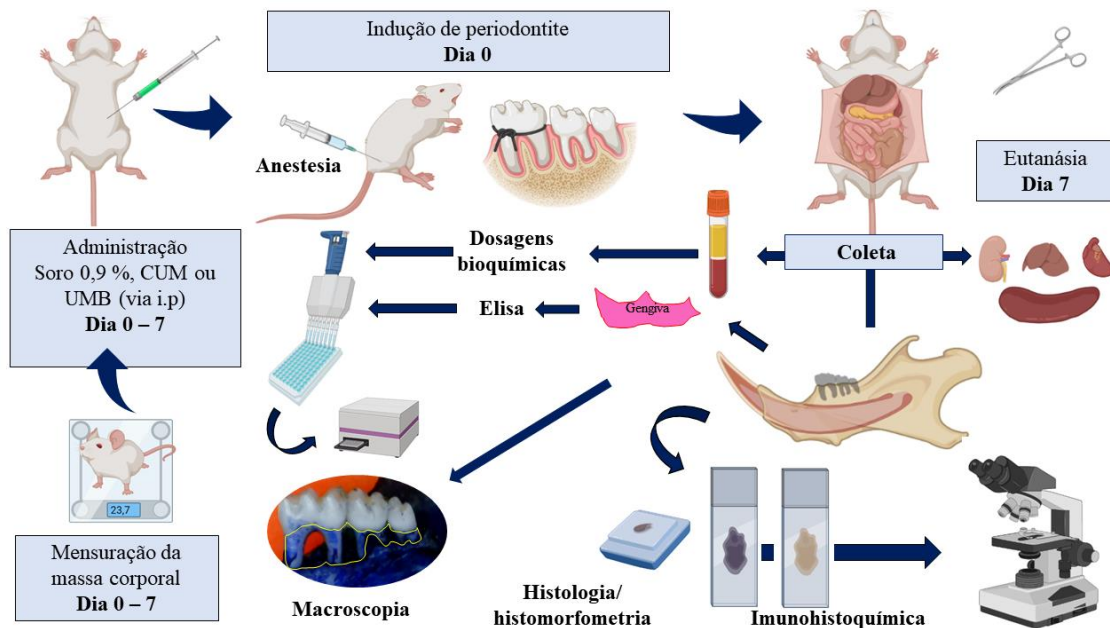
A ligadura foi realizada através da inserção de um fio de sutura de algodão com poliéster 4-0, 15 x 45 cm (Point suture do Brasil Ltda., Fortaleza, CE, Brasil) em torno do 1º molar inferior direito de camundongos (OLIVEIRA *et al.*, 2019) previamente anestesiados com cloridrato de xilazina (Xilazin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil) e cloridrato de cetamina (Cetamin, Syntec®, Hortolândia, SP, Brasil) nas dosagens de 10 mg/kg e 90 mg/kg, respectivamente, por via intramuscular (CANDEO *et al.*, 2017). Previamente à passagem do fio, um espaçador endodôntico digital 25 mm foi utilizado nos espaços interproximais distais dos 1 molares inferiores (Figura 4A). Logo em seguida, o fio foi passado (Figura 4B) e com o auxílio de pinças anatômicas foi realizado um nó (Figura 4C), deixando o nó voltado para a face méso-vestibular da cavidade oral do animal (Figura 4D). O fio permaneceu por 7 dias (OLIVEIRA *et al.*, 2019), quando então os animais foram eutanasiados para as coletas de tecidos e fluidos para análises posteriores (Figura 5).

Figura 4 – Protocolo de indução da periodontite em camundongos



Legenda: Uso do espaçador endodôntico como guia nos espaços interproximais (A). Passagem do fio de sutura de algodão com poliéster 4-0 (B). Nó voltado para a face méso-vestibular do primeiro molar inferior (C). Ligadura finalizada (D). [Elaborado pelo autor]

Figura 5 – Esquema do protocolo experimental



Legenda: No dia 0, os animais tiveram suas massas corpóreas mensuradas, seguidas da administração de Salina 0,9%, cumarina (CUM) ou umbeliferona (UMB). Após 30 minutos os animais foram anestesiados e a periodontite foi induzida por ligadura. No 7º dia, os animais foram eutanasiados e a gengiva, mandíbula, fígado, coração, baço e rim foram removidos para análises posteriores. Ainda foram coletadas amostras sanguíneas para dosagens bioquímicas. [Elaborado pelo autor - Imagens geradas com o © Biorender 2021].

3.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 7 grupos e seus respectivos subgrupos, com seis a sete camundongos cada.

3.4.1 Grupo Naïve

Grupo único constituído por 6 camundongos não submetidos à indução de periodontite. Os animais foram acompanhados durante todo o período experimental e eutanasiados ao final deste, no 7º dia.

3.4.2 Grupos não tratados

Foram constituídos por hemiarcadas submetidas à ligadura de animais que receberam apenas o veículo (solução salina de NaCl 0,09%) administrado por via i.p, previamente à

ligadura e, diariamente por mais 6 dias. Esses grupos foram compostos paralelamente a cada abordagem farmacológica utilizada, com n=7, por protocolo.

3.4.3 Grupos Cumarina

Foram constituídos por 3 subgrupos de hemiarcadas submetidas à ligadura de animais tratados com Cumarina, nas doses de 5; 15 e 45 mg/kg, respectivamente, administrada por via i.p, previamente à ligadura, diariamente por mais 6 dias. Esses grupos foram compostos paralelamente a cada abordagem farmacológica utilizada, com n=7, por protocolo (STEFENOVA *et al.*, 2006).

3.4.4 Grupos Umbeliferona

Foram constituídos por 3 subgrupos de hemiarcadas submetidas à ligadura de animais tratados com Umbeliferona, nas doses de 15; 45 e 135 mg/kg, respectivamente, administrada por via i.p, previamente à ligadura, diariamente por mais 6 dias. Esses grupos foram compostos paralelamente a cada abordagem farmacológica utilizada, com n=7, por protocolo (KWAK *et al.*, 2019; OUYANG *et al.*, 2019).

3.5 Parâmetros de avaliação

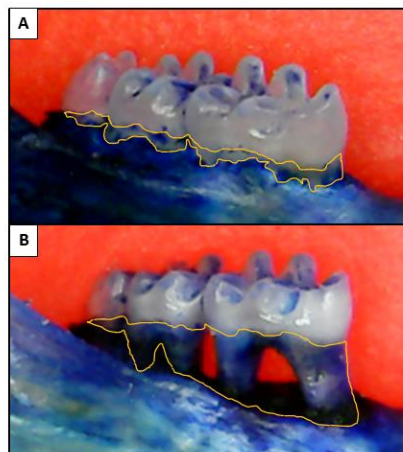
Ao término do período experimental, os animais foram eutanasiados conforme descrito anteriormente e suas hemiarcadas foram removidas (gengiva e osso) e processadas conforme as análises a serem realizadas: macroscópicas, análises histológicas/histomorfometria, imunohistoquímica, dosagem da mieloperoxidase de tecido gengival e ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) para citocina pró-inflamatória.

3.5.1 Reabsorção óssea alveolar

Ao final do período experimental (7º dia), os animais foram eutanasiados e suas hemiarcadas foram removidas e fixadas em formol (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) a 10%, durante 24 horas. A seguir, as hemiarcadas foram dissecadas e coradas com azul de metileno a 1% com o objetivo de discriminar o osso dos dentes, os quais se coram em menor intensidade (LIMA *et al.*, 2000; 2004). Para a quantificação da reabsorção óssea, as duas hemiarcadas foram

acomodadas em massa de modelar em lâminas e posteriormente foram fotografadas em microscópio digital modelo CIF.26445 (Gastaki, Brasil) conforme descrição feita por Lima *et al.* (2000). A seguir, as áreas linguais e vestibulares compreendidas entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) dos 3 dentes molares (KUHR *et al.*, 2004) dos animais (Figura 6) foram analisadas utilizando-se o software Image JTM (ImageJ 1.32j, National Institute of Health; EUA). Os resultados encontrados foram expressos como a reabsorção óssea alveolar (em mm²).

Figura 6 – Ilustração da mensuração da área compreendida entre a junção cimento-esmalte (JCE) e a crista óssea alveolar (COA) dos molares em camundongos



Legenda: Aspectos macroscópicos das hemiarcadas contralaterais não submetidas (A) e submetidas à periodontite induzida por ligadura durante 7 dias (B), e respectivos delineamentos das áreas de reabsorção óssea alveolar (ROA). [Elaborado pelo autor]

3.5.2 Dosagem da mieloperoxidase de tecido gengival

Amostras do tecido gengival subjacente à área desafiada foram removidas delicadamente das hemiarcadas direita e esquerda, assim como das hemiarcadas do grupo naïve. Os tecidos foram mantidos em freezer -80°C, posteriormente homogeneizados e processados para a análise da atividade da mieloperoxidase, enzima abundante nos grânulos azurófilos dos neutrófilos.

Para tal, foi seguido o protocolo conforme metodologia adaptada por Lima *et al.* (2005). O tecido gengival foi pesado e triturado com o auxílio de pistilo e cadinho, sob resfriamento com gelo, em uma solução de pH 4,7, contendo NaCl (100mM [p/v]), EDTA (15mM [p/v]);

NaPO₄ (20mM [p/v]) (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), o homogenato foi centrifugado a 4°C durante 15 min, a 3000 rpm. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -80°C para o ELISA. O pellet foi, então, ressuscitado em solução hipotônica contendo 900µl de NaCl a 0,2% (p/v); 900µl NaCl a 1,6% (p/v); 900 µl de glicose a 5% (p/v) e novamente centrifugado a 4°C durante 15min, a 3000rpm. O pellet final foi ressuscitado em uma solução de pH 5,4, contendo NaPO₄ a 50mM (p/v) e brometo de hexadeciltrimetilamônio (H-TAB) sólido (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), homogeneizado e centrifugado novamente a 4°C durante 15 min, 10.000 rpm. O sobrenadante foi usado para o ensaio de MPO usando 1,6mM de tetrametilbenzidina (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) e H₂O₂ (0,5mM), e a concentração de MPO foi determinada por meio da medição da mudança da absorbância a 450nm. Os valores foram expressos em quantidade de atividade de MPO por miligrama de gengiva em comparação à curva padrão de neutrófilos, obtidos a partir da cavidade peritoneal de ratos através da indução da migração neutrofílica pela injeção intraperitoneal de carragenina (300µg por animal), perfazendo uma curva padrão relacionando um número de neutrófilos maior que 90%.

3.5.3 Histologia/histomorfometria

As análises microscópicas foram realizadas, repetindo-se o mesmo protocolo de indução da perda óssea. Os grupos de animais foram eutanasiados e suas hemiarçadas foram removidas e fixadas em formol a 10%, por 24 horas. A seguir, foram submetidas à desmineralização em uma solução de pH 7,0, contendo EDTA (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) a 10%, por aproximadamente 50 dias. Posteriormente, as hemiarçadas foram neutralizadas em banho de água corrente por 24 horas, e processadas para inclusão em parafina. Em seguida, foram feitos cortes seriados de 4µm e as lâminas obtidas foram coradas pelo método Hematoxilina-Eosina (H&E).

Para a mensuração da área de furca foi considerada a área do ligamento periodontal na furca do primeiro molar inferior direito, considerando a área compreendida entre o teto da furca e osso alveolar, conforme descrito Luo *et al.* (2014). As fotomicrografias foram obtidas com microscópio óptico DM2000, Leica®, Alemanha, (100x e 200x) acoplado à câmera digital (DFC295, Leica®, Wetzlar, Alemanha) e analisadas com o software Nikon Infinity Analyze™.

3.5.4 Análise da quantificação de IL-1 β

Para o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), o tecido gengival subjacente à área desafiada, na hemiarcada direita, assim como da hemiarcada do grupo naïve foram removidos delicadamente. O sobrenadante coletado na primeira etapa do ensaio para MPO foi utilizado. O kit utilizado foi o IL-1 β /IL-1F2 (DY401) DuoSet® ELISA, obtidos da R&D Systems (Minneapolis, MN, USA).

Placas de 96 poços foram incubadas com o anticorpo primário anti-IL-1 β diluído em PBS (1:1000), durante 12h a 4°C (*overnight*). Posteriormente, as placas foram lavadas em solução tampão PBS e bloqueadas com uma solução de BSA 1% (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), durante 1h a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas em solução tampão PBS para aplicação das amostras e realização da curva padrão que ocorreu em várias diluições, em seguida incubou-se por 2h a 4°C. Novamente, as placas foram lavadas três vezes como descrito anteriormente e incubadas com anticorpo monoclonal biotinizado anti-IL-1 β diluído em BSA a 1% (1:1000), durante 2h em temperatura ambiente, após uma nova lavagem, as amostras receberão 100 μ L do complexo HRP-estreptavidina diluído 1:200. Esperou-se 20 minutos, e então aplicou-se o reagente de cor o-fenilenodiamina (OPD, 50 μ L), as placas foram incubadas na ausência de luz a 37 °C, por 15 a 20 minutos. A reação enzimática foi interrompida com H₂SO₄ (2N) e a densidade óptica foi medida a 450nm em espectrofotômetro.

Por fim, as concentrações das citocinas foram calculadas a partir de uma curva padrão com 11 pontos, obtida através de diluição seriada, considerando como concentrações iniciais 4000pg/mL. O resultado foi expresso em picograma de citocinas por miligrama de tecido (CUNHA *et al.*, 1993).

3.5.5 Imunohistoquímica

As hemiarcadas processadas para inclusão em parafina para a histologia/histomorfometria foram utilizadas para as imunomarcações de TRAP, para o qual foi utilizado anticorpo primário anti-TRAP (sc 30833 – Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) para a mensuração.

Para tal, os cortes foram desparafinados e hidratados em xilol, álcool 95%, 85% e 70% (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil) e água destilada. Posteriormente foi realizada a recuperação antigênica em solução tamponada 0,1M (tampão de citrato, pH 6,4) sob aquecimento a 60°C, por 30 minutos. Após o resfriamento em temperatura ambiente, as amostras foram incubadas

em peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos, sendo intercaladas por lavagens com solução tamponada de fosfato 10% (PBS). Em seguida, as amostras foram incubadas em BSA 5% por 30 minutos e lavadas com PBS 10%. Posteriormente o anticorpo primário (anti-TRAP [1:200]) foi incorporado *overnight* e após essa etapa as amostras foram lavadas com PBS 10% e incubadas com anticorpo biotilado anti-IgG (secundário) por 30 minutos, à temperatura de 22°C a 25°C (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

A revelação da reação se deu através de uma coloração utilizando o cromógeno 3,3 diaminobenzidina DAB/peróxido, após lavagem com PBS. A reação foi interrompida em água destilada e as lâminas foram contra-coradas por hematoxilina de Harris à temperatura ambiente, durante 1 minuto. Salienta-se que os controles negativos foram processados simultaneamente, seguindo a mesma descrição, sendo que estes não mostraram imunorreatividade para TRAP. Finalmente as amostras foram desidratadas em álcoois, clareadas em xilol e foram montadas nas lâminas/lamínulas para a quantificação (GUIMARÃES *et al.*, 2016).

A quantificação de células positivas foi expressa como o número de células imunorreativas por campo (5) no aumento de 400x, expresso como células TRAP+, por campo. Para tal, as fotomicrografias foram obtidas com microscópio óptico DM2000, Leica®, Alemanha, (200x e 400x) acoplado à câmera digital (DFC295, Leica®, Wetzlar, Alemanha) e analisadas com o software Nikon Infinity Analyze™.

3.5.6 Análises dos parâmetros sistêmicos

Para verificação das condições sistêmicas, no 7º dia amostras sanguíneas foram coletadas pelo plexo orbital dos animais sob anestesia e reservadas para as subsequentes análises bioquímicas. Para a avaliação das funções hepática e renal foram feitas dosagens séricas de transaminases hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), ureia e creatinina, respectivamente, utilizando-se kits apropriados (Labtest®). Esses dados foram comparados aos pesos úmidos do fígado e dos rins em relação às respectivas massas corporais dos animais no 7º dia. Os valores de massas corporais dos animais foram registrados antes da ligadura e, diariamente, até o 7º dia e expressos como variação de massa corporal em relação ao dia zero.

3.5.7 Análises Estatísticas

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. O número de animais por grupo, independente do protocolo, foi calculado a fim de se detectar diferença entre os grupos de 10% com poder de 90%, e um nível de significância $p < 0,05$.

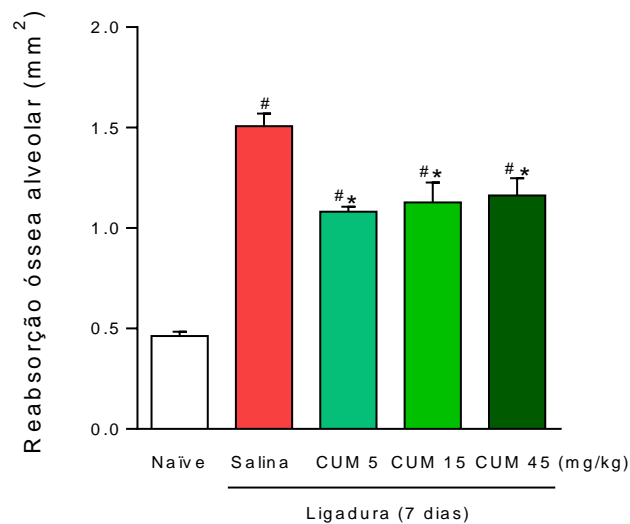
Segundo a normalidade, para dados paramétricos foi realizada análise de Variância (Anova) seguida pelo teste de Bonferroni. Para dados não paramétricos foram realizados Kruskal Wallis e Dunn. Para tais análises foi utilizado o software GraphPad Prism® (San Diego, CA, EUA), versão 9.2 para macOS, 2021.

4 RESULTADOS

4.1 Aspectos macroscópicos do efeito da cumarina na reabsorção óssea alveolar

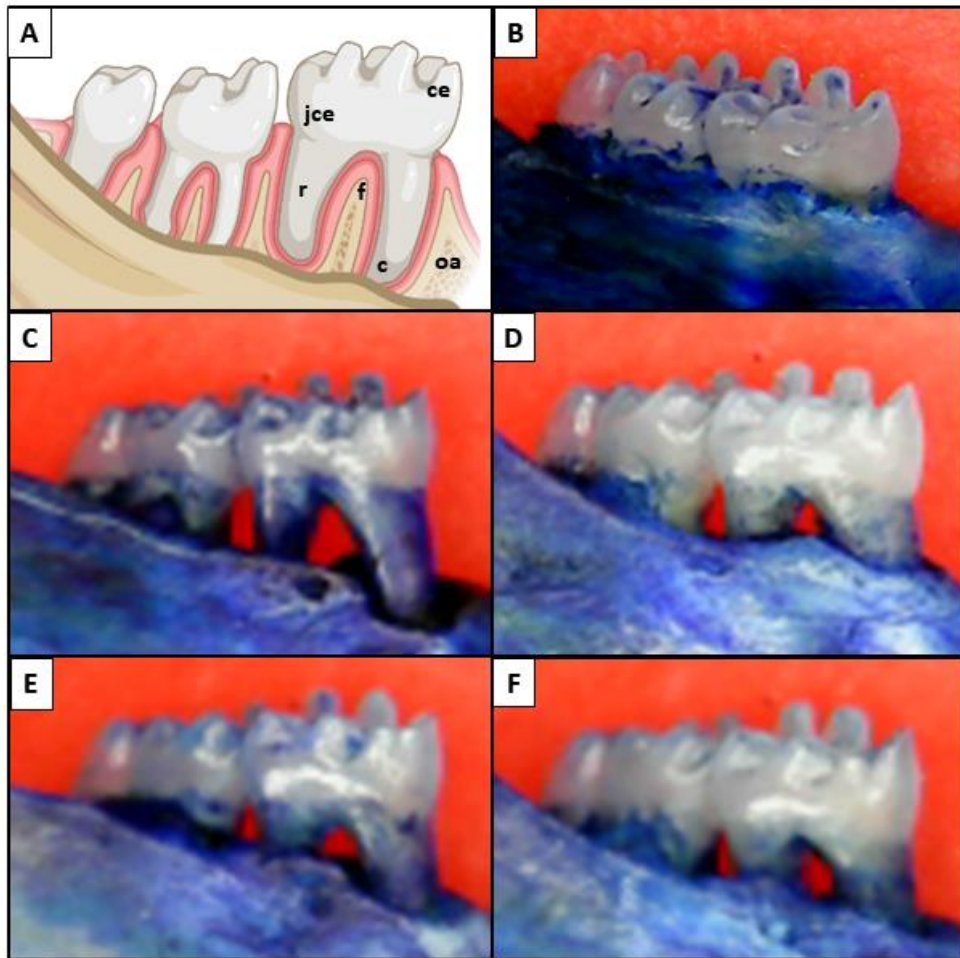
A ligadura no primeiro molar inferior direito, durante 7 dias, induziu ROA de 224%, caracterizada por exposições radiculares e lesões de furca nas hemiarcadas dos animais do grupo salina em comparação ao naíve ($p < 0,05$). A cumarina (CUM), nas doses de 5, 15 e 45 mg/kg, i.p, reduziu a ROA, de maneira significativa ($p < 0,05$), em 28%, 25% e 22% respectivamente (Figura 7 e 8).

Figura 7 – Efeito da cumarina na reabsorção óssea alveolar em camundongos



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. Os animais receberam salina ou cumarina (CUM 5, 15 e 45 mg/kg, i.p) diariamente durante 7 dias. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naíve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

Figura 8 – Aspecto macroscópico do efeito da cumarina na reabsorção óssea alveolar em camundongos

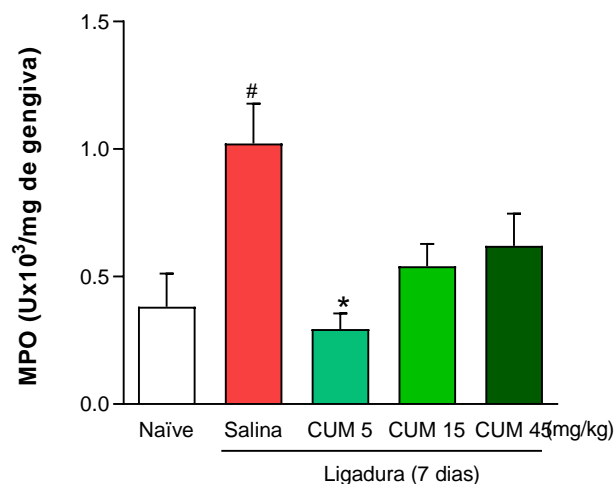


Legenda: Desenho esquemático ilustrando aspectos anatômicos do periodonto mandibular da face vestibular de camundongos (A) – Coroa de esmalte [ce], furca [f], junção cimento esmalte [jce], osso alveolar [oa], cimento [c] e raiz [r]. Aspectos macroscópicos das hemiarcadas não submetidas (B) e submetidas à periodontite induzida por ligadura em animais que receberam solução salina (C) e cumarina nas dosagens de 5, 15 e 45 mg/kg (D, E e F), respectivamente. [Elaborado pelo autor]

4.2 Efeito da cumarina sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido gengival

Observou-se que a ligadura durante 7 dias aumentou significativamente a atividade de MPO em aproximadamente 168% nos animais do grupo salina ($p < 0,05$) quando comparados aos do grupo naïve. O tratamento com CUM (5 mg/kg, i.p) reduziu os níveis de MPO em 71,6% ($p < 0,05$), enquanto as demais doses de CUM (15 e 45 mg/kg, i.p) não foram capazes de prevenir o aumento de MPO ($p > 0,05$) em comparação com os animais do grupo salina. Os dados podem ser observados na figura 9, a seguir.

Figura 9 – Efeitos da cumarina sobre a atividade de MPO em tecido gengival em camundongos



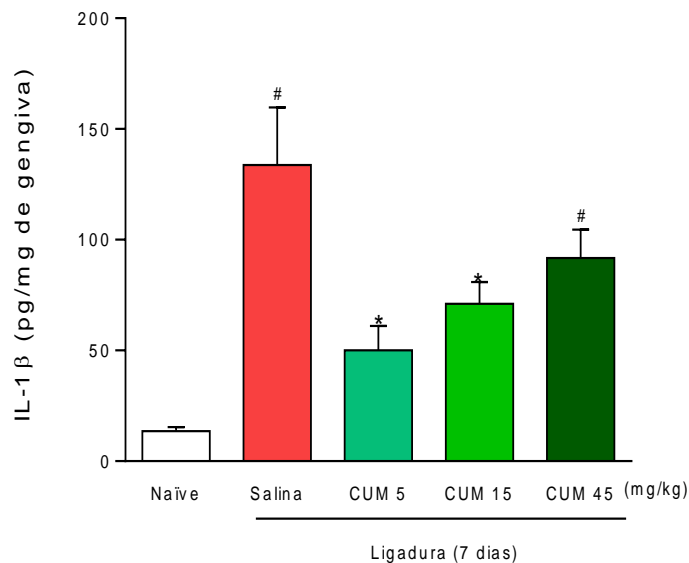
Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naïve, salina, cumarina (CUM) 5, 15 e 45 mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naïve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

4.3 Efeito da cumarina sobre os níveis de IL-1 β em tecido gengival

Quanto aos níveis de IL-1 β , os animais do grupo salina, onde a periodontite foi induzida por ligadura durante 7 dias apresentaram aumento significativo da IL-1 β cerca de 883% em comparação aos animais do grupo naïve. Exceto, para a maior dose, o tratamento com CUM (5

e 15mg/kg, i.p) reduziu de forma significativa os níveis de IL-1 β gengival ($p<0,05$), em 62,6% e 53% respectivamente. Os dados podem ser observados na figura 10, a seguir.

Figura 10 – Efeitos da cumarina sobre os níveis de IL-1 β em tecido gengival em camundongos



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naïve, salina, cumarina (CUM) 5, 15 e 45 mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p<0,05$ em relação ao naïve. * $p<0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

4.4 Efeitos sistêmicos da cumarina

Para avaliação das funções hepáticas e renais, o fígado e um rim foram removidos, pesados e correlacionados com as respectivas massas corporais dos animais no último dia experimental e expressos como índice do respectivo órgão, além de realizadas dosagens séricas de AST, ALT, ureia e creatinina. Não foram observadas alterações significantes entre os grupos submetidos a periodontite (Salina) para os índices hepático e renal em comparação aos animais naïve ($p>0,05$). Os dados podem ser visualizados na tabela 1.

Em relação à função renal, nenhuma das doses de CUM causou quaisquer alterações no índice renal ou nas dosagens bioquímicas ($p>0,05$). Quanto à função hepática, observou-se que o tratamento com a CUM (5, 15 e 45 mg/kg, i.p), embora não tenha alterado o peso úmido do fígado quando comparado aos valores dos animais Salina ou naïve ($p>0,05$), as maiores doses

aumentaram, de maneira significativa e dose-dependente, os níveis de ALT em 100% e 255%, respectivamente, em comparação ao Salina, ou em 201% e 434%, respectivamente, em relação ao naïve. Particularmente a dose de CUM 45mg/kg, i.p elevou os níveis de AST em 31%, quando comparado aos animais naïve ($p<0,05$) (tabela 1).

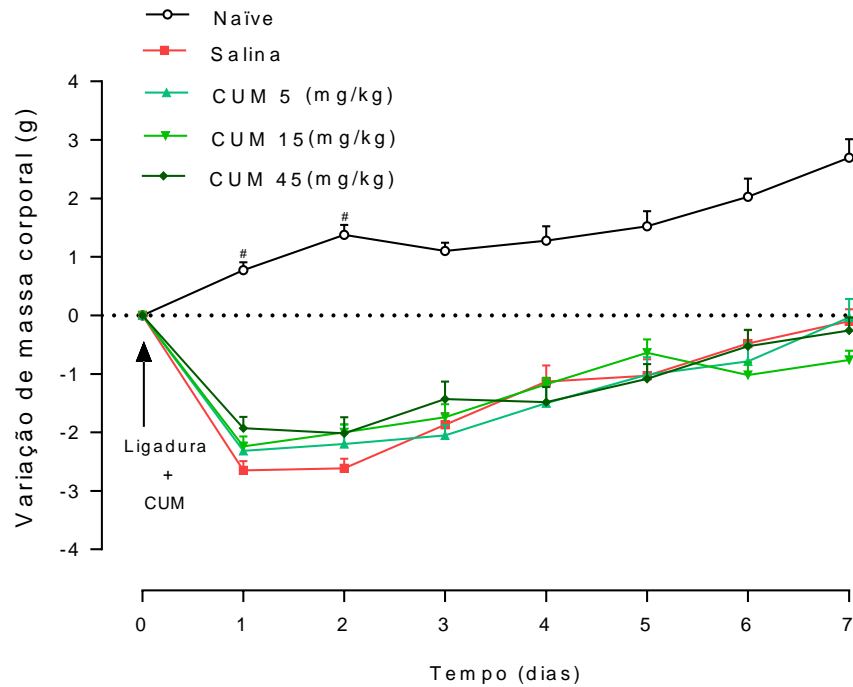
Quanto ao peso dos animais, a indução da periodontite causou perda significativa de massa corpórea no primeiro dia pós ligadura ($p<0,05$) quando comparados aos animais naïve, o tratamento com a CUM (5, 15 e 45 mg/kg, i.p) não alterou, de forma significativa, a variação de massa corporal induzida pela ligadura, quando comparada ao grupo de animais Salina ($p>0,05$). O gráfico da variação da massa corporal pode ser observado na figura 11.

Tabela 1 – Efeitos da cumarina sobre os parâmetros sistêmicos de camundongos submetidos à ligadura durante 7 dias

Parâmetros	Naïve	Periodontite			
		Salina	CUM 5 mg/kg	CUM 15 mg/kg	CUM 45 mg/kg
Índice hepático (x10 ³)	49,65±0,8180	50,9±2,208	49,22±1,480	52,31±1,678	53,4±0,7789
ALT (U/L)	16,73±7,599	25,15±3,822	11,38±3,534	50,39±2,966 ^{#*&}	89,43±9,547 ^{#*&§}
AST (U/L)	94,95±6,453	119,6±8,023	83,80±10,17	107,0±9,202	124,2±8,434 ^{#&}
Índice renal (x10 ³)	7,9±0,5212	8,433±0,3801	8,317±0,1973	8,886±0,2154	8,171±0,1936
Ureia (mg/dL) (x10 ³)	10,75± 0,8539	11,83± 0,4014	10,33± 0,9888	9,8± 0,3742	11,29± 0,4738
Creatinina (mg/dL)	1,000±0,208	0,9600±0,133	1,025±0,035	0,8694±0,006	1,154±0,040

Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura nos molares inferiores durante 7 dias. O grupo naïve, salina, cumarina (CUM) 5, 15 e 45 mg/kg, i.p foram avaliados no dia 7. Os valores representam a média ± erro padrão da média (6-7 animais por grupo) dos níveis séricos das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e índices de fígado e rim, calculado como a relação entre o peso úmido do órgão e a massa corporal do animal do 7º dia. [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. [#]p<0,05 em relação ao naïve. ^{*}p<0,05 em relação ao salina. [&]p<0,05 em relação ao grupo CUM 5. [§]p<0,05 em relação ao grupo CUM 15.

Figura 11 – Efeitos da cumarina na variação de massa corpórea de camundongos submetidos a periodontite durante 7 dias



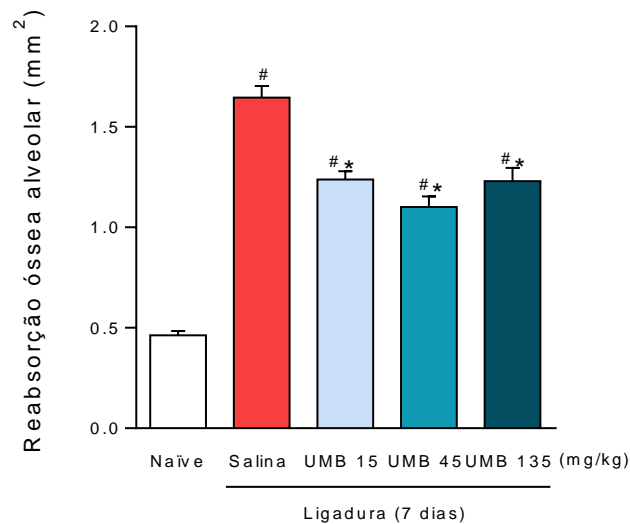
Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naïve, salina, cumarina (CUM) 5, 15 e 45 mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni].

[#]p<0,05 em relação ao naïve. [Elaborado pelo autor]

4.5 Aspectos macroscópicos do efeito da umbeliferona na reabsorção óssea alveolar

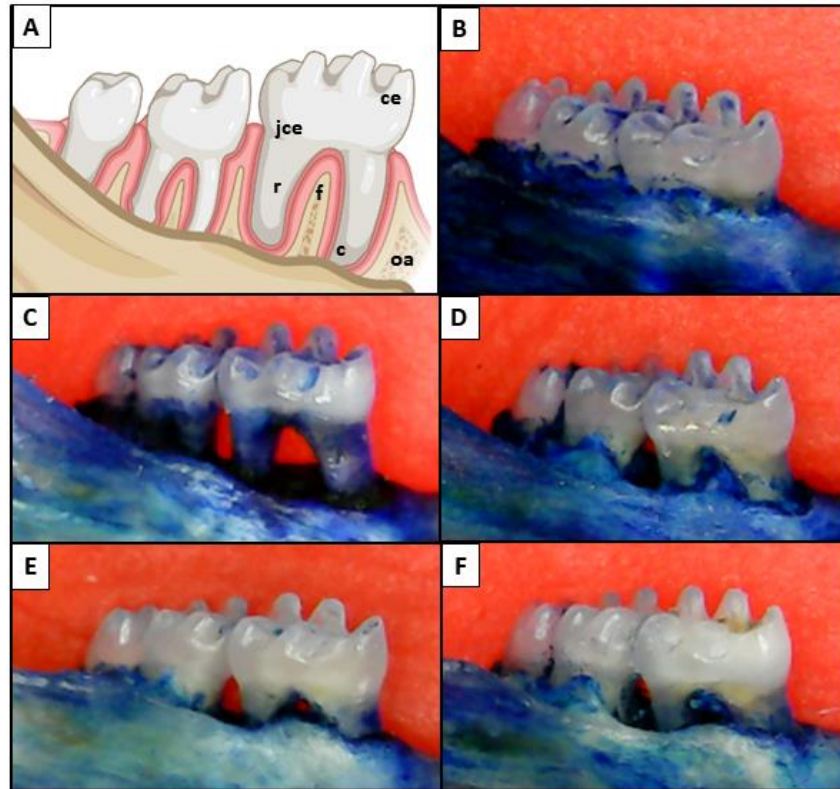
A ligadura no primeiro molar inferior direito, durante 7 dias, induziu ROA de 256%, caracterizada por exposições radiculares e lesões de furca nos animais do grupo salina, quando comparada ao naïve ($p < 0,05$). A umbeliferona (UMB), nas doses de 15, 45 e 135 mg/kg, i.p reduziu a ROA em 25%, 33% e 25% ($p < 0,05$), respectivamente ($p > 0,05$) (Figura 12 e 13).

Figura 12 – Efeito da umbeliferona na reabsorção óssea alveolar em camundongos



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. Os animais receberam salina ou umbeliferona (UMB 15, 45 e 135mg/kg, i.p) diariamente durante 7 dias. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naïve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

Figura 13 – Aspectos macroscópicos do efeito da umbeliferona na reabsorção óssea alveolar em camundongos

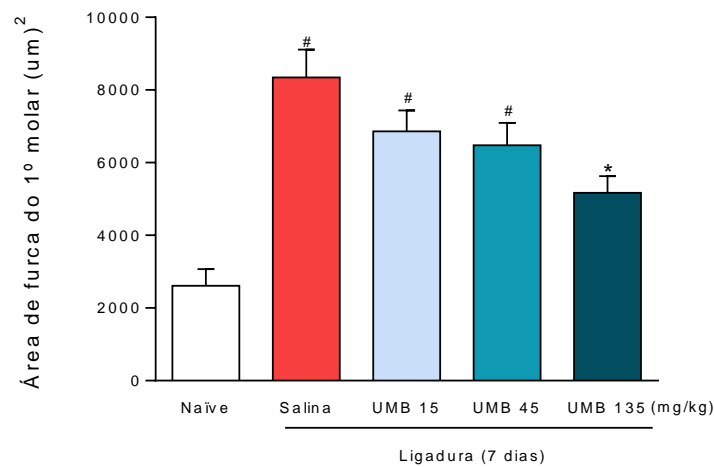


Legenda: Desenho esquemático ilustrando aspectos anatômicos do periodonto mandibular da face vestibular de camundongos (A) – Coroa de esmalte [ce], furca [f], junção cimento esmalte [jce], osso alveolar [oa], cimento [c] e raiz [r]. Aspectos macroscópicos das hemiarcadas não submetidas (B) e submetidas à periodontite induzida por ligadura em animais que receberam, por via i.p, solução salina (C) e umbeliferona nas dosagens de 15, 45 e 135 mg/kg (D, E e F). [Elaborado pelo autor]

4.6 Efeitos da umbeliferona sobre os aspectos microscópicos da reabsorção óssea alveolar

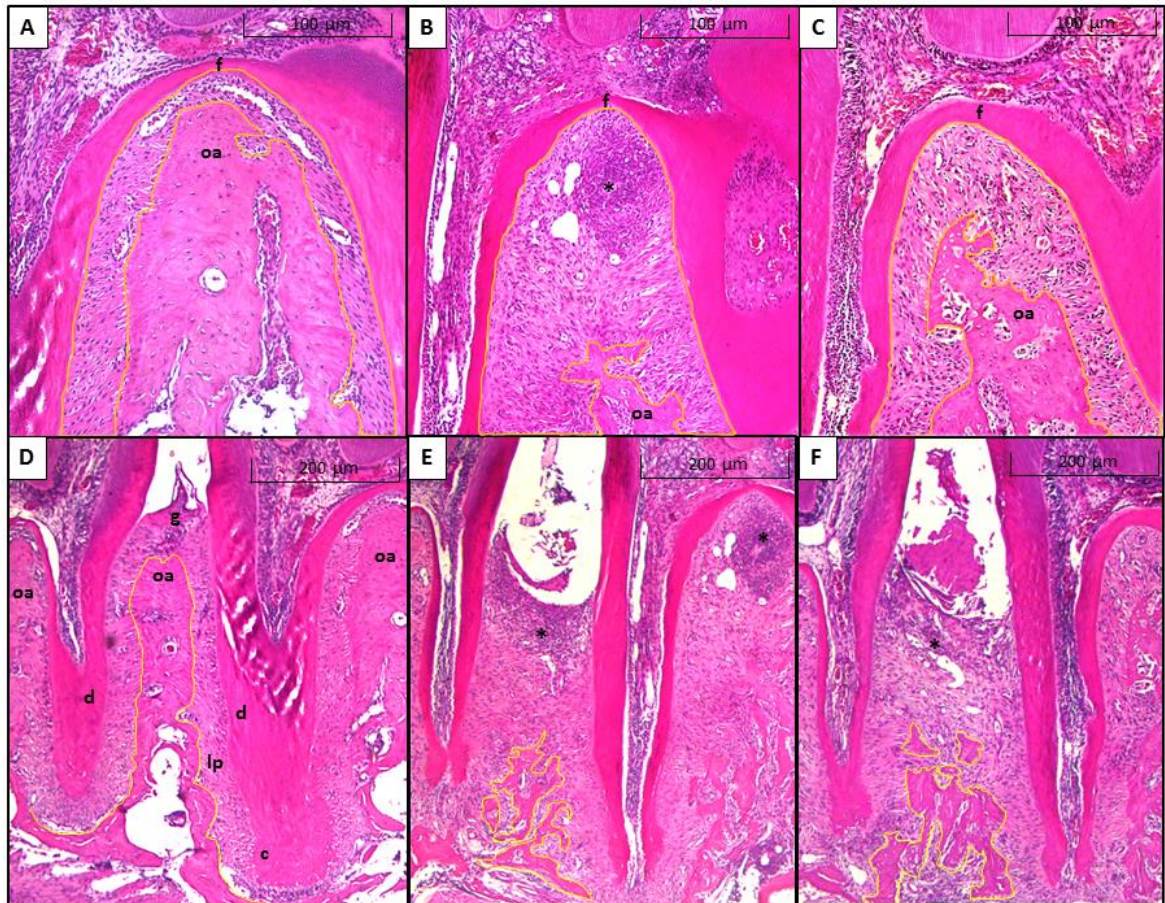
A análise histométrica demonstrou que a ligadura durante 7 dias provocou lesão de furca em 219% nos animais do grupo salina em relação ao grupo naïve ($p < 0,05$). O tratamento com UMB na maior dose reduziu a lesão de furca em 31% ($p < 0,05$). Os dados podem ser visualizados nas figuras 14 e 15.

Figura 14 – Efeitos da umbeliferona sobre os aspectos microscópicos do periodonto de camundongos submetidos à ligadura durante 7 dias



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naïve, salina, umbeliferona (UMB) 15, 45 e 135 mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naïve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

Figura 15 – Fotomicrografias do periodonto íntegro e submetidos à ligadura durante 7 dias em camundongos

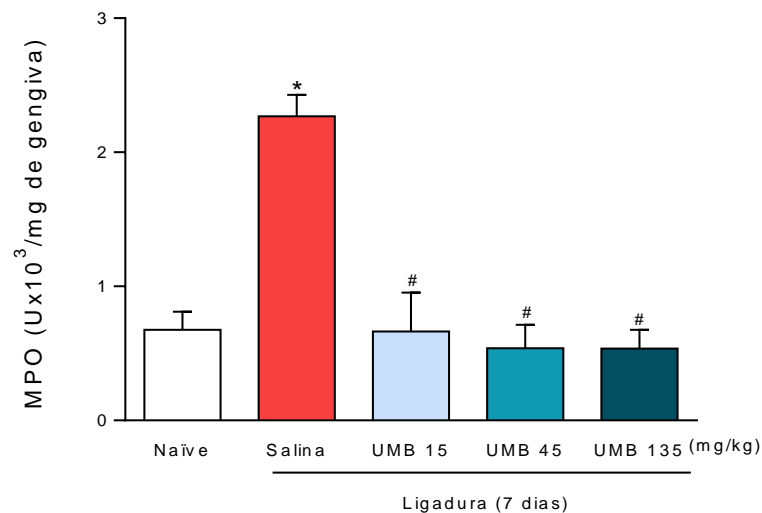


Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito durante 7 dias. Periodonto de camundongos naïve (A e D), após 7 dias de ligadura tratados com salina (B e E) ou umbeliferona (UMB) 135 mg/kg (C e F). Áreas de furca (f; em amarelo) e osso alveolar interproximal(oa; em amarelo); cimento (c); dentina (d), gengiva (g), ligamento periodontal (lp), osso alveolar (oa) e infiltrado inflamatório (*). Coloração de hematoxilina-eosina; 100x e 40x, respectivamente; barras= 100 ou 200 μ m. [Elaborado pelo autor]

4.7 Efeito da umbeliferona sobre a atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecido gengival

Em conformidade com os achados histopatológicos, na qual os tecidos gengivais de hemiarcadas dos animais do grupo salina apresentam intenso infiltrado inflamatório em relação aos do grupo naïve. Aqui, observou-se que a ligadura durante 7 dias resultou na elevação significativa da atividade de MPO em aproximadamente 237% nos animais do grupo salina ($p < 0,05$) quando comparados aos do grupo naïve. O tratamento com UMB (15, 45 e 135mg/kg, i.p), reduziu de forma significativa a atividade de MPO ($p < 0,05$) em 71%, 76% e 77%, respectivamente. Os dados podem ser observados na figura 16, a seguir.

Figura 16 – Efeitos da umbeliferona sobre a atividade de MPO em tecido gengival em camundongos

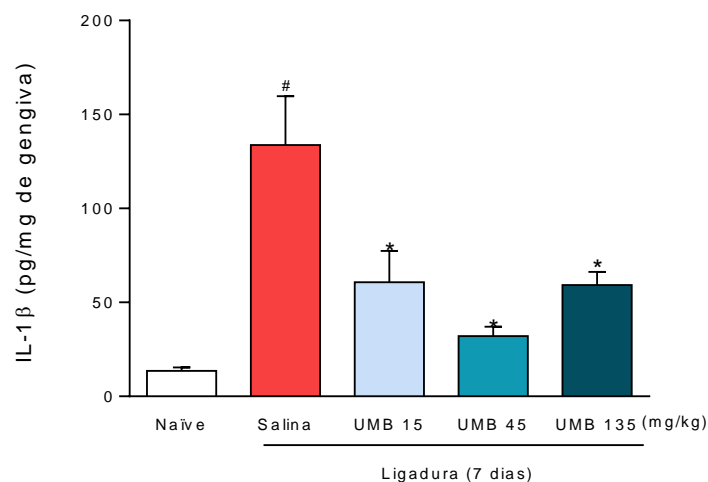


Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naïve, salina, umbeliferona (UMB) 15, 45 e 135mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naïve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

4.8 Efeito da umbeliferona sobre os níveis de IL-1 β em tecido gengival

Quanto aos níveis de IL-1 β , os animais do grupo salina onde a periodontite foi induzida por ligadura durante 7 dias apresentaram intenso aumento da IL-1 β , cerca de 883% em comparação aos animais do grupo naíve. O tratamento com UMB (15, 45 e 135mg/kg, i.p), reduziu de forma significativa os níveis de IL-1 β gengival ($p < 0,05$) em 54%, 78% e 50%, respectivamente. Os dados podem ser observados na figura 17, a seguir.

Figura 17 – Efeitos da umbeliferona sobre os níveis de IL-1 β em tecido gengival em camundongos



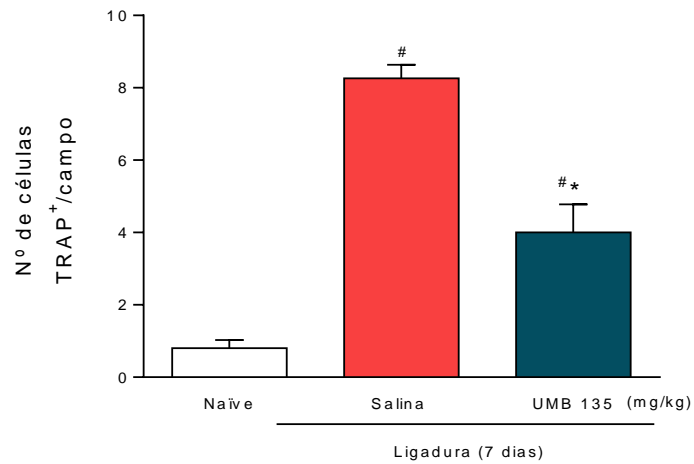
Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naíve, salina, umbeliferona (UMB) 15, 45 e 135 mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naíve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

4.9 Efeito da umbeliferona sobre imunomarcção para TRAP

A imunomarcção para TRAP foi analisada no periodonto de camundongos submetidos a periodontite por ligadura durante 7 dias. A permanência da ligadura aumentou em 932% o número de células imunocoradas para TRAP nos animais do grupo salina quando comparados ao grupo naíve ($p < 0,05$). O tratamento com UMB 135 (mg/kg, i.p) reduziu em 48,4% a

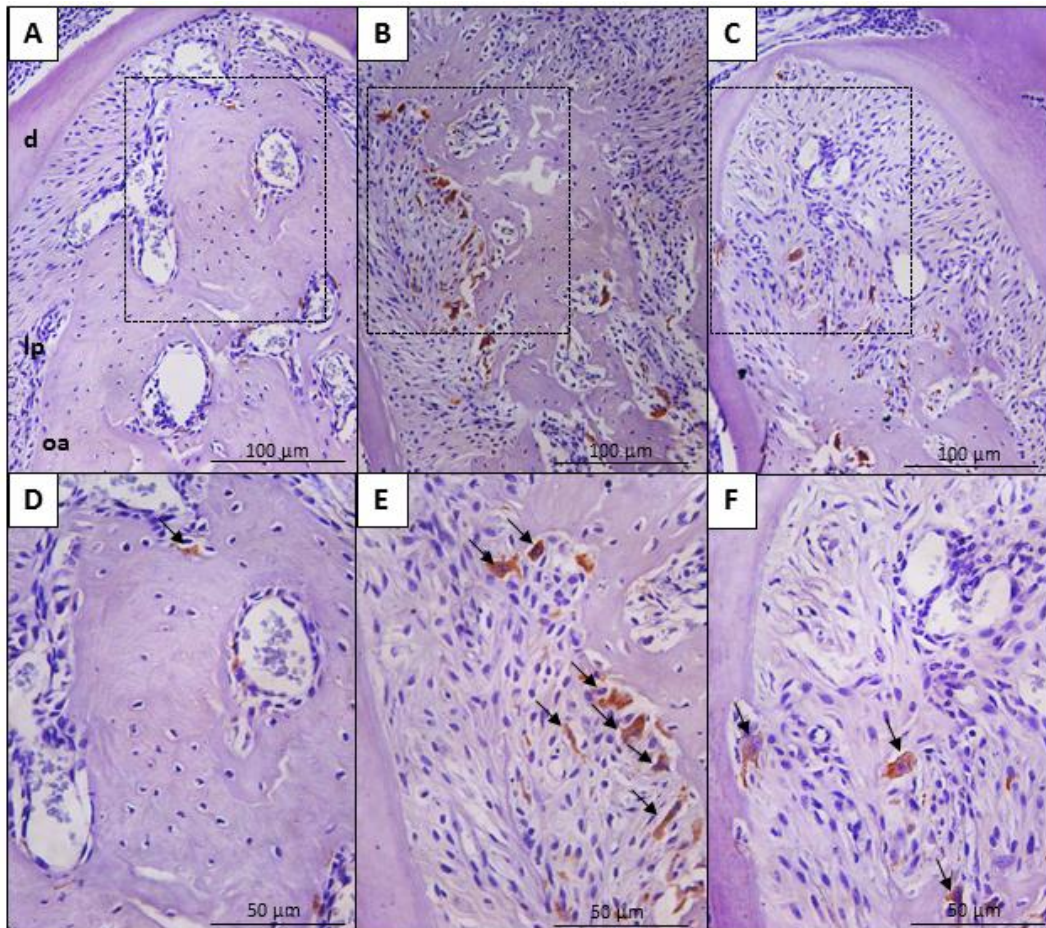
imunocoloração para TRAP comparada aos animais do grupo salina ($p < 0,05$). Os dados podem ser observados na figura 18 e 19.

Figura 18 – Efeito da umbeliferona sobre a imunomarcção para TRAP no periodonto em camundongos



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito. O grupo naïve, salina, umbeliferona (UMB) 135mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (3 animais). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naïve. * $p < 0,05$ em relação ao grupo salina. [Elaborado pelo autor]

Figura 19 – Fotomicrografias da imunocoloração para TRAP em camundongos



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito durante 7 dias. Periodonto de camundongos naïve área de furca (A e D) e após 7 dias de ligadura tratados com salina (B e E) ou umbeliferona (UMB) 135mg/kg, i.p (C e F). Aumentos de 200x (A, B, C; barras= 100μm e 400x (D, E e F; barras= 50μm). Áreas de dentina (d), ligamento periodontal (lp) e osso alveolar (oa). As setas indicam células TRAP⁺. [Elaborado pelo autor]

4.10 Efeitos sistêmicos da umbeliferona

Para avaliação das funções hepáticas e renais, o fígado e um rim foram removidos, pesados e correlacionados com as respectivas massas corporais dos animais no último dia experimental e expressos como índice do respectivo órgão, além de realizadas dosagens séricas de aspartato AST, ALT, ureia e creatinina.

A UMB, nas três doses utilizadas, não causou quaisquer alterações sistêmicas, sem alterar os índices hepáticos e renais, nem as dosagens bioquímicas quando comparados aos animais Salina ou naïve ($p > 0,05$). Os dados podem ser visualizados na tabela 2.

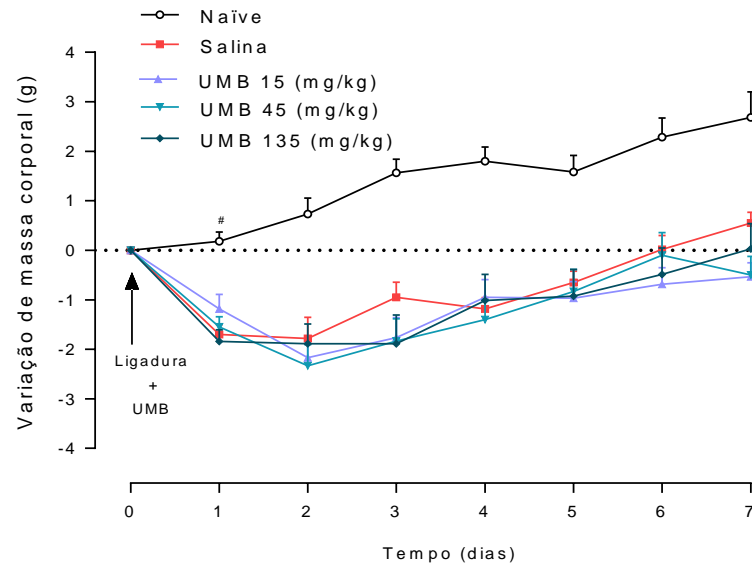
Quanto ao peso dos animais, a indução da periodontite causou perda significativa de massa corpórea no primeiro dia pós ligadura ($p < 0,05$) quando comparados aos animais naïve. O tratamento com a UMB (15, 45 e 135mg/kg, i.p) não alterou, de forma significativa, a variação de massa corporal induzida pela ligadura quando comparada ao grupo de animais Salina ($p > 0,05$). O gráfico da variação da massa corporal pode ser observado na figura 20.

Tabela 2 – Efeitos da umbeliferona sobre os parâmetros sistêmicos de camundongos submetidos à ligadura durante 7 dias

Parâmetros	Naïve	Periodontite			
		Salina	UMB 15 mg/kg	UMB 45 mg/kg	UMB 135 mg/kg
Índice hepático (x10 ³)	49,65±0,81	50±1,4	51,8±1,1	48,6±1,2	47±0,5
ALT (U/L)	16,73±7,6	33,50±3,81	17,80±2,19	21,77±3,08	29,15±3,17
AST (U/L)	70,2±10,5	66,7±8,5	55,1±9,4	60,4±7,1	61,1±4,6
Índice renal (x10 ³)	7,9±0,52	7,9±0,4	6,9±0,2	7,4±0,1	7,6±0,1
Ureia (mg/dL) (x10 ³)	10,75± 0,85	10,6±0,3	9,5±0,2	9,4±0,2	10,7±0,3
Creatinina (mg/dL)	1,000±0,20	0,7504±0,08	0,8663±0,04	0,8768±0,12	0,8104±0,06

Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura nos molares inferiores durante 7 dias. Os grupos naïve, salina, umbeliferona (UMB) 15, 45 e 135 mg/kg, i.p foram avaliados no dia 7. Os valores representam a média ± erro padrão da média (6-7 animais por grupo) dos níveis séricos das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e índices de fígado e rim, calculado como a relação entre o peso úmido do órgão e a massa corporal do animal do 7º dia. [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]

Figura 20 – Efeitos da umbeliferona na variação de massa corpórea de camundongos submetidos a periodontite durante 7 dias



Legenda: A periodontite foi induzida por ligadura no molar inferior direito durante 7 dias. O grupo naïve, salina, umbeliferona (UMB) 15, 45 e 135mg/kg, i.p foram eutanasiados no dia 7. Os valores representam a média \pm erro padrão da média (6-7 animais por grupo). [Os dados foram analisados por meio de análise de variância (Anova) e teste de Bonferroni]. # $p < 0,05$ em relação ao naïve. [Elaborado pelo autor]

5 DISCUSSÃO

A periodontite é uma doença infecciosa e inflamatória de alta prevalência, caracterizada por inflamação e consequente destruição dos tecidos de proteção e de suporte dentário. Clinicamente são observados o sangramento gengival, a formação de bolsa periodontal, a recessão gengival, a lesão de furca e a mobilidade dental (PAPAPANOU *et al.*, 2018).

Nesta pesquisa, os efeitos da cumarina e da umbeliferona foram avaliados sobre a inflamação e a reabsorção óssea alveolar induzida por ligadura em camundongos. No 7º dia de periodontite foi verificada uma reabsorção óssea alveolar (ROA) significativa, comparada à de animais naïve. Em modelos não clínicos, a literatura demonstra que o aumento do processo inflamatório associado à intensa perda óssea alveolar é mais evidente nos períodos iniciais de indução de periodontite considerando o período até 14 dias, com o aumento dos mediadores inflamatórios de forma mais crítica na primeira semana (MOLON *et al.*, 2018). Nesta fase, o volume ósseo é reduzido gradual e significativamente a partir de 3 ou 5 dias após a instalação da ligadura (ABE; HAJISHENGALLIS, 2013; MAEKAWA *et al.*, 2019), e aos 8 dias de periodontite induzida por ligadura foi possível observar um defeito intraósseo grave (MAEKAWA *et al.*, 2019).

De maneira relevante, o processo destrutivo periodontal em humanos pode envolver a região de furca de dentes multirradiculares, o que acarreta a perda de suporte nesta região, e quando não tratada o prognóstico dentário a longo prazo é altamente desfavorável, com consequentes prejuízos funcionais e estéticos (LAUGISCH *et al.*, 2018). Em estudos realizados por Kim *et al.* (2020) e Oliveira *et al.* (2019), grupos de camundongos com doença periodontal apresentaram porcentagem aumentada de área do ligamento periodontal e perda óssea significativa na região de furca em comparação aos animais sem periodontite. Neste sentido, foi demonstrado que camundongos com periodontite induzida por ligadura apresentaram intensa ROA no 7º dia (KIM *et al.*, 2020), bem como lesão de furca aos 8 dias de periodontite (LAUGISCH *et al.*, 2018). Em nossa pesquisa a periodontite no 7º dia foi caracterizada por exposições radiculares e lesões de furca dos molares mandibulares, em consonância com a literatura, corroborando que tal modelo confere adequada reprodutibilidade.

Neste estudo, a CUM e a UMB, em todas as doses empregadas, reduziram a ROA vista por macroscopia. Verificou-se ainda que a maior dose de UMB reduziu a área de furca vista por histomorfometria. Apesar de não haver na literatura relatos sobre a administração especificamente destas cumarinas em modelos de perda óssea alveolar, outros derivados

cumarínicos, como o cloricromeno e a cinamoiloxi-mammeisinam (uma cumarina encontrada na geoprópolis de *Melipona scutellaris*), demonstraram reduzir a ROA em modelos de periodontite induzida por ligadura e *Porphyromonas gingivalis*, respectivamente, em camundongos (DA CUNHA *et al.*, 2017; MUIÀ *et al.*, 2006).

Sabe-se que a disbiose está claramente envolvida na patogênese da periodontite, entretanto, a desregulação dos elementos da imunidade inata e adaptativa são fatores (chaves) para os danos teciduais do periodonto (LAMON; KOO; HAJISHENGALLIS, 2018; MAEKAWA *et al.*, 2018). Assim, a administração de substâncias com atividade anti-inflamatória pode ser um importante recurso terapêutico (ODUNCUOGLU *et al.*, 2018). Foi demonstrado que a utilização da UMB em um modelo de artrite conseguiu reduzir o edema sinovial, a infiltração de granulócitos e células mononucleares, a degeneração das células epiteliais e a erosão da cartilagem articular, sugerindo que a UMB apresentou um efeito protetor na artrite em ratos (OUYANG *et al.*, 2019), doença autoimune, crônica e inflamatória que possui mecanismos de patogenicidade semelhantes aos da periodontite, visto que a inflamação crônica associada tanto à artrite reumatóide quanto à periodontite apresentam similaridades no que diz respeito a desregulação imunológica, vista através da ativação maciça de células como neutrófilos e mononucleares, resultando no desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias (ARAÚJO; MELO; LIMA, 2015). A CUM quando administrada em baixas doses reduziu os danos associados ao modelo de colite (LUCHINI *et al.*, 2008). Tanto a UMB como também a CUM reduziram a resposta inflamatória neste modelo, dada a redução da atividade de MPO e a quantificação de IL-1 β , o que é coerente com estudos em outros modelos de inflamação (LUCHINI *et al.*, 2008; OUYANG *et al.*, 2019).

Inicialmente na periodontite ocorre a liberação de mediadores pré-formados em células residentes, como a histamina e a IL-1 β , os quais conseguem promover a intensa infiltração de neutrófilos (BRITO *et al.*, 2021; UEDA *et al.*, 2009), células que constituem a primeira linha de defesa do organismo contra microrganismos invasores através de fagocitose e degradação intracelular, liberação de grânulos e material nuclear na forma de “armadilhas” extracelulares (ROSALES, 2018). Dados os efeitos potencialmente prejudiciais dos neutrófilos desregulados e a granulopoiese, as substâncias que modulam a super ativação destas células podem ser um importante recurso terapêutico para a periodontite (CAO *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020; MAEKAWA *et al.*, 2019).

Aqui, a ligadura induziu um intenso infiltrado inflamatório, caracterizado pelo aumento da atividade de MPO, enzima indicativa da presença de neutrófilos maduros (ROSALES,

2018). Observou-se que os tratamentos com todas as doses de UMB e a menor dose de CUM preveniram o aumento de MPO neste estudo, o que parece concordar com outros estudos, os quais demonstraram que a CUM e a UMB possuem importantes efeitos anti-inflamatórios (ALVES *et al.*, 2009; LEAL *et al.*, 2000; 2003; OUYANG *et al.*, 2019). A cumarina conseguiu inibir a permeabilidade vascular e o rolamento de neutrófilos em direção ao foco inflamatório (ALVES *et al.*, 2009; LEAL *et al.*, 2003), e reduziu a MPO em cólon de ratos (LUCHINI *et al.*, 2008), bem como a UMB preveniu a lesão pulmonar aguda induzida por LPS, com a redução do edema pulmonar e da atividade de MPO (WANG *et al.*, 2019).

A interação de neutrófilos recrutados no local da inflamação por células residentes, mediadores inflamatórios locais ou matriz extracelular pode levar à produção de vários outros mediadores, como quimiocinas, enzimas líticas, espécies reativas de oxigênio e, especialmente, as citocinas, como a IL-1 β , amplificando, conseqüentemente, a resposta inflamatória (CAO *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020; MAEKAWA *et al.*, 2019). Achados clínicos demonstram que os níveis de IL-1 β são elevados em pacientes que apresentam periodontite (RANGBULLA *et al.*, 2017). A formação de IL-1 β na periodontite ocorre em resposta a presença de lipopolissacarídeo (LPS) que são reconhecidos por receptores Toll-like (TLRs). Este, por sua vez, ativa o NF- κ B, promovendo a expressão do precursor inativo pró-IL-1 β , o qual deverá ser proteolísado em sua forma ativa pela ação da caspase-1 (CHENG *et al.*, 2020). Desse modo, considerando que a IL-1 β , é capaz de promover a infiltração de neutrófilos para o sítio de inflamação (UEDA *et al.*, 2009) e está relacionada com a patogênese da periodontite (CHENG *et al.*, 2020), logo, foi demonstrado em modelos não clínicos que a modulação da produção de IL-1 β é considerada essencial para a resolução da periodontite (KOIDE *et al.*, 1995; UEDA *et al.*, 2009).

No presente estudo, observou-se aumento dos níveis de IL-1 β nos tecidos gengivais dos animais com periodontite, dados estes corroborados com a literatura, onde camundongos com periodontite induzida por ligadura durante 10 dias apresentaram aumento dos níveis de mRNA de IL-1 β (FU; WEI; ZHANG, 2019). Todas as doses de UMB e as duas menores doses de CUM reduziram eficazmente os níveis IL-1 β nos tecidos gengivais, de maneira coerente com a redução de MPO neste modelo. Consistente com a literatura, o extrato de Guaco, cujo constituinte majoritário é a cumarina, modulou negativamente os níveis de IL-1 β em camundongos desafiados com carragenina (ALVES *et al.*, 2009), e a UMB, administrada durante 7 dias, reduziu os níveis de IL-1 β em ratos artríticos (OUYANG *et al.*, 2019). Pode-se inferir que a redução da ROA pela CUM e a UMB pode estar associada à modulação da atividade de neutrófilos por mecanismo dependente de IL-1 β , tendo em vista que a

administração de substâncias com capacidade modular negativamente os níveis de IL-1 β resultou em menor reabsorção óssea em um modelo de perda óssea induzida por LPS e ovariectomia em camundongos (SON *et al.*, 2020).

De fato, é demonstrado que a migração de neutrófilos para a mucosa oral durante a infecção aguda pode estar sob o controle da sinalização de IL-1 β , pois camundongos sem o receptor de IL-1 (IL-1R) apresentaram menor recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, quando comparados a animais naïves, bem como a indução da transcrição de *Csf3*, gene que codifica o fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) foi reduzida na mucosa oral de camundongos *Il1r1* - / - , logo, a granulopoiese é prejudicada (ALTMEIER *et al.*, 2016). Os neutrófilos também estão entre as células imunes capazes de secretar grandes quantidades de IL-1 β , uma vez que a administração de anticorpos para depleção de neutrófilos em camundongos resultou na redução dos níveis IL-1 β (PEIRÓ *et al.*, 2016).

A IL-1 β é um importante mediador capaz de promover a osteoclastogênese e recrutar osteoclastos maduros, o que conseqüentemente culmina em reabsorção óssea (CHEN *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2009). Recentemente, foi demonstrado *in vitro* que ocorre a indução precoce e tardia de IL-1 β , mas não a expressão inicial de TNF- α em células da medula óssea de camundongos cultivadas na presença de M-CSF e RANKL. Além disso, o tratamento com IL-1 β resultou no aumento da formação de osteoclastos, demonstrado pelo aumento de células TRAP+ e aumentou os níveis de CTSK, um marcador de função de osteoclastos, consistente com o aumento da reabsorção óssea *in vitro*. Foi demonstrado ainda que o tratamento com uma substância que apresenta atividade anti-inflamatória resultou na redução da osteoclastogênese e da reabsorção óssea, e este efeito inibitório foi revertido pela adição da IL-1 β (SON *et al.*, 2020).

Tendo em vista que as cumarinas reduziram os níveis de IL-1 β em tecido gengival, buscou-se avaliar a imunomarcagem para TRAP, uma enzima secretada por diversos grupamentos celulares, como macrófagos. A TRAP é considerada um marcador histoquímico para osteoclastos, estando diretamente relacionado à atividade destas células (BURSTONE, 1959; HAYMAN, 2008). Além disso, a TRAP exibe ainda diversas outras funções biológicas, como, síntese e degradação de colágeno, mineralização óssea e produção de citocinas (HAYMAN, 2008). Observou-se que o número de células TRAP+ foi significativamente maior nos animais Salina. Esses dados estão em consonância com a literatura onde ocorre um aumento da formação de osteoclastos no sétimo dia de periodontite (KIM AR *et al.*, 2020). A UMB (135 mg/kg, i.p), em consonância com seu efeito antirreabsortivo ósseo, reduziu significativamente a

imunomarcção de células TRAP+. Esses achados estão de acordo com o estudo de Kwak *et al.* (2019) onde foi demonstrado que a UMB (60 e 120mg/kg, v.o) inibiu a perda óssea inflamatória induzida por LPS e o número de células TRAP+ em fêmeas de camundongos.

Em conjunto, as cumarinas avaliadas apresentaram importante efeito anti-inflamatório, dada a redução da atividade de MPO e da quantificação da IL-1 β , importante citocina pró-inflamatória, o que deve estar relacionado ao seu efeito antirreabsortivo ósseo visto por macroscopia e histomorfometria, e pela redução de células TRAP+. Portanto, a cumarina e a umbeliferona apresentaram potencial benefício como tratamento da periodontite.

Por fim, com o intuito de se descartar eventuais eventos adversos por parte das cumarinas utilizadas, buscou-se avaliar seus efeitos sistemicamente. Quanto à escolha das doses empregadas para a cumarina nesta pesquisa, foram primeiramente considerados os dados de toxicidade e carcinogenicidade realizados por um programa americano de toxicologia, em 1993, onde a cumarina (97% de pureza) foi administrada por gavagem nas doses de 40, 75, 150, 300 ou 600mg/kg, em grupos de 5 camundongos B6C3F1 (machos e fêmeas) cada, durante 16 dias. Neste estudo, foi demonstrado que todos os camundongos que receberam 600mg/kg, dois camundongos machos que receberam 300mg/kg e um camundongo que recebeu 75mg/kg morreram, indicando que estas doses alteraram a sobrevivência destes animais durante este período (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993).

Outros autores, porém, avaliaram a administração de 50mg/kg de CUM por gavagem durante 10 dias, e esta foi considerada segura e não tóxica (STEFENOVA *et al.*, 2006). Em outro estudo nenhum efeito carcinogênico hepático foi relacionado à dose em camundongos após 2 anos de dieta contendo até 3000ppm de cumarinas, o equivalente a ingestão de 280mg/kg/dia nos machos e 271mg/kg/dia nas fêmeas (CARLTON *et al.*, 1996). Logo, na presente pesquisa, com o intuito de se buscar maior efeito protetor que o apresentado inicialmente com a dose de CUM 5mg/kg, i.p optou-se por aumentar a dosagem e empregamos a dose máxima de 45mg/kg, i.p. Em relação a umbeliferona, optou-se por estender até a dose de 135mg/kg, i.p dado que não foram relatados sinais visíveis ou sintomas de toxicidade aguda em camundongos machos tratados com 50, 100 e 200mg/kg, v.o durante 14 dias (CRUZ *et al.*, 2020).

Neste estudo, a periodontite causou perda de massa corporal na 24^a hora, possivelmente relacionada com os efeitos da anestesia para a ligadura (LIMA *et al.*, 2004). Os animais com periodontite e tratados com a CUM ou a UMB durante 7 dias não apresentaram alteração da variação de massa corpórea quando comparados aos animais Salina. Estes achados são

corroborados com a literatura onde a administração por gavagem da CUM, em doses de 40mg/kg, v.o durante 16 dias não resultou em morte nem alterou a variação ponderal de camundongos machos (NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM, 1993), assim como a administração v.o de UMB, nas doses de 60 e 120mg/kg, durante 10 dias em um modelo de perda óssea inflamatória induzida por LPS não acarretou alterações no padrão alimentar, nem na variação de peso dos animais (KWAK *et al.*, 2019).

A função renal foi avaliada através das dosagens séricas de ureia, creatinina e mensuração do peso úmido do rim. A ureia, quando mensurada no sangue é um produto do metabolismo das proteínas, sendo, portanto, um produto residual que deve ser eliminado pela excreção renal, logo, sua elevação pode ser um indicativo da diminuição da excreção renal, no entanto, apesar de a ureia ser um marcador útil para avaliar a função renal, ela pode ser influenciada pela dieta. Neste ponto, a dosagem concomitantemente de creatinina a qual também é um tipo de resíduo produzido a partir da degradação da creatina e da fosfocreatina deve ser associada, especialmente por ser mais específica, dada a pouca influência da dieta (HOSTEN, 1990). Aqui, não foram observadas quaisquer alterações para os níveis séricos de ureia e creatinina, nem o peso do rim para os tratamentos com CUM e UMB em todas as doses. Esses dados estão de acordo com os achados de Khan, Sharma e Sultana (2004) e Younas *et al.* (2021), onde foi realizada a administração v.o da CUM em roedores nas doses de 10 e 20mg/kg, durante cinco dias e de UMB nas doses de 50mg/kg, durante 12 dias não alteraram os parâmetros bioquímicos renais.

Quanto ao fígado, foram realizadas as dosagens séricas de AST, enzima de localização mitocondrial no hepatócito, mas também presente no citosol das células do músculo esquelético, cardíaco e tecido renal, bem como de ALT, enzima presente no citosol dos hepatócitos e de alta especificidade. A elevação destas enzimas é altamente sugestiva de lesão hepatocelular (HALL; CASH, 2012). A UMB em todas as doses utilizadas não evidenciou nenhum indício de hepatotoxicidade, o que pode ser corroborado com a literatura onde não foram observadas alterações significantes para os níveis de AST, ALT e bilirrubina quando da administração da UMB em doses de 1, 10 e 50 mg/kg, i.p (YOUNAS *et al.*, 2021). Por outro lado, a maior dose de CUM resultou em um aumento significativo dos níveis de ALT. Tal achado é de suma importância, pois a elevação de ALT no plasma dentro de 24-48horas é altamente sugestiva de lesão hepatocelular, mesmo sem alteração de AST, especialmente se o dano ocorrer de forma contínua, como advindo do uso de medicamentos. Neste caso a ALT se tornará mais elevada que a AST, devido à sua meia-vida plasmática mais longa (KIM, 2008).

De fato, foi relatado que administração de 200mg/kg, v.o de CUM em camundongos causou hipertrofia hepática leve e aumento de 2 a 6 vezes da ALT (BORN *et al.*, 1998).

É bem estabelecido que a CUM apresenta um perfil hepatóxico, especialmente em roedores, devido a metabolização hepática por 7-hidroxilação (uma via de desintoxicação) assumir um papel secundário nestes animais, sendo predominante a via da 3,4-epoxidação (LUSH; ANDREWS, 1978; KAIPAINEN *et al.*, 1985), a qual resulta na formação dos compostos hepatotóxicos, como a cumarina 3,4-epóxido e o-hidroxifenilacetaldeído (o-HPA) (BORN *et al.*, 1998; 2000; LAKE, 1999).

Para entender melhor o papel da 7-hidroxilação e 3,4-epoxidação na depuração da cumarina em camundongos os metabólitos dessas vias foram quantificados no plasma e na urina de animais que receberam uma dose única de 200mg/kg de cumarina por gavagem durante 14 dias. Foi observado que a cumarina é rapidamente metabolizada em ácido o-hidroxifenilacético (o-HPAA) e 7-hidroxycumarina (7-HC), todavia, os valores para o-HPAA foram 14 vezes maiores do que aqueles de 7-HC, indicando que nesta dose alta a cumarina foi eliminada predominantemente por meio da via de 3,4-epoxidação. Todavia não foram detectadas o-HPA ou o-HPE no plasma, sugerindo haver outros produtos de metabolização. Dada a complexidade da metabolização desta substância é difícil determinar a suscetibilidade à hepatotoxicidade mediada por cumarina entre as espécies, o que deve ser analisado com cautela (BORN *et al.*, 2003).

As cumarinas apresentam um bom padrão de segurança sistêmica neste modelo. Apesar de a administração da CUM nas maiores doses poder estar relacionada a hepatotoxicidade, é prudente não subestimar ou descartar a CUM como terapia auxiliar no tratamento da periodontite, visto que em humanos a CUM segue a via da 7-hidroxilação e dá origem à UMB, e, se não houver variações das CYP2A6 e CYP2A13, a aplicação da CUM poderá ser considerada tão segura quanto a UMB.

Em suma, a cumarina e a umbeliferona, metabólitos secundários de plantas medicinais de uso popular no Brasil, apresentaram efeitos anti-inflamatório e antirreabsortivo ósseo, acompanhada de boa tolerabilidade sistêmica no modelo de periodontite induzida por ligadura em camundongos. A partir do esclarecimento do potencial mecanismo de ação destas substâncias isoladas, este estudo contribui substancialmente para a grande área da fitoquímica, destacando a necessidade de mais pesquisas envolvendo estas cumarinas, bem como de extratos de plantas medicinais que apresentam estas substâncias como compostos majoritários, devido

à diversidade de espécies naturais brasileiras pouco exploradas neste campo e que podem ser bases para o desenvolvimento de fitoterápicos com potencial terapêutico para a periodontite.

6 CONCLUSÃO

A cumarina e a umbeliferona, de maneira relativamente segura, reduziram a inflamação e a reabsorção óssea alveolar via inibição de IL-1 β

REFERÊNCIAS

- ABE, T.; HAJISHENGALLIS, G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **J Immunol Methods**, v. 394, p. 49-54, 2013. doi:10.1016/j.jim.2013.05.002.
- ADAMOPOULOS, I. E. Inflammation in bone physiology and pathology. **Curr Opin Rheumatol.**, v.30, n.1, p.59-64, 2018. doi:10.1097/BOR.0000000000000449.
- ALLEN, M. R.; BURR, D. B. **Chapter 4 Bone Modeling and Remodeling**. In: Basic and Applied Bone Biology, 75-90 – 2014. doi:https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416015-6.00004-6
- AL-MAJEDY, Y. K. *et al.* Coumarins as Potential Antioxidant Agents Complemented with Suggested Mechanisms and Approved by Molecular Modeling Studies. **Molecules**. v.21, n.2, p.1-11, 2016. doi:10.3390/molecules21020135.
- ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* Amburana cearensis – uma revisão química e farmacológica. **Scientia Plena**, v.6, n.11, p.1-7, 2010.
- ALTMEIER, S. *et al.* IL-1 Coordinates the Neutrophil Response to *C. albicans* in the Oral Mucosa. **PLoS Pathog.**, v.12, n.9, p. 1-22, 2016. doi:10.1371/journal.ppat.1005882.
- ALVES, C. F. *et al.* Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **J Pharm Pharmacol**, v.61, n.8, p.1097-104, 2009. doi:10.1211/jpp/61.08.0014.
- AMARASEKARA, D. S. *et al.* Regulation of Osteoclast Differentiation by Cytokine Networks. **Immune Netw**, v. 18, n.1, p. 1-18, 2018. doi:10.4110/in.2018.18.e8.
- ANDRÉJAK, M. *et al.* French pharmacovigilance survey evaluating the hepatic toxicity of coumarin. **Pharmacoepidemiol Drug Saf**, 1998. doi:10.1002/(sici)10991557(199808)7:1+<s45::aid-pds353>3.3.co;2-t.
- ANSARI, N.; SIMS, N. A. The Cells of Bone and Their Interactions. **Handb Exp Pharmacol**, v. 262, p.1-25, 2020. doi:10.1007/164_2019_343.
- ARAÚJO, L. L. N.; FARIA, M. J. M.; SAFADI, G. M.V.V. Prospecção fitoquímica da espécie *Justicia pectoralis* Jacq. var. *stenophylla* Leonard pertencente à família Acanthaceae. **FaSeM Ciências**, v.3, n.2, 2014. Disponível em: <http://www.fasem.edu.br/revista/index.php/fasemciencias/article/view/67/104> Acesso em: 14 de jan. 2019.
- ARAÚJO, V. M. A.; MELO, I. M.; LIMA, V. Relationship between Periodontitis and Rheumatoid Arthritis: Review of the Literature. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 1-15, 2015. doi:10.1155/2015/259074.
- AZUMA, Y. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. **J Biol Chem.**, v. 275, n.7, p. 4858-4864, 2000. doi:10.1074/jbc.275.7.4858

BADO, I. *et al.* Estrogen receptors in breast and bone: from virtue of remodeling to vileness of metastasis. **Oncogene**, v.36, n.32, p.4527-4537, 2017. doi:10.1038/onc.2017.94.

BÅGE, T. Expression of prostaglandin E synthases in periodontitis immunolocalization and cellular regulation. **Am J Pathol**, v.178, n.4, p. 1676-88, 2011. doi:10.1016/j.ajpath.2010.12.048.

BARROS, T. A. A. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory properties of 7-hydroxycoumarin in experimental animal models: potential therapeutic for the control of inflammatory chronic pain. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.62, p.205–213, 2010. doi:10.1211/jpp.62.02.0008.

BARTOLD, P. M.; DYKE, T. E. V. Host modulation: controlling the inflammation to control the infection. **Periodontol 2000**, v.75, n.1, p.317-329, 2017. doi:10.1111/prd.12169.

BEZERRA, M. M. *et al.* Selective cyclooxygenase-2 inhibition prevents alveolar bone loss in experimental periodontitis in rats. **J Periodontol**, v.71, n.6, p.1009-1014, 2000. doi:10.1902/jop.2000.71.6.1009

BJARNASON, I. *et al.* Mechanisms of Damage to the Gastrointestinal Tract From Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs. **Gastroenterology**, v.154, n.3, p.500-514, 2018. doi:10.1053/j.gastro.2017.10.049.

BLAHOVÁ, J.; SVOBODOVÁ, Z. Assessment of Coumarin Levels in Ground Cinnamon Available in the Czech Retail Market. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 1-4, 2012. doi:10.1100/2012/263851

BONEWALD, L. D.; MUNDY, G. R. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. **Clin Orthop Relat Res.**, v.250, p. 261-276, 1990.

BORN, S. L. *et al.* Comparative metabolism and kinetics of coumarin in mice and rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, n.2, p.247–258, 2003. doi:10.1016/s0278-6915 (02)00227-2.

BORN, S. L. *et al.* In vitro kinetics of coumarin 3,4-epoxidation: Application to species differences in toxicity and carcinogenicity. **Toxicological Sciences**, v.58, p.23–31, 2000.

BORN, S. L. *et al.* Selective Clara Cell Injury in Mouse Lung Following Acute Administration of Coumarin. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.151, n.1, p. 45–56, 1998. doi:10.1006/taap.1998.8442.

BOSSHARDT, D. D. The periodontal pocket: pathogenesis, histopathology and consequences. **Periodontol 2000**, v.76, n.1, p. 43-50, 2018. doi:10.1111/prd.12153.

BOURGAUD, F. *et al.* Biosynthesis of coumarins in plants: a major pathway still to be unravelled for cytochrome P450 enzymes. **Phytochem Ver**, v. 5, p.293–308, 2006. doi:10.1007/s11101-006-9040-2.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA. **Resolução - RDC nº 219, de 22 de dezembro 181 de 2006**. Dispõe sobre a inclusão do uso das espécies vegetais e parte(s) de espécies vegetais para o preparo de chás. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: 2012.

BRAVO, B. *et al.* Bioactive phenolic from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v.50, n.1, p.71-74, 1999. doi:[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00497-X](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00497-X).

BRITO, V. G. B. *et al.* Mast cells contribute to alveolar bone loss in Spontaneously Hypertensive Rats with periodontal disease regulating cytokines production. **PLoS One**, v.16, n.3, p. 1-24. doi:10.1371/journal.pone.0247372. eCollection 2021.

BURSTONE, S. Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts, J. Histochem. **Cytochem**, v.7, p. 39-41, 1959. doi.org/10.1177/7.1.39.

CANDEO, L. C. *et al.* Effects of periodontitis on the development of asthma: The role of photodynamic therapy. **PLoS One**, v.12, n.11, p. 1-22,2017. doi:10.1371/journal.pone.0187945.

CANUTO, K. M. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas do Nordeste: *Amburana cearensis* A.C. Smith e *Herissantia tiubae* K. Schum.** 123 p. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2002.

CAO, G. *et al.* Local promotion of B10 function alleviates experimental periodontitis bone loss through antagonizing RANKL-expressing neutrophils. **J Periodontol**, v.92, n.6, p.907-920, 2021. doi:10.1002/JPER.20-0074.

CARLTON B. D.; AUBRUN J. C.; SIMON G. S. Effects of coumarin following perinatal and chronic exposure in Sprague-Dawley rats and CD-1 mice. **Fundam. appl. Toxicol**, v.30, p.145–151, 1996.

CARVALHO, C. S. *et al.* *Tonka, baru and cumaru*: Nomenclatural overview, typification and updated checklist of Dipteryx (Leguminosae). **Taxon**, v.69, n.3, p.582-592, 2020. doi:<https://doi.org/10.1002/tax.12238>.

CARVALHO, C. S.; LIMA, H. C.; CARDOSO, D. B. O. S. *Dipteryx odorata*. Flora do Brasil 2020 – Algas, Fungos e Plantas. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB22954>. Acesso em: 10 out. 2021.

CASLEY-SMITH, J. R.; CASLEY-SMITH, J.R. Modern treatment of lymphoedema. II. The benzopyrones. **Australas J Dermatol.**, v.33, n.2, p.69-74, 1992. doi:10.1111/j.1440-0960.1992.tb00082.x.

CASLEY-SMITH, J. R.; MORGAN, R. G.; PILLER, N. B. Treatment of Lymphedema of the Arms and Legs with 5,6-Benzo-[alpha]-pyrone. **N Engl J Med.**, v.329, p.1158-1163, 1993. doi:10.1056/NEJM199310143291604

CFO. Conselho Federal de Odontologia. **Resolução n. 82, de 19 de setembro de 2008**. Reconhece e regulamenta o uso pelo cirurgião-dentista de práticas integrativas e complementares à saúde bucal. Disponível em: http://www.crorj.org.br/integrativas/resolucao_82_2008.pdf Acesso em: 16 jan. 2021.

CHANG, T. S. *et al.* The use of 5,6 benzo-[α]-pyrone (coumarin) and heating by microwaves in the treatment of chronic lymphedema of the legs. **Lymphology**, v.29, n.3, p.106-111, 1996.

CHEN, Y. *et al.* NLRP3 regulates alveolar bone loss in ligature-induced periodontitis by promoting osteoclastic differentiation. **Cell Prolif.**, v.54, n.2, p. 1-14, 2021. doi:10.1111/cpr.12973.

CHENG, R. *et al.* Interleukin-1 β is a potential therapeutic target for periodontitis: a narrative review. **Int J Oral Sci.**, v.12, n.1, p. 1-9, 2020. doi:10.1038/s41368-019-0068-8.

CHOWDHURY, G. *et al.* Emergence of Azithromycin Resistance Mediated by Phosphotransferase-Encoding mph(A) in Diarrheagenic *Vibrio fluvialis*. **mSphere**, v.4, n.3, p.215-219, 2019. doi:10.1128/mSphere.00215-19.

CHUNHUA, M. *et al.* Umbelliferone Reverses Depression-Like Behavior in Chronic Unpredictable Mild Stress-Induced Mice via RIP140/NF- κ B Pathway. **IUBMB Life**, p. 1-12, 2016. doi:10.1002/iub.1570.

CLODIUS, L.; DEAK, L.; PILLER, N. B. A new instrument for the evaluation of tissue tonicity in lymphoedema. **Lymphology**, v.9, n.1, p.1-5, 1976.

COHEN, A. J. Critical review of the toxicology of coumarin with special references to interspecies differences in metabolism and hepatotoxic response and their significance to man. **Food Cosm Toxicol**, v.17, p.277-89, 1979. doi:[https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90289-X](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90289-X).

CORRÊA, G. M.; ALCÂNTARA, A. F. C. Chemical constituents and biological activities of species of *Justicia*: a review. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.22, p.220–238, 2012. doi:<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000196>.

COSGAREA, R. *et al.* Microbiological and host-derived biomarker evaluation following non-surgical periodontal therapy with short-term administration of systemic antimicrobials: secondary outcomes of an RCT. **Sci Rep.**, v.10, n.1, 2020. doi:10.1038/s41598-020-73054-8.

CRUZ, L. F. *et al.* Umbelliferone (7-hydroxycoumarin): A non-toxic antidiarrheal and antiulcerogenic coumarin. **Biomed Pharmacother**, v.129, p.1-8, 2020. doi:10.1016/j.biopha.2020.110432

CUI, N.; HU, M.; KHALIL, R. A. Biochemical and Biological Attributes of Matrix Metalloproteinases. **Prog Mol Biol Transl Sci.**, v.147, p.1-73, 2017. doi:10.1016/bs.pmbts.2017.02.005.

CUNHA, F. Q. *et al.* Blockade by fenspiride of endotoxin-induced neutrophil migration in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 238, n. 1, p. 47-52, 1993.

CURTIS, M. A. *et al.* The role of the microbiota in periodontal disease. **Periodontol 2000**, v.83, n.1, p.14-25, 2020. doi:10.1111/prd.12296.

DA CUNHA, M. G. *et al.* Effects of Cinnamoyloxy-mammeisin from Geopropolis on osteoclast differentiation and porphyromonas gingivalis-induced periodontitis. **J. Nat. Prod.**, v. 80, p.1893-1899, 2017. doi:10.1021/acs.jnatprod.7b00194.

DANIEL, T. F. Additional chromosome numbers of American Acanthaceae. **Systematic Botany**, v.25, p.15-25. 2000.

DELAISSE, J. M. *et al.* Matrix metalloproteinases (MMP) and cathepsin K contribute differently to osteoclast activities. **Microsc Res Tech.**, v.61, n.6, p.504–513, 2003. doi:10.1002/jemt.10374.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DIAS, J. S. A. **Potencial anti-fúngico dos óleos fixos de *Copaifera sp.*, *Carapa guianensis* Aubl. e *Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd. sobre *Aspergillus nomius* Kurtzman, Horn & Hesseltnine e *Aspergillus fumigatus* Fresenius isolados de *Bertholletia excelsa* Humb. & Bompland e avaliação da toxicidade aguda em *Danio rerio***. 216 p. Tese (Doutorado em Biodiversidade e Biotecnologia) – Universidade Federal do Amapá, Macapá, 2019.

EGAN, D. *et al.* The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. **Drug Metab Rev.**, v. 22, n.5, p.503-529, 1990. doi:10.3109/03602539008991449

ENDELL, W.; SEIDEL, G. Coumarin Toxicity in Different Strains of Mice. **Agents and Actions.**, v. 8/3, p.299-302, 1978. doi:10.1007/BF01966619.

FERREIRA, L. M.; FERREIRA, L. R. K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cir Bras.**, v.18, p.1-3, 2003.

FREEMONT, A. J. Basic bone cell biology. **Int J Exp Pathol.**, v.74, n.4, p.411–416, 1993.

FRENCHEN, J. E. *et al.* Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **J Clin Periodontol.**, v. 44, n.18, p.S94-S105, 2017. doi:10.1111/jcpe.12677.

FU, C.; WEI, Z.; ZHANG, D. PTEN Inhibits Inflammatory Bone Loss in Ligature-Induced Periodontitis via IL1 and TNF- α . **Biomed Res Int.**, v.2019, p.1-9, 2019. doi:10.1155/2019/6712591.2019.

GASPARETTO, J. C. *et al.* A kinetic study of the main guaco metabolites using syrup formulation and the identification of an alternative route of coumarin metabolism in humans. **PLoS One.**, v.10, n.3, p. 2015. doi:10.1371/journal.pone.0118922. eCollection 2015.

GOES, P. *et al.* Anti-inflammatory and Anti-resorptive Effects of Atorvastatin on Alveolar Bone Loss in Wistar **Rats. Braz. Dent. J.**, v.27, n.3, 2016. doi:10.1590/0103-6440201600600.

GRABOWSKI, P. Physiology of Bone. **Endocr Dev.**, v.28, p.33-55, 2015. doi:10.1159/000380991.

GRAVES, D. T. *et al.* The use of rodent models to investigate host-bacteria interactions related to periodontal diseases. **J Clin Periodontol.**, v.35, n.2, p.89-105, 2008. doi:10.1111/j.1600-051X.2007.01172.x.

GRAZIANI, F. *et al.* Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? **Periodontol 2000.**, v.75, n.1, p.152-188, 2017. doi:10.1111/prd.12201.

GROSSER, T.; RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. The Cardiovascular Pharmacology of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Trends Pharmacol Sci.**, v.38, n.8, p.,733-748, 2017. doi: 10.1016/j.tips.2017.05.008

GUIMARÃES, M.V. *et al.* Dry Extract of *Matricaria recutita* L. (Chamomile) Prevents Ligature-Induced Alveolar Bone Resorption in Rats via Inhibition of Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 β . **J Periodontol.**, v. 87, n.6, p.706-715, 2016. doi:10.1902/jop.2016.150411.

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.**, v.78, n.2, p. 221-225, 2007. doi:10.1080/17453670710013717.

HALL, P.; CASH, J. What is the real function of the liver 'function' tests? **Ulster Med J.**, v.81, n.1, p.30-6, 2012.

HAM, J. R. *et al.* Methoxsalen supplementation attenuates bone loss and inflammatory response in ovariectomized mice. **Chem Biol Interact.**, v.278, p.135-140, 2017. doi:10.1016/j.cbi.2017.10.014.

HAYMAN, A. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. **Autoimmunity**, v.41, p.218–223, 2008. doi:https://doi.org/10.1080/08916930701694667

HEMSHEKHAR, M. *et al.* Antiarthritic and antiinflammatory propensity of 4-methylesculetin, a coumarin derivative. **Biochimie**, v.95, n.6, p.1326-35, 2013. doi:10.1016/j.biochi.2013.02.014.

HOSTEN, A. O. *et al.* **Chapter 3-BUN and Creatinine**. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition. Boston: Butterworths; 1990.

INDAHL, S.R.; SCHELIN, R.R. The Metabolism of Umbelliferone and Herniarin in Rats and by the Rat Intestinal Microflora. **Xenobiotica**, v.1, n.1, p. 13-24, 1971. doi: 10.3109/00498257109044375

JÄGER, A. *et al.* Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. **J Immunol.**; v.183, n.11, p.7169-7177,2009. doi: 10.4049/jimmunol.0901906

JAMAL, S.; CASLEY-SMITH, J.R.; CASLEY-SMITH, J. R. The effects of 5,6-benzo[a]pyrone (coumarin) and DEC on filaritic lymphoedema and elephantiasis in India. Preliminary results. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.83, p.287-290, 1989.

JANG, D. S. *et al.* Potencial câncer chemopreventive constituents of the seeds of *Dipteryx odorata* (tonka bean). **J Nat Prod.**, v.66, n.5, p.583-7, 2003. Doi:10.1021/np020522n.

JANUÁRIO, A. H. *et al.* Isolation and structure determination of bioactive isoflavones from callus culture of *Dipteryx odorata*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v.53, n.7, p.740-2, 2005. doi:10.1248/cpb.53.740.

JOHNSTON, C. B.; DAGAR, M. Osteoporosis in Older Adults. **Med Clin North Am.**, v.104, n.5, p.873-884, 2020. doi:10.1016/j.mcna.2020.06.004.

KAIPAINEN, P.; KOIVUSAARI, U.; LANG, M. Catalytic and immunological comparison of coumarin 7-hydroxylation in different species. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.81C, p. 293–296, 1985. doi:https://doi.org/10.1016/0742-8413(85)90008-8

KANDIL, S.; WESTWELL, A. D.; MCGUIGAN, C. 7-Substituted umbelliferone derivatives as androgen receptor antagonists for the potential treatment of prostate and breast cancer. **Bioorg Med Chem Lett.**, v.26, p.2000–2004, 2016. doi:10.1016/j.bmcl.2016.02.088.

KENKRE, J. S.; BASSETT, J. H. D. The bone remodelling cycle. **Ann Clin Biochem.**, v.55, n.3, p.308-327, 2018. doi:10.1177/0004563218759371.

KHAN, N.; SHARMA, S. SULTANA, S. Attenuation of potassium bromate-induced nephrotoxicity by coumarin (1,2-benzopyrone) in Wistar rats: chemoprevention against free radical-mediated renal oxidative stress and tumor promotion response. **Redox Rep**⁹, v.1, p. 19-28, 2004. doi:10.1179/135100004225003860.

KIM, A. R. *et al.* The presence of neutrophils causes RANKL expression in periodontal tissue, giving rise to osteoclast formation. **J. periodontal Research.**, v.6, p. 868-876, 2020. doi.org/10.1111/jre.12779.

KIM, J. H. *et al.* The mechanism of osteoclast differentiation induced by IL-1. **J Immunol.**, v.183, n.3, p.1862-70,2009. doi:10.4049/jimmunol.0803007.

KIM, J. M. *et al.* Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis. **Cells**, v.9, n.9, p.1-14, 2020. doi:10.3390/cells9092073

KIM, W. R. *et al.* Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. **Hepatology**, v.47, n.4, p.1363-1370, 2008. doi:10.1002/hep.22109.

KOIDE, M. *et al.* In vivo administration of IL-1 beta accelerates silk ligature-induced alveolar bone resorption in rats. **J Oral Pathol Med.**, v. 24, n.9, p. 420-434, 1995. doi:10.1111/j.1600-0714.1995.tb01212.x.

KOIDE, M.; KOBAYASHI, Y. Regulatory mechanisms of sclerostin expression during bone remodeling. **J Bone Miner Metab.**, v.37, n.1, p.9-17, 2019. doi:10.1007/s00774-018-0971-7.

KONG, L. *et al.* Psoralidin suppresses osteoclastogenesis in BMMs and attenuates LPS-mediated osteolysis by inhibiting inflammatory cytokines. **Int Immunopharmacol.**, v.51, p.31-39, 2017. doi:10.1016/j.intimp.2017.07.003.

KUHR, A. *et al.* Observations on experimental marginal periodontitis in rats. **J. Periodontal Res.**, v.39, n.2, p. 101–106, 2004.

KUMAR, V. *et al.* Umbelliferone β -D galactopyranoside from *Aegle marmelos* (L.) *corr.* an ethnomedicinal plant with antidiabetic, antihyperlipidemic and antioxidative activity. **BMC Complement Altern Med.**, v.13, b.273, p.1-19, 2013. doi:10.1186/1472-6882-13-273

KWAK, S. C. *et al.* Umbelliferone prevents lipopolysaccharide-induced bone loss and suppresses rankl-induced osteoclastogenesis by attenuating akt-c-fos-nfatc1 signaling. **Int. J. Biol. Sci.**, v.15, p. 2427-2437, 2019. doi:10.7150/ijbs.28609

LACY, A.; O’KENNEDY, R. Studies on coumarins and coumarin-related compounds to determine their therapeutic role in the treatment of cancer. **Curr Pharm Des.**, v.10, n.30, p.3797-811, 2004. doi:10.2174/1381612043382693.

LAGASSE, E.; WEISSMAN, I. L. Enforced expression of Bcl-2 in monocytes rescues macrophages and partially reverses osteopetrosis in *op/op* mice. **Cell.**, v.89, p.1021-1031, 1997.

LAKE, B. G. Coumarin Metabolism, Toxicity and Carcinogenicity: Relevance for Human Risk Assessment. **Food Chem. Toxicol.**, v.37, p. 423–453, 1997. doi:10.1016/S0278-6915(99)00010-1.

LAMON, R. J.; KOO, H.; HAJISHENGALLIS, G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. **Nat Rev Microbiol.**, v.16, n.12, p.745-759, 2018. doi:10.1038/s41579-018-0089-x.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive Problems. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.13, 2007. doi:https://doi.org/10.1186/1746-4269-3-13.

LAUGISCH, O. *et al.* Histologic evidence of periodontal regeneration in furcation defects: a systematic review. **Clin Oral Investig.**, v.23, n.7, p.2861-2906, 2019. doi:10.1007/s00784-019-02964-3

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Anti-inflammatory and Smooth Muscle Relaxant Activities of the Hydroalcoholic Extract and Chemical Constituents from *Amburana cearensis* A. C. Smith. **Phytother. Res.**, v.17, p. 335–340, 2003. doi:10.1002/ptr.1139.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive and antiedematogenic effects of the hydroalcoholic extract and coumarin from *Torresea cearensis* Fr. All. **Phytomedicine**, v.4, n.3, p.221-227,1997. doi:10.1016/S0944-7113(97)80071-2.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Effects of Amburoside A and Isokaempferide, Polyphenols from *Amburana cearensis*, on Rodent Inflammatory Processes and Myeloperoxidase Activity in Human Neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.104, n.3 p.198-205, 2009. doi:10.1111/j.1742-7843.2008.00329.x.

LEAL, L. K. A. M.; SILVA, A. H.; VIANA, G. S. B. *Justicia pectoralis*, a coumarin medicinal plant have potential for the development of antiasthmatic drugs? **Rev. bras. Farmacogn**, v.27, n.6, p. 1-9, 2017.

LEAL, L. K. A. M. *et al.* Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **J. Ethnopharmacol.**, v.70, p.151–159, 2000.

LEE, C. T. *et al.* Resolvin E1 reverses experimental periodontitis and dysbiosis. **J Immunol.**, v.197. n.7, p.2796-806, 2016. doi:10.4049/jimmunol.1600859.

LEONART, L. P. *et al.* New Metabolites of Coumarin Detected in Human Urine Using Ultra Performance Liquid Chromatography/Quadrupole-Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry. **Molecules.**, v.22, n.11, p. 1-12, 2017. doi:10.3390/molecules22112031.

LI, W.; ZHANG, Z.; WANG, Z. Differential immune cell infiltrations between healthy periodontal and chronic periodontitis tissues. **BMC Oral Health**, v.20, p.293, 2020. doi:10.1186/s12903-020-01287-0

LIMA, V. *et al.* Antinociceptive activity of the Pyranocoumarin Seselin in mice. **Fitoterapia.**; v. 77, p. 574-578, 2006. doi:10.1016/j.fitote.2006.09.005.

LIMA, V. *et al.* Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **Eur J Oral Sci.**, v.108, n.2, p. 123-129, 2000.

LIMA, V. *et al.* Effects of the tumour necrosis factor-alpha inhibitors pentoxifylline and thalidomide in short-term experimental oral mucositis in hamsters. **European Journal of Oral Science.**, v.113, n.3, p.210-217, 2005.

LIMA, V. *et al.* Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – papel de moduladores farmacológicos. **Revista Periodontia**, v.18, n.3, p. 7-19, 2008.

- LIMA, V. *et al.* Uncaria tomentosa reduces osteoclastic bone loss in vivo. **Phytomedicine**, v.79, p. 1-9, 2020. doi:10.1016/j.phymed.2020.153327.
- LINO, C. S. *et al.* Analgesic and anti-inflammatory activities of Justicia pectoralis Jacq and its constituents: coumarin and umbelliferone. **Phytother. Res**, v.11, p.211-215, 1997.
- LOCKLEARA, T. D. *et al.* Estrogenic and progestogenic effects of extracts of Justicia pectoralis Jacq., an herbal medicine from Costa Rica used for the treatment of menopause and PMS. **Maturitas**, v.66, n.3, p.315–322, 2010. doi:10.1016/j.maturitas.2010.04.001
- LOPES, A. *et al.* Afrormosin, an Isoflavonoid from Amburana cearensis A. C. Smith Modulates the Inflammatory Response of Stimulated Human Neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, n.6, p.363-9, 2013. doi:10.1111/bcpt.12106.
- LORENZI, H.; MATOS; F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 298 p.
- LUCHINI, A. C. *et al.* Intestinal Anti-inflammatory Activity of Coumarin and 4-Hydroxycoumarin in the Trinitrobenzenesulphonic Acid Model of Rat Colitis. **Biol Pharm Bull.**, v.31, n.7, p.1343-1350, 2008. doi:10.1248/bpb.31.1343.
- LUKE, D. A. The structure and functions of the dentogingival junction and periodontal ligament. **Br Dent J.**, v.172, n.5, p.187-190. doi:10.1038/sj.bdj.4807818.
- LUO, G. *et al.* TNF- α and RANKL promote osteoclastogenesis by upregulating RANK via the NF- κ B pathway. **Mol Med Rep.**, v.17, n.5, p 6605–6611, 2018. doi:10.3892/mmr.2018.8698
- LUO, K. *et al.* Association between postmenopausal osteoporosis and experimental periodontitis. **Biomed Res Int.**, v.2014, p.1-7, 2014. doi:10.1155/2014/316134.
- LUSH, I. E.; ANDREWS, K. M. Genetic variation between mice in their metabolism of coumarin and its derivatives. **Genetic Research.**, v.31, p. 177–186, 1978. doi:10.1017/s0016672300017936
- LV, S. *et al.* Inhibition of osteolysis after local administration of osthole in a TCP particles-induced osteolysis model. **Int Orthop.**, v.40, n.7, p.1545-15452, 2016. doi:10.1007/s00264-015-3021-2.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
- MAEKAWA, S. *et al.* RNA sequencing for ligature induced periodontitis in mice revealed important role of S100A8 and S100A9 for periodontal destruction. **Scientific Reports.**, v. 9, p.1-12, 2019. doi:org/10.1038/s41598-019-50959-7
- MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas - Sistema de Utilização de Plantas Medicinais Projetado para Pequenas Comunidades**. Editora UFC: Fortaleza, 2002.

MAZIMBA, O. Umbelliferone: Sources, chemistry and bioactivities review. **Bulletin of Faculty of Pharmacy**, v. 55, p.223–232, 2017.

McGREGOR, N. E. *et al.* IL-6 exhibits both cis- and trans-signaling in osteocytes and osteoblasts, but only trans-signaling promotes bone formation and osteoclastogenesis. **J Biol Chem.**, v. 294, n.19, p.7850–7863, 2019. Doi:10.1074/jbc.RA119.008074.

MOHLER, J. L. *et al.* Phase II evaluation of coumarin (1,2-benzopyrone) in metastatic prostate carcinoma. **Prostate.**, v.20, p.123–131, 1992.

MOLON, R. C. *et al.* Characterization of ligature-induced experimental periodontitis. **Microsc Res Tech.**, v.81, n.12, p.1412-1421, 2018. doi:10.1002/jemt.23101.

MOSS, D. W.; WHITBY, L. G. A simplified heat-inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. **Clinical Chimica Acta**, v. 61, n. 1, p. 63-71. 1975.

MOURA, C. T. M. *et al.* Inhibitory effects of a standardized extract of *Justicia pectoralis* in an experimental rat model of airway hyper-responsiveness. **J Pharm Pharmacol.**, v.69, n.6, p. 722-732, 2017. doi:10.1111/jphp.12689.

MOURA, C. T. M. *et al.* Inhibitory effects of a standardized extract of *Justicia pectoralis* in an experimental rat model of airway hyper-responsiveness. **J Pharm Pharmacol.**, v.69, n.6, p. 722-732, 2017. doi:10.1111/jphp.12689.

MUIÀ, C. *et al.* Cloricromene, a coumarine derivative, reduced the development of periodontitis in rats. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.**, v. 373, n.1, p.51-59, 2006. doi:10.1007/s00210-006-0048-3.

MURAKAMI, M. *et al.* IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. **Science**, v.260, n.5115, p.1808-1810, 1993. doi:10.1126/science.8511589.

MUTHU, R.; SELVARAJ, N.; VAIYAPURI, M. Anti-inflammatory and proapoptotic effects of umbelliferone in colon carcinogenesis. **Hum Exp Toxicol.**, v.35, n.10, p. 1014–1054, 2016. doi:10.1177/0960327115618245

NAKAMURA, M. Histological and immunological characteristics of the junctional epithelium. **Japanese Dental Science Review**, v.54, n.2, p. 59-65, 2018.

NAKASHIMA, K.; CROMBRUGGHE, B. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. **Trends Genet.**, v.19, n.8, p. 458-466, 2003.

NAKASHIMA, T.; HAYASHI, M.; TAKAYANAGI, H. New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms. **Trends Endocrinol Metab.**, v. 23, n.11, p. 582-590. 2012. doi:10.1016/j.tem.2012.05.005

NAOT, D.; MUSSON, D. V.; CORNISH, J. The Activity of Peptides of the Calcitonin Family in Bone. **Physiol Ver.**, v. 99, n.1, p.781-805, 2019. doi:10.1152/physrev.00066.2017.

NAQVI, A. A. HASSALI, M. A.; AFTAB, M. T. Epidemiology of rheumatoid arthritis, clinical aspects and socio-economic determinants in Pakistani patients: A systematic review and meta-analysis. **J Pak Med Assoc.**, v.69, n.3, p. 389-398, 2019.

NATIONAL TOXICOLOGY PROGRAM. NTP Toxicology and Carcinogenesis Studies of Coumarin (CAS No. 91-64-5) in F344/N Rats and B6C3F1 Mice (Gavage Studies). **Natl Toxicol Program Tech Rep Ser.**, v.422, p.1-340, 1993.

ODUNCUOGLU, B. F. Effects of a cyclic NSAID regimen on levels of gingival crevicular fluid prostaglandin E 2 and Interleukin-1 β : A 6-month randomized controlled clinical trial. **Niger J Clin Pract.**, v.21, n.5, p.658-666, 2018. doi:10.4103/njcp.njcp_221_17.

OHLRICH, E. J.; CULLINAN, M. P.; SEYMOUR, G. J. The immunopathogenesis of periodontal disease. **Aust Dent J.**, v.54, n.1, 2-10, 2009. doi:10.1111/j.1834-7819.2009.01139.x.

OLIVEIRA, A. F. M.; ANDRADE, L. H. Caracterização morfológica de *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. gendarussa* Burm. F. (Acanthaceae). **Acta Amazon**, v.30, p.569-578, 2000.

OLIVEIRA, S. H. P. *et al.* Aliskiren Attenuates the Inflammatory Response and Wound Healing Process in Diabetic Mice With Periodontal Disease. **Front Pharmacol.**, v.10, n.708, p.1-16, 2019. doi:10.3389/fphar.2019.00708.

ONO, T.; NAKASHIMA, T. Recent advances in osteoclast biology. **Histochem Cell Biol.**, v.149, n.4, p.325-341, 2018. doi:10.1007/s00418-018-1636-2.

OUYANG, L. *et al.* Effect of umbelliferone on adjuvant-induced arthritis in rats by MAPK/NF- κ B pathway. **Drug Des Devel Ther.**, v.13, p.1163-1170, 2019. doi:10.2147/DDDT.S190155.

OZ, H. S.; PULEO, D. A. Animal models for periodontal disease. **J Biomed Biotechnol.**, v. 2011, p.1-8, 2011. doi:10.1155/2011/754857

PACIFICI, R. Archives of Biochemistry and Biophysic. **Elsevier**, v. 503, p. 41–53, 2010.

PAPAPANOU, P. N. *et al.* Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. **J Periodontol.**, v.89, n.1, p. S173-S182, 2018. doi:10.1002/JPER.17-0721.

PAPAPANOU, P. N. SUSIN, C. Periodontitis epidemiology: is periodontitis under-recognized, over-diagnosed, or both? **Periodontol 2000**, v. 75, n.1, p.45-51, 2017. doi:10.1111/prd.12200.

PARK, H. S. *et al.* Sub antibiotic dose of azithromycin attenuates alveolar bone destruction and improves trabecular microarchitectures in a rat model of experimental periodontitis: A study using micro-computed tomography. **Int Immunopharmacol.**, v.47, p. 212-217, 2017. doi:10.1016/j.intimp.2017.04.008.

PEIRÓ, T. *et al.* Neutrophils drive alveolar macrophage IL-1 β release during respiratory viral infection. **Thorax**, v.73, p.546–556, 2018. doi:10.1136/thoraxjnl-2017-210010.

PENG, YI. *et al.* Type H blood vessels in bone modeling and remodeling. **Theranostics**, v.10, n.1, p. 426–436, 2020. doi:10.7150/thno.34126.

PENTA, S. **Advances in Structure and Activity Relationship of Coumarin Derivatives**. Academic Press-Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015.

PIERDONÁ, T. M. *et al.* P.1.g.103 Evaluation of the neuroprotective effects of bioproducts from *Amburana cearensis* on microglial cells. **European Neuropsychopharmacology**, v. 24, p. S264, 2014. doi:10.1016/S0924-977X(14)70414-6

PROFICE, S. R. *et al.* **Acanthaceae**. In Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21673>. Acesso em: 14 jan. 2019.

RANGBULLA, V. *et al.* Salivary IgA, Interleukin-1 β and MMP-8 as Salivary Biomarkers in Chronic Periodontitis Patients. **Chin J Dent Res.**, v.20, n.1, p.43-51, 2017. doi:10.3290/j.cjdr.a37741.

REDLICH, K.; SMOLEN, J. S. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. **Nat Rev Drug Discov.**; v. 11, n. 3, p.234-250, 2012. doi:10.1038/nrd3669.

RÊGO, L. J. S. *et al.* Caracterização do consumo de amêndoa de cumaru na Amazônia Oriental. Biota Amazônia. **Open Journal System**, v.7, n.3, p.23- 27, 2017. doi:<http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v7n3p23-27>.

RITSCHHEL, W. A. *et al.* Pharmacokinetics of coumarin and its 7-hydroxy-metabolites upon intravenous and peroral administration of coumarin in man. **Eur J Clin Pharmacol.**, v.12, n.6, p. 457-61, 1977. doi:10.1007/BF00561066.

RODRIGUES, G. *et al.* Effects of estrogen-like plant compounds on the vaginal epithelium pituitary, adrenal glands, and uterus of rats. **Exp Biol Med (Maywood)**, v.243, n.16, p.1173-1184, 2018. doi:10.1177/1535370218817503.

ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? **Front Physiol.**, v.9, n.113, p. 1-17, 2018. doi:10.3389/fphys.2018.00113.

ROSSI, V.; LEE, B.H.; MAROM, R. Osteogenesis imperfecta: advancements in genetics and treatment. **Curr Opin Pediatr.**, v. 31, n.6, p.708-715, 2019. doi:10.1097/MOP.0000000000000813.

RUSCITTI, P. The Role of IL-1 β in the Bone Loss during Rheumatic Diseases. **Mediators Inflamm.**; v.2015, p. 1-10, 2015. doi:10.1155/2015/782382

SHILLING, W. H.; CRAMPTON, R. F.; LONGLAND, R. C. Metabolism of coumarin in man. **Nature**, v. 221, n.5181, p.664-665, 1969.doi: 10.1038/221664b0.

SIDDIQUI, J. A.; PARTRIDGE, N. C. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and GrowthFactor Involvement. **Physiology (Bethesda)**, v.31, n.3, p.233–245. 2016. doi:10.1152/physiol.00061.2014

SIM, M. O. *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant effects of umbelliferone in chronic alcohol-fed rats. **Nutr. Res. Pract.**, v.9, n.4, p. 364–369, 2015. doi:10.4162/nrp.2015.9.4.364

SIMA, C. *et al.* Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2 down-regulation in oral neutrophils is associated with periodontal oxidative damage and severe chronic periodontitis. **Am. J. Pathol.**, v. 186, n.6, p. 1417–1426, 2016.

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

SILVA, A.H. **CONTRIBUIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DE FITOTERÁPICO A PARTIR DE *Justicia pectoralis* (CHAMBÁ) PARA O TRATAMENTO DA ASMA: OTIMIZAÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.** 2018. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Ceará Fortaleza, 2018.

SON, H. S. Benzydamine inhibits osteoclast differentiation and bone resorption via down-regulation of interleukin-1 β expression. **Acta Pharm Sin B.**, v.10, n.3, p.462-474, 2020. doi:10.1016/j.apsb.2019.11.004.

SONG, I. *et al.* Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation. **FEBS Lett**, v. 583, n.14, p.2435-2440. 2009. doi:10.1016/j.febslet.2009.06.047

STEFANACHI, A. *et al.* Review Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. **Molecules**, v. 23, n.2, p. 1-34, 2018. doi:10.3390/molecules23020250

STEFANOVA, T. H. *et al.* Antitumor and immunomodulatory effect of coumarin and 7-hydroxycoumarin against Sarcoma 180 in mice. **J Exp Ther Oncol.**, v.6, p. 1-10, 2006.

SUZUKI, A.; HORIE, T.; NUMABE, Y. Investigation of molecular biomarker candidates for diagnosis and prognosis of chronic periodontitis by bioinformatics analysis of pooled microarray gene expression datasets in Gene Expression Omnibus (GEO). **BMC Oral Health**, v.19, n.1, p.52, 2019. doi:10.1186/s12903-019-0738-0.

TEITELBAUM, S. L. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. **Arthritis Res Ther.**, v. 8, n.1, p. 1-8, 2006. doi:10.1186/ar1857

TONETTI, M. S. *et al.* Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. **J Clin Periodontol**, v.44, n.5, p.456-462, 2017. doi:10.1111/jcpe.12732

UDAGAWA, N. *et al.* Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. **J Bone Miner Metab.**, v.39, n.1, p.19-26, 2021. doi:10.1007/s00774-020-01162-6.

UEDA, Y. *et al.* IL-1R type I-dependent hemopoietic stem cell proliferation is necessary for inflammatory granulopoiesis and reactive neutrofilia. **J Immunol.**, v.182, n.10, p.6477-6484, 2009. doi:10.4049/jimmunol.0803961.

VALENZUELA, E. N.; PIETSCHMANN, P. Epidemiology and pathology of Paget's disease of bone – a review. **Wien Med Wochenschr.**, v.167, n.1, p. 2–8, 2017. doi:10.1007/s10354-016-0496-4

VAN DYKE, T. E. Pro-resolving mediators in the regulation of periodontal disease. **Mol Aspects Med.**, v. 58, p. 21-36, 2017. doi:10.1016/j.mam.2017.04.006.

VENÂNCIO, E. T. **Avaliação do potencial anticonvulsivante do extrato padronizado de justicia pectoralis (chambá): estudo de neuroproteção e mecanismo de ação.** Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

VENÂNCIO, E. T. *et al.* Anxiolytic-like effects of standardized extract of Justicia pectoralis (SEJP) in mice: Involvement of GABA/benzodiazepine in receptor. **Phytother Res.**, v.25, n.3, p. 444-450, 2011. doi:10.1002/ptr.3274.

VENUGOPALA, K.N.; RASHMI, V; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **Biomed Res Int.**, v.2013, p.1-14, 2013. doi: 10.1155/2013/963248.

VIJAYALAKSHM, A.; SINDHU, G. Data Article - Data on efficacy of umbelliferone on glycoconjugates and immunological marker in 7,12-dimethylbenz(a) anthracene induced oral carcinogenesis. **Data in Brief.**, v. 15, p. 216–221, 2017. doi:10.1016/j.dib.2017.09.035

VOGEL, A. Darstellung von Benzoesäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten- oder Steinklee-Blumen. **Ann. Phys.**, v.64, p.161–166, 1820. doi:10.1002/andp.18200640205.

WADELIUS, M.; PIRMOHAMED, M. Pharmacogenetics of warfarin: current status and future challenges. **Pharmacogenomics**, v. 7, p. 99–111, 2007. doi:10.1038/sj.tpj.6500417

WANG, D. *et al.* Umbelliferone Alleviates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Responses in Acute Lung Injury by Down-Regulating TLR4/MyD88/NF- κ B Signaling. **Inflammation**, v. 42, n.2, p.440-448, 2019. doi:10.1007/s10753-018-00953-4.

WANG, Q. *et al.* Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v. 41, n. 3-4, p. 97-103, 2005. doi: 10.1290/0501005.1.

WARA-ASWAPATI, N. *et al.* RANKL upregulation associated with periodontitis and Porphyromonas gingivalis. **J Periodontol.**, v. 78, n.6, p. 1062-1069, 2007. doi:10.1902/jop.2007.060398

WEIN, M. N.; KRONENBERG, H. M. Regulation of Bone Remodeling by Parathyroid Hormone. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, v.8, n.8, p. 1-20, 2018. doi:10.1101/cshperspecta031237.

WU, L. *et al.* The Structure and Pharmacological Functions of Coumarins and Their Derivatives. **Current Medicinal Chemistry**, v.16, n.32, 2009.

YASUDA, H. *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.95, p. 3597–602, 1998.

YIN, J.; WANG, H.; LU, G. Umbelliferone alleviates hepatic injury in diabetic db/db mice via inhibiting inflammatory response and activating Nrf2-mediated antioxidant. **Biosci Rep.**, v.38, n.4, p. 1-10, 2018. doi:10.1042/BSR20180444.

YOUNAS. *et al.* Anti-allergic activities of Umbelliferone against histamine- and Picryl chloride induced ear edema by targeting Nrf2/iNOS signaling in mice. **Complementary Medicine and Therapies**, v.21, n.215, p. 1-7, 2021. doi:https://doi.org/10.1186/s12906-021-03384-1

YUCEL-LINDBERG, T.; BAGE, T. Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. **Expert Rev Mol Med.**, v.15, p. 1-22, 2013. doi:10.1017/erm.2013.8.

ZHAI, Y. *et al.* The higher osteoprotective activity of psoralidin in vivo than coumestrol is attributed by its presence of an isopentenyl group and through activated PI3K/Akt axis. **Biomed Pharmacother**, v.102, p.1015-1024, 2018.doi:10.1016/j.biopha.2018.03.166.

ZHANG, S. *et al.* Total Coumarins from *Hydrangea paniculata* Show Renal Protective Effects in Lipopolysaccharide-Induced Acute Kidney Injury via Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. **Front Pharmacol.**, v. 8, n.872, p.1-16, 2017. doi:10.3389/fphar.2017.00872

ZHAO, D. *et al.* In Vitro Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of *Angelica decursiva*. **Arch Pharm Res.**, v. 35, n.1, v.179-192, 2012. doi:10.1007/s12272-012-0120-0.

ZHAO, L. Effect of non-surgical periodontal therapy on the levels of Th17/Th1/Th2 cytokines and their transcription factors in Chinese chronic periodontitis patients. **J Clin Periodontol**, v.38, n.6, p.509-16, 2011. doi:10.1111/j.1600-051X.2011.01712.

ZHENG, Y. *et al.* Th2 cell regulatory and effector molecules single nucleotide polymorphisms and periodontitis. **J Leukoc Biol.**; v. 108, n. 5, p.1641-1654, 2020. doi: 10.1002/JLB.4MA0720-698RR.

ZHU, X. *et al.* Osthole induces apoptosis and suppresses proliferation via the PI3K/Akt pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma. **Int J Mol Med.**, v. 40, n.4, p. 1143-1151, 2017. doi:10.3892/ijmm.2017.3113

APÊNDICE

Review

TAVARES, SJS.; LIMA, V. Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream cellular signaling: a systematic review of the literature. *Fitoterapia.*; v.150, n.104842, 2021. doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104842

Disponível online: 6 de fevereiro de 2021

Informações do periódico

ISSN: 0367-326X

Editor: G. Appendino, PhD - University of Eastern Piedmont Amedeo Avogadro Department of Pharmaceutical Sciences, Novara, Italy.

Plataforma revisada por pares: Sciencedirect

Empresa editora: Elsevier BV

Métricas

Escore de citação: 4.2

Fator de impacto: 2,882

Qualis (ciências biológicas II): B1

Qualis (novo): A3

Fitoterapia

Review article

Bone anti-resorptive effects of coumarins on RANKL downstream cellular signaling: a systematic review of the literature

Samia Jessica Silva Tavares^a, Vilma Lima^{b*}

^a School of Pharmacy, Nursing, and Dentistry, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60430-355, Brazil. E-mail address: samiajtavares@alu.ufc.br.

^b School of Medicine, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, 60.430-275, Brazil. E-mail address: vilma@ufc.br.

*Corresponding author:

Vilma Lima, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, 1000 Coronel Nunes de Melo Street, Rodolfo Teofilo.

Zip code: 60.430-275. Fortaleza, CE, Brazil

Tel.: +55 85 3366 8259

E-mail address: vilma@ufc.br.

Abstract

Background: Members of the botanical families Apiaceae/Umbelliferae, Asteraceae, Fabaceae/Leguminosae, and Thymelaeaceae are rich in coumarins and have traditionally been used as ethnomedicines in many regions including Europe, Asia, and South America. Coumarins are a class of secondary metabolites that are widely present in plants, fungi, and bacteria and exhibit several pharmacological, biochemical, and therapeutic effects. Recently, many plants rich in coumarins and their derivatives were found to affect bone metabolism.

Objective: To review scientific literature describing the mechanisms of action of coumarins in osteoclastogenesis and bone resorption.

Materials and methods: For this systematic review, the PubMed, Scopus, and Periodical Capes databases and portals were searched. We included *in vitro* research articles published between 2010 and 2020 that evaluated coumarins using osteoclastogenic markers.

Results: Coumarins have been reported to downregulate RANKL-RANK signaling and various downstream signaling pathways required for osteoclast development, such as NF- κ B, MAPK, Akt, and Ca²⁺ signaling, as well as pathways downstream of the nuclear factor of activated T-cells (NFATc1), including tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), cathepsin K (CTSK), and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9).

Conclusions: Coumarins primarily inhibit osteoclast differentiation and activation by modulating different intracellular signaling pathways; therefore, they could serve as potential candidates for controlled randomized clinical trials aimed at improving human bone health.

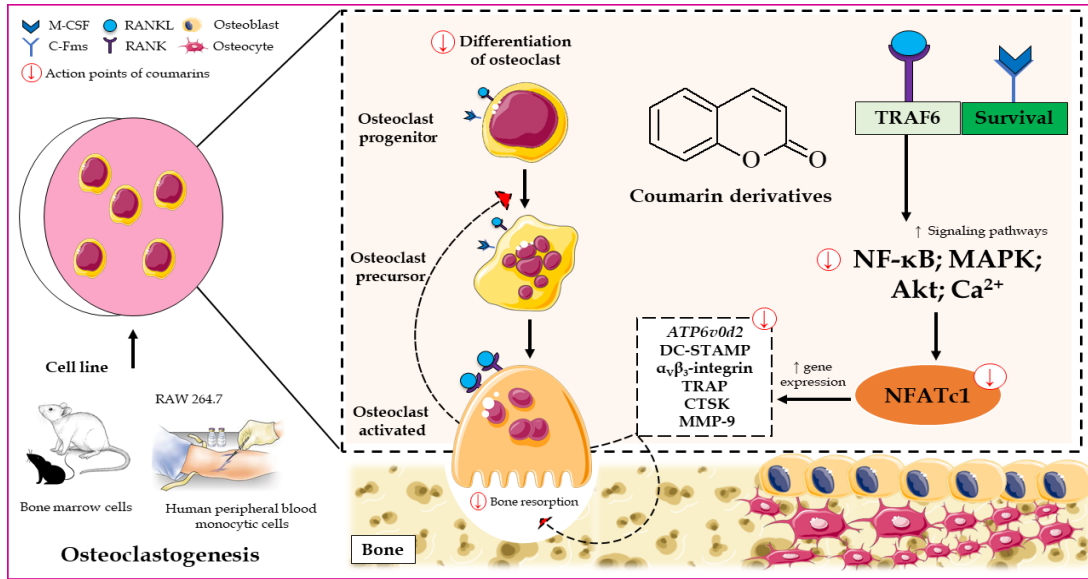
Keywords: coumarin; transcription factor; bone marker; osteoclastogenesis; nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1.

Abbreviations

AP-1	Activator Protein-1
2-APB	2-Aminoethoxydiphenyl borate
ATP6v0d2	ATPase H ⁺ Transporting V0 Subunit D2
CaMKK β	Ca ²⁺ /calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase β
c-Fos	Proto-oncogene protein
CTSK	Cathepsin K
DC-STAMP	Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
IL	Interleukin
I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IKK	I κ B Kinase complex
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MMP-9	Matrix Metalloproteinase 9
NFATc1	Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic 1
NF- κ B	Nuclear Factor-kappa B
OB	Osteoblast
OC	Osteoclast
OC-STAMP	Osteoclast-Stimulatory Transmembrane Protein
OPG	Osteoprotegerin
OSCAR	Osteoclast-associated receptor

p38	p38 kinase
Pyk2	Protein tyrosine kinase 2
PICOS	Problem, Intervention, Comparison, Outcomes, and Study
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B Ligand
SOCE	Store-Operated Ca ²⁺ Entry
TNF	Tumor Necrosis Factor
TRAF6	Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 6
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase
TRP	Transient Receptor Potential

GRAPHICAL ABSTRACT



1 Introduction

Members of the botanical families Apiaceae/Umbelliferae, Asteraceae, Fabaceae/Leguminosae, and Thymelaeaceae are rich in coumarins and have traditionally been known for their ethnomedicinal properties in Europe, Asia, South America, and North America [1].

Angelica biserrata (Apiaceae) is known as “Dokwhal”, and its roots are used in the treatment of leg numbness and pain associated with neck stiffness. In Chinese medicine, it is used in the treatment of arthritis [2]. The volatile oil of *Angelica* sp. reduces the degeneration of articular cartilage, decreases the expression of interleukin-1, and increases the expression of transforming growth factor- β in rabbits [3]. Coumarins such as osthole, columbianadin, bergapten, psoralen, scopoletin, umbelliferone, and xanthotoxin are its major components [2].

Cnidium monnieri (L.) Cusson belongs to Apiaceae family. It grows in China, Japan, Korea, and Vietnam and is widely used to treat female genitals, skin diseases and osteoporosis [4-6]. Among all coumarins identified in the extracts of this plant, osthole is the major compound [4-6]. This coumarin inhibits bone resorption and osteoclastogenesis [6,7].

Ecliptae herba belongs to Asteraceae family and is used as a traditional Chinese and Indian medicine for the treatment of various conditions. According to traditional Chinese medicine, *E. herba* nourishes the kidneys and may potentially treat osteoporosis [8,9] as it inhibits bone loss and increases bone mass in ovariectomized rats [9]. The predominant component of its extract is wedelolactone, a derivative of coumarin [8,10].

Psoralea corylifolia L. belongs to Leguminosae family and is used as a traditional Chinese medicine for the treatment and prevention of various conditions, as osteoporosis [11]. The extract of *Fructus Psoraleae* increased bone volume and thickness, and bone density in an animal model of osteoporosis [12]. Among of all coumarins identified in the extract of this plant, psoralen and isopsoralen reduced tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) and increased alkaline phosphatase [13].

Dipteryx odorata (Aubl.) Willd (Fabaceae) is native plant in North America and South America, mainly in Amazonia. In Brazil it is known as coumarou and is used for the treatment of various diseases, as rheumatism [14,15]. The predominant component of its extract is 1,2-benzopirona [16].

Daphne L. belongs to Thymelaeaceae family and is used in the treatment of various diseases in Asia, Europe, and North Africa. According to traditional Chinese medicine, *Daphne*

giraldii Nitsche and *Daphne tangutica* are used in the treatment of inflammatory diseases, as rheumatoid arthritis [17-19]. Daphnetin is the predominant component of these extracts [19].

Coumarins are natural compounds that are widely distributed in vegetables, predominantly in angiosperms, and are found as secondary metabolites in fungi and bacteria. Generally, these compounds are o-hydroxycinnamic acid lactones, among which coumarin (1,2-benzopyrone) is the simplest representative and is considered as the basic structure common to all derivatives [20,21]. Currently, more than 1300 coumarins have been identified, many of which have several biological activities [21], including antioxidant [22,23], bronchodilator [24], anti-inflammatory [22,24,25], antinociceptive [24, 26], anticoagulant [27], and antitumor [28] activities. Many plants rich in coumarins and their derivatives reportedly interfere with bone metabolism [6,9].

Bone remodeling is a continuous and dynamic process that is fundamental for the renewal and maintenance of bone resistance, as well as mineral bone homeostasis. The major bone cells are osteoclasts (OCs), osteoblasts (OBs), and osteocytes. OCs are derived from hematopoietic stem cells, whose precursors are monocytic/macrophage cells. The basic function of OCs is reabsorbing bone tissue. OBs are cells of mesenchymal origin; their functions are secretion of the extracellular matrix and bone mineralization. OCs and OBs act in a coordinated manner by reabsorbing and forming the bone tissue, respectively [29], in response to several endogenous factors, such as vitamin D, estrogen, growth factors and cytokines, as well as TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-7, IL-8, and other pro-inflammatory cytokines, which induce RANKL expression [30].

RANKL and its receptor RANK are key osteoclastogenic factors. The binding of RANKL to RANK on osteoclast precursors leads to the recruitment of TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6), which activates several downstream signaling pathways including NF- κ B, MAPKs, Akt, and calcium (Ca²⁺) signaling [29,30]. The factors that induce osteoclastic differentiation and activation are related to the high morbidity of patients. Osteoporosis, rheumatoid arthritis, and periodontitis are examples of bone diseases in which greater bone resorption occurs at the expense of formation [31-33].

For most lytic bone diseases, pharmacological approaches include antiresorptive agents such as bisphosphonates; anti-RANKL monoclonal antibody; denosumab; selective estrogen receptor modulators, such as raloxifene; and estrogen replacement therapy [32]. However, the use of these drugs is related to serious adverse effects, such as the development of mandibular osteonecrosis by bisphosphonates [34] and the increased risk of breast and endometrial cancer

due to hormone replacement therapies [35]. Considering this issue, natural products such as coumarins and their derivatives, which interfere with bone metabolism, can offer therapeutic value for the prevention and treatment of bone diseases [6,9,36]. Thus, we sought to review the scientific literature on the mechanisms of action of coumarins in osteoclastogenesis and bone resorption.

2 Materials and methods

The present review followed the Preferred Reporting Items for Systematic Review and Meta-Analysis Protocols (PRISMA-P) 2015 statement [37]. The research question and the criteria for eligibility and exclusion of the articles were designed using the Problem, Intervention, Comparison, Outcomes, and Study type (PICOS) strategy (Supplementary 1A). To describe the mechanisms of action by which coumarins reduce the formation of OCs and subsequent bone resorption, we referred to articles indexed in the database and portals Scopus, PubMed, and CAPES Periodicals. The search strategy consisted of a combination of keywords and descriptors related to osteoclastogenesis (Supplementary 1B). The descriptors, according to Medical Subject Heading (MeSH) “*coumarins; rank ligand; nfatc transcription factors; tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP); cathepsins (CTSK) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)*” and the keyword “*bone*” were combined as follows: *coumarins and bone and (RANK or RANK Ligand or nfatc transcription factors, tartrate-resistant acid phosphatase, cathepsins, or matrix metalloproteinase 9)*. Additionally, a manual search was performed on the web, using the Google search tool to choose other possible studies.

The data sources were independently examined by two evaluators. We established the following criteria for the inclusion of articles: articles published in English, scientific research published between 2010 and 2020 that evaluated coumarin compounds in the process of OC formation and bone resorption from bone markers. Articles from literature reviews, articles that did not evaluate markers of osteoclastogenesis, or studies with the effects of coumarins were associated with cytotoxicity were excluded. Finally, disagreements between the reviewers were resolved without the need for a third observer.

After the complete reading of the included articles, the data were extracted and grouped in a spreadsheet. The data collected were: References (author/year), characteristics of the intervention (coumarin derivative), characteristics of the sample (culture system/cell type and stimulus), duration, methods, results, and conclusion.

3 Results

This review included 33 non-clinical studies published between 2010 and 2020. Of these, 15 studies used methodologies only *in vitro* [8,38-51], and 18 articles combined methodologies *in vitro* and *in vivo* [52-69]. The search strategies can be viewed in a flow chart (Fig. 1). According to the major guidelines for assessing the methodological quality of *in vitro* studies [70], all studies used methodologies suitable for evaluating bone markers (Supplementary 1C).

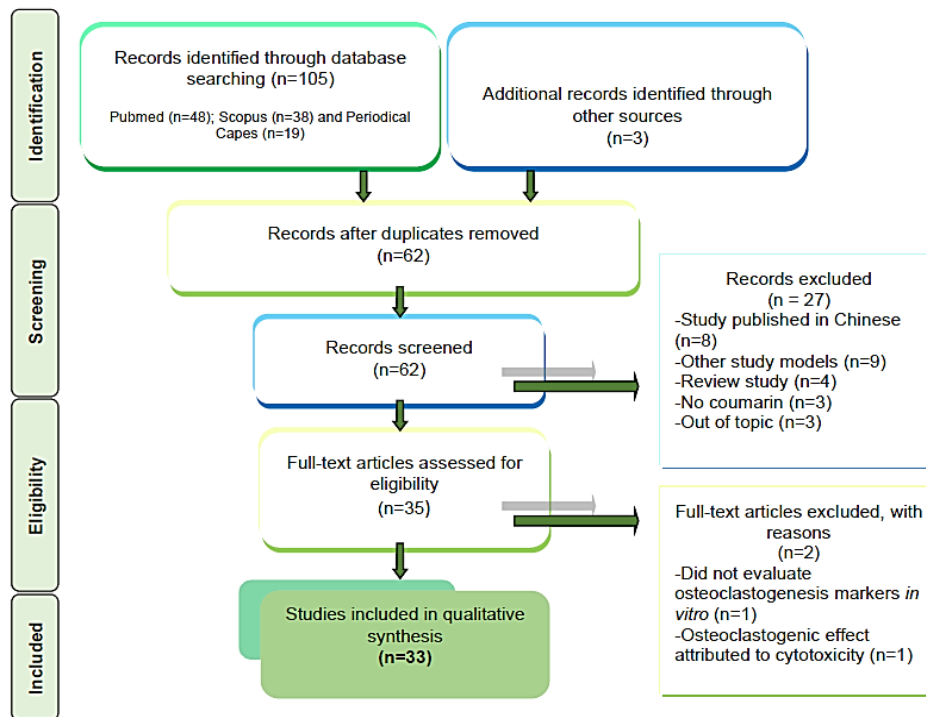


Fig. 1 Flowchart of the research strategy Based on the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement [37].

The osteoclastogenesis study models involved the following cell types: primary bone marrow cells from animals [38-40,44,48-50,53-59,63,65,66,68,69], culture with RAW 264.7 cells [43,45,46,51,67], or human bone marrow cells [42,47]. In some studies, the authors used both primary cells, such as RAW 264.7 [8,41,52,60,61,64], and bone marrow cells from animals and humans [62] (Table 1).

As stimuli for osteoclastogenesis, the studies predominantly used RANKL+M-CSF [38-40,42,47,48,52-59,62,63-66,68,69], RANKL only [8,41,43-46,60,61,67], LPS [51], 1,25-

dihydroxy vitamin D3 [49], with one study using both 1,25-dihydroxy vitamin D3 and RANKL+M-CSF [50] (Table 1)

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
5'-hidroxi auraptene (5'-HA)	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (25 ng/ml) Treatment: 5'-HA (1; 10 or 50 μ M)	6-7 d	- TRAP Staining and activity - Bone resorption in calcium phosphate-coated plates - Real-Time PCR - Western Blot	↓ TRAF6 ↓ Signaling of NF- κ B and MAPKs ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ TRAP ↓ CTSK and MMP-9 ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Abdalah et al., (2019)[38]
7-methoxycoumarin	BMCs of rabbit Rat calvarial osteoblasts	Osteoclast Formation: 1,25(OH) ₂ D ₃ (10^{-8} M) Treatment: 7-methoxycoumarin (10^{-5} M)	6-9 d	- TRAP Staining and activity - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR	↓ TRAP ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Zhai et al., (2014)[49]
Aesculin	RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (50 ng/ml) Treatment: Aesculin (5; 10 or 20 μ M)	3-5 d	- TRAP Staining - Real-Time PCR - Western Blot - F-actin ring formation	↓ RANK ↓ Signaling of NF- κ B and MAPKs ↓ NFATc1 ↓ Atp6v0d2 ↓ TRAP ↓ Formation of filamentous actin ↓ CTSK and MMP-9	↓ Osteoclastogenesis	Zhao et al., (2017)[67]
Bergapten	RAW 264.7	Osteoclast Formation: LPS (100 ng/ml) Treatment:	3-6 d	- TRAP Staining - Bone resorption in bone slices	↑ Apoptosis of OCs	↓ Osteoclastogenesis	Zheng et al., (2014)[51]

		Bergapten (5; 20 or 40 $\mu\text{mol/l}$)		- Western Blot - Cytometry - Hoechst 33342 staining	↓ TRAP ↓ Size of pit area	↓ Bone resorption	
Bergapten	BMCs of mice RAW 264.7	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (50 ng/ml) Treatment: Bergapten (1,2; 2,5 or 5 $\mu\text{mol/l}$)	5-7 d	- TRAP Staining - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot - F-actin ring formation	↓ Signaling of NF- κ B and JNKs ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ ATP6v0d2 ↓ TRAP ↓ Formation of filamentous actin ↓ CTSK ↓ Formation of pits Did not suppress signaling p38 and ERK	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Chen et al., (2019)[52]

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
Cinnamoyloxy-mammeisin (CNM)	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (10 ng/ml) Treatment: CNM (5; 10 or 20 μ M)	3-4 d	- TRAP Staining - Bone resorption in hydroxyapatite-coated plates - Real-Time PCR - Western Blot - MMP-9 by gelatin zymography assay	↓ NFATc1 ↓ ATP6v0d2 ↓ TRAP ↓ α V/ β 3 integrin ↓ CTSK and MMP-9 ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Da Cunha et al., (2017)[54]
Collinin	BMCs human	Osteoclast Formation: M-CSF (33 ng/ml) + RANKL (66 ng/ml) Treatment: Collinin (2,5; 5; 7,5 or 10 μ g/ml)	4-6 d	- TRAP Staining - Bone resorption in release of collagen helical peptide - ELISA	↓ TRAP ↓ MMP-9 ↓ Release of collagen helical peptides	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Santos et al., (2013)[47]
Coumarin triazole	RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (100 ng/ml) Treatment: Compounds 4d, 4j and 6j (10 μ M)	5 d	- TRAP Staining - Western Blot	↓ Signaling of NF- κ B by compounds 4d ↓ TRAP by compounds 4d, 4j and 6j	↓ Osteoclastogenesis	Rama Krishna et al., (2018)[46]
Coumermycin A1	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Coumermycin A1 (10 μ M)	4-7 d	- TRAP Staining - Bone resorption in dentine slices - Real-Time PCR - Western Blot - Retroviral gene transduction (NFATc1)	↓ Signaling of MAPKs ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ TRAP ↓ CTSK ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Zheng et al., (2013)[69]

					Did not suppress signaling of NF- κ B		
Dalbergin	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ μ l) + RANKL (50 ng/ μ l) Treatment: Dalbergin (1 μ M; 10 nM or 100 pM)	7 d	- TRAP staining - Real-Time PCR	↓ TRAP	↓ Osteoclastogenesis	Choudhary et al., (2016)[53]

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
Daphnetin	BMCs of mice	Osteoclast Formation: RANKL (50 ng/ml) Treatment: Daphnetin (20 or 40 μ M)	4-5 d	- TRAP Staining - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot	↓ TRAF6 ↓ Signaling of NF- κ B and Akt/GSK-3 β ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ TRAP ↓ CTSK ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Liu et al., (2019)[44]
Daphnetin	BMCs of mice RAW 264.7	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Daphnetin (2,5; 5; 10 or 15 μ M)	3-6 d	- TRAP Staining - Bone resorption in hydroxyapatite-coated plates - Real-Time PCR - Western Blot - Luciferase reporter assay (NFATc1) - Immunofluorescence assay (F-actin ring)	↓ Signaling of ERK ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ ATP6v0d2 ↓ DC-STAMP ↓ TRAP ↓ Formation of filamentous actin ↓ CTSK and MMP-9 ↓ Formation of pits Did not suppress signaling of NF- κ B, p38 and JNK	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Wu et al., (2019)[64]

Decursin	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (10 ng/ml) Treatment: Decursin (2,5; 5 or 10 μ M)	2-4 d	- TRAP Staining - Real-Time PCR - Western Blot - Retroviral gene transduction (NFATc1)	↓ NFATc1 ↓ DC-STAMP ↓ TRAP ↓ β 3 integrin ↓ CTSK	↓ Osteoclastogenesis	Kim et al., (2015)[56]
Decursin	BMCs of mice PBMC	Osteoclast Formation: M-CSF (30 or 100 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Decursin (5; 10 or 20 μ M)	2-14 d	- TRAP Staining - Bone resorption in dentine slices - Real-Time PCR - Western Blot	↓ Signaling of ERK ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ ATP6v0d2 ↓ DC-STAMP ↓ TRAP ↓ α V/ β 3 integrin ↓ CTSK ↓ Formation of pits Did not suppress signaling of NF- κ B and p38	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Wang et al., (2016)[62]

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
Esculetin	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Esculetin (1; 5 or 10 μ M)	3-4 d	- TRAP Staining - Bone resorption hydroxyapatite-coated plates - Real-Time PCR - Western Blot - F-actin ring staining	↓ c-Fos and NFATc1 ↓ OSCAR ↓ DC-STAMP ↓ OC-STAMP ↓ TRAP ↓ Formation of filamentous actin ↓ α V/ β 3 integrin ↓ CTSK Did not suppress signaling of NF- κ B, MAPKs, Akt and PLC γ 2	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Baek et al., (2015)[39]

Fraxetin	BMCs of mouse RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (50 ng/ml) Treatment: Fraxetin (3; 6 or 12 μ M)	7 d	- TRAP Staining - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot	↓ Signaling of p38 ↓ NFATc1 ↓ TRAP ↓ CTSK ↓ Formation of pits Did not suppress signaling of ERK and JNK	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Liao et al., (2018)[60]
Novobiocin	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Novobiocin (200 μ M)	4-7 d	- TRAP Staining - Real-Time PCR - Western Blot	↓ TRAP ↓ CTSK	↓ Osteoclastogenesis	Zheng et al., (2013)[69]
Osthole	BMCs of rabbit Rat calvarial osteoblasts	Osteoclast Formation: 1,25(OH) ₂ D ₃ (10 ⁻⁸ M) Treatment: Osthole (10 ⁻⁵ M)	6-9 d	- TRAP Staining and activity - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR	↓ RANKL ↑ OPG ↓ TRAP ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Zhai et al., (2014)[49]
Osthole	BMCs of mice Mice calvarial osteoblasts	Osteoclast Formation: M-CSF (10 ng/ml) + RANKL (50 ng/ml) Treatment: Osthole (0,1; 1 or 10 μ M)	7 d	- TRAP staining - Real-Time PCR	↓ RANKL ↑ OPG ↓ TRAP	↓ Osteoclastogenesis	Li et al., (2016)[59]

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
Osthole	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (44 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Osthole (0,5; 1, 2, 3, 4, 5 μ M)	4-10 d	- TRAP Staining - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot	↓ c-Fos and NFATc1 ↓ TRAP ↓ CTSK and MMP-9 ↓ Formation of pits Did not suppress signaling of NF- κ B and MAPKs	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Zhao et al., (2018)[68]

Osthole	RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (100 ng/ml) Treatment: Osthole (10^{-6} or 10^{-5} mol/l)	4-5 d	- TRAP Staining - Bone resorption in osteoassay - Real-Time PCR - Western Blot - Luciferase reporter assay (NFATc1)	↓ Signaling of NF-κB ↓ NFATc1 ↓ TRAP ↓ β3 integrin ↓ CTSK and MMP-9 ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Ma et al., 2019[45]
Osthole	BMCs of rats	Osteoclast Formation: M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Osthole (10^{-5} mol/l)	5 d	- TRAP Staining - Bone resorption in osteoassay - Real-Time PCR - Western Blot - Luciferase reporter gene assay (NFATc1)	↓ Signaling of NF-κB ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ TRAP ↓ CTSK ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Wang et al., (2020)[63]
Praeruptorin A	BMCs of mice	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (10 ng/ml) Treatment: Praeruptorin A (1; 2,5; 5 or 10 μM)	4 d	- TRAP Staining and activity - Bone resorption BioCoat Osteologic MultiTest - Real-Time PCR - Western Blot - Luciferase assay (NFATc1) - Retrovirus Preparation and Infection (NFATc1) - Ca^{2+} Measurement	↓ Signaling of p38 and Akt ↓ Oscillations of Ca^{2+} ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ OSCAR ↓ DC-STAMP ↓ TRAP ↓ CTSK ↓ Formation of pits Did not suppress signaling of ERK, JNK and PLCγ2	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Yeon et al., (2014)[48]

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
---------------------	------------	----------------	----------	---------	---------	------------	------------

Praeruptorin A	BMCs of mice	<p>Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (10 ng/ml)</p> <p>Treatment: Praeruptorin A (0,1; 0,3; 1; 3 or 10 μM)</p>	3 d	<ul style="list-style-type: none"> - TRAP Staining and activity - Real-Time PCR - Western Blot - Calcineurin activity 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Ca²⁺/calmodulin-calcineurin signaling pathways ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ ATP6v0d2 ↓ DC-STAMP ↓ TRAP ↓ αV integrin ↓ CTSK 	↓ Osteoclastogenesis	Yeon et al., (2015)[65]
Psoralen	BMCs of mice	<p>Osteoclast Formation: M-CSF (10 ng/ml) + RANKL (30 ng/ml)</p> <p>Treatment: Psoralen (0,05; 0,1 or 0,5 μM)</p>	8-15 d	<ul style="list-style-type: none"> - TRAP Staining and activity - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot - MMP-9 by gelatin zymography assay - ELISA 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Translocation into the nucleus of c-jun ↓ TRAP ↓ CTSK and MMP-9 not significant ↓ Formation of pits not significant Did not suppress signaling of NF-κB, ERK and Akt 	↓ Osteoclastogenesis	Chai et al., (2018)[40]
Psoralen	BMCs of mice	<p>Osteoclast Formation: M-CSF (25 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml)</p> <p>Treatment: Psoralen (2,5; 5; 10; 20 or 40 μM)</p>	7-15 d	<ul style="list-style-type: none"> - TRAP Staining - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot - Immunofluorescence assay (F-actin ring) 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Signaling of ERK ↑ c-Fos and NFATc1 ↑ ATP6v0d2 ↑ TRAP ↑ Formation of filamentous actin ↑ CTSK ↑ Formation of pits Did not suppress signaling of p38 and JNK 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Osteoclastogenesis ↑ Bone resorption 	Zhang et al., (2019)[66]
Psoralidin	BMCs of mice	<p>Osteoclast Formation:</p>	2-4 d	<ul style="list-style-type: none"> - TRAP Staining - Bone resorption in bone slices 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Signaling of NF-κB and MAPKs ↓ c-Fos and NFATc1 	↓ Osteoclastogenesis	Kong et al., (2017)[57]

		M-CSF (20 ng/ml) + RANKL (40 ng/ml) Treatment: Psoralidin (1; 10 or 30 μ M)		- Real-Time PCR - Western Blot - F-actin labeling	↓ OSCAR ↓ TRAP ↓ Formation of filamentous actin ↓ CTSK ↓ Formation of pits	↓ Bone resorption	
--	--	--	--	---	--	-------------------	--

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
Psoralidin	BMCs of rats Rat calvarial osteoblast	Osteoclast Formation: 1 α ,25(OH) ₂ VD ₃ (10 ⁻⁸ mol/l) + M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (30 ng/ml) Treatment: Psoralidin (10 ⁻⁶ mol/l)	3-12 d	- TRAP Staining and activity - Bone resorption in bone slices - Western Blot - Real-Time PCR	↓ RANKL ↑ OPG ↓ TRAP ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Zhai et al., (2017)[50]
Scoparone	RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (50 ng/ml) Treatment: Scoparone (1; 10 or 20 μ M)	5 d	- TRAP Staining and activity - Western blot	↓ Signaling of MAPKs ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ TRAP ↓ CSTK	↓ Osteoclastogenesis	Lee and Jang (2015)[43]
Umbelliferone	BMCs of mice Mice calvarial osteoblast	Osteoclast Formation: M-CSF (30 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Umbelliferone (50; 100 or 200 μ M)	3-4 d	- TRAP Staining - Bone Resorption in hydroxyapatite-coated plates - Real-Time PCR - Western Blot Assays - Stability of c-Fos and NFATc1	↓ Signaling of Akt ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ OSCAR ↓ ATP6v0d2 ↓ TRAP ↓ CTSK ↓ Formation of pits Did not suppress signaling of NF- κ B, p38, JNK and PLC γ 2	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Kwak et al., (2019)[58]

Wedelolactone	BMCs of mice RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (30 ng/ml) Treatment: Wedelolactone (0,06; 0,6; 1,25; 2,5 or 5 µg/ml)	3-6 d	- TRAP Staining and activity	↓ TRAP	↓ Osteoclastogenesis	Liu et al., (2014)[8]
Wedelolactone	PBMC	Osteoclast Formation: M-CSF (200 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml) Treatment: Wedelolactone (1; 5 or 10 µM)	14-21 d	- TRAP Staining - Bone resorption in calcium phosphate apatite-coated plate - Western Blot - ELISA	↓ RANKL ↑ OPG ↓ Signaling of Akt/ mTOR ↓ TRAP ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Hsieh et al., (2015)[42]

Table 1. Overview of *in vitro* studies with coumarins in osteoclastogenesis (continuation)

Coumarin derivative	Cell lines	Culture system	Duration	Methods	Results	Conclusion	References
Wedelolactone	BMCs RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (100 ng/ml) Treatment: Wedelolactone (1,25; 2,5 or 5 µg/ml)	4-5 d	- Bone resorption in dentine slices - Real-Time PCR - Western Blot - F-actin ring formation - Immunofluorescence staining	↓ Signaling of NF-κB ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ Formation of filamentous actin ↓ CTSK ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Liu et al., (2016)[61]
Wedelolactone	BMCs of mice RAW 264.7	Osteoclast Formation: RANKL (100 ng/ml) Treatment: Wedelolactone (1, 2 or 5 µg/ml)	4 d	- TRAP Staining and activity - Bone resorption in dentine slice	↓ TRAP ↓ Formation of pits	↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption	Deng et al., (2018)[41]

Xanthotoxin	BMCs of mice	<p>Osteoclast Formation: M-CSF (50 ng/ml) + RANKL (100 ng/ml)</p> <p>Treatment: Xanthotoxin (0,1 or 1 μM)</p>	3-5 d	<ul style="list-style-type: none"> - TRAP staining and activity - Bone resorption in bone slices - Real-Time PCR - Western Blot - Actin cytoskeleton and focal adhesion - Ca^{2+} measurement 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Signaling of CaMKKβ / PYK2 ↓ Oscillations of Ca^{2+} ↓ c-Fos and NFATc1 ↓ DC-STAMP ↓ TRAP ↓ Formation of filamentous actin ↓ CTSK ↓ Formation of pits 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Osteoclastogenesis ↓ Bone resorption 	Dou et al., (2016)[55]
-------------	--------------	--	-------	--	--	---	------------------------

Abbreviations: ATPase H⁺ Transporting V0 Subunit D2(Atp6v0d2); Bone Marrow Cells (BMCs); Ca²⁺/calmodulin-dependent Protein Kinase Kinase β (CaMKK β); Proto-oncogene protein (c-Fos); Cathepsin K (CTSK); Dendrite Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP); Extracellular Signal-Regulated Kinases (ERKs); c-Jun N-terminal kinases (JNKs); Human Peripheral Blood Monocytic Cells (PBMC); Macrophage Colony-Stimulating Factor (M-CSF); Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9); Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs); Nuclear Factor of Activated T-cells, Cytoplasmic 1 (NFATc1); Nuclear Factor-kappaB (NF- κ B); Osteoclast Stimulatory Transmembrane Protein (OC-STAMP); Osteoclast-Associated Receptor (OSCAR); Osteoprotegerin (OPG); p38 kinases (p38); Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B (RANK); Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand (RANKL); Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP); TNF Receptor Associated Factor 6 (TRAF6)

In this review, 22 different coumarins were studied throughout the selected articles (Fig. 2), among which the predominant ones are osthole [45,49,59,63,68] and wedelolactone [8,41,42,61]. The other coumarins were evaluated in two or fewer studies; these included bergapten [51,52], daphnetin [44,64], decursin [56,62], psoralen [40,66], psoralidin [50,57], and praeruptorin A [48,65], 5'-hydroxy auraptene [38], 7-methoxycoumarin [49], aesculin [67], cinnamoyloxy-mammeisin [54], collinin [47], coumarin–triazole derivatives [46], coumermycin A1 [69], dalbergin [53], esculetin [39], fraxetin [60], novobiocin [69], scoparone [43], umbelliferone [58], and xanthotoxin [55].

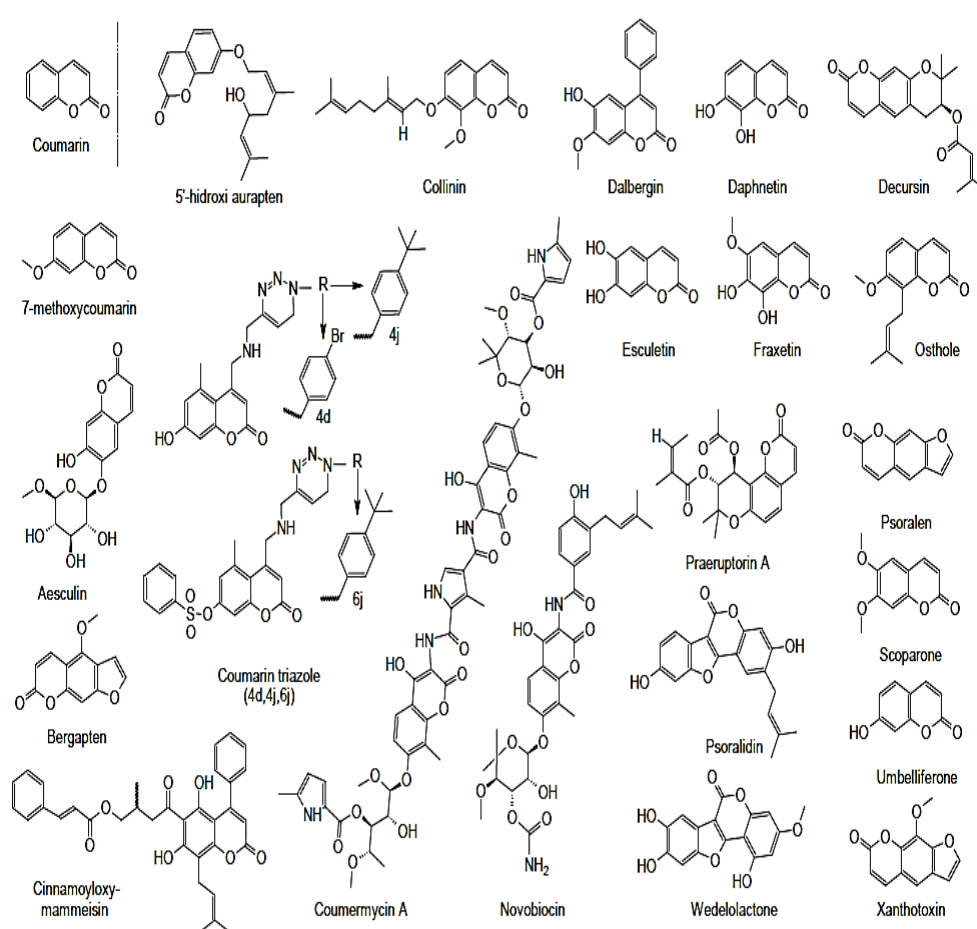


Fig. 2 Structures of coumarin and derivatives. A schematic overview of the basic chemical structure of coumarin characterized by a 2H-chromen-2-one (1,2-benzopyrone or 2H-1-benzopyran-2-one) oxa-heterocycle and its derivatives that showed effects on osteoclasts.

3.1 Effects of coumarins on osteoclastogenesis in vitro upstream of NFATc1

The RANKL-RANK link induces the recruitment of factor 6 associated with the tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 6 (TRAF6), which is involved in the activation of important downstream signaling pathways [29]. All coumarins evaluated in this review exhibited effects on osteoclastogenesis, according to the expression of bone markers. We subsequently compiled the signaling pathways evaluated in these studies. We found that several coumarins downregulated NF- κ B, MAPK–JNK, p38, ERK, Akt, or calcium (Ca^{2+}) signaling.

Fig. 3 illustrates the distribution of the different coumarins and their respective targets.

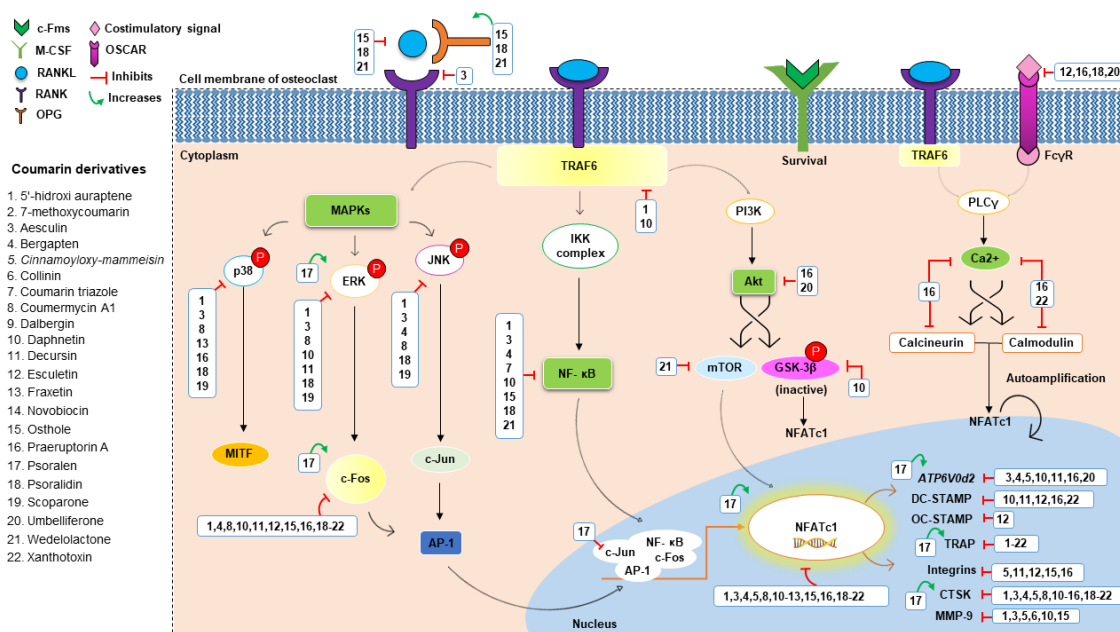


Fig. 3. Pathways of osteoclast differentiation and action targets for coumarins. RANKL is recognized by RANK to recruit TRAF6, leading to the activation of several signaling pathways, such as the canonical/non-canonical NF- κ B pathways, JNK phosphorylation, p-38 and ERK (MAPK activation), and Akt. These events culminate in the activation of c-Fos and NFATc1, which are essential transcription factors for differentiating osteoclasts. Additionally, there is the involvement of a co-stimulatory pathway associated with Ca^{2+} signaling through ITAM adaptors for immunoglobulin type receptors, such as OSCAR, which activates NFATc1 through tyrosine phosphorylation of signaling molecules such as PLC γ 2. Finally, NFATc1, together with AP-1 and MTF, orchestrates the transcription of specific genes important for osteoclast activity such as ATP6v0d2, DC-STAMP, CTSK, TRAP, and MMP-9. In contrast, the combination of M-CSF and C-Fms is important for osteoclast survival.

A major pathway involved in osteoclastogenesis is the activation of the NF- κ B [71] family. Not all studies considered in this review have evaluated this factor. However, most studies that have been included have identified that the following coumarins downregulated the NF- κ B pathway: 5'-hydroxy auraptene, aesculin, bergapten, coumarin–triazole derivatives, high concentrations of daphnetin, low concentrations of osthole, psoralidin, and wedelolactone

[38, 44-46,52,57,61,63,67], in addition to coumermycin A1, daphnetin (low concentrations), decursin, esculetin, osthole (high concentrations), psoralen, and umbelliferone, which did not affect the phosphorylation of I κ B [39,40,58,62,64,68,69] (Fig. 3; Table 1).

In parallel, MAPK signaling, which leads to the induction of AP-1 and c-Fos, is related to the stimulation of OC differentiation [72]. Several authors have evaluated the effect of coumarins on MAPK signaling. Ten coumarins inhibited MAPKs, through inhibiting the phosphorylation of ERK, p38, and/or JNK, including 5'-hydroxy auraptene, aesculin, bergapten, coumermycin A1, daphnetin, decursin, fraxetin, praeruptorin A, psoralidin, and scoparone [38,43,48,52,57,60,62,64,67,69]. Esculetin, osthole, and umbelliferone, however, did not affect the phosphorylation of MAPKs [39,58,68]. In contrast, high concentrations of psoralen increased the phosphorylation of ERK [66]. The coumarins 5'-hydroxy auraptene, bergapten, coumermycin A1, daphnetin, decursin, praeruptorin A, psoralidin, and scoparone were correlated with decreased expression of c-Fos [38,43,48,52,57,62,64,69] (Fig. 3; Table 1).

The other pathway that is involved in osteoclast differentiation is the PI3K/Akt pathway [73]. Akt induces osteoclast differentiation through the regulation of mTOR [74] and GSK3 β /NFATc1 signaling cascades [75]. Praeruptorin A [48] and umbelliferone [58] reduced Akt expression, wedelolactone inhibited Akt/mTOR [42] signaling, and daphnetin suppressed activation of the Akt/GSK-3 β [44] pathway. Esculetin and psoralen did not inhibit the phosphorylation of Akt [39,40] (Fig. 3; Table 1).

Despite the effects of several coumarins on the NF- κ B, MAPK, and Akt pathways, the effects of some coumarins on osteoclastic differentiation through co-stimulatory pathways associated with Ca²⁺ signaling have been evaluated. This pathway has not been well explored. Esculetin, praeruptorin A, and umbelliferone did not alter the phosphorylation of PLC γ 2 [39,48,58]. However, praeruptorin A reduced the Ca²⁺ oscillation [48] and the Ca²⁺/calmodulin-calcineurin axis, which can reduce NFATc1 self-amplification [65]. Additionally, xanthotoxin reduced Ca²⁺ oscillations and the expression of protein kinases (CaMKK β and Pyk₂) dependent on the Ca²⁺/calmodulin axis [55], negatively modulating the expression of NFATc1 [48,55,65] (Fig. 3; Table 1).

Among the included studies, only 11 did not evaluate the expression of NFATc1 [8,40,41,42,46,47,49,50,51,53,59]. Nevertheless, 21 studies demonstrated that coumarins (Table 1) reduced the expression of NFATc1 [38,39,43-45,48,52,54-58,60-65,67-69], with the exception of a study on psoralen, which showed that psoralen at high concentrations, induced an increase in NFATc1 [66]. Through this review, we observed that most coumarins were reduced or that they did not consistently affect NF- κ B, MAPK, or Ca²⁺ signaling through the

downregulation of NFATc1. The events upstream of NFATc1 are important for its nuclear translocation; the coding of several fundamental proteins for the fusion of pre-osteoclasts begins at this point [76]. A previous study demonstrated that psoralen increased the expression of ATPase H⁺ Transporting V0 Subunit D2 (ATP6v0d2) [66]; in contrast, aesculin, bergapten, cinnamoyloxy-mammeisin, daphnetin, decursin, praeruptorin A, and umbelliferone efficiently reduced the expression of ATP6v0d2 [52,54,58,62,64,65,67]. In addition, daphnetin, decursin, esculetin, praeruptorin A, and xanthotoxin expression of dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) [39,48,55,56,62,64,65]. Furthermore, esculetin reduced the osteoclast-stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) [39] (Fig. 3; Table 1).

OCs are multinucleated cells that secrete various enzymes, particularly tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), an enzyme widely used as a marker for these cells [77,78]. As expected, all coumarins induced a reduction in TRAP staining, consistent with the reduction in the formation of OCs [8,38-60,62-65,67-69]. Particularly, the coumarins aesculin, bergapten, daphnetin, esculetin, psoralidin, wedelolactone, and xanthotoxin have been shown to efficiently reduce the formation of the F-actin ring during the differentiation of pre-OCs [39,52,55,57,61,64,67] (Table 1). The exception, however, was the study in which the high psoralen concentration resulted in increased TRAP staining, as well as greater F-actin ring formation [66].

3.2 Coumarins and osteoclast activity

The activity of OCs is related to the action of several adhesion proteins, such as $\alpha_v\beta_3$ -integrin, and the enzymes CTSK, TRAP, and MMP-9 [79]. Cinnamoyloxy-mammeisin, decursin, esculetin, osthole, and praeruptorin A reduced the expression of α_v and/or β_3 -integrin *in vitro* [39,45,54,56,62,65]. 5'-Hydroxy auraptene, aesculin, bergapten, cinnamoyloxy-mammeisin, coumermycin A1, daphnetin, decursin, esculetin, fraxetin, novobiocin, osthole, praeruptorin A, psoralidin, scoparone, umbelliferone, wedelolactone, and xanthotoxin effectively reduced the expression of CTSK [38,39,43-45,48,52,54-58,60-65,67,68,69], and 5'-hydroxy auraptene, aesculin, cinnamoyloxy-mammeisin, collinin, daphnetin, and osthole [38,45,47,54,64,67,68] reduced that of MMP-9 (Fig. 3; Table 1). Only psoralen appeared to be associated with an increase in CTSK and TRAP [66].

To confirm the anti-osteoclastogenic effects of the various coumarins included in this review, we verified their role *in vitro* OC functionality tests. Psoralen was shown to be associated with increased pit formation in bone slices [66]; eight studies did not perform any *in*

in vitro functional reabsorption assay [8,43,46,53,56,59,65,67]. Nevertheless, most coumarins were reported to significantly reduce the resorptive function of OCs. Thus, 7-methoxycoumarin, bergapten, daphnetin, fraxetin, osthole, psoralidin, and xanthotoxin reduced pit formation on bone slices [44,49-52,55,57,60,68]; osthole reduced the reabsorbed area in osteoassay plates [45,63]; cinnamoyloxy-mammeisin, daphnetin, esculetin, and umbelliferone reduced the reabsorption area in hydroxyapatite-coated plates [39,54,58,64]; Coumermycin A1, decursin, and wedelolactone decreased the area in slices of tooth dentine [41,61,62,69]. The coumarins 5'-hydroxy auraptene and wedelolactone reduced the dissolution of calcium phosphate apatite-coated plate [38,42]; praeruptorin A decreased the dissolution of calcium phosphate thin films coated onto various culture vessels [48]; collinin decreased the release of collagen helical peptide on the human bone plate [47] (Table 1).

4 Discussion

Coumarins have several biological effects [21]. However, there is no consensus regarding their potential in the treatment of lytic bone diseases, considering that the intrinsic mechanisms of coumarins in this disease are not well understood. In this review, we summarize the studies published in the literature in the last 10 years regarding the mechanisms of action of coumarins in the formation and activation of *in vitro* OCs. Most of the articles included were published in the last 5 years, which shows a current trend in the investigation of coumarins as modulators of the osteoclastogenesis process.

In vitro research enables the investigation of intracellular pathways and molecular mechanisms that influence osteoclastogenesis [80]. Thus, the culture models considered in the various articles consist of classic methods that are fundamental for the study of bone biology and suitable for evaluating the effect of substances and products on the formation and activity of OCs [81].

Several isolated substances and compounds derived from medicinal plants, such as flavonoids, terpenoids, and alkaloids, exert effects on the formation and activity of OCs by modulating several intracellular signaling pathways and key regulators of the osteoclastogenesis process [82]. In nature, there exist highly diverse coumarin compounds, whose common base is the 1,2-benzopyrone oxa-heterocycle structure. It has been reported that substitution patterns can affect the pharmacological, biochemical, and therapeutic properties of coumarins [21]. For instance, based on the correlation between its chemical structure and the mechanism of its action on osteoclasts, the 8-prenyl group of the osthole molecule is related

with major antiosteoclastogenic and bone antiresorptive effects when compared to 7-methoxycoumarin, which does not contain the 8-prenyl group [49]. However, as different coumarins have been studied in different *in vitro* studies, the exact structure-activity relationship of the coumarins on osteoclasts is not yet fully understood.

Considering the intracellular pathways involved in osteoclastogenesis, coumarins have been reported to downregulate NF- κ B, MAPK, Akt, and Ca²⁺ signaling. The NF- κ B family, which consists of p50, p52, RelA, RelB, and c-Rel, is classically related to osteoclastogenesis. The canonical pathway activates most NF- κ B dimers as a result of I κ B phosphorylation, which is stimulated primarily by TNF- α . The non-canonical pathway leads to the activation of the p52–RelB-dependent p100 phosphorylation heterodimer. Many inducers comprise a subgroup of the TNF receptor superfamily, including RANK; the signal associated with this protein is mediated primarily by TRAF6. In the nucleus, NF- κ B initiates the transcription of target genes, such as NFATc1 [83]. 5'-Hydroxy auraptene, aesculin, bergapten, coumarin–triazole derivatives, daphnetin (high concentrations), osthole (low concentrations), psoralidin, and wedelolactone have been shown to reduce the activity of NF- κ B, which culminates in decreased osteoclastogenesis. Mice doubly deficient in p50 and p52 develop severe osteopetrosis [84]. Some coumarins, however, were not found to reduce NF- κ B, such as coumermycin A1, decursin, esculetin, psoralen, and umbelliferone, even though they are related to the reduction of osteoclastogenesis. This observation suggests that not all coumarins act on OCs via the NF- κ B pathway.

MAPK signaling induced by RANKL stimulation occurs through phosphorylation of ERK, JNK, and p38; the suppression of its activity reduces the formation of OCs [71]. In the studies included in this review, the coumarins 5'-hydroxy auraptene, aesculin, bergapten, coumermycin A1, daphnetin, decursin, fraxetin, praeruptorin A, psoralidin, and scoparone reduced at least one of the kinases through mechanisms related to the reduction of osteoclastogenesis. The use of the specific p38 inhibitor resulted in the inhibition of the differentiation of OCs [85], and the gene deletion of ERK1, JNK1, and p38 reduced the formation of OCs [86-88]. However, the coumarins esculetin and umbelliferone, which have exhibited the ability to reduce osteoclastogenesis, did not affect this pathway, regardless of NF- κ B and MAPK signaling.

MAPK signaling is associated with the AP-1/c-Fos axis, which regulates the differentiation of OCs [72]. c-Fos is a transcription factor, a member of the activator protein-1 (AP-1) family. c-Fos-knockout mice exhibit osteopetrosis [89], and overexpression of NFATc1 in cells with c-Fos deficiency rescued osteoclastogenesis [90]. Although the coumarins

esculetin, osthole, umbelliferone, wedelolactone, and xanthotoxin need to be further studied for their effect on the MAPK/AP-1 axis has not been fully evaluated [39,55,58,61,68], the coumarins 5'-hydroxy auraptene, bergapten, coumermycin A1, daphnetin, decursin, esculetin, osthole, praeruptorin A, psoralidin, scoparone, umbelliferone, wedelolactone, and xanthotoxin have been reported to downregulate the expression of c-Fos [38,39,43,48,52,55,57,58,61,62,64,68,69]. However, the other studies included in this review did not evaluate the c-Fos protein.

RANKL/RANK as well as M-CSF/c-Fms active PI3K induce Akt signaling in osteoclast precursors or mature osteoclasts to promote proliferation and differentiation, and to attenuate apoptosis of osteoclasts [73,91]. The use of the PI3K inhibitor (LY294002) reduces the survival of precursor cells of OCs [73]. Additionally, Akt deficiency impairs osteoclastogenesis and bone resorption [92] by regulating mTOR and GSK3 β /NFATc1 signaling cascades. In fact, the overexpression of a constitutively active form of GSK-3 β reduces the differentiation of OCs by downregulating NFATc1 [91,75], as well as the inhibitor of mTOR (rapamycin) reduces the differentiation and survival of OCs [74]. In this review, although esculetin and psoralen did not inhibit Akt phosphorylation, praeruptorin A and umbelliferone reduced Akt expression, wedelolactone inhibited Akt/mTOR signaling, and daphnetin suppressed activation of the Akt/GSK-3 β pathway, and no other Akt-dependent signaling was found related to coumarins, but these coumarins presented anti-osteoclastogenic activity.

The binding of RANKL to RANK on osteoclast precursors leads to the recruitment of TRAF6, which activates several downstream signaling pathways [29,30]. Besides NF- κ B, MAPK, and Akt pathways, increase in intracellular calcium concentration is a fundamental process for mediating osteoclastogenesis and bone resorption. The C γ 2 phospholipase (PLC γ 2) pathway is a co-stimulatory pathway for RANKL-dependent Ca²⁺ oscillation [93]. Cytosolic Ca²⁺ binds to calmodulin (CaM), which results in the activation of CaM-dependent enzymes such as phosphatase calcineurin [94,95] and favors the amplification of NFATc1. Oscillations in intracellular Ca²⁺ concentrations also depend on the pathway regulated by tyrosine kinase (SYK), through pairing with the osteoclast-associated receptor (OSCAR), followed by PLC γ 2 phosphorylation and activation of the Ca²⁺/calmodulin pathway, which induce self-amplification of NFATc1 [71,93].

Among the 5 studies that evaluated this pathway, praeruptorin A and xanthotoxin were associated with less Ca²⁺/calmodulin axis activity, consistent with the use of calmodulin antagonists (calmidazolium and trifluoperazine) that potently inhibit osteoclastogenesis and bone resorption by this route [96]. However, praeruptorin A, in addition to esculetin and

umbelliferone, did not reduce PLC γ ₂ phosphorylation. Interestingly, praeruptorin A reduced Ca²⁺ oscillations without decreasing PLC γ phosphorylation [48]. Recently, it was reported that RANKL-induced Ca²⁺ oscillation involves the release not only via PLC γ activation but also through Ca²⁺ channels, such as store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) and transient receptor potential (TRP), which contribute to the role of intracellular Ca²⁺ signaling in the differentiation of OCs [93]. In fact, 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) and SKF-96365, blockers of SOCE channels, were reported to significantly decrease osteoclastic survival and bone resorption [97]. Given the scarcity of studies evaluating the effects of coumarins on this pathway, Ca²⁺ signaling needs to be better explored, especially given the apparent potential of coumarins to modulate this pathway.

In this review, we found that most coumarins effectively reduced osteoclastogenesis. However, some coumarins, such as 7-methoxycoumarin, cinnamoyloxy-mammeisin, collinin, dalbergin, and novobiocin, have not been evaluated for the involvement of NF- κ B, MAPK, Akt, or Ca²⁺ signalings [47,53,54,69]. In addition, the mechanisms of action of coumarin–triazole derivatives and xanthotoxin have not been clearly elucidated since few pathways upstream of NFATc1 have been evaluated [46,55]. It is also noted that the reduction in osteoclastogenesis by Esculetin was not necessarily associated with NF- κ B, MAPK, Akt, or Ca²⁺ signaling signals. Interestingly, esculetin did not reduce the signaling of NF- κ B, MAPKs, Akt, and PLC γ ₂; however, it reduced the expression of c-Fos and NFATc1. In this context, the overexpression of c-Fos or NFATc1 reversed the action of esculetin on osteoclastogenesis, suggesting that the negative regulation of these genes was responsible for the inhibitory effect of this coumarin on OCs [39].

The NF- κ B, MAPK, Akt, and Ca²⁺ signaling pathways represent important pathways in the modulation of osteoclastic differentiation; all lead to the activation of NFATc1. Most coumarins reduced the expression of NFATc1, which was expected since NFATc1 is the master regulator of osteoclastogenesis; therefore, the inhibition of NFATc1 may be a common target for the anti-osteoclastogenic effects of coumarins. In fact, NFATc1 knockout mice exhibit an osteopetrotic bone phenotype [98]. In an NFATc1-deficient cell culture system, osteoclastogenesis is unsatisfactory. However, the ectopic expression of NFATc1 in these cells in the absence of RANKL can induce differentiation of OCs [99]. NF- κ B, MAPK, and Akt signaling lead to the initial induction of NFATc1, while Ca²⁺ signaling acts in the intermediate stage of osteoclastogenesis, facilitating the self-amplification of NFATc1. These events lead to the nuclear translocation of NFATc1 and consequent coding of specific genes for OCs [71]. In summary, the coumarins reduce upstream NFATc1 signaling pathways and thus compromise

the formation and function of OCs. However, processes downstream of NFATc1 can also contribute greatly to the de facto formation of OCs.

OC formation requires the expression of genes related to the fusion of pre-OCs, such as *Atp6v0d2* and *DC-STAMP* [100]. Although they are important in the osteoclastogenesis process, few studies have evaluated fusion markers, which may indicate that few targets have been explored with respect to the effect of coumarins. In this review, only daphnetin, decursin, and praeruptorin A were evaluated for their effect on these proteins; these coumarins have been reported to reduce the expression of *Atp6v0d2* and *DC-STAMP*, indicating that inhibition of cell fusion is one of their mechanisms for OC inhibition. In fact, mice deficient in *DC-STAMP* and *Atp6v0d2* presented osteopetrosis, with a predominance of undifferentiated mononuclear cells [100,101].

Active OCs need to adhere to the bone matrix to promote bone resorption, which occurs after the organization of its cytoskeleton and formation of the F-actin ring. Well-polarized actin rings are a prerequisite for efficient bone resorption [71,102]; this polarization process depends on $\alpha_v\beta_3$ -integrin, enabling OCs to adhere to the bone matrix by linking $\alpha_v\beta_3$ integrin receptors/bone matrix peptides [103]. Similar to the fusion markers of pre-OCs, markers of their adhesion to the bone matrix have been poorly studied. Thus, cinnamoyloxy-mammeisin, decursin, esculetin, osthole, and praeruptorin A efficiently reduced the expression of α_v and/or β_3 integrins, demonstrating their role in compromising the adhesion of OCs to the bone matrix and, consequently, affecting the expression of enzymes necessary for the dissolution of mineral hydroxyapatite and degradation of the organic matrix [104].

The dissolution and digestion of bone structure are the result of the activity of enzymes, including proteases, such as TRAP, CTSK, and MMP-9 [71,79]. In this review, with the exception of the study with psoralen [66], all other studies on coumarins, as expected, used TRAP staining as the main marker of osteoclastogenesis [77,78]. TRAP performs several functions in the bone system, such as skeletal development and collagen degradation [78]. Additionally, most coumarins were shown to reduce CTSK, which is expressed at high levels in OCs and the main function of which is collagen degradation [105]; CTSK-knockout mice developed osteopetrosis due to a deficiency in bone matrix degradation [106]. Few studies evaluated the inhibition of MMP-9 by certain coumarins, such as 5'-hydroxy auraptene, aesculin, cinnamoyloxy-mammeisin, collinin, daphnetin, and osthole. The role of MMPs mainly consists of degrading components of the extracellular matrix [107]. Additionally, certain coumarins have been shown to reduce V-ATPases, which, in addition to being related to cell differentiation, control the extracellular acidification of OCs; V-ATPases are a key factor in the

bone resorption environment [108]. Therefore, changes in the expression of these enzymes can lead to a reduction in bone resorption.

Studies related to the deficiency of hydrolysis of inorganic hydroxyapatite and reduced degradation of the organic bone matrix, primarily collagen, are essential for the evaluation of OC activity [109]. Although functional resorption *in vitro* has not been evaluated through the application of aesculin, coumarin–triazole derivatives, dalbergin, and novobiocin, these coumarins reduced the expression of TRAP, and many of them reduced bone loss in *in vivo* models [53,67,69]. In addition, the other coumarins efficiently reduced bone resorption. Furthermore, bergapten has been reported to induce apoptosis in mature OCs, suggesting that bergapten prevents osteoclastic bone resorption, primarily via inhibition of OC function and survival [51]. In particular, daphnetin (inhibiting NF- κ B, ERK, and Akt/GSK-3 β) and osthole (inhibiting NF- κ B and increasing the OPG/RANKL ratio) reduced the expression of CTSK, TRAP, and MMP-9 and inhibited the function of OC *in vitro*, as well as bone loss in LPS-induced osteolysis, ovariectomy, and renal osteodystrophy models [59,63,64,68]. These results indicate that they could be good candidates for bone resorption control.

The mechanisms of action of psoralen have not been well explored. In one of the studies reviewed here, low concentrations of psoralen reduced the nuclear translocation of c-jun, without affecting the phosphorylation of p65, I κ B, ERK, c-jun, and Akt [40] and without significant reduction in CTSK, MMP-9, and bone resorption in bone slices [40]. When used at high concentrations, psoralen increased the number and size of OCs and increased bone resorption in a concentration-dependent manner; these effects were associated with increased phosphorylation of ERK [66]. Nevertheless, psoralen has been shown to accelerate bone healing *in vivo* via facilitating bone remodeling; it has demonstrated the ability to potentiate the action of both OCs and OBs [66].

Other coumarins, such as aesculin, bergapten, cinnamoyloxy-mammeisin, dalbergin, daphnetin, decursin, fraxetin, novobiocin, osthole, praeruptorin A, psoralidin, umbelliferone, wedelolactone, and xanthotoxin reduced bone resorption in several *in vivo* models [52-65,67-69], consistent with *in vitro* results.

It is important to highlight that not all markers were considered throughout the reviewed articles, which does not imply that coumarins do not impact these markers. This indicates that there are several targets that need to be explored. In summary, most coumarins included in this review demonstrated downregulation of signaling pathways required for OC development, including NF- κ B, MAPK, Akt, and Ca²⁺ signaling, as well as processes downstream of the NFATc1 pathway, especially associated with important osteoclastogenesis genes, such as

Atp6v0d2, TRAP, CTSK, and MMP-9. These reports confirm the role of coumarins in restricting the formation and function of OCs.

5 Study limitation

1. Due to the heterogeneity of coumarins, cell types, stimuli for osteoclastogenesis, biomarkers, and differentiation periods, the data reported in this review could not be analyzed quantitatively.
2. In this review, only those factors that control the process of differentiation and activation of OCs through RANKL signaling were considered. We did not include factors that regulate the recruitment, migration, and adhesion of progenitor cells under inflammatory conditions.

6 Conclusion and future prospects

The studies included in this review showed that the mechanisms of action of various coumarins were consistent with anti-osteoclastogenic and anti-bone resorptive activity, which indicates the potential of coumarins in the control of bone diseases. However, further investigations are needed to clarify the pharmacological profile of some coumarins to guarantee their efficacy and safety and, therefore, justify the proposal for randomized controlled trials on these compounds. In summary, most studies have shown that coumarins reduce the formation and activity of OCs, with a consequent reduction in bone resorption.

Funding: This study was supported by grants from Brazilian government agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel [CAPES: 88887.476298/2020-00] and National Council for Scientific and Technological Development [CNPq: 428380/2016-6].

Declarations of interest: None.

Acknowledgments: We would like to thank Editage (www.editage.com) for English language editing.

Author contributions: **Samia Jessica Silva Tavares:** Methodology, Data curation, Writing - Original Draft. **Vilma Lima:** Methodology, Supervision, Writing - Review & Editing.

References

- [1] M.J. Matos, L. Santana, E. Uriarte, O.A. Abreu, E. Molina, E.G. Yordi, Coumarins — An Important Class of Phytochemicals, in: *Phytochem. - Isol. Characterisation Role Hum. Heal.*, InTech, (2015) 113-139. <https://doi.org/10.5772/59982>.
- [2] J. Ma, J. Huang, S. Hua, Y. Zhang, Y. Zhang, T. Li, L. Dong, Q. Gao, X. Fu, The ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Angelica biserrata* – A review, *J. Ethnopharmacol.* 231 (2019) 152-169. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.040>
- [3] J. Yi, Y. Zhou, W. Pan, Y. Li, W. Zhang, X. Ma, Protective effect and mechanism of volatile oil *angelica* intragastric administration on the treatment of rabbit knee osteoarthritis. *J. Clin. Orthop.* 16 (2013) 451–454.
- [4] Y.M. Li, M. Jia, H.Q. Li, N.D. Zhang, X. Wen, K. Rahman, Q.Y. Zhang, L.P. Qin, *Cnidium monnieri*: A review of traditional uses, phytochemical and ethnopharmacological properties, *Am. J. Chin. Med.* 43 (2015) 835–877. <https://doi.org/10.1142/S0192415X15500500>.
- [5] Y. Sun, A.W.H. Yang, G.B. Lenon, Phytochemistry, ethnopharmacology, pharmacokinetics and toxicology of *Cnidium monnieri* (L.) cusson, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1006. <https://doi.org/10.3390/ijms21031006>.
- [6] Q. Zhang, L. Qin, W. He, L. Van Puyvelde, D. Maes, A. Adams, H. Zheng, N. De Kimpe, Coumarins from *Cnidium monnieri* and their antiosteoporotic activity, *Planta Med.* 73 (2007) 13–19. <https://doi.org/10.1055/s-2006-951724>.
- [7] L.P. Qin, Q.Y. Zhang, Y.P. Tian, H.C. Zheng, M. Huang, B.K. Huang, Total coumarins from fruits of *Cnidium monnieri* inhibit formation and differentiation of multinucleated osteoclasts of rats, *Acta Pharmacol. Sin.* 24 (2003) 181–186.
- [8] Y.Q. Liu, L. Bin Zhan, T. Liu, M.C. Cheng, X.Y. Liu, H. Bin Xiao, Inhibitory effect of *Ecliptae herba* extract and its component wedelolactone on pre-osteoclastic proliferation and differentiation, *J. Ethnopharmacol.* 157 (2014) 206–211. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.033>.
- [9] Z.G. Zhang, D. Bai, M.J. Liu, Y. Li, J.H. Pan, H. Liu, W.L. Wang, L.H. Xiang, G.G. Xiao, D.H. Ju, Therapeutic effect of aqueous extract from *Ecliptae herba* on bone metabolism of ovariectomized rats, *Menopause.* 20 (2013) 232-240. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e318265e7dd>.
- [10] I.M. Chung, G. Rajakumar, J.H. Lee, S.H. Kim, M. Thiruvengadam, Ethnopharmacological uses, phytochemistry, biological activities, and biotechnological applications of *Eclipta prostrata*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 101 (2017) 5247–5257. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8363-9>.

- [11] B. Koul, P. Taak, A. Kumar, A. Kumar, I. Sanyal, Genus Psoralea: A review of the traditional and modern uses, phytochemistry and pharmacology, *J. Ethnopharmacol.* 232 (2019) 201–226. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.11.036>.
- [12] R.W.K. Wong, A.B.M. Rabie, Systemic effect of Fructus Psoraleae extract on bone in mice, *Phyther. Res.* 24 (2010) 1578–1580. <https://doi.org/10.1002/ptr.3184>.
- [13] X. Yuan, Y. Bi, Z. Yan, W. Pu, Y. Li, K. Zhou, Psoralen and Isopsoralen Ameliorate Sex Hormone Deficiency-Induced Osteoporosis in Female and Male Mice, *Biomed Res. Int.* 2016 (2016) 6869452. <https://doi.org/10.1155/2016/6869452>.
- [14] R. Carvalho, Cumaru-Ferro *Dipteryx odorata*. *Comun. Técnico Embrapa* 225 (2009) 1–8.
- [15] M.A.R. Sousa, V.H.P. Moutinho, S.S. Silva, Levantamento das espécies comercializadas vernacularmente como cumarú no estado do Pará. *Rev. Bras. Biociências* 5 (2007) 80–83.
- [16] F.A. Haskins, H.J. Gorz, Glucosides of Coumarinic and o-Coumaric Acids in the Tonka Bean, *Science.* 139 (1963) 496–497. <https://doi.org/10.1126/science.139.3554.496>.
- [17] Q. Gao, J. Shan, L. Di, L. Jiang, H. Xu, Therapeutic effects of daphnetin on adjuvant-induced arthritic rats, *J. Ethnopharmacol.* 120 (2008) 259–263. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.08.031>.
- [18] Huyiligeqi, X. Dong, C. Yang, G. Xu, S. Cao, J. Fu, L. Lin, J. Ni, Chemical constituents from *daphne giraldii nitsche* and their contents simultaneous determination by HPLC, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2016 (2016) 18–23. <https://doi.org/10.1155/2016/9492368>.
- [19] G. Moshvashvili, N. Tabatadze, V. Mshvildadze, The genus *Daphne*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology, *Fitoterapia.* 143 (2020) 104540. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104540>.
- [20] S. Penta, *Introduction to Coumarin and SAR*, Elsevier Inc., 2015. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803797-3.00001-1>.
- [21] A. Stefanachi, F. Leonetti, L. Pisani, M. Catto, A. Carotti, Coumarin: A natural, privileged and versatile scaffold for bioactive compounds, *Molecules.* 23 (2018) 250. <https://doi.org/10.3390/molecules23020250>.
- [22] A. Witacenis, L.N. Seito, A. Da Silveira Chagas, L.D. De Almeida, A.C. Luchini, P. Rodrigues-Orsi, S.H. Cestari, L.C. Di Stasi, Antioxidant and intestinal anti-inflammatory effects of plant-derived coumarin derivatives, *Phytomedicine.* 21 (2014) 240–246. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2013.09.001>.

- [23] S. Zhang, J. Ma, L. Sheng, D. Zhang, X. Chen, J. Yang, D. Wang, Total coumarins from *Hydrangea paniculata* show renal protective effects in lipopolysaccharide-induced acute kidney injury via anti-inflammatory and antioxidant activities, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 1–16. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00872>.
- [24] L.K.A.M. Leal, A.A.G. Ferreira, G.A. Bezerra, F.J.A. Matos, G.S.B. Viana, Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: A comparative study, *J. Ethnopharmacol.* 70 (2000) 151–159. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(99\)00165-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(99)00165-8).
- [25] H. Fan, Z. Gao, K. Ji, X. Li, J. Wu, Y. Liu, X. Wang, H. Liang, Y. Liu, X. Li, P. Liu, D. Chen, F. Zhao, The in vitro and in vivo anti-inflammatory effect of osthole, the major natural coumarin from *Cnidium monnieri* (L.) Cuss, via the blocking of the activation of the NF- κ B and MAPK/p38 pathways, *Phytomedicine.* 58 (2019) 152864. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152864>.
- [26] V. Lima, C.B. Silva, J. Mafezoli, M.M. Bezerra, M.O. Moraes, G.S.M.M. Mourão, J.N. Silva, M.C.F. Oliveira, Antinociceptive activity of the pyranocoumarin seselin in mice, *Fitoterapia.* 77 (2006) 574–578. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.09.005>.
- [27] M. Wadelius, M. Pirmohamed, Pharmacogenetics of warfarin: Current status and future challenges, *Pharmacogenomics J.* 7 (2007) 99–111. <https://doi.org/10.1038/sj.tpj.6500417>.
- [28] X. Zhu, X. Song, K. Xie, X. Zhang, W. He, F. Liu, Osthole induces apoptosis and suppresses proliferation via the PI3K/Akt pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma, *Int. J. Mol. Med.* 40 (2017) 1143–1151. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3113>.
- [29] L.I. Plotkin, A. Bruzzaniti. Molecular signaling in bone cells: Regulation of cell differentiation and survival, in: R. Donev (Eds.), *Adv Protein Chem Struct Biol*, 1st ed., Elsevier Inc., 2019, pp. 237–281. doi: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.002.
- [30] K. Redlich, J.S. Smolen, Inflammatory bone loss: Pathogenesis and therapeutic intervention, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 234–250. <https://doi.org/10.1038/nrd3669>.
- [31] I.B. McInnes, G. Schett, Mechanism of disease the pathogenesis of rheumatoid arthritis, *N. Engl. J. Med.* 365 (2011) 2205–2219.
- [32] S.K. Sandhu, G. Hampson, The pathogenesis, diagnosis, investigation and management of osteoporosis, *J. Clin. Pathol.* 64 (2011) 1042–1050. <https://doi.org/10.1136/jcp.2010.077842>.
- [33] J. Slots, Periodontitis: facts, fallacies and the future, *Periodontol.* 2000. 75 (2017) 7–23. <https://doi.org/10.1111/prd.12221>.

- [34] E.M. Lewiecki, Safety of long-term bisphosphonate therapy for the management of osteoporosis, *Drugs*. 71 (2011) 791–814. <https://doi.org/10.2165/11585470-000000000-00000>
- [35] C.E. Bowring, R.M. Francis, National Osteoporosis Society's Position Statement on hormone replacement therapy in the prevention and treatment of osteoporosis, *Menopause Int.* 17 (2011) 63–65. <https://doi.org/10.1258/mi.2011.011012>.
- [36] Z. Zhang, W.N. Leung, G. Li, Y.M. Lai, C.W. Chan, Osthole Promotes Endochondral Ossification and Accelerates Fracture Healing in Mice, *Calcif. Tissue Int.* 99 (2016) 649–660. <https://doi.org/10.1007/s00223-016-0189-4>.
- [37] D. Moher, L. Shamseer, M. Clarke, D. Ghersi, A. Liberati, M. Petticrew, P. Shekelle, L. Stewart, PRISMA-P, Evaluation of ASTM Standard Test Method E 2177, 6 Retroreflectivity of Pavement Markings in a Condition of 7 Wetness, *Syst. Rev.* (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-1>.
- [38] B.M. Abdallah, E.M. Ali, H. Elsayy, G.M. Badr, A.M. Abdel-Moneim, A.M. Alzahrani, The Coumarin Derivative 5'-Hydroxy Auraptene Suppresses Osteoclast Differentiation via Inhibiting MAPK and c-Fos/NFATc1 Pathways, *Biomed Res. Int.* 2019 (2019) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/9395146>.
- [39] J.M. Baek, S.H. Park, Y.H. Cheon, S.J. Ahn, M.S. Lee, J. Oh, J.Y. Kim, Esculetin attenuates receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand-mediated osteoclast differentiation through c-Fos/nuclear factor of activated T-cells c1 signaling pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461 (2015) 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.034>.
- [40] L. Chai, K. Zhou, S. Wang, H. Zhang, N. Fan, J. Li, X. Tan, L. Hu, X. Fan, Psoralen and Bakuchiol Ameliorate M-CSF Plus RANKL-Induced Osteoclast Differentiation and Bone Resorption Via Inhibition of AKT and AP-1 Pathways in Vitro, *Cell. Physiol. Biochem.* 48 (2018) 2123–2133. <https://doi.org/10.1159/000492554>.
- [41] X. Deng, L.N. Liang, D. Zhu, L.P. Zheng, J.H. Yu, X. ling Meng, Y.N. Zhao, X.X. Sun, T.W. Pan, Y.Q. Liu, Wedelolactone inhibits osteoclastogenesis but enhances osteoblastogenesis through altering different semaphorins production, *Int. Immunopharmacol.* 60 (2018) 41–49. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.04.037>.
- [42] C.J. Hsieh, P.L. Kuo, M.F. Hou, J.Y. Hung, F.R. Chang, Y.C. Hsu, Y.F. Huang, E.M. Tsai, Y.L. Hsu, Wedelolactone inhibits breast cancer-induced osteoclastogenesis by decreasing Akt/mTOR signaling, *Int. J. Oncol.* 46 (2015) 555–562. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2769>.
- [43] S.H. Lee, H.D. Jang, Scoparone attenuates RANKL-induced osteoclastic differentiation through controlling reactive oxygen species production and scavenging, *Exp. Cell Res.* 331 (2015) 267–277. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.12.018>.

- [44] X. Liu, X. Gao, Y. Liu, D. Liang, T. Fu, Y. Song, C. Zhao, B. Dong, W. Han, Daphnetin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in vitro, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 2304–2312. <https://doi.org/10.1002/jcb.27555>.
- [45] Y. Ma, L. Wang, S. Zheng, J. Xu, Y. Pan, P. Tu, J. Sun, Y. Guo, Osthole inhibits osteoclasts formation and bone resorption by regulating NF- κ B signaling and NFATc1 activations stimulated by RANKL, *J. Cell. Biochem.* 120 (2019) 16052–16061. <https://doi.org/10.1002/jcb.28886>.
- [46] B. Rama Krishna, D. Thummuri, V.G.M. Naidu, S. Ramakrishna, U. Venkata Mallavadhani, Synthesis of some novel orcinol based coumarin triazole hybrids with capabilities to inhibit RANKL-induced osteoclastogenesis through NF- κ B signaling pathway, *Bioorg. Chem.* 78 (2018) 94–102. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2018.03.005>.
- [47] J. Santos, A. Marquis, F. Epifano, S. Genovese, M. Curini, D. Grenier, Collinin Reduces Porphyromonas gingivalis Growth and Collagenase Activity and Inhibits the Lipopolysaccharide-Induced Macrophage Inflammatory Response and Osteoclast Differentiation and Function, *J. Periodontol.* 84 (2013) 704–711. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120118>.
- [48] J.T. Yeon, K.J. Kim, S.W. Choi, S.H. Moon, Y.S. Park, B.J. Ryu, J. Oh, M.S. Kim, M. Erkhembaatar, Y.J. Son, S.H. Kim, Anti-osteoclastogenic activity of praeuptorin a via inhibition of p38/Akt-c-Fos-NFATc1 signaling and PLC γ -independent Ca²⁺ oscillation, *PLoS One.* 9 (2014) e88974. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088974>.
- [49] Y.K. Zhai, Y.L. Pan, Y.B. Niu, C.R. Li, X.L. Wu, W.T. Fan, T.L. Lu, Q.B. Mei, C.J. Xian, The importance of the prenyl group in the activities of osthole in enhancing bone formation and inhibiting bone resorption in vitro, *Int. J. Endocrinol.* 2014 (2014) 1–16. <https://doi.org/10.1155/2014/921954>.
- [50] Y. Zhai, Y. Li, Y. Wang, J. Cui, K. Feng, X. Kong, L. Chen, Psoralidin, a prenylated coumestan, as a novel anti-osteoporosis candidate to enhance bone formation of osteoblasts and decrease bone resorption of osteoclasts, *Eur. J. Pharmacol.* 801 (2017) 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.03.001>.
- [51] M. Zheng, Y. Ge, H. Li, M. Yan, J. Zhou, Y. Zhang, Bergapten prevents lipopolysaccharide mediated osteoclast formation, bone resorption and osteoclast survival, *Int. Orthop.* 38 (2014) 627–634. <https://doi.org/10.1007/s00264-013-2184-y>.
- [52] G. Chen, Q. Xu, M. Dai, X. Liu, Bergapten suppresses RANKL-induced osteoclastogenesis and ovariectomy-induced osteoporosis via suppression of NF- κ B and JNK signaling pathways, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 509 (2019) 329–334. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.12.112>.
- [53] D. Choudhary, P. Kushwaha, J. Gautam, P. Kumar, A. Verma, A. Kumar, S.W. Maurya, I.R. Siddiqui, P.R. Mishra, R. Maurya, R. Trivedi, Fast and long acting

neoflavonoids dalbergin isolated from *Dalbergia sissoo* heartwood is osteoprotective in ovariectomized model of osteoporosis: Osteoprotective effect of Dalbergin, *Biomed. Pharmacother.* 83 (2016) 942–957. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.010>.

[54] M.G. Da Cunha, E.S. Ramos-Junior, M. Franchin, T.M. Taira, J.A. Beutler, G.C.N. Franco, M. Ikegaki, S.M. De Alencar, S.Y. Fukada, P.L. Rosalen, Effects of Cinnamoyloxy-mammeisin from Geopropolis on Osteoclast Differentiation and Porphyromonas gingivalis-Induced Periodontitis, *J. Nat. Prod.* 80 (2017) 1893–1899. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00194>.

[55] C. Dou, Y. Chen, N. Ding, N. Li, H. Jiang, C. Zhao, F. Kang, Z. Cao, H. Quan, F. Luo, J. Xu, S. Dong, Xanthotoxin prevents bone loss in ovariectomized mice through the inhibition of RANKL-induced osteoclastogenesis, *Osteoporos. Int.* 27 (2016) 2335–2344. <https://doi.org/10.1007/s00198-016-3496-8>.

[56] K.J. Kim, J.T. Yeon, S.W. Choi, S.H. Moon, B.J. Ryu, R. Yu, S.J. Park, S.H. Kim, Y.J. Son, Decursin inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 and blocking fusion of pre-osteoclasts, *Bone.* 81 (2015) 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.023>.

[57] L. Kong, R. Ma, X. Yang, Z. Zhu, H. Guo, B. He, B. Wang, D. Hao, Psoralidin suppresses osteoclastogenesis in BMMs and attenuates LPS-mediated osteolysis by inhibiting inflammatory cytokines, *Int. Immunopharmacol.* 51 (2017) 31–39. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.07.003>.

[58] S.C. Kwak, J.M. Baek, C.H. Lee, K.H. Yoon, M.S. Lee, J.Y. Kim, Umbelliferone prevents lipopolysaccharide-induced bone loss and suppresses rankl-induced osteoclastogenesis by attenuating akt-c-fos-nfatc1 signaling, *Int. J. Biol. Sci.* 15 (2019) 2427–2437. <https://doi.org/10.7150/ijbs.28609>.

[59] X. Li, C. Xue, L. Wang, D. Tang, J. Huang, Y. Zhao, Y. Chen, D. Zhao, Q. Shi, Y. Wang, B. Shu, Osteoprotective effects of osthole in a mouse model of 5/6 nephrectomy through inhibiting osteoclast formation, *Mol. Med. Rep.* 14 (2016) 3769–3776. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5687>.

[60] J.C. Liao, Z.X. Wei, C. Zhao, Z.P. Ma, D.Z. Cai, Inhibition of osteoclastogenesis for periprosthetic osteolysis therapy through the suppression of p38 signaling by fraxetin, *Int. J. Mol. Med.* 42 (2018) 1257–1264. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3698>.

[61] Y.Q. Liu, Z.L. Hong, L. Bin Zhan, H.Y. Chu, X.Z. Zhang, G.H. Li, Wedelolactone enhances osteoblastogenesis by regulating Wnt/ β -catenin signaling pathway but suppresses osteoclastogenesis by NF- κ B/c-fos/NFATc1 pathway, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep32260>.

- [62] X. Wang, T. Zheng, J.H. Kang, H. Li, H. Cho, R. Jeon, J.H. Ryu, M. Yim, Decursin from *Angelica gigas* suppresses RANKL-induced osteoclast formation and bone loss, *Eur. J. Pharmacol.* 774 (2016) 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.01.008>.
- [63] L. Wang, S. Zheng, G. Huang, J. Sun, Y. Pan, Y. Si, P. Tu, G. Xu, Y. Ma, Y. Guo, Osthole-loaded N-octyl-O-sulfonyl chitosan micelles (NSC-OST) inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis and prevents ovariectomy-induced bone loss in rats, *J. Cell. Mol. Med.* 24 (2020) 4105–4117. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15064>.
- [64] Z. Wu, H. Wu, C. Li, F. Fu, J. Ding, S. Shao, K. Li, X. Yu, Y. Su, J. Liang, X. Lin, G. Yuan, J. Zhou, F. Song, J. Zhao, J. Xu, Q. Liu, F. Xu, Daphnetin attenuates LPS-induced osteolysis and RANKL mediated osteoclastogenesis through suppression of ERK and NFATc1 pathways, *J. Cell. Physiol.* 234 (2019) 17812–17823. <https://doi.org/10.1002/jcp.28408>.
- [65] J.T. Yeon, S.W. Choi, B.J. Ryu, K.J. Kim, J.Y. Lee, B.J. Byun, Y.J. Son, S.H. Kim, Praeruptorin A inhibits in vitro migration of preosteoclasts and in vivo bone erosion, possibly due to its potential to target calmodulin, *J. Nat. Prod.* 78 (2015) 776–782. <https://doi.org/10.1021/np501017z>.
- [66] T. Zhang, W. Han, K. Zhao, W. Yang, X. Lu, Y. Jia, A. Qin, Y. Qian, Psoralen accelerates bone fracture healing by activating both osteoclasts and osteoblasts, *FASEB J.* 33 (2019) 5399–5410. <https://doi.org/10.1096/fj.201801797R>.
- [67] X. li Zhao, L. feng Chen, Z. Wang, Aesculin modulates bone metabolism by suppressing receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL)-induced osteoclastogenesis and transduction signals, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 488 (2017) 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.04.148>.
- [68] D. Zhao, Q. Wang, Y. Zhao, H. Zhang, N. Sha, D. Tang, S. Liu, S. Lu, Q. Shi, Y. Zhang, Y. Dong, Y. Wang, B. Shu, The naturally derived small compound Osthole inhibits osteoclastogenesis to prevent ovariectomy-induced bone loss in mice, *Menopause.* 25 (2018) 1459–1469. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000001150>.
- [69] T. Zheng, A.L.S.M. Noh, H. Park, M. Yim, Aminocoumarins inhibit osteoclast differentiation and bone resorption via downregulation of nuclear factor of activated T cells c1, *Biochem. Pharmacol.* 85 (2013) 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.10.022>.
- [70] G.O. Samuel, S. Hoffmann, R.A. Wright, M.M. Lalu, G. Patlewicz, R.A. Becker, G.L. DeGeorge, D. Fergusson, T. Hartung, R.J. Lewis, M.L. Stephens, Guidance on assessing the methodological and reporting quality of toxicologically relevant studies: A scoping review, *Environ. Int.* 92–93 (2016) 630–646. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.03.010>.
- [71] J.H. Park, N.K. Lee, S.Y. Lee, Current understanding of RANK signaling in osteoclast differentiation and maturation, *Mol. Cells.* 40 (2017) 706–713. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0225>.

- [72] K. Lee, I. Seo, M.H. Choi, D. Jeong, Roles of mitogen-activated protein kinases in osteoclast biology, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3004. <https://doi.org/10.3390/ijms19103004>.
- [73] S.E. Lee, K.M. Woo, S.Y. Kim, H.M. Kim, K. Kwack, Z.H. Lee, H.H. Kim, The phosphatidylinositol 3-Kinase, p38, and extracellular signal-regulated kinase pathways are involved in osteoclast differentiation, *Bone*. 30 (2002) 71–77. [https://doi.org/10.1016/S8756-3282\(01\)00657-3](https://doi.org/10.1016/S8756-3282(01)00657-3).
- [74] K. Tiedemann, D. Le Nihouannen, J.E. Fong, O. Hussein, J.E. Barralet, S. V. Komarova, Regulation of osteoclast growth and fusion by mTOR/raptor and mTOR/ricor/Akt, *Front. Cell Dev. Biol.* 5 (2017) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00054>.
- [75] H.D. Jang, J.H. Shin, D.R. Park, J.H. Hong, K. Yoon, R. Ko, C.Y. Ko, H.S. Kim, D. Jeong, N. Kim, S.Y. Lee, Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β is required for osteoclast differentiation, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 39043–39050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.256768>.
- [76] I. Song, J.H. Kim, K. Kim, H.M. Jin, B.U. Youn, N. Kim, Regulatory mechanism of NFATc1 in RANKL-induced osteoclast activation, *FEBS Lett.* 583 (2009) 2435–2440. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.06.047>.
- [77] S. Burstone, Histochemical demonstration of acid phosphatase activity in osteoclasts, *J. Histochem. Cytochem.* 7 (1959) 39–41. <https://doi.org/10.1177/7.1.39>
- [78] A. Hayman, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41 (2008) 218–223. <https://doi.org/10.1080/08916930701694667>
- [79] T. Nakashima, M. Hayashi, H. Takayanagi, New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms, *Trends Endocrinol. Metab.* 23 (2012) 582–590. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2012.05.005>.
- [80] E.W. Bradley, M.J. Oursler, Osteoclast Culture and Resorption Assays, in: *Methods Bone Biol.*, Springer US, Boston, MA, 2008: pp. 19–35. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-104-8_2.
- [81] S. Marino, J.G. Logan, D. Mellis, M. Capulli, Generation and culture of osteoclasts, *Bonekey Rep.* 3 (2014) 1–9. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2014.65>.
- [82] J. An, D. Hao, Q. Zhang, B. Chen, R. Zhang, Y. Wang, H. Yang, Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption, *Int. Immunopharmacol.* 36 (2016) 118–131. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.024>.

- [83] B.F. Boyce, Y. Xiu, J. Li, L. Xing, Z. Yao, NF- κ B-mediated regulation of osteoclastogenesis, *Endocrinol. Metab.* 30 (2015) 35–44.
<https://doi.org/10.3803/EnM.2015.30.1.35>.
- [84] V. Iotsova, J. Caamaño, J. Loy, Y. Yang, A. Lewin, R. Bravo, Osteopetrosis in mice lacking NF- κ B1 and NF- κ B2, *Nat. Med.* 3 (1997) 1285–1289.
<https://doi.org/10.1038/nm1197-1285>.
- [85] M. Matsumoto, T. Sudo, T. Saito, H. Osada, M. Tsujimoto, Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway in osteoclastogenesis mediated by receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL), *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 31155–31161.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M001229200>.
- [86] C. Böhm, S. Hayer, A. Kilian, M.M. Zaiss, S. Finger, A. Hess, K. Engelke, G. Kollias, G. Krönke, J. Zwerina, G. Schett, J.-P. David, The α -Isoform of p38 MAPK Specifically Regulates Arthritic Bone Loss, *J. Immunol.* 183 (2009) 5938–5947.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901026>.
- [87] J.P. David, K. Sabapathy, O. Hoffman, M.H. Idarraga, E.F. Wagner, JNK1 modulates osteoclastogenesis through both c-Jun phosphorylation-dependent and -independent mechanisms, *J. Cell Sci.* 115 (2002) 4317–4325. <https://doi.org/10.1242/jcs.00082>.
- [88] Y. He, K. Staser, S.D. Rhodes, Y. Liu, X. Wu, S.J. Park, J. Yuan, X. Yang, X. Li, L. Jiang, S. Chen, F.C. Yang, Erk1 positively regulates osteoclast differentiation and bone resorptive activity, *PLoS One.* 6 (2011) e24780.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024780>.
- [89] Z.Q. Wang, C. Ovitt, A.E. Grigoriadis, U. Möhle-Steinlein, U. Rüther, E.F. Wagner, Bone and haematopoietic defects in mice lacking c-fos, *Nature.* 360 (1992) 741–745.
<https://doi.org/10.1038/360741a0>.
- [90] K. Matsuo, D.L. Galson, C. Zhao, L. Peng, C. Laplace, K.Z.Q. Wang, M.A. Bachler, H. Amano, H. Aburatani, H. Ishikawa, E.F. Wagner, Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 26475–26480. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313973200>.
- [91] J.B. Moon, J.H. Kim, K. Kim, B.U. Youn, A. Ko, S.Y. Lee, N. Kim, Akt Induces Osteoclast Differentiation through Regulating the GSK3 β /NFATc1 Signaling Cascade, *J. Immunol.* 188 (2012) 163–169. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101254>.
- [92] N. Kawamura, F. Kugimiya, Y. Oshima, S. Ohba, T. Ikeda, T. Saito, Y. Shinoda, Y. Kawasaki, N. Ogata, K. Hoshi, T. Akiyama, W.S. Chen, N. Hay, K. Tobe, T. Kadowaki, Y. Azuma, S. Tanaka, K. Nakamura, U. Il Chung, H. Kawaguchi, Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling, *PLoS One.* 2 (2007).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001058>.

- [93] J.Y. Kang, N. Kang, Y.M. Yang, J.H. Hong, D.M. Shin, The role of Ca²⁺-nfatc1 signaling and its modulation on osteoclastogenesis, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms21103646>.
- [94] S. Feske, J. Giltneane, R. Dolmetsch, L.M. Staudt, A. Rao, Gene regulation mediated by calcium signals in T lymphocytes, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 316–324. <https://doi.org/10.1038/86318>.
- [95] L. Zhang, X. Feng, J.M. McDonald, The role of calmodulin in the regulation of osteoclastogenesis, *Endocrinology.* 144 (2003) 4536–4543. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0147>.
- [96] J.P. Williams, H.C. Blair, M.A. McKenna, S.E. Jordan, J.M. McDonald, Regulation of avian osteoclastic H⁺-ATPase and bone resorption by tamoxifen and calmodulin antagonists: Effects independent of steroid receptors, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12488–12495. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.21.12488>.
- [97] R. Mentaverri, S. Kamel, M. Brazier, Involvement of capacitive calcium entry and calcium store refilling in osteoclastic survival and bone resorption process, *Cell Calcium.* 34 (2003) 169–175. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00080-0](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00080-0).
- [98] M.M. Winslow, M. Pan, M. Starbuck, E.M. Gallo, L. Deng, G. Karsenty, G.R. Crabtree, Calcineurin/NFAT Signaling in Osteoblasts Regulates Bone Mass, *Dev. Cell.* 10 (2006) 771–782. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.04.006>.
- [99] H. Takayanagi, S. Kim, T. Koga, H. Nishina, M. Isshiki, H. Yoshida, A. Saiura, M. Isobe, T. Yokochi, J.I. Inoue, E.F. Wagner, T.W. Mak, T. Kodama, T. Taniguchi, Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts, *Dev. Cell.* 3 (2002) 889–901. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(02\)00369-6](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(02)00369-6).
- [100] K. Kim, S.H. Lee, H.K. Jung, Y. Choi, N. Kim, NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the Dendritic Cell-Specific Transmembrane Protein (DC-STAMP), *Mol. Endocrinol.* 22 (2008) 176–185. <https://doi.org/10.1210/me.2007-0237>.
- [101] M. Yagi, T. Miyamoto, Y. Sawatani, K. Iwamoto, N. Hosogane, N. Fujita, K. Morita, K. Ninomiya, T. Suzuki, K. Miyamoto, Y. Oike, M. Takeya, Y. Toyama, T. Suda, DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 345–351. <https://doi.org/10.1084/jem.20050645>.
- [102] T. Akisaka, H. Yoshida, S. Inoue, K. Shimizu, Organization of cytoskeletal F-actin, G-actin, and gelsolin in the adhesion structures in cultured osteoclast, *J. Bone Miner. Res.* 16 (2001) 1248–1255. <https://doi.org/10.1359/jbmr.2001.16.7.1248>.

- [103] I. Holt, M.J. Marshall, Integrin subunit $\beta 3$ plays a crucial role in the movement of osteoclasts from the periosteum to the bone surface, *J. Cell. Physiol.* 175 (1998) 1–9. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199804\)175:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-S](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199804)175:1<1::AID-JCP1>3.0.CO;2-S).
- [104] F.P. Ross, S.L. Teitelbaum, $\alpha\beta 3$ and macrophage colony-stimulating factor: Partners in osteoclast biology, *Immunol. Rev.* 208 (2005) 88–105. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2005.00331.x>.
- [105] M.T. Drake, B.L. Clarke, M.J. Oursler, S. Khosla, Cathepsin K inhibitors for osteoporosis: Biology, potential clinical utility, and lessons learned, *Endocr. Rev.* 38 (2017) 325–350. <https://doi.org/10.1210/er.2015-1114>.
- [106] M. Gowen, F. Lazner, R. Dodds, R. Kapadia, J. Feild, M. Tavarria, I. Bertoncello, F. Drake, S. Zavarselk, I. Tellis, P. Hertzog, C. Debouck, I. Kola, Cathepsin K knockout mice develop osteopetrosis due to a deficit in matrix degradation but not demineralization, *J. Bone Miner. Res.* 14 (1999) 1654–1663. <https://doi.org/10.1359/jbmr.1999.14.10.1654>.
- [107] C.C. Lynch, L.M. Matrisian, Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication, *Differentiation.* 70 (2002) 561–573. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2002.700909.x>.
- [108] X. Duan, S. Yang, L. Zhang, T. Yang, V-ATPases and osteoclasts: Ambiguous future of V-ATPases inhibitors in osteoporosis, *Theranostics.* 8 (2018) 5379–5399. <https://doi.org/10.7150/thno.28391>.
- [109] T. Miyazaki, S. Miyauchi, T. Anada, H. Imaizumi, O. Suzuki, Evaluation of osteoclastic resorption activity using calcium phosphate coating combined with labeled polyanion, *Anal. Biochem.* 410 (2011) 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.11.014>.

ANEXO

ANEXO I – CERTIFICADO DA CEUA UFC



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORPTIVO DE CUMARINAS NA REABSORÇÃO ÓSSEA ALVEOLAR EM CAMUNDONGOS", protocolada sob o CEUA nº 9597020519 (ID 001071), sob a responsabilidade de **Vilma de Lima** e equipe; *Samia Jéssica da Silva Tavares; Iracema Matos de Melo* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (CEUA-UFC) na reunião de 18/06/2019.

We certify that the proposal "EVALUATION OF ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIRREABSORPTIVE POTENTIAL OF CUMARINES IN ALVEOLAR BONE REABSORPTION IN MICE ", utilizing 224 Heterogenics mice (224 males), protocol number CEUA 9597020519 (ID 001071), under the responsibility of **Vilma de Lima** and team; *Samia Jéssica da Silva Tavares; Iracema Matos de Melo* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Ceará (CEUA-UFC) in the meeting of 06/18/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **07/2019** a **06/2021**

Área: **Departamento de Fisiologia E Farmacologia**

Origem: **Biotério Prof. Eduardo Torres (setorial FAMED)**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 6 semanas**

N: **224**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **18 a 20 g**

Local do experimento: **Biotério Setorial da FAMED, vinculados ao Departamento de Fisiologia e Farmacologia (DFF).**

Fortaleza, 22 de setembro de 2019

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindé

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Profa. Dra. Camila Ferreira Roncari

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

DECLARAÇÃO

Eu, **Marcos Paulo Brito de Sousa**, RG: 2209136 SSP/PI, CPF: 025.940.713-58, licenciado em Letras/Inglês pela Universidade Federal do Piauí (UFPI), com matrícula 04H13997 e professor efetivo da Secretaria Municipal de Educação (SEMEC), com matrícula 78765, declaro para os devidos fins de direito ter realizado a correção ortográfica e gramatical do Trabalho de conclusão de curso intitulado: **“EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTIRREABSORTIVO ÓSSEO DA CUMARINA E DA UMBELIFERONA NA PERIODONTITE VIA INIBIÇÃO DE IL-1 β EM CAMUNDONGOS”**, da mestranda *Samia Jéssica da Silva Tavares* do CPF de nº 054.084.043-23 e RG de nº 20074374329 SSP/CE, do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará.

Por ser verdade firmo o presente.

Teresina, 18 de Outubro de 2021.


Marcos Paulo Brito de Sousa