



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

Desenvolvimento de um gel contendo troxerrutina e aplicação com atividade antioxidante e anti-inflamatória em modelo de periodontite em camundongos

FORTALEZA

2024

ANDRE TAVARES DE FREITAS FIGUEREDO DIAS

Desenvolvimento de um gel contendo troxerrutina e aplicação com atividade antioxidante e anti-inflamatória em modelo de periodontite em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia celular e tecidual.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

Coorientadora: Prof^aDr^a Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- D53d Dias, Andre Tavares de Freitas Figueredo.
Desenvolvimento de um gel contendo troxerrutina e aplicação com atividade antioxidante e antiinflamatória em modelo de periodontite em camundongos / Andre Tavares de Freitas Figueredo Dias. – 2024.
51 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Fortaleza, 2024.
Orientação: Profa. Dra. Renata Ferreira de Carvalho
Leitão. Coorientação: Profa. Dra. Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro.
1. Reabsorção Óssea. 2. Periodontite. 3. Flavonoides. 4. Derivados da Hipromelose. I. Título.
CDD 611
-

ANDRE TAVARES DE FREITAS FIGUEREDO DIAS

Desenvolvimento de um gel contendo troxerrutina e aplicação com atividade antioxidante e anti-inflamatória em modelo de periodontite em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará como requisito para obtenção de título de Mestre em Ciências Morfofuncionais. Área de Concentração: Biologia celular e tecidual.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata Ferreira de Carvalho Leitão

Coorientadora: Prof^aDr^a Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro

Aprovado em 19/02/2024.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Renata Ferreira de Carvalho Leitão (orientadora)
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a. Dr^a. Ana Beatriz Graça Duarte
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof^a.Dr^a Helliada de Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará - UFC

FORTALEZA

2024

A Deus e a todos meus professores que acreditaram em mim.

Em especial, aos meus pais, Vanderléa Tavares e Francisco Roberto, pelo imenso apoio.

Mainha e painho, amo vocês.

AGRADECIMENTOS

A minha professora Dr^a Elenir Ribeiro, que me a concebeu a oportunidade de ingressar na iniciação científica e me encaminhar para o mestrado. Sempre lembrando dos aniversários de seus orientandos, sem contar as festinhas comemorativas que fazia questão de fazer-las.

A minha professora Dr^a Renata Leitão, que me acolheu no programa da pós-graduação. Nesses 2 anos de mestrado consegui engrandecer exponencialmente minha formação profissional e científica, que me permitiram estar inserido no meio da docência e pesquisa.

A Dr^a Josyane Martins, por toda ajuda, conhecimento e edificação profissional e científica. Sempre com um bom humor e muitas histórias. Pelo seu caráter profissional, disponibilidade e sugestões pertinentes em todo o decorrer deste trabalho.

Ao meu professor de filosofia e sociologia do ensino médio, Dr Mário Thé, que conseguiu somar críticas construtivas em relação aos estudos. Jamais me esquecerei quando me chamou em sua mesa e me falou “Andre, você, de toda a turma, foi o único que fez a atividade diferente dos demais, meus parabéns, mas precisa melhorar”. Sim, professor, estou tentando melhorar um pouquinho mais a cada dia.

Ao professor Dr Jannison Ribeiro que foi minha fonte primária de inspiração para seguir a carreira de pesquisa e docência durante a graduação de biomedicina.

A todos os professores do Programas de Pós-graduação em Ciências Morfofuncionais da Universidade Federal do Ceará que contribuíram em minha formação.

A todos os colegas do Laboratório de Polímeros e Inovação de Materiais e do Núcleo de Estudos em Microscopia e Processamento de Imagem, que conviveram comigo durante todo esse período, na qual estabeleci laços especiais de amizade. Especialmente, João Neto, Matheus Câmpelo, Matheus Moraes, Beatriz Nogueira, George de Almeida, Álamo Lourenço, Emanuel Freires, Rafaela Franco, Luana Gaudêncio e Maick Marques. Por muitas vezes foram e são uma grande família para mim.

A técnica do laboratório Ludimila Gomes pela paciência e dedicação para algumas etapas essenciais na construção deste trabalho. Por sua serenidade em todas as solicitações feitas por mim e sempre atendidas prontamente.

Ao auxiliar de laboratório Michel Nogueira que me ajudou em diversos momentos. Um companheiro exímio, que me rende sempre bons momentos quando estamos juntos.

Aos meus gatinhos cristal e mobim, que me sustentaram em momentos de crise estudantil com suas fofuras, carinhos e muitos ronronados.

Ao coordenador da Escola Técnica CETESA de Maracanaú, João Paulo, pela oportunidade de contribuir com o meu crescimento profissional na docência.

RESUMO

A periodontite é uma doença caracterizada por inflamação crônica. Sua principal causa é de natureza infecciosa, afetando os tecidos que sustentam os dentes. Esta condição pode desempenhar um papel no desenvolvimento de várias condições patológicas, uma vez que as bactérias associadas ao seu desenvolvimento liberam substâncias inflamatórias e toxinas, as quais entram na corrente sanguínea, podendo desencadear inflamação sistêmica. Produtos naturais, como a troxerrutina, derivada da rutina, têm sido objeto de estudo devido às suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, além de facilitar o reparo ósseo. O presente trabalho objetivou estudar, pela primeira vez, a ação de um gel contendo troxerrutina no tratamento da periodontite experimental, investigando os possíveis mecanismos associados. A periodontite foi induzida em 48 camundongos, previamente anestesiados, através da colocação de um fio de sutura de algodão ao redor dos primeiros molares inferiores. Os animais foram divididos em cinco grupos: grupo controle sem indução da doença (naive), um grupo controle com periodontite e que recebeu a aplicação local de um gel contendo apenas o veículo de diluição (HPMC) e três grupos que receberam a aplicação local do gel contendo diferentes concentrações de troxerrutina (0,1%, 0,5% e 1%) após a colocação do fio, 1 vez ao dia durante 11 dias. A eutanásia ocorreu no 11º dia e as mandíbulas foram coletadas para as análises histopatológicas, contagem de osteoclastos e para os estudos morfométricos da perda óssea. Realizou-se ainda a dosagem de fosfatase alcalina óssea no sangue coletado no 11º dia e análise de RANKL e OPG por western blotting. Os tecidos gengivais foram dissecados e imediatamente congelados até a realização dos ensaios para a verificação das concentrações de marcadores de estresse oxidativo (avaliação indireta de NO por nitrito/nitrato, glutathione reduzida -GSH- e malondialdeído -MDA). Os animais tratados com os géis contendo troxerrutina apresentaram uma diminuição significativa do infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais concomitante com uma menor contagem de osteoclastos ativos em relação ao grupo HPMC. Esse resultado foi associado a um menor índice de perda óssea alveolar corroborando com uma maior expressão de OPG e uma menor expressão de RANKL nos grupos tratados com troxerrutina (0,5% e 1%) em relação ao grupo HPMC. Ainda, observou-se diferenças estatísticas na dosagem de fosfatase alcalina nos grupos tratados com troxerrutina (0,5% e 1%) em relação ao grupo HPMC. Outros resultados obtidos, através de dosagem de GSH, MDA e NO, mostram uma maior preservação de GSH e uma menor concentração de MDA e NO nos grupos tratados com troxerrutina (0,5% e 1%) destacando suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, indicando o potencial terapêutico da troxerrutina, nas concentrações testadas, na periodontite experimental.

Palavras-chave: Reabsorção Óssea, Periodontite, Flavonoides, Derivados da Hipromelose.

ABSTRACT

Periodontitis is a disease characterized by chronic inflammation. Its main cause is infectious in nature, affecting the tissues that support the teeth. This condition may play a role in the development of various pathological conditions, as the bacteria associated with its development release inflammatory substances and toxins, which enter the bloodstream, potentially triggering systemic inflammation. Natural products, such as troxerutin derived from rutin, have been the subject of study due to their antioxidant and anti-inflammatory properties, as well as their facilitation of bone repair. This study aimed to investigate, for the first time, the action of a gel containing troxerutin in the treatment of experimental periodontitis, exploring the possible associated mechanisms. Periodontitis was induced in 48 previously anesthetized mice by placing a cotton suture thread around the first lower molars. The animals were divided into five groups: a control group without disease induction (naive), a control group with periodontitis receiving local application of a gel containing only the dilution vehicle (HPMC), and three groups receiving local application of the gel containing different concentrations of troxerutin (0.1%, 0.5%, and 1%) after suture placement, once daily for 11 days. Euthanasia occurred on the 11th day, and the mandibles were collected for histopathological analyses, osteoclast counting, and morphometric studies of bone loss. Additionally, bone alkaline phosphatase assay was performed on blood collected on the 11th day, and RANKL and OPG analysis was conducted by western blotting. Gingival tissues were dissected and immediately frozen until assays were performed to verify the concentrations of oxidative stress markers (indirect evaluation of NO by nitrite/nitrate, reduced glutathione - GSH-, and malondialdehyde -MDA-). Animals treated with troxerutin-containing gels showed a significant decrease in inflammatory infiltrate in periodontal tissues, accompanied by a lower count of active osteoclasts compared to the HPMC group. This result was associated with a lower alveolar bone loss index, corroborating with higher OPG expression and lower RANKL expression in the troxerutin-treated groups (0.5% and 1%) compared to the HPMC group. Furthermore, statistical differences were observed in alkaline phosphatase levels in the troxerutin-treated groups (0.5% and 1%) compared to the HPMC group. Other results obtained through GSH, MDA, and NO dosage show greater preservation of GSH and lower concentrations of MDA and NO in the groups treated with troxerutin (0.5% and 1%), highlighting its anti-inflammatory and antioxidant properties, indicating the therapeutic potential of troxerutin, at the tested concentrations, in experimental periodontitis.

Keywords: Bone Resorption;Periodontitis;Flavonoids;Hydroxypropyl Methylcellulose Derivatives.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Fisiologia óssea	11
1.2 Periodontite	12
1.3 Tratamento para a periodontite	14
1.4 Produtos naturais no tratamento da periodontite	15
2. JUSTIFICATIVA	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 Metodologia relacionado ao objetivo específico 3.2.1: Produzir um hidrogel para promover a liberação da troxerrutina no local da indução da periodontite.	17
4.1.1 Componentes do hidrogel	17
4.1.2 Preparo do hidrogel	17
4.2 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.2: Avaliar se a aplicação local da troxerrutina é capaz de reduzir a reabsorção óssea inflamatória gerada pela periodontite experimental.	18
4.2.1 Aspectos Éticos:	18
4.2.2 Indução da Periodontite Experimental	20
4.2.3 Grupos experimentais	20
4.2.4 Cálculo do Índice de Perda Óssea	21
4.2.5 Análise histopatológica	21
4.3 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.3: Investigar os efeitos da aplicação local da troxerrutina nas dosagens séricas de fosfatase alcalina óssea.	22
4.3.1 Fosfatase alcalina óssea (FAO)	22
4.4 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.4: Avaliar o potencial anti-inflamatório e antioxidante da troxerrutina frente a periodontite experimental.	22
4.4.1 Óxido Nítrico (NO)	22
4.4.2 Glutathione Reduzida - GSH	23
4.4.3 Malondialdeído - MDA	23
4.5 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.5: Analisar os efeitos da aplicação local da troxerrutina nos marcadores do metabolismo ósseo relacionados ao sistema RANKL/OPG.	23
4.5.1 RANKL / OPG	23
4.6 Análise estatística	24

5. RESULTADOS	24
5.1 Quantificação da perda óssea	24
5.2 Análise histopatológica por HE	26
5.4 Escores histopatológicos.....	27
5.5 Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)	29
5.6 Dosagem de nitrito/nitrato.....	29
5.7 Concentração de Glutationa Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA).....	30
5.8 Expressão de RANKL e OPG por Western blotting.....	31
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS	38
ANEXO - APROVAÇÃO NA COMISSÃO ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL	46
ANEXO – DEPÓSITO DE PATENTE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO TROXERRUTINA	47

1. INTRODUÇÃO

1.1 Fisiologia óssea

O osso é um tecido altamente vascularizado e mineralizado que mantém naturalmente sua massa, microarquitetura, forma e função por meio de um processo bem orquestrado conhecido como remodelação óssea. Essa complexa atividade exige uma coordenação precisa entre os tipos celulares residentes no osso como os osteoblastos e osteócitos, que são de origem mesenquimal, e osteoclastos, de origem hematopoiética (TERKAWI et al., 2022; ARAÚJO et al., 2017).

Os osteoblastos desempenham um papel crucial na síntese de fosfatase alcalina para alcalinizar o meio e facilitar a deposição de material inorgânico (cristais de hidroxiapatita) no tecido ósseo e também são capazes de sintetizar de colágeno tipo I. Eles exercem influência na resposta ambiental dos osteoclastos. Esse controle envolve processos como localização estratégica, liberação de produtos para indução, estimulação e inibição da reabsorção óssea. O ligante do receptor ativador do fator nuclear κ B (RANKL) é uma proteína expressa na membrana de osteoblastos, que também estão presentes em osteócitos e linfócitos T e B. Quando ligados ao receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) promove a fusão de pré-osteoclastos em osteoclastos maduros (YANG et al., 2022; LÓPEZ ROLDÁN; GARCÍA GIMÉNEZ; ALPISTE ILLUECA, 2020). Para equilibrar a formação óssea excessiva, os osteoblastos têm a capacidade de bloquear a ligação entre o RANKL e o RANK por meio da liberação de osteoprotegerina (OPG). A OPG atua competindo com o RANK pelo sítio de ligação, impedindo assim sua associação com o RANKL e exercendo um efeito osteoprotetor (RELVAS et al., 2023; TERKAWI et al., 2022; YANG et al., 2021b).

Os osteócitos representam aproximadamente 90% das células em tecido ósseo maduro e desempenham um papel vital na homeostase de fosfato de cálcio através da via de sinalização da vitamina D. Essas células são um subconjunto de osteoblastos aprisionados e incorporados na matriz mineralizada, formam redes lacunar-canaliculares, estabelecendo comunicação através de processos dendríticos, conectando-se entre si, com células da superfície óssea e medula. Essa rede permite nutrição celular, detecção de alterações no ambiente ósseo e coordenação de osteoblastos e osteoclastos em resposta a mudanças ambientais. A função mecanossensorial destaca seu papel na adaptação óssea a forças mecânicas e como principais reguladores da remodelação óssea (TERKAWI et al., 2022; KITAURA et al., 2020; HIENZ et al., 2015).

Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea, para tanto, possuem uma grande quantidade de mitocôndrias para gerar energia necessária e produzir íons hidrogênio. Essas células desempenham papel essencial no remodelamento ósseo removendo constantemente osso maduro nas lacunas de reabsorção, gerando um gradiente de pH entre a célula e a superfície óssea, favorecendo a ação de dissolução mineral. A anidrase carbônica é a principal fonte citoplasmática de prótons para a acidificação da lacuna, hidratando o dióxido de carbono (CO_2) em ácido carbônico (H_2CO_3), ao passo que se ioniza em íons carbonato (CO_3^{2-}) e íons hidrogênio (H^+) (HIENZ et al., 2015). Esse mecanismo de reabsorção óssea,

como dito anteriormente, é estimulado por RANKL, que é secretado por osteoblasto, osteócitos e linfócitos. Essa estimulação ocorre mediante a ação de diversas citocinas inflamatórias, destacando-se interleucinas (IL)-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (UDAGAWA et al., 2021; KITAURA et al., 2020; KLEIN, 2018).

Levando em consideração os elementos fisiológicos da remodelação óssea, a relação RANKL/OPG tem sido relacionada à quantidade e gravidade da reabsorção óssea periodontite. Geralmente esses pacientes apresentam níveis mais elevados de RANKL quando comparados a média de indivíduos saudáveis. Além do aumento de RANKL, as concentrações de IL-1 β também se apresentam significativamente maior (RELVAS et al., 2023; TSUKASAKI, 2021).

1.2 Periodontite

A periodontite é uma condição patológica que afeta o periodonto, na qual inclui tecido gengival, osso alveolar, cemento e ligamento periodontal. A gengivite é a forma mais branda de periodontite e caracteriza-se pela inflamação da gengiva, sendo esse estágio reversível com a melhora da higiene bucal. A periodontite ocorre quando há uma progressão além da gengivite para um estado de doença inflamatória crônica, destrutiva e irreversível. Frequentemente, ela progride de maneira silenciosa, sem apresentar sinais clínicos óbvios, como dor ou sangramento (YANG et al., 2021a; STEFFENS et al., 2018; CATON et al., 2018; KINANE et al., 2017). Sua etiologia é principalmente infecciosa, ocasionada pelo acúmulo duradouro de um biofilme dental, formado por comunidades de microrganismos altamente organizadas embebidos em matriz orgânica acelular, que se desenvolve aderido ao dente (FOROUZANFAR et al., 2020).

Essa doença não apenas afeta localmente os tecidos orais, resultando em perda dentária, mas também pode ter ramificações sistêmicas, sendo sua prevenção e tratamento adequados essenciais para manter a saúde bucal e possivelmente reduzir o risco de complicações associadas em outros sistemas do corpo. Está associada epidemiologicamente a vários distúrbios crônicos, como doença cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, doença de Alzheimer, esteatose hepática não alcoólica e certos tipos de câncer (IWASHITA et al., 2023; BORSA et al., 2021; HAJISHENGALLIS et al., 2021).

A periodontite é inicialmente desencadeada pela presença de lipopolissacarídeos (LPS) provenientes de bactérias patogênicas. O reconhecimento desses patógenos pelo hospedeiro é mediado pelos receptores tipo Toll (Toll-Like), moléculas de superfície expressas em diversas células, como células epiteliais orais e células endoteliais. A ativação desses receptores nas células endoteliais induz à expressão de moléculas como a selectina, promovendo a migração transendotelial de leucócitos. Esses leucócitos são atraídos pelo gradiente de citocinas gerado pelas células do epitélio juncional (ATEEQ et al., 2022; VO et al., 2020; ALQALLAF et al., 2018).

Essa resposta fisiológica de defesa contra patógenos, inicialmente caracterizada como uma inflamação aguda, pode persistir na ausência de resolução devido a desafios bacterianos

persistentes (ausência de tratamento) e/ou comprometimento do sistema imunológico. Nesse cenário, a ativação contínua dos componentes celulares e humorais do hospedeiro resulta em respostas inflamatórias crônicas, desencadeando a liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, proteases e prostanoídes (VO et al., 2020).

A contribuição das citocinas na periodontite está bem documentada na literatura por MARTINS e colaboradores, 2016. Essas substâncias, especialmente o TNF- α , IL-6 e IL-1 β , têm o potencial de intensificar a resposta inflamatória, causando destruição tecidual e perda óssea. Isso ocorre devido à facilitação da osteoclastogênese e à ativação osteoclástica, mediante o aumento da expressão de RANK e RANKL e à diminuição da expressão de OPG. Ademais, observou-se que essas citocinas inflamatórias induzem a transcrição do gene da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), resultando na produção de óxido nítrico (TERKAWI et al., 2022; DE SOUZA CARVALHO et al., 2021).

O óxido nítrico (NO) é um radical livre, altamente reativo que apresenta importantes funções nos sistemas cardiovascular, neurológico e imune. É sintetizado por células endoteliais e algumas células de defesa a partir do aminoácido L-arginina e do oxigênio molecular. Essa reação é catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas de NOS foram identificadas, sendo duas delas constitutivamente expressas no organismo e, por essa razão, referidas como NOS constitutivas. As atividades dessas enzimas são dependentes da atividade citossólica de cálcio que aumenta em decorrência de vários estímulos fisiológicos, liberando NO em concentrações picomolares (VO et al., 2020; WANG; HUANG; HE, 2019).

A óxido nítrico sintase induzida (iNOS), por sua vez, é regulada a nível transcricional, em resposta a infecção, inflamação ou trauma (VO et al., 2020; WANG; HUANG; HE, 2019). A ativação da iNOS independe da concentração de cálcio e resulta na liberação de concentrações nanomolares de NO por períodos mais longos. O NO em altas concentrações atua como uma molécula citotóxica contra patógenos além de apresentar efeito vasodilatador, provocando uma maior permeabilidade vascular, de forma a facilitar a diapedese dos leucócitos para o local da afecção no tecido. Por outro lado, essa liberação de NO tem outras consequências biológicas, incluindo a lesão tecidual característica da periodontite (KUKA et al., 2019; WANG; HUANG; HE, 2019).

A liberação de grandes quantidades de NO tem sido associada à fisiopatologia da periodontite (TEIXEIRA et al., 2017; LEITÃO et al., 2005; LEITÃO et al., 2004). O NO reage com radicais livres derivados do oxigênio, como o ânion superóxido, formando moléculas altamente reativas, como o ânion peroxinitrito e o radical hidroxila. A produção dessas espécies pode contribuir para danos nos tecidos, induzindo a uma peroxidação lipídica. A determinação laboratorial do NO é complexa uma vez que é facilmente oxidado em nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) (KUKA et al., 2019; WANG; HUANG; HE, 2019). Por esse motivo, a dosagem plasmática, urinária ou tecidual de NO pode ser feita indiretamente através da concentração de nitrito e nitrato.

As condições bucais representam um foco significativo de preocupação na saúde pública mundial, com destaque para a periodontite que aumentou o número de casos e

prospecta avançar ainda mais nos próximos anos. No contexto brasileiro, a situação não é diferente. Quando comparamos dados epidemiológicos da literatura, a periodontite superou a cárie e emergiu nas últimas décadas como uma das principais causas de perda dentária em adultos, com impactos negativos significativos na qualidade de vida dessas pessoas (NAZIR et al., 2020; IBGE, 2019a; IBGE, 2019b; DESOUZA et al., 2010). Essa situação ressalta uma lacuna preocupante no Sistema Único de Saúde (SUS) que carece de uma estrutura adequada para suprir essa crescente demanda por cuidados com a saúde bucal. Diante desse panorama, torna-se ainda mais relevante a realização de estudos voltados para terapias que visem prevenir e tratar essa doença(WU et al., 2021; CHEN et al., 2020).

1.3 Tratamento para a periodontite

Em geral, o tratamento para a periodontite concentra-se na raspagem mecânica do biofilme dental, visando minimizar os efeitos dos produtos nocivos produzidos pelos microrganismos presentes no biofilme. Estes produtos incluem enzimas que destroem a matriz extracelular, colágeno e membrana celular (BAEZA et al., 2020; LLAVANERAS et al., 2001).

O tratamento mecânico para a periodontite, no entanto, é limitado devido à rápida formação do biofilme. Além disso, características anatômicas como a presença de pérolas de esmalte, concavidades, ranhuras e depressões nas raízes, assim como lesões de furca e bolsas periodontais profundas, complicam o manuseio da instrumentação periodontal, dificultando a adequada limpeza da área. Nesse contexto, agentes antibacterianos sistêmicos são considerados como complemento aos métodos de debridamento mecânico. Contudo, o uso de antibióticos acarreta algumas limitações que podem comprometer a eficácia do tratamento. Entre essas limitações, destacam-se a resistência antimicrobiana, a ocorrência de efeitos colaterais e as restrições na capacidade de penetração do antibiótico no biofilme bacteriano (MAHULI et al., 2020; AKRAM et al., 2017).

Outra abordagem no tratamento da periodontite é a terapia fotodinâmica, a qual requer o uso de drogas fotossensíveis e uma luz apropriada para induzir efeitos citotóxicos resultando na eliminação do patógeno. Essa modalidade terapêutica direciona o tratamento especificamente ao local da afecção, visando reduzir os efeitos sistêmicos associados ao uso de medicamentos, por vezes, empregados no tratamento da periodontite. No entanto, é importante salientar que essa técnica não se sobrepõe à terapia convencional de raspagem e alisamento radicular, uma vez que a descontaminação isolada não é suficiente para abordar integralmente a condição patológica(PARK et al., 2020)além da necessidade de deslocamento para comparecer às diversas sessões do tratamento no consultório odontológico.

Nesse cenário, a comunidade científica tem investigado a exploração de produtos naturais como uma opção terapêutica complementar ou alternativa para infecções. Estudos evidenciam propriedades anti-inflamatórias em diversos compostos derivados de plantas, apontando um potencial significativo para auxiliar no tratamento de condições inflamatórias, como a periodontite. Esses anti-inflamatórios e antioxidantes de origem vegetal oferecem uma série de vantagens. Destacam-se pela reduzida incidência de efeitos colaterais em comparação com medicamentos sintéticos. Muitos desses agentes podem ser adquiridos a partir de fontes

alimentares ou na forma de suplementos. Além disso, o custo pode ser consideravelmente reduzido, principalmente em um país como o Brasil, com uma rica biodiversidade. Essa disponibilidade facilitada pode representar uma alternativa mais acessível em termos de custo quando comparada aos medicamentos sintéticos (YANG et al., 2021a; CASTRO et al., 2019).

1.4 Produtos naturais no tratamento da periodontite

Vários estudos apontam para os efeitos promissores dos antioxidantes e anti-inflamatórios extraídos da natureza na prevenção e tratamento de diversas doenças, incluindo câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, artrite reumatoide, distúrbios gastrointestinais (NDIAMAKA et al., 2019) e periodontite (LÓPEZ-VALVERDE et al., 2021; LALEMAN et al., 2020; KAUR et al., 2016; VARELA-LÓPEZ et al., 2015).

A prevenção da perda óssea inflamatória, evidenciada na periodontite, vem sendo explorada por meio da aplicação local de derivados naturais em forma de géis ou administrados por via oral. Alguns exemplos documentados na literatura incluem o uso de curcumina (FOROUZANFAR et al., 2020; BHATIA et al., 2014), quercetina (TASKAN; GEVREK, 2020; NIU et al., 2020), cumarina (HE et al., 2022) e rutina (IOVA et al., 2021).

A troxerrutina é um derivado tri-hidroxietilado da rutina, sua síntese ocorre pela etoxilação de três hidroxilas da rutina, nas posições 3', 4' e 7 (FRIGHETTO et al., 1995). Essa modificação em sua estrutura química proporciona maior solubilidade em água em comparação com sua precursora, facilitando sua aplicação terapêutica em formas farmacêuticas como os hidrogéis. Além disso, essa modificação possibilita uma melhor absorção pelo sistema digestivo (DE MIRANDA et al., 2020; MALINSKA et al., 2019; XIN et al., 2018; SAMPATH et al., 2014).

A troxerrutina também é conhecida como vitamina P4, podendo ser encontrada no café, maçã, frutas cítricas, amora, azeitonas e em grãos de cereais, como o trigo (YANG et al., 2021b; CAVALCANTI et al., 2020; MALINSKA et al., 2019; AZIZ et al., 2015). Além desses alimentos, pode ser extraída com maior abundância de plantas como a *Styphnolobium japonicum*, *Sophora japonica* ou Acácia-do-Japão, como é popularmente conhecida (FAHMIDEH et al., 2022), e também na *Dimorphandra Gardneriana*, conhecida popularmente como fava d'anta (DE MIRANDA et al., 2020; NAJAFI et al., 2018).

Suas propriedades farmacêuticas exibem efeitos benéficos na viscosidade sanguínea e na agregação plaquetária, sendo amplamente utilizada no tratamento de varicosidades, hemorroidas, fragilidade capilar e insuficiência venosa crônica (XING et al., 2020; XIN et al., 2018). Seu perfil de segurança é bastante positivo e tolerável, mesmo em doses elevadas, já que é encontrada em certos alimentos consumidos por humanos (MALINSKA et al., 2019). Além disso, estudos na literatura apontam que a troxerrutina exibe atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, de citoproteção e regeneração tecidual, adicionalmente, demonstra capacidade para aprimorar o metabolismo lipídico e aumentar a sensibilidade à insulina (AHMADI et al., 2021; MALINSKA et al., 2019; SAMPATH et al., 2014; CELIK et al., 2010).

O emprego de biomateriais no tratamento de processos inflamatórios, principalmente aqueles relacionados à perda óssea, é essencial, considerando a complexidade da regeneração do tecido ósseo, que demanda períodos mais prolongados. A hipromelose (HPMC) - um polímero derivado da celulose que contém unidades repetitivas de hidroxipropilmetilcelulose - é amplamente empregada em formulações farmacêuticas para fins biomédicos, atuando como um agente gelificante na produção de hidrogéis, destacando sua relevância e versatilidade nessa área. Um aspecto crucial na utilização do HPMC é sua capacidade de liberação lenta de fármacos (SCHASCHKOW et al., 2020; KALEPU; NEKKANTI, 2015), podendo resultar em melhores resultados terapêuticos.

O HPMC é hidrofílico, viscoelástico, inerte, biocompatível, bioabsorvível e possui propriedades mecânicas adaptadas à uma aplicação com seringa (HOARE et al., 2010). Também possui uma característica de mucoadesividade (HANIF et al., 2022), muito importante quando visada para o tratamento de periodontite com aplicação local do ativo. Além disso, já se tem na literatura científica o uso desse polímero em formulações farmacêuticas direcionadas ao reparo de tecido ósseo (ZEESHAN et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Dentro do contexto da periodontite, é crucial ponderar o expressivo envelhecimento da população brasileira, conforme indicado pelo último censo, o que potencialmente aumenta as incidências de doenças ósseas além dos impactos sobre a saúde bucal do indivíduo. Investir em pesquisas nesta área não apenas proporciona o conhecimento necessário, mas também contribui significativamente para promover a saúde e o bem-estar dessa parcela crescente da população. Esses esforços têm o potencial de gerar impactos positivos no sistema nacional de saúde, com a possibilidade de transferência de conhecimento científico da universidade para as empresas.

Considerando que a periodontite impacta a homeostase óssea e os efeitos anti-inflamatórios da troxerrutina, este estudo investiga de forma inédita o potencial terapêutico de um hidrogel da troxerrutina aplicado localmente na perda óssea associada à inflamação na periodontite. A aplicação local do princípio ativo aumenta potencialmente a eficácia do tratamento e reduz os possíveis efeitos colaterais sistêmicos, facilitando a transição para futuros ensaios clínicos. O presente trabalho apresenta, portanto, um potencial promissor para aplicação clínica futura, devido à abordagem terapêutica inovadora.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e aplicar localmente um hidrogel de HPMC contendo troxerrutina para avaliação de efeito anti-inflamatório, antioxidante e osteoprotetor no tratamento de periodontite experimental.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Produzir um hidrogel para promover a liberação da troxerrutina no local da indução da periodontite experimental;

3.2.2 Avaliar se a aplicação local da troxerrutina é capaz de reduzir a reabsorção óssea inflamatória gerada pela periodontite experimental;

3.2.3 Investigar os efeitos da aplicação local da troxerrutina nas dosagens séricas de fosfatase alcalina óssea;

3.2.4 Avaliar o potencial anti-inflamatório e antioxidante da troxerrutina frente a periodontite experimental;

3.2.5 Analisar os efeitos da aplicação local da troxerrutina nos marcadores do metabolismo ósseo relacionados ao sistema RANKL/OPG.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Metodologia relacionado ao objetivo específico 3.2.1: *Produzir um hidrogel para promover a liberação da troxerrutina no local da indução da periodontite.*

4.1.1 Componentes do hidrogel

- A troxerrutina utilizada foi obtida da empresa Xi'na Quano Biotech Co. Lta. (Xi'na, China) e apresenta massa molar de 742,6752 g/mol⁻¹.
- O HPMC foi adquirido da Sigma-Aldrich (massa molar de 1261,4 g/mol⁻¹, n° CAS 9004-65-3).
- A água destilada foi obtida por um Destilador de Água Tipo Pilsen Modelo 106.

4.1.2 Preparo do hidrogel

O preparo dos hidrogéis seguiu conforme MARTINS et al., 2016. Os constituintes pesados foram de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 – Formulação dos hidrogéis.

Hidrogel	Troxerrutina (g)	HPMC (g)	H ₂ O _d (g)	q.s.p
HPMC	-	0,0225	1,4775	
T 0,1%	0,0015	0,0225	1,4760	
T 0,5%	0,0075	0,0225	1,4700	
T 1%	0,0150	0,0225	1,4625	

Fonte: Autor.

Primeiramente, a troxerrutina (0,1, 0,5 ou 1% m/m), foi pesada separadamente em vidro de relógio para laboratório. Após isso, um recipiente de vidro (10 mL) foi pesado e a balança foi tarada logo em seguida, nele foi colocado o HPMC em concentração de 1,5% em relação à massa final (1,5g). A troxerrutina previamente pesada foi introduzida no recipiente, onde se atentou para não tarar a balança novamente. Por fim, a água destilada foi adicionada no processo de pesagem para completar a massa escolhida do sistema final.

Após esse processo de pesagem, os sistemas foram levados para agitação (entre 3 a 6 minutos em potência de leve a moderada). Por fim, os hidrogéis foram conservados sob refrigeração (2 a 8°C por pelo menos 24 horas), sendo essa fase crucial para a melhor solubilização dos constituintes.

Devido ao ineditismo deste estudo, a seleção destas concentrações foi pautada na análise das dosagens empregadas em pesquisas da literatura científica envolvendo o uso de outros flavonoides em gel, administrados localmente para tratamento de periodontite ou reparo tecidual, como a quitosana a 1% (BHATIA et al., 2014; AKINCIBAY; ŞENEL; YETKIN AY, 2007) e rutina a 0,5% e 1% (GAGLIARDI et al., 2024).

4.2 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.2: *Avaliar se a aplicação local da troxerrutina é capaz de reduzir a reabsorção óssea inflamatória gerada pela periodontite experimental.*

4.2.1 Aspectos Éticos:

Os protocolos experimentais utilizando os animais seguiram as diretrizes ARRIVE (DU SERT et al., 2020). Os ensaios foram iniciados somente após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFC, sob o registro nº 3806290622, aprovado em 16/09/2022 (ANEXO I).

48 camundongos *swiss*, machos, com 5 a 8 semanas de idade e peso de 20 a 25g, foram obtidos do Biotério Setorial Prof. Eduardo Torres do campus Porangabussu da UFC. Os camundongos foram alojados em gaiolas de polipropileno revestidas com serragem de madeira. Ao longo dos experimentos, os animais foram mantidos em condições ambientais controladas (temperatura: 22°C ± 2°C, com exaustão de ar, e um ciclo de luz de 12 horas/12 horas de escuro), com acesso irrestrito à água e ração padrão *ad libitum*.

O tratamento com aplicação do hidrogel se deu no dia 0 (imediatamente após a colocação do fio de sutura ao redor dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo, ainda com os animais anestesiados) com uma seringa de insulina acoplada a um bico de plástico, muito utilizado em seringas de clareamento dental. O tratamento seguiu, por mais 10 dias (totalizando 11 dias, dia 0 ao dia 10) no mesmo horário (14:00h), sem necessidade de anestesia.

A eutanásia dos animais foi conduzida por meio de hipovolemia (exsanguinação), realizada sob anestesia com xilazina (10 mg/ml) e quetamina (100 mg/ml) no 11º dia. A escolha desse intervalo se deu por coincidir com o pico da perda óssea (DE LIMA et al., 2000).

Após a eutanásia, foram coletados os materiais biológicos (sangue, tecido gengival e mandíbulas) que foram processados e, posteriormente, analisados. As mandíbulas foram cortadas em duas hemiarquadas e divididas para os testes.

A Figura 1 resume o protocolo experimental enquanto o fluxograma subsequente ilustra o destino e quantidade de hemiarquadas utilizadas para cada teste.

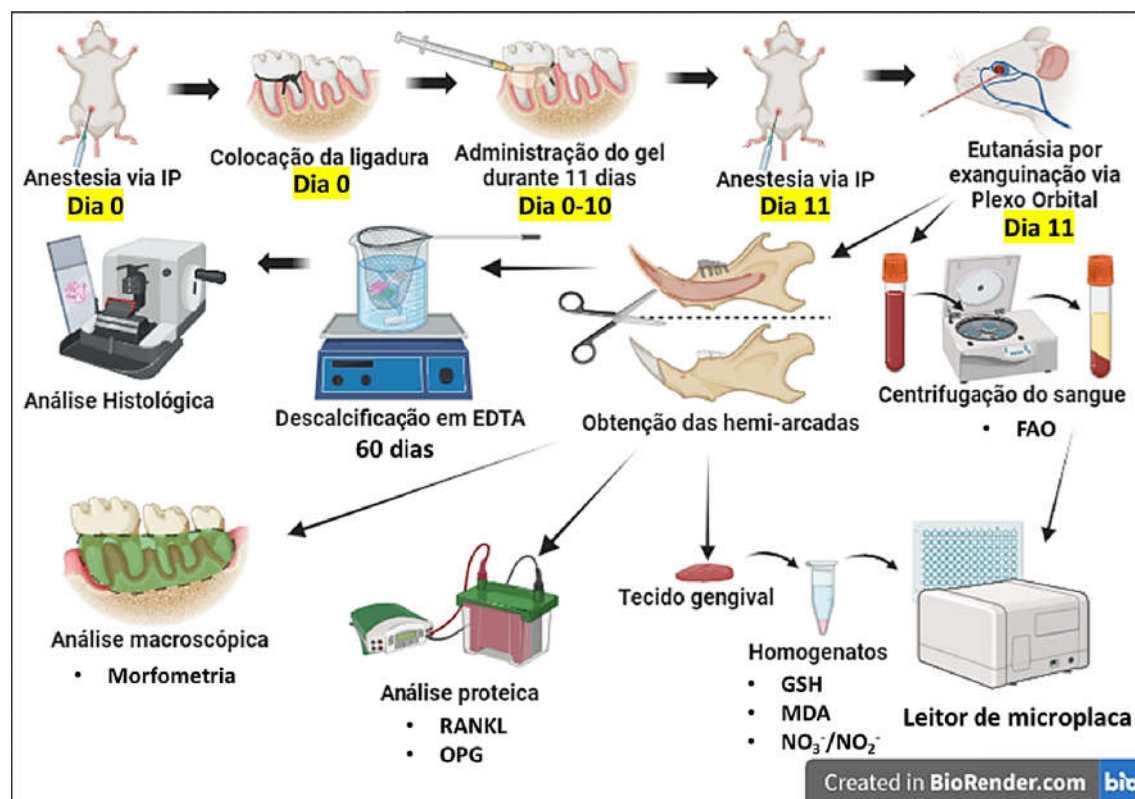
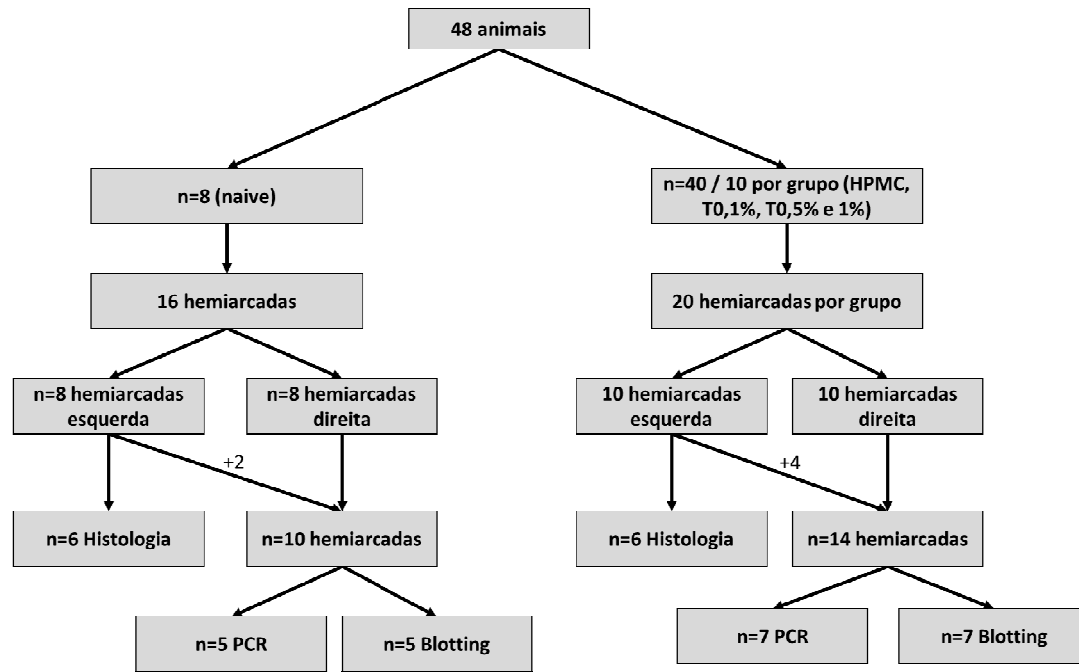


Figura 1 – Esquema do protocolo experimental. No dia 0 foi realizada uma anestesia com a combinação de xilazina e quetamina via intraperitoneal (IP). Após os animais anestesiados, a colocação de um fio de sutura foi realizada no 1º molar direito e esquerdo da mandíbula no animal. No dia da indução e durante 11 dias o gel foi aplicado localmente (0,02mL em cada dente; 1x ao dia; as 14:00h) com o auxílio de uma seringa com bico de plástico. Passados os 11 dias, os animais foram anestesiados novamente com a mesma combinação de anestésicos e em seguida encaminhados para eutanásia por exsanguinação via plexo orbital. O sangue foi coletado por um capilar de vidro e armazenados em tudo de análises clínicas sem anticoagulante (tampa

vermelha). Após a coagulação sanguínea, o sangue foi centrifugado a 1500rpm para a obtenção do soro. O soro obtido foi encaminhado para dosagem bioquímica. As mandíbulas foram cortadas ao meio para obtenção de duas hemiarquadas de cada animal. Parte das hemiarquadas foram encaminhadas para os testes histológicos (com descalcificação em EDTA). Outra parte foi realizada a dissecação para a coleta de tecido gengival (preparação dos homogenatos), análise macroscópica, análise proteica, e dosagens bioquímicas.



4.2.2 Indução da Periodontite Experimental

Para indução da periodontite, foi seguido o modelo induzido por ligadura, com adaptações (AUNG et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2019). Um fio de sutura de algodão (4.0) foi posicionado em torno do 1º molar inferior esquerdo e direito de um camundongo previamente anestesiado com Ketamina (100mg/ml; i.p.) e Xilazina (10mg/ml; i.p.). Posterior a passagem do fio de algodão, foi realizado um nó cirúrgico de forma que o nó ficasse voltado para a face vestibular da cavidade oral. O fio de algodão facilita o acúmulo de microrganismos no local, promovendo a formação de biofilme e, conseqüentemente, desencadeando uma resposta inflamatória que resulta na destruição dos tecidos periodontais (GRAVES et al. 2008, ABE e HAJISHENGALLIS, 2013).

4.2.3 Grupos experimentais

Os animais foram aleatoriamente distribuídos nos seguintes grupos:

- Grupo controle negativo (n=8), formado por animais não submetidos à colocação do fio de sutura e sem administração de ativos (**Naive**);
- Grupo controle positivo (n=10), formado por animais submetidos à periodontite experimental e que receberam a aplicação local de um gel contendo apenas os excipientes da formulação (**HPMC**);

- Grupos experimentais (n=30; n=10 por subgrupo), formados por animais submetidos à periodontite experimental e que receberam a aplicação local de um gel contendo troxerrutina nas concentrações de 0,1 (T0,1%), 0,5 (T0,5%) ou 1% (T1%).

4.2.4 Cálculo do Índice de Perda Óssea

Após 11 dias da indução da periodontite, os animais foram eutanasiados e suas hemi-arcadas removidas e fixadas no formol tamponado a 10%, durante 24 horas. Em seguida, foram dissecadas e coradas com azul de metileno a 1%, a fim de distinguir o tecido ósseo dos dentes, os quais se coram em menor intensidade.

Para a quantificação da reabsorção óssea alveolar, as mandíbulas foram posicionadas em cera ortodôntica para registro fotográfico em câmera digital sob lupa estereoscópica (n=5 para grupo naive e n=7 para os demais grupos – HPMC e troxerrutina 0,1, 0,5 e 1%). Após seu posicionamento, a lupa permaneceu com o foco inalterado para todas as amostras. Anterior as imagens das hemi-arcadas, uma foto de uma régua com o mesmo foco das amostras foi registrada para auxiliar na demarcação de 1mm como base. As imagens digitais foram, então, avaliadas no software ImageJ® para se calcular a área correspondente à perda óssea alveolar. Essa área foi calculada inicialmente em pixels e posteriormente convertidos em mm².

4.2.5 Análise histopatológica

As análises histopatológicas (n=6) foram realizadas em cortes seriados das mandíbulas. As mandíbulas foram dissecadas e fixadas em formol tamponado a 10% durante 24 horas, sendo, posteriormente, submetidas à desmineralização com EDTA a 10% por aproximadamente 60 dias. As peças foram, então, incluídas em parafina para a realização de cortes longitudinais seriados de 5µm em micrótomo apropriado. As lâminas obtidas foram coradas com método hematoxilina e eosina (HE).

Para a análise histológica, a região entre o 1º e 2º molar, correspondente ao periodonto de proteção e do periodonto de sustentação foi considerada, sendo avaliados os aspectos inflamatórios como presença/intensidade de infiltrado celular, além do estado de preservação do processo alveolar, do cemento e dentina, atribuindo-se escores que variaram de 0 a 3, de acordo com a intensidade dos achados (LEITÃO et al., 2005; DE LIMA et al., 2000), listados logo abaixo:

Escore 0: *Infiltrado celular ausente ou leve (infiltração celular inflamatória é limitada e restrita à região gengival marginal) e processo alveolar e cemento preservados.*

Escore 1: *Infiltrado celular moderado (infiltração celular inflamatória presente em toda a gengiva inserida), processo alveolar com leve reabsorção e cemento intacto.*

Escore 2: *Infiltrado celular pronunciado (infiltração de células inflamatórias presente na gengiva e ligamento periodontal), processo alveolar com degradação moderada e destruição parcial do cemento.*

Escore 3: *Infiltrado celular acentuado, processo alveolar com reabsorção completa e destruição grave do cimento.*

A análise histopatológica foi conduzida por dois avaliadores experientes, seguindo um procedimento cego. Nos casos de discordância dos achados entre os avaliadores, um terceiro avaliador foi designado para fornecer uma avaliação adicional e dirimir quaisquer divergências. Os resultados foram apresentados na forma de mediana (mínimo-máximo).

4.3 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.3: *Investigar os efeitos da aplicação local da troxerrutina nas dosagens séricas de fosfatase alcalina óssea.*

4.3.1 Fosfatase alcalina óssea (FAO)

Para investigar a atividade desta enzima, amostras de sangue foram coletadas do plexo orbital de todos os camundongos com o auxílio de um capilar de vidro. O sangue foi coletado em tubo de análises clínicas tampa vermelha (sem anticoagulante). Esperou-se sangue coagular por aproximadamente 15min e logo em seguida foi centrifugado (1500rpm por 15min) e o sobrenadante armazenado a -80°C até a análise bioquímica, obtendo-se, portanto, o soro. Uma alíquota das amostras de soro foi utilizada para a dosagem de fosfatase alcalina total, utilizando-se Kit específico para fosfatase alcalina, cuja metodologia seguiu a orientação do laboratório fabricante (LABTEST[®]). Posteriormente, novas alíquotas, das mesmas amostras do material, foram aquecidas a 56°C por 10min, em seguida dosou-se novamente as concentrações enzimáticas da amostra.

O método está fundamentado na labilidade dessa fração frente ao calor que por sua vez, foi determinada indiretamente subtraindo-se a atividade obtida de fosfatase alcalina termoestável da fosfatase alcalina total (LINDER et al., 2013; MOSS; WHITBY, 1975). Os resultados foram expressos em unidade de enzima por litro de soro (U/L) de acordo com o fabricante.

4.4 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.4: *Avaliar o potencial anti-inflamatório e antioxidante da troxerrutina frente a periodontite experimental.*

Para a avaliação do potencial anti-inflamatório e antioxidante do gel de troxerrutina, foi avaliado a quantificação de óxido nítrico, glutatona reduzida e malondialdeído do tecido gengival dissecado das hemiarquadas destinadas ao teste de blotting e morfometria.

4.4.1 Óxido Nítrico (NO)

Para a quantificação indireta de NO por nitrito/nitrato, seguiu-se a metodologia conforme descrito por GREEN e colaboradores, 1982, adaptado. 50 μL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida (p/v)) e 0,1% de NEED (p/v) em uma proporção de 1:1 foram adicionados a 50 μL do sobrenadante do homogeneizado em placas de 96 poços. Em seguida,

a mistura foi incubada a 37 °C por 15 minutos. Posteriormente, a absorbância das amostras foi lida em 540 nm e os resultados foram expressos em $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.4.2 Glutathiona Reduzida - GSH

Para o GSH, os tecidos gengivais foram pesados e homogeneizados em solução de ácido etilenodiaminotetracético gelado (EDTA, 0,02 M; pH 8,9), em uma proporção de 10%, com o auxílio do homogeneizador de tecidos. 40 μL dos homogenatos foram misturados com 50 μL de água destilada, mais 10 μL de ácido tricloroacético (TCA, 50%), e centrifugados a 5000 rpm por 15 minutos, a 4 °C. O sobrenadante obtido foi pipetado em uma placa de 96 poços com tampão Trizma (0,4 M), além de EDTA (0,02 M, pH 8,9) e DTNB (0,01 M). A absorbância foi mensurada em um leitor de microplaca, dentro de 5 minutos após a adição de DTNB, em um comprimento de onda de 412nm. Os valores de absorbância foram interpolados na curva padrão de glutathiona, e os resultados foram expressos como microgramas de GSH por grama de tecido ($\mu\text{g/g}$).

4.4.3 Malondialdeído - MDA

Para o MDA, os tecidos foram pesados e homogeneizados em tampão fosfato de sódio gelado (0,1 M, pH = 7,0), com homogeneizador de tecido na proporção de 10%. Em seguida, o homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, durante 5 minutos, a 4 °C. Aliquotas de 100 μL do sobrenadante foram misturadas com ácido acético 20% e ácido 2-tiobarbitúrico 0,5% (diluído em ácido acético 20%, pH 2,4 - 2,6). A mistura foi transferida para o banho-maria com temperatura de 95°C, onde permaneceu por 1 hora; a amostra foi homogeneizada a cada 15 minutos e, sequencialmente, para o banho de gelo, onde permaneceu 30 minutos. Em seguida, recebeu dodecil sulfato de sódio (SDS, 8,1%) e foi imediatamente centrifugada a 12.000 rpm, durante 15 minutos, a 25 °C. A leitura da amostra foi realizada em leitor de microplaca de 96 poços com comprimento de onda em 532nm. A curva padrão foi obtida usando 1,1,3,3-tetrametoxipropano como padrão. Os resultados foram expressos em nanomol de MDA por miligrama de tecido (nmol/mg).

4.5 Metodologia associada ao objetivo específico 3.2.5: *Analisar os efeitos da aplicação local da troxerrutina nos marcadores do metabolismo ósseo relacionados ao sistema RANKL/OPG.*

4.5.1 RANKL / OPG

Western blots foram realizados a partir das hemi-arcadas (n=5 para grupo naive e n=7 para os demais grupos – HPMC e troxerrutina 0,1, 0,5 e 1%), para análise da expressão de RANKL e OPG. Para tal, decorrido os 11 dias de experimento, os animais foram sacrificados e as hemi-arcadas, retiradas, imediatamente congeladas e armazenadas em freezer (-80°C). Os espécimes retirados para as análises foram submersos em nitrogênio líquido e macerados em gral com pistilo, após a maceração o material foi acondicionado em micro tubos (eppendorf

2mL) contendo tampão de lise e triturados novamente com um homogeneizador de tecidos para obtenção dos homogenatos. Os mesmos foram transferidos para tubos de ensaio com inibidores de protease e centrifugados a 14.000 rpm. O sobrenadante foi quantificado para proteína usando kit de ensaio BCA (Thermo Fisher Scientific), a fim de se padronizar a quantidade de proteína a ser colocada nos poços (50 µg). As amostras foram colocadas para corrida de eletroforese em gel de desnaturação de poliacrilamida 10% (Sistema mini-gel, da Biorad, Hercules). Após, as proteínas corridas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose previamente bloqueadas com tampão de bloqueio da Biorad. As membranas foram, então, incubadas com anticorpo primário de rato anti-RANKL, anti-OPG (1:500; Cell Signaling Technology, Estados Unidos; overnight em temperatura ambiente) e depois lavadas por três vezes, 5min cada, num tampão de lavagem para, em seguida, serem incubadas com um anticorpo secundário anti-rabbit por 90min e lavadas novamente como descrito acima. Cada membrana, então, foi banhada com kit Clarity Western Biorad e imediatamente escaneada em fotodocumentador ChemiDoc MP Biorad. Para a realização da análise densitométrica das bandas utilizou-se o programa ImageJ. O mesmo procedimento foi realizado utilizando anticorpo primário anti-β-actina. Os resultados foram expressos pela relação de RANKL/β-actina e OPG/β-actina.

4.6 Análise estatística

Todos os resultados quantitativos foram expressos como média ± desvio padrão da média, exceto os escores histopatológicos que estão expressos pela mediana, com variação de menor e maior valor. A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk como pré-teste. Após a verificação da normalidade, os dados paramétricos foram analisados pelo teste estatístico ANOVA seguido de Tukey como post hoc teste. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste Kruskal-Wallis seguido de Dunn's. O nível de significância para todos os casos foi $p < 0,05$. O software utilizado foi o GraphPad Prism[®] versão 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação da perda óssea

A avaliação morfológica das mandíbulas revelou que a periodontite resultou em significativa reabsorção óssea nos animais do grupo controle positivo, ou seja, que receberam a aplicação de HPMC (Figura 2B) em comparação aos animais saudáveis, do grupo naïve (Figura 2A). Foi observada uma redução de perda óssea nos grupos tratados com o gel contendo troxerrutina, nas concentrações de 0,5% (Figura 2D) e 1% (Fig. 2E) em comparação ao grupo controle que recebeu HPMC (Figura 2B) exceto na concentração 0,1% (Figura 2C). Também pôde-se observar diferença significativa quando comparado o grupo T1% ao grupo T0,5%.

A mensuração da área de reabsorção óssea (Figura 3) permitiu observar que a aplicação do gel de troxerrutina, nas concentrações de 0,5% e 1%, reduziu significativamente a perda óssea induzida pela periodontite experimental.

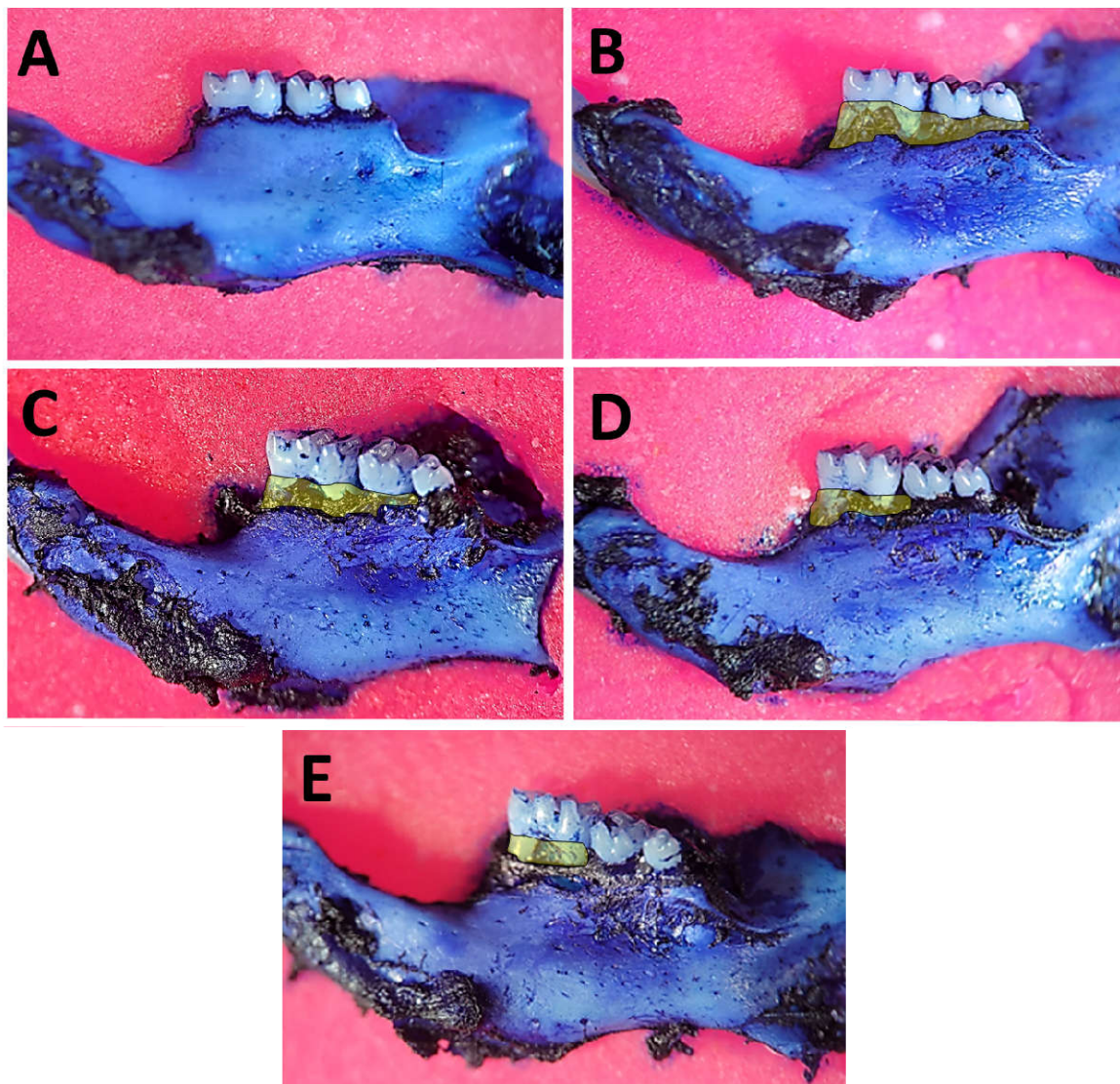


Figura 2 – Aspectos macroscópicos e área de perda óssea das hemi-arcadas. A perda óssea foi mensurada pela área de reabsorção óssea (representada em sombra amarela) dos grupos Naive (A), HPMC (B), T0,1% (C), T0,5% (D), e T1% (E). A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11º dia, as mandíbulas de animais foram processadas para análise macroscópica. A morfometria para quantificação da perda óssea foi calculada pelo programa Image J®. Hemi-arcadas coradas com Azul de Metileno 1% e fotografadas sob lupa estereoscópica.

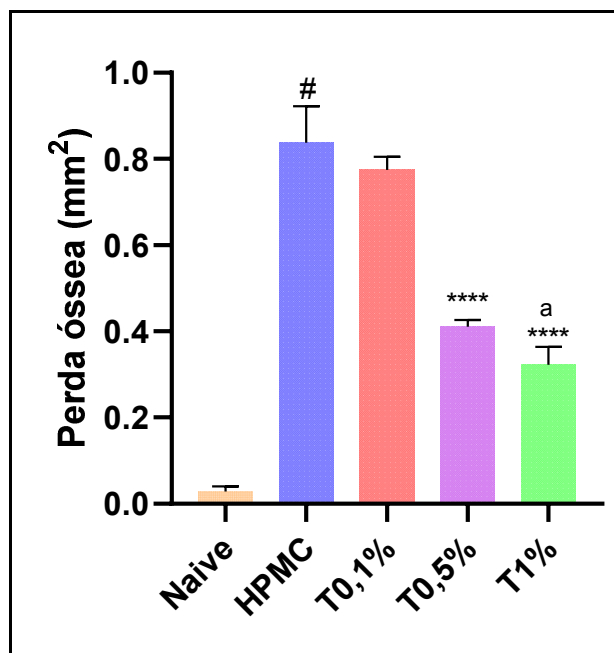


Figura 3 – Índice de perda óssea. O índice de perda óssea foi obtido após a mensuração da área de perda óssea macroscópica (morfometria). A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as mandíbulas de animais foram processadas para análise macroscópica. Os valores obtidos da área de reabsorção óssea foram analisados no software GraphPad Prism 8. #<0,0001 em relação ao naive; ****P<0,0001 em relação ao HMPC; a P=0,01 em relação ao T0,5%; por ANOVA/Tukey.

5.2 Análise histopatológica por HE

A análise histológica da região entre o primeiro e o segundo molares inferiores evidencia os aspectos normais dos tecidos periodontais no grupo de animais saudáveis, que não foram submetidos à periodontite (grupo naive), sem sinais de inflamação e perda óssea (Figura 4A). Por outro lado, no grupo de animais submetidos à periodontite e que não receberam tratamento, apenas a aplicação local do gel com HPMC, observou-se intenso infiltrado inflamatório, com predominância de neutrófilos, reabsorção do cimento, da dentina e do osso alveolar (Figura 4B).

Houve uma diminuição significativa do infiltrado de células inflamatórias e uma redução da reabsorção do processo alveolar nos grupos T0,5% (Figura 4D) e T1% (Figura 4E) em relação ao grupo HPMC.

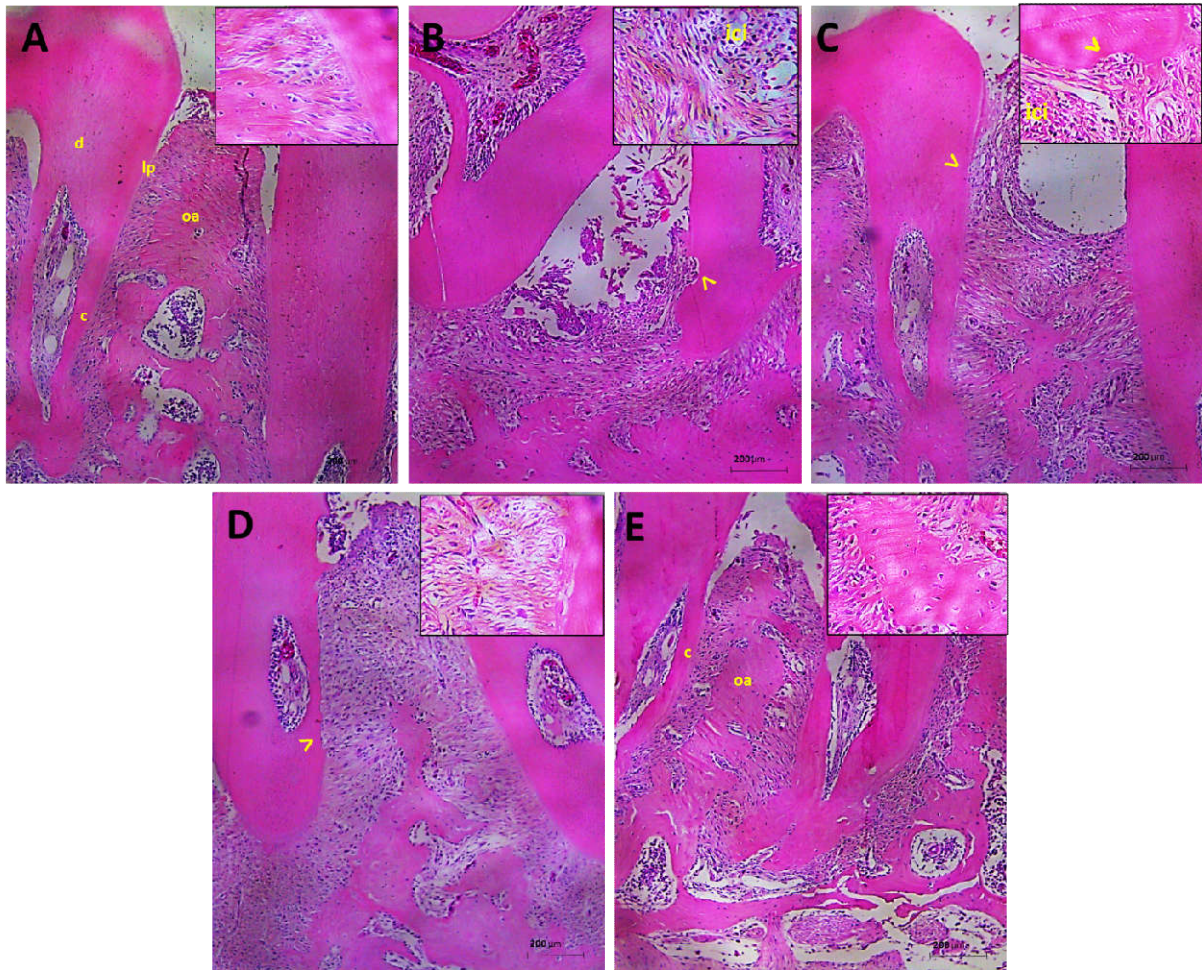


Figura 4 – Histologia das hemi-arcadas.Aspecto microscópico do periodonto das hemi-arcadas dos grupos Naive (A), HPMC (B), T0,1% (C), T0,5% (D), e T1% (E). A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as mandíbulas de animais foram processadas para análise histológica (coloração com hematoxilina e eosina; aumento de 100X). As abreviações c, d, lp e oa representam cemento, dentina, ligamento periodontal e osso alveolar, respectivamente. As pontas de setas indicam reabsorção do cemento e dentina. Infiltrado celular inflamatório é representado pela sigla ici, indicadas nas imagens (canto superior direito de cada grupo) com aumento de 400x.

5.4 Escores histopatológicos

A periodontite induzida nos camundongos foi capaz de induzir um intenso infiltrado celular inflamatório, reabsorção do osso alveolar, dentina e cemento além de aumentar o número de osteoclastos ativados, pontuando grau máximo nos escores histopatológicos. A aplicação local com troxerrutina a 1% em gel de HPMC pontuou escores significativamente menores, em relação ao grupo HPMC, evidenciados pelos achados histológicos. Os resultados estão expressos na Figura 5 e Tabela 2.

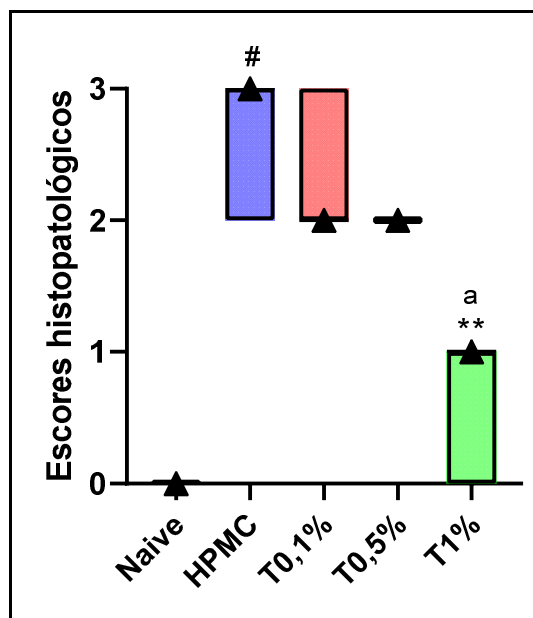


Figura 5 – Escores histopatológicos. Os escores histopatológicos foram obtidos após a avaliação de um profissional cego e são demonstrados pela mediana (triângulo) com variação do menor e maior valor. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11º dia, as mandíbulas de animais foram processadas para análise histológica. Escore 0: Infiltrado celular ausente ou discreto; escassos ou raros osteoclastos; processo alveolar preservado; cimento preservado. Escore 1: Infiltrado celular moderado; presença de alguns osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado. Escore 2: Infiltrado celular acentuado; presença de grande número de osteoclastos; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cimento. Escore 3: Infiltrado celular acentuado; presença de um número aumentado de osteoclastos; processo alveolar ausente; destruição total do cimento. # $P < 0,0001$ em relação ao naive, ** $p = 0,0021$ em relação ao HPMC; a $P = 0,04$ em relação ao T0,1%; Kruskal-Wallis seguido de Dunn's.

Tabela 2 – Escores histopatológicos. Escore 0: Infiltrado celular ausente ou discreto; escassos ou raros osteoclastos; processo alveolar preservado; cimento preservado. Escore 1: Infiltrado celular moderado; presença de alguns osteoclastos; pequena reabsorção do processo alveolar; cimento preservado. Escore 2: Infiltrado celular acentuado; presença de grande número de osteoclastos; processo alveolar com reabsorção acentuada; destruição parcial de cimento. Escore 3: Infiltrado celular acentuado; presença de um número aumentado de osteoclastos; processo alveolar ausente; destruição total do cimento. # $P < 0,0001$ em relação ao naive, ** $P = 0,0021$ em relação ao HPMC; a $P = 0,04$ em relação ao T0,1%. Kruskal-Wallis seguido de Dunn's.

Grupos	Mediana (mínimo – máximo)
Naive	0 (0-0)
HPMC	3 (2-3)#
T 0,1%	2 (2-3)
T 0,5%	2 (2-2)
T 1%	1 (0-1)**, a

Fonte: Autor.

5.5 Fosfatase Alcalina Óssea (FAO)

Os animais submetidos à periodontite experimental e que receberam apenas HPMC apresentaram uma diminuição significativa na concentração sérica de FAO, quando comparados ao grupo naive. O tratamento com o gel contendo troxerrutina nas concentrações de 0,5% e 1%, mas não na concentração de 0,1%, foi capaz de prevenir a diminuição sérica de FAO induzida pela doença (Figura 6), evidenciando diferenças estatísticas significativas entre esses grupos e o grupo HPMC.

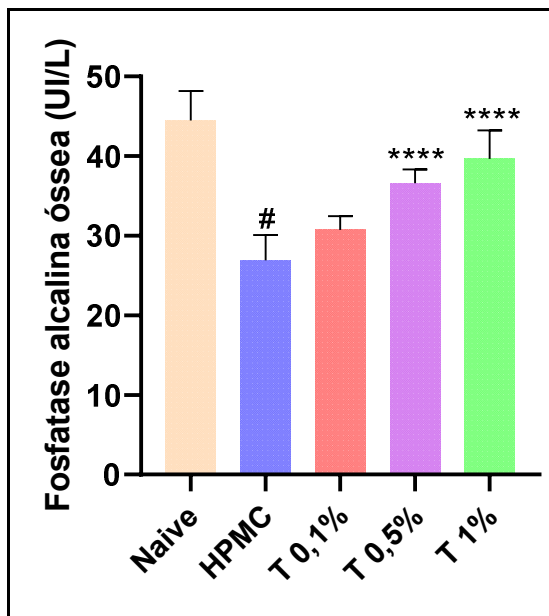


Figura 6 – Atividade osteoblástica. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11º dia, as mandíbulas foram dissecadas e o tecido gengival coletado dos animais foram armazenados e posteriormente processados para análise. A concentração sérica de fosfatase alcalina óssea foi mensurada por ELISA utilizando kit Labtest®. O grupo naive, comparado aos demais grupos, foi estatisticamente significativo. # $p < 0,0001$ em relação ao naive; **** $p < 0,0001$ em relação ao HPMC; por ANOVA/Tukey.

5.6 Dosagem de nitrito/nitrato

Os animais que foram submetidos à periodontite experimental e que receberam apenas HPMC apresentaram um aumento significativo na concentração tecidual de nitrito/nitrato quando comparados ao grupo naive. O tratamento com o gel contendo troxerrutina nas concentrações de 0,5% e 1% foi capaz de prevenir o aumento tecidual de nitrito/nitrato, induzido pela doença (Figura 7).

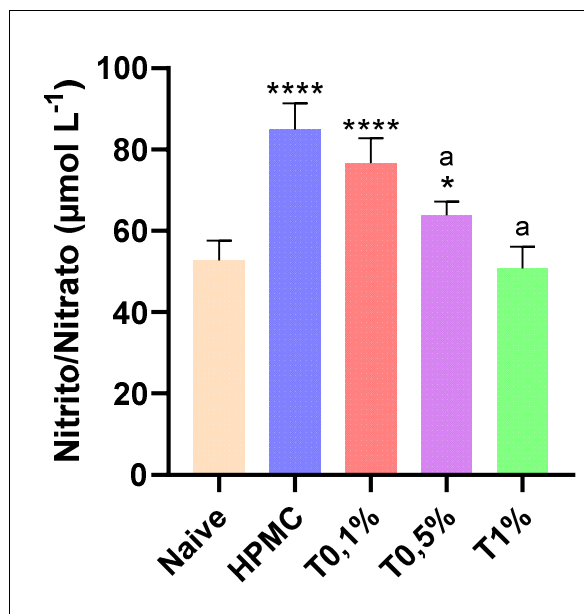


Figura 7 – Dosagem de Nitrato/Nitrito. Quantificação indireta de NO a partir da concentração de Nitrato/Nitrito no tecido gengival dos camundongos. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as mandíbulas foram dissecadas e os tecidos gengivais coletados e congelados. **** P<0,0001 e * P=0,02 em relação ao naive; a P<0,0001 em relação ao HPMC.; por ANOVA/Tukey.

5.7 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH) e Malondialdeído (MDA)

Para avaliação do estresse oxidativo foram mensuradas as concentrações de GSH e MDA (Figura 8) nos tecidos gengivais associados aos primeiros molares.

A periodontite experimental resultou em uma significativa diminuição de GSH (Figura 8A) e um aumento significativo de MDA (Figura 8B) nos tecidos gengivais dos animais que receberam apenas HPMC, quando comparados ao grupo naive. Esses resultados indicam a ocorrência de estresse oxidativo.

A aplicação diária do gel de troxerrutina a 0,5% e 1% foi capaz de diminuir significativamente a geração de estresse oxidativo, evidenciado pelas concentrações significativamente maiores de GSH (Figura 8A), associadas a concentrações significativamente menores de MDA (Figura 8B) nos tecidos gengivais desse grupo de animais em comparação ao grupo que recebeu apenas HPMC. No mesmo sentido, ao compararmos o gel de troxerrutina a 1% em relação ao gel de 0,5%, pôde-se destacar diferença estatística significativa nas concentrações de GSH (Figura 8A) e MDA (Figura 8B) de tecido gengival.

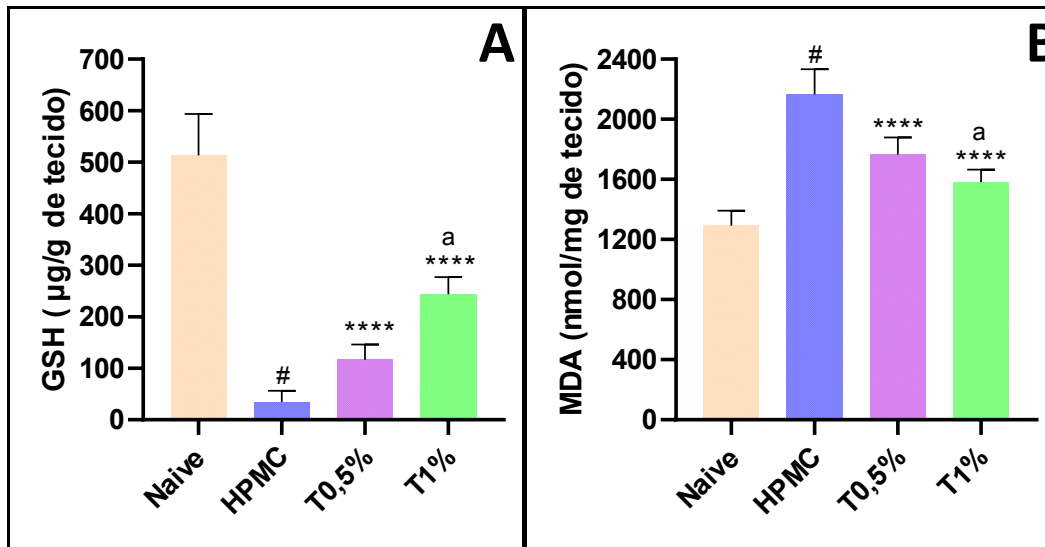


Figura 8 – Marcadores do estresse oxidativo. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as mandíbulas foram dissecadas e o tecido gengival coletado dos animais foram armazenados e posteriormente processados para análise. Concentração de GSH (A) e MDA (B) mensurados de tecido gengival dos camundongos. [#] $P < 0,0001$ em relação ao naive; ^{****} $P < 0,0001$ em relação ao HPMC; ^a $P = 0,023$ em relação ao T0,5%; por ANOVA/Tukey.

5.8 Expressão de RANKL e OPG por Western blotting

A atividade do repórter de sinalização utilizadas na revelação da membrana, demonstrou que a periodontite induzida nos camundongos foi capaz de elevar a expressão de RANKL e diminuir a expressão de OPG (Figura 9). O tratamento com troxerrutina a 1%, aplicado localmente, foi capaz de reduzir a expressão de RANKL e induzir a expressão de OPG (Figura 9). A relação RANKL/ β -actina e OPG/ β -actina (Figura 10 e 11, respectivamente) confirmam os achados qualitativos vistos nas bandas reveladas na membrana.

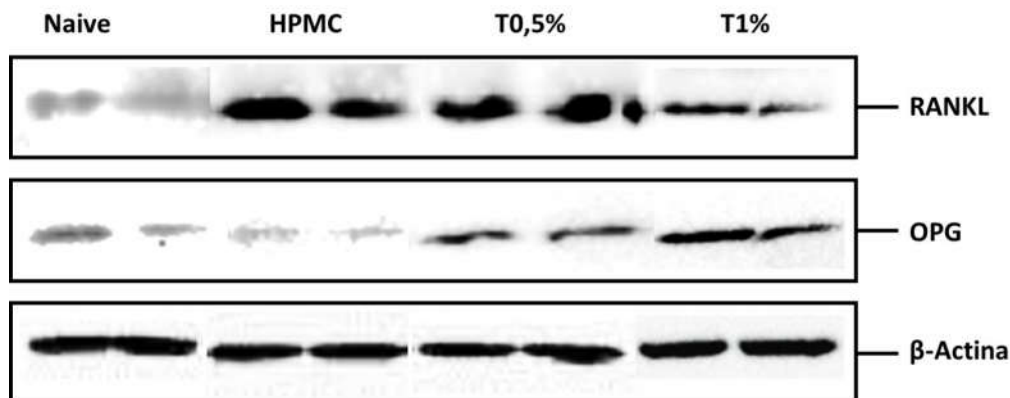


Figura 9 – Análise de RANKL/OPG por Western blotting. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as hemi-arcadas dos animais foram retiradas, armazenadas

e posteriormente processados para análise. Imagens representativas de Western blotting demonstrando aumento na expressão de RANKL e diminuição de expressão de OPG no grupos doente (HPMC), inversamente ao grupo tratado com troxerrutina 0,5% e 1% que demonstrou aumento da expressão de OPG e diminuição da expressão de RANKL evidenciadas pelas bandas.

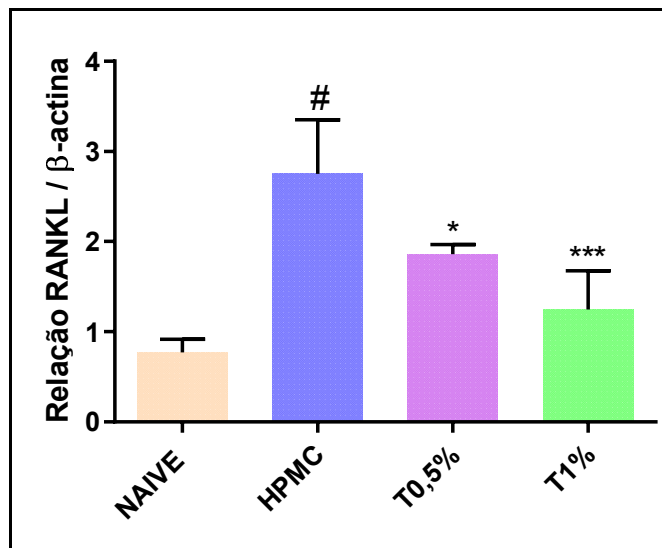


Figura 10 – Relação RANKL/ β -actina. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as hemi-arcadas dos animais foram retiradas, armazenadas e posteriormente processadas para análise. As bandas de Western blotting foram mensuradas por ImageJ e feita a relação entre RANKL e β -actina. # $P < 0,0001$ em relação ao naive; * $P = 0,027$; *** $P = 0,0006$ em relação ao HPMC; por ANOVA/Tukey.

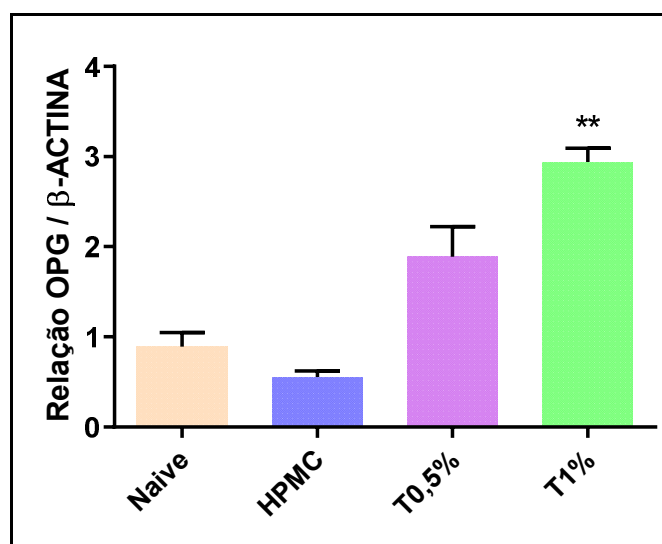


Figura 11 – Relação OPG/ β -actina. A periodontite foi induzida por ligadura no primeiro molar inferior. Após a eutanásia, no 11^o dia, as hemi-arcadas dos animais foram retiradas, armazenadas e posteriormente processadas para análise. As bandas de Western blotting foram mensuradas por ImageJ e feita a relação entre OPG e β -actina. # $P < 0,0001$ em relação ao naive; ** $P = 0,0022$ em relação ao HPMC; por Kuskal-Wallis/Dunn's.

6. DISCUSSÃO

A periodontite é uma condição comum e crônica caracterizada por inflamação, cuja origem infecciosa destrói os tecidos de suporte dos dentes, o que potencialmente resulta em perda dentária. O presente estudo concentrou-se em avaliar a aplicação local de um gel de troxerrutina, conhecida por suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. O gel foi aplicado localmente em camundongos com periodontite experimental, resultando em uma significativa redução do infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais e um menor índice de perda óssea alveolar nos grupos tratados em comparação com o grupo controle positivo para a doença (HPMC), indicando o potencial terapêutico da troxerrutina na perda óssea inflamatória.

Tratamentos com medicamentos aplicados no sítio da infecção revela-se de extrema relevância por diversos motivos. Em certos cenários, é viável atingir concentrações mais elevadas do fármaco na região-alvo, maximizando seus efeitos terapêuticos e minimizando possíveis efeitos colaterais em outras partes do organismo. Ademais, a administração local de flavonoides proporciona uma resposta mais direta no local afetado, otimizando a eficácia do tratamento quando comparada a outras vias de administração, como a via oral. Nesta última, a entrega de bioativos é substancialmente reduzida devido a metabolização hepática (efeito de primeira passagem) e pela influência dos microrganismos presentes na microbiota intestinal (RAMADON; ANWAR; HARAHAP, 2017). Em patologias específicas, como a periodontite previamente abordada, a entrega localizada do ativo pode ser, sobretudo, pertinente para abordar a inflamação e a perda óssea associadas a essa condição.

A periodontite inflamatória envolve diversas falhas nas vias de restauração da homeostase. A resolução dessa inflamação é um retorno ativo bem orquestrado à homeostase dos tecidos, sendo necessária para amenizar seus efeitos deletérios no tecido ósseo, corroborando com estudos na literatura que relatam o uso de flavonoides como potentes auxiliares na prevenção da periodontite, podendo representar um método significativo para aumentar a imunidade local e a defesa do hospedeiro (DE SOUZA CARVALHO et al., 2021; VAN DYKE, 2008).

De fato, ao longo da história, diversos produtos naturais têm sido empregados com propósitos medicinais, e há relatos indicando que diversos desses produtos desempenham um papel na mitigação da perda óssea (FREIRES et al., 2018). Entre esses produtos utilizados no tratamento da periodontite, a literatura científica destaca a cumarina, possuindo efeitos de inibição dos patógenos, demonstrando ser anti-biofilme (HE et al., 2022), a quercetina, com redução da perda óssea alveolar, aumentando a atividade osteoblástica, diminuindo a atividade osteoclástica, da apoptose e da inflamação (WEI et al., 2021; HUANG et al., 2020; TASKAN et al., 2020). Em paralelo, utilizando um modelo de osteoporose, a rutina, exibiu efeitos de osteoproteção, reduzindo a reabsorção óssea trabecular e promovendo a diferenciação de células-tronco mesenquimais da medula óssea em osteoblastos (XIAO et al., 2019).

Até o presente momento, não há relatos na literatura da troxerrutina no tratamento da periodontite. No entanto já foi relatado efeitos benéficos com tratamento local em gel de seu percussor, a rutina, que foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e equilibrar o mecanismo de enzimas antioxidantes além de reduzir a expressão de metaloproteinases e aumentar concentrações de colágeno tipo III na gengiva (ALBAQAMI et al., 2023; IOVA et al., 2020).

Em concordância, pesquisas na literatura relatam que o tratamento preliminar com a troxerrutina conseguiu diminuir expressivamente a lesão miocárdica, bem como diminuir citocinas pró-inflamatórias, reduzindo o impacto do infarto do miocárdio (SHU et al., 2019; SHU et al., 2017). Com base nessas informações, é pertinente sugerir a potencial participação da troxerrutina na modulação de eventos inflamatórios e nos danos oxidativos provocados por radicais livres, não apenas durante a reperfusão, mas em vários eventos patológicos. Não há dúvidas que a identificação e intervenção precoce têm potencial de preservar tecidos isquêmicos e lesados, prevenindo a progressão das lesões (JIANG et al., 2020). Nesse contexto, a troxerrutina tem sido reconhecida como um fármaco com atividade vascular, podendo melhorar a microcirculação, diminuir a permeabilidade capilar e reduzir o edema intersticial (XING et al., 2020).

Em estudos recentes, para tratamento de mucosite intestinal ocasionada pelo uso do quimioterápico 5-fluorouracil, observou-se uma melhora dos efeitos colaterais associados quando utilizado a troxerrutina, em modelo experimental *in vivo*, em camundongos, com objetivo preventivo, na maioria das alterações da mucosa intestinal induzidas por quimioterapia. A troxerrutina evidenciou efeito restaurador da integridade epitelial com aceleração da cicatrização e melhora da inflamação (DE MIRANDA et al., 2020).

Em nosso estudo, os resultados macroscópicos das hemi-arcadas demonstram que os animais tratados com os géis contendo troxerrutina em sua composição, nas concentrações de 0,5 e 1%, apresentaram uma diminuição significativa da perda óssea quantificada morfometricamente. Esse resultado pode ser associado aos achados microscópicos onde, pela histologia, foi evidenciado uma maior preservação do osso alveolar, do cemento e dentina. Além disso constatou-se haver uma diminuição do infiltrado inflamatório nos tecidos periodontais em relação ao grupo controle que recebeu apenas os excipientes na composição do gel (HPMC).

Entre os marcadores de remodelação óssea, destaca-se a fosfatase alcalina, reconhecida como um indicador significativo de formação óssea, refletindo as atividades osteoblásticas. É o marcador mais amplamente empregado para avaliar o metabolismo ósseo, sendo capaz de indicar tanto a extensão da formação óssea quanto a atividade dos osteoblastos. Essa dupla função da fosfatase alcalina a torna crucial na compreensão e monitoramento dos processos dinâmicos que ocorrem no tecido ósseo (COSME-SILVA et al., 2020; VAN STRAALLEN et al., 1991) destacando-se assim como uma ferramenta valiosa na investigação de aspectos relacionados à saúde óssea e à evolução da periodontite.

De forma interessante, o tratamento com o gel de troxerrutina conseguiu elevar a concentração de FAO. Essa isoforma óssea localiza-se na membrana plasmática dos

osteoblastos, estando relacionada à mudança de pH do meio para que ocorra o processo deposição dos minerais envolvidos no processo de formação dos ossos (WU et al., 2021; VIMALRAJ, 2020; SARDIWAL et al., 2013). Essa ativação dos osteoblastos também pôde ser evidenciada nos resultados obtidos pelas análises de RANKL e OPG por Western blotting, onde, pelas análises qualitativas e quantitativas, a troxerrutina aplicada localmente reduziu a expressão de RANKL e induziu a expressão se seu bloqueador OPG, podendo favorecer uma maior osteoproteção na perda óssea evidenciada pela periodontite.

Nossos achados corroboram com estudos de YANG e colaboradores 2021b, onde a troxerrutina foi capaz de acelerar o reparo tecidual em fraturas ósseas promovendo a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais humanas de maneira dependente da concentração, incitando a atividade da fosfatase alcalina além de estimular a formação de novo osso, acelerando a cicatrização da fratura.

Dessa forma, os resultados nos apontam que o tratamento com a troxerrutina consegue induzir a atividade osteoblástica para favorecer os processos de reparo ou remodelação óssea como resposta à doença. Os osteoblastos não apenas desempenham um papel crucial na formação óssea, mas também influenciam a resposta ambiental dos osteoclastos por meio de processos como indução, estimulação e inibição da reabsorção óssea (YANG et al., 2021b; HIENZ et al., 2015).

A periodontite é uma doença cuja condição cursa com níveis mais elevados de RANKL (RELVAS et al., 2023; TSUKASAKI, 2021). O presente trabalho também buscou investigar os efeitos da administração local de troxerrutina em gel de HPMC sob o eixo RANKL/OPG na doença e nossos resultados foram bastante promissores. A troxerrutina conseguiu induzir uma menor expressão de RANKL e uma maior expressão do seu bloqueador natural, a OPG.

Embora até o momento não se tenha dados da troxerrutina na perda óssea causada pela periodontite, diversos estudos demonstraram uma ação benéfica da utilização de flavonoides. Em estudos *in silico*, de Noor e colaboradores (2018) com o objetivo de analisar a interação de diversos bioativos, entre eles a rutina, no eixo RANK/RANKL/OPG, observaram que a rutina consegue interagir mais facilmente com esse sistema. Respalhando descobertas de Wang e colaboradores (2017b) onde a utilização do bioativo em questão resultou em trabéculas ósseas mais espessas e densas em modelo de perda óssea por osteoporose.

Alinhado a essa perspectiva, os resultados de Ge e colaboradores (2020) utilizando a quercetina em modelo de inflamação craniana foram promissores ao mostrar que a expressão de RANKL foi significativamente inibida, mas a expressão da proteína OPG aumentou com a adição da quercetina.

Os papéis desempenhados pelos mediadores inflamatórios locais, originados por macrófagos e linfócitos T, no processo de reabsorção óssea têm sido alvo de extensivas pesquisas. Esses mediadores exercem suas funções efetoras no tecido em relação à via de produção de RANKL estimulada por osteoblastos (MARTINS et al., 2016). Destaca-se que a reabsorção óssea alveolar associada à periodontite pode ser desencadeada tanto de forma direta quanto indireta pelo infiltrado inflamatório celular (HIENZ et al., 2015). Uma

compreensão aprofundada desses processos contribui significativamente para a identificação de estratégias de intervenção mais direcionadas e eficazes.

No aspecto inflamatório, no presente estudo, constatou-se menores concentrações de nitrito/nitrato nos tecidos gengivais de animais tratados com troxerrutina comparado ao grupo controle HPMC, o que sugere menor liberação de óxido nítrico (NO). O NO é um radical livre reativo secretado por diversas células, como polimorfonucleares, células predominantes em quadros inflamatórios agudos e desempenham um papel importante no combate aos microrganismos, ele é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, ou seja, nitrito e nitrato, na maioria dos fluidos corporais(WALTZ et al., 2015).

A menor liberação de NO nos grupos tratados com a troxerrutina, sugere fortemente uma menor liberação dessas citocinas nesses grupos, uma vez que oNO é capaz de mediar efeitos de citocinas inflamatórias como TNF e IL-1(WANG; HUANG; HE, 2019). Concentrações menores de nitrito/nitrato refletem, portanto, menor liberação de citocinas. Ainda, os valores dosados desses animais tratados com troxerrutina conseguiram se equiparar estatisticamente aos níveis encontrados nos animais naive (não submetidos à indução da periodontite experimental), reiterando que uma menor liberação de NO pode estar relacionado à capacidade da troxerrutina de influenciar em situações inflamatórias reduzindo esses efeitos relacionados a esse mecanismo.

O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio das defesas antioxidantes, como a glutatona reduzida, que pode ser induzido por espécies reativas de oxigênio (EROs). A glutatona livre está presente principalmente na sua forma reduzida (GSH) e pode ser convertida para a forma oxidada (GSSG) na presença de EROs(RAJPAL et al., 2022). Em determinadas condições, oNO pode interagir com EROs e contribuir para o estresse oxidativo. A interação do NO com radicais livres pode levar à formação de peroxinitrito, uma espécie reativa que pode iniciar ou amplificar a peroxidação lipídica de membranas celulares, danos proteicos e nucleares. Um dos produtos finais desta reação é o malondialdeído (MDA) (TSIKAS; MIKUTEIT, 2022; WANG; ANDRUKHOV; RAUSCH-FAN, 2017; MARTINS et al., 2016). Portanto, a liberação desregulada de NO pode desempenhar um papel na indução do estresse oxidativo, que, por sua vez, pode contribuir para a peroxidação lipídica. Esses processos estão interconectados e estão envolvidos em diversas condições patológicas, incluindo processos inflamatórios e danos celulares associados a diversas doenças, incluindo a periodontite.

De fato, no presente trabalho, o uso do gel de troxerrutina aplicado localmente, foi capaz de preservar os níveis de GSH e diminuir a concentração de MDA e Nitrato/Nitrito o que nos aponta um efeito antioxidante e anti-inflamatório do gel. Esses dados corroboram com trabalhos da literatura que utilizaram a rutina para o tratamento de periodontite em ratos *wistar*, destacando como promissor os efeitos benéficos desse flavonoide (IOVA et al., 2021) e, portanto, de seu derivado, a troxerrutina.

Além disso, há estudos que avaliaram o efeito da administração oral da troxerrutina no comprometimento cognitivo induzido pela resistência à insulina no cérebro em camundongos alimentados com uma dieta rica em colesterol. Os resultados demonstraram que a troxerrutina

atenua o comprometimento cognitivo e o estresse oxidativo induzido no cérebro dos camundongos por meio da redução dos produtos finais de glicação avançada, espécies reativas de oxigênio e diminuição da concentração de proteínas carboniladas - grupos carbonilas (aldeídos e cetonas) em proteínas (LU et al, 2011), ressaltando seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios.

Antioxidantes são substâncias que impedem a oxidação, neutralizando os radicais livres gerados pela exposição à poluição, tabagismo, estresse e fatores genéticos. Nos organismos vivos, incluindo os humanos, a deterioração e morte celular são provocadas pelos radicais livres, que se formam devido à oxidação de moléculas do ambiente. Esses radicais livres também impactam a saúde bucal, causando problemas graves. No entanto, diversos antioxidantes podem resolver esse problema, combatendo os efeitos nocivos dos radicais livres (TSIKAS; MIKUTEIT, 2022;IOVA et al., 2021;MARTINS et al., 2016; WALTZ et al., 2015) na qual foi registrado no presente estudo com a troxerrutina aplicada localmente (tecido afetado)na periodontite experimental.

A atividade antioxidante da troxerrutina também foi demonstrada na literatura por meio de um modelo de hemólise de eritrócitos. Por ser um composto polar, no qual facilita a distribuição uniforme na fase aquosa, foi capaz de proteger as células por meio da eliminação de radicais livres em meio aquoso (XIN et al., 2018). Essa atividade também foi comprovada nas ciências cardiovasculares, utilizando lesões causadas por isquemia/reperfusão, por meio de modelo *in vivo* em camundongos diabéticos e saudáveis apresentando efeitos antiarrítmicos e anti-inflamatórios, caracterizando uma redução da gravidade da arritmia (NAJAFI et al., 2018). Atualmente, ratificada de maneira inédita por intermédio de um modelo de periodontite.

7. CONCLUSÃO

Conforme a literatura científica, não há dúvidas que o modelo de ligadura com fio de sutura de algodão seja eficaz para evidenciar intensa reabsorção óssea em 11 dias em camundongos. Diante disso, o presente estudo apresentou que o tratamento com troxerrutina aplicada localmente em gel de HPMC, aumentou o perfil de osteoproteção pelo eixo RANKL/OPG correlacionado por uma maior ativação de osteoblastos e menor ativação de osteoclastos nos tecidos periodontais frente a periodontite induzida nos animais. Além disso, o tratamento com esse flavonoide exibiu uma maior prevenção da reabsorção óssea inflamatória podendo estar associada através das características antioxidantes desse bioativo, indicando seu potencial terapêutico, nas concentrações testadas, na periodontite experimental.

REFERÊNCIAS

- ABE, Toshiharu; HAJISHENGALLIS, George. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. **Journal of immunological methods**, v. 394, n. 1-2, p. 49-54, 2013.
- AHMADI, Zahra et al. Biological and therapeutic effects of trolox: molecular signaling pathways come into view. **Journal of pharmacopuncture**, v. 24, n. 1, p. 1, 2021.
- AKINCIBAY, Hakan; ŞENEL, Sevdâ; YETKİN AY, Zühal. Application of chitosan gel in the treatment of chronic periodontitis. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials**, v. 80, n. 2, p. 290-296, 2007.
- AKRAM, Zohaib et al. Efficacy of photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of periodontitis: A systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 19, p. 86-92, 2017.
- ALBAQAMI, Fahad F. et al. Rutin Gel with Bone Graft Accelerates Bone Formation in a Rabbit Model by Inhibiting MMPs and Enhancing Collagen Activities. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 5, p. 774, 2023.
- ALQALLAF, Hawra et al. Differential profiles of soluble and cell surface toll like receptor (TLR)-2 and 4 in chronic periodontitis. **PLoS One**, v. 13, n. 12, p. e0200231, 2018.
- ARAÚJO, Aurigena Antunes de et al. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. **PloS one**, v. 12, n. 8, p. e0183506, 2017.
- ATEEQ, Hira et al. Effect of inflammation on bones in diabetic patients with periodontitis via RANKL/OPG system-A review. **Journal of Diabetes & Metabolic Disorders**, v. 21, n. 1, p. 1003-1009, 2022.
- AUNG, KyawThu et al. Aging-affected MSC functions and severity of periodontal tissue destruction in a ligature-induced mouse periodontitis model. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 21, p. 8103, 2020.
- AZIZ, Z. et al. A systematic review of the efficacy and tolerability of hydroxyethylrutosides for improvement of the signs and symptoms of chronic venous insufficiency. **Journal of clinical pharmacy and therapeutics**, v. 40, n. 2, p. 177-185, 2015.
- BAEZA, Mauricio et al. Effect of periodontal treatment in patients with periodontitis and diabetes: systematic review and meta-analysis. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, 2020.
- BHATIA, Madhu et al. Novel therapeutic approach for the treatment of periodontitis by curcumin. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 12, p. ZC65, 2014.

BORSA, Leslie et al. Analysis the link between periodontal diseases and Alzheimer's disease: a systematic review. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 17, p. 9312, 2021.

CASTRO, Micaele Maria Lopes et al. Antioxidants as adjuvants in periodontitis treatment: a systematic review and meta-analysis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 1-24, 2019.

CATON, Jack G. et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. **Journal of periodontology**, v. 89, p. S1-S8, 2018.

CAVALCANTI, Bruno Coêlho et al. Chemopreventive effect of troxerutin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human leukocytes through modulation of glutathione-dependent enzymes. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 84, n. 4, p. 137-151, 2021.

CELIK, Alper et al. Comparison of the effects of troxerutin and heparinoid on flap necrosis. **Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery**, v. 63, n. 5, p. 875-883, 2010.

CHEN, You et al. Association between periodontal disease, tooth loss and liver diseases risk. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 47, n. 9, p. 1053-1063, 2020.

COSME-SILVA, L. et al. Reduced bone resorption and inflammation in apical periodontitis evoked by dietary supplementation with probiotics in rats. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 8, p. 1084-1092, 2020.

DE LIMA, Vilma et al. Effects of chlorpromazine on alveolar bone loss in experimental periodontal disease in rats. **European journal of oral sciences**, v. 108, n. 2, p. 123-129, 2000.

DE MIRANDA, João Antônio Leal et al. Troxerutin prevents 5-fluorouracil induced morphological changes in the intestinal mucosa: role of cyclooxygenase-2 pathway. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 1, p. 10, 2020.

DE SOUZA CARVALHO, Jhonatan et al. Impact of citrus flavonoid supplementation on inflammation in lipopolysaccharide-induced periodontal disease in mice. **Food & Function**, v. 12, n. 11, p. 5007-5017, 2021.

DESOUZA, Maria Elisa et al. Impact of tooth loss in quality of life. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, n. 3, p. 841, 2010.

DU SERT, Nathalie Percie et al. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. **PLoS biology**, v. 18, n. 7, p. e3000411, 2020.

FAHMIDEH, F. et al. Effect of troxerutin in counteracting hyperglycemia-induced VEGF upregulation in endothelial cells: a new option to target early stages of diabetic retinopathy?. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 951833, 2022.

FOROUZANFAR, Fatemeh et al. Curcumin for the management of periodontal diseases: A review. **Current pharmaceutical design**, v. 26, n. 34, p. 4277-4284, 2020.

FREIRES, Irlan Almeida et al. The alveolar bone protective effects of natural products: A systematic review. **Archives of oral biology**, v. 87, p. 196-203, 2018.

FRIGHETTO, N. et al. Síntese de troxerutina a partir de rutina. In: REUNIAO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 18, 1995, Caxambu. Resumos. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 1995. Disponível em <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/150978/1/1995PL013-Frighetto-Sintese-2906.PDF>>, acesso em 11/02/2023.

GAGLIARDI, Agnese et al. Rutin-loadedzein gel as a greenbiocompatibleformulation for woundhealingapplication. **InternationalJournalofBiologicalMacromolecules**, v. 269, p. 132071, 2024.

GE, Yu□Wei et al. Quercetin inhibits macrophage polarization through the p□38α/β signalling pathway and regulates OPG/RANKL balance in a mouse skull model. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 24, n. 5, p. 3203-3216, 2020.

GRAVES, Dana T. et al. The use ofrodent models toinvestigate host-bacteriainteractionsrelatedto periodontal diseases. **Journal of clinicalperiodontology**, v. 35, n. 2, p. 89-105, 2008.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

HAJISHENGALLIS, George; CHAVAKIS, Triantafyllos. Local and systemic mechanisms linking periodontal disease and inflammatory comorbidities. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 7, p. 426-440, 2021.

HANIF, Sana et al. Smartmucoadhesivebuccalchitosan/HPMC scaffold for sore throat: In vitro, ex vivo andpharmacokineticprofiling in humans. **JournalofDrug Delivery Science and Technology**, v. 71, p. 103271, 2022.

HE, Zhiyan et al. Anti-biofilm activities of coumarin as quorum sensing inhibitor for Porphyromonasgingivalis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 2055523, 2022.

HIENZ, Stefan A. et al. Mechanisms of bone resorption in periodontitis. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

HOARE, Todd et al. Rheological blends for drug delivery. I. Characterization in vitro. **JournalofBiomedicalMaterialsResearch Part A: AnOfficialJournalof The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterialsandthe Korean Society for Biomaterials**, v. 92, n. 2, p. 575-585, 2010.

HUANG, Yue-Yue et al. Oral administration of quercetin or its derivatives inhibit bone loss in animal model of osteoporosis. **Oxidative medicine andcellularlongevity**, v. 2020, 2020.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde. Pessoas de 18 anos ou mais de idade que perderam 13 ou mais dentes, por sexo e situação do domicílio. 2019, atualizado em 2021a.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Nacional de Saúde. Pessoas de 18 anos ou mais de idade que perderam todos os dentes, por sexo e situação do domicílio. 2019, atualizado em 2021b.

IOVA, Gilda M. et al. The antioxidant effect of curcumin and rutin on oxidative stress biomarkers in experimentally induced periodontitis in hyperglycemic Wistar rats. **Molecules**, v. 26, n. 5, p. 1332, 2021.

IWASHITA, Misaki. Association between periodontal disease and arteriosclerosis-related diseases. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 30, n. 11, p. 1517-1524, 2023.

JIANG, Xiaoqiong et al. Skin temperature and vascular attributes as early warning signs of pressure injury. **Journal of tissue viability**, v. 29, n. 4, p. 258-263, 2020.

KALEPU, Sandeep; NEKKANTI, Vijaykumar. Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 5, n. 5, p. 442-453, 2015.

KAUR, Gurbani et al. Dietary antioxidants and their indispensable role in periodontal health. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, n. 2, p. 239-246, 2016.

KINANE, Denis F.; STATHOPOULOU, Panagiota G.; PAPAPANOU, Panos N. Periodontal diseases. **Nature reviews Disease primers**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2017.

KITAURA, Hideki et al. Osteocyte-related cytokines regulate osteoclast formation and bone resorption. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 14, p. 5169, 2020.

KLEIN, Gordon L. The role of calcium in inflammation-associated bone resorption. **Biomolecules**, v. 8, n. 3, p. 69, 2018.

KUKA, Gizem Ince et al. Evaluation of nitric oxide levels in chronic periodontitis patients treated with initial periodontal therapy and probiotic food supplements: A double blind, randomized controlled clinical trial. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 33, n. 1, p. 974-979, 2019.

LALEMAN, Isabelle; TEUGHEL, Wim. Novel natural product-based oral topical rinses and toothpastes to prevent periodontal diseases. **Periodontology 2000**, v. 84, n. 1, p. 102-123, 2020.

LEITÃO, R. F. C. et al. Locally applied isosorbide decreases bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 75, n. 9, p. 1227-1232, 2004.

LEITÃO, R. F. C. et al. Nitric oxide synthase inhibition prevents alveolar bone resorption in experimental periodontitis in rats. **Journal of periodontology**, v. 76, n. 6, p. 956-963, 2005.

LINDER, Cecilia Halling et al. Isozyme profile and tissue-origin of alkaline phosphatases in mouse serum. **Bone**, v. 53, n. 2, p. 399-408, 2013.

LLAVANERAS, Analeyda et al. A combination of a chemically modified doxycycline and a bisphosphonate synergistically inhibits endotoxin-induced periodontal breakdown in rats. **Journal of periodontology**, v. 72, n. 8, p. 1069-1077, 2001.

LÓPEZ ROLDÁN, Andrés; GARCÍA GIMÉNEZ, José Luis; ALPISTE ILLUECA, Francisco. Impact of periodontal treatment on the RANKL/OPG ratio in crevicular fluid. **PLoS One**, v. 15, n. 1, p. e0227757, 2020.

LÓPEZ-VALVERDE, Nansi et al. Effectiveness of propolis in the treatment of periodontal disease: updated systematic review with meta-analysis. **Antioxidants**, v. 10, n. 2, p. 269, 2021.

LU, Jun et al. Troxerutin protects against high cholesterol-induced cognitive deficits in mice. **Brain**, v. 134, n. 3, p. 783-797, 2011.

MAHULI, Simpy Amit et al. Antibiotics for periodontal infections: Biological and clinical perspectives. **J. Contemp. Dent. Pract**, v. 21, p. 372-376, 2020.

MALINSKA, Hana et al. Beneficial effects of troxerutin on metabolic disorders in non-obese model of metabolic syndrome. **PLoS One**, v. 14, n. 8, p. e0220377, 2019.

MARTINS, Conceição S. et al. Correction: Topical HPMC/S-Nitrosoglutathione Solution Decreases Inflammation and Bone Resorption in Experimental Periodontal Disease in Rats. **Plos one**, v. 11, n. 5, p. e0156356, 2016.

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

NAJAFI, Moslem et al. Anti-arrhythmogenic and anti-inflammatory effects of troxerutin in ischemia/reperfusion injury of diabetic myocardium. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 102, p. 385-391, 2018.

NAZIR, Muhammad et al. Global prevalence of periodontal disease and lack of its surveillance. **The Scientific World Journal**, v. 2020, 2020.

NDIAMAHA, H. Okorie., et al. "Antioxidants Properties of Natural and Synthetic Chemical Compounds: Therapeutic Effects on Biological System. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 28-42, 2019.

NIU, Yin-bo et al. Quercetin prevents bone loss in hindlimb suspension mice via stanniocalcin 1-mediated inhibition of osteoclastogenesis. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 11, p. 1476-1486, 2020.

NOOR, Zairin et al. The interaction of the active compounds of *Labisia pumila* on RANK–RANKL–OPG system. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 17, p. 23-27, 2018.

OLIVEIRA, Sandra Helena Penha et al. Aliskiren attenuates the inflammatory response and wound healing process in diabetic mice with periodontal disease. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 708, 2019.

PARK, Danbi et al. Antimicrobial photodynamic therapy efficacy against specific pathogenic periodontitis bacterial species. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101688, 2020.

RAMADON, Delly; ANWAR, E.; HARAHAP, Yahdiana. In vitro Penetration and Bioavailability of Novel Transdermal Quercetin-loaded Ethosomal Gel. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 79, n. 6, 2017.

RELVAS, Marta et al. Analysis of Salivary Levels of IL-1 β , IL17A, OPG and RANK-L in Periodontitis Using the 2017 Classification of Periodontal Diseases—An Exploratory Observational Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 3, p. 1003, 2023.

SAMPATH, Sathish; KARUNDEVI, Balasubramanian. Effect of troxerutin on insulin signaling molecules in the gastrocnemius muscle of high fat and sucrose-induced type-2 diabetic adult male rat. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 395, p. 11-27, 2014.

SARDIWAL, Sunita et al. Bone alkaline phosphatase in CKD—mineral bone disorder. **American journal of kidney diseases**, v. 62, n. 4, p. 810-822, 2013.

SCHASCHKOW, Anaïs et al. Glycaemic control in diabetic rat treated with islet transplantation using plasma combined with hydroxypropylmethylcellulose hydrogel. **Acta Biomaterialia**, v. 102, p. 259-272, 2020.

SHU, Liliang et al. Troxerutin attenuates myocardial cell apoptosis following myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibition of miR-146a-5p expression. **Journal of cellular physiology**, v. 234, n. 6, p. 9274-9282, 2019.

SHU, Liliang et al. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via Pi3k/Akt pathway in rats. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 5, p. 1939-1948, 2017.

STEFFENS, J. P.; MARCANTONIO, R. A. C. Classification of periodontal and periimplantar diseases and conditions: a practical guide and key points. **Rev Odontol UNESP**, v. 47, n. 4, p. 189-97, 2018.

TASKAN, Mehmet M.; GEVREK, Fikret. Quercetin decreased alveolar bone loss and apoptosis in experimentally induced periodontitis model in Wistar rats. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Inflammatory and Anti-Allergy Agents)**, v. 19, n. 4, p. 436-448, 2020.

TEIXEIRA, Alrieta H. et al. Stemodiamaritima L. extract decreases inflammation, oxidative stress, and alveolar bone loss in an experimental periodontitis rat model. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 988, 2017.

TERKAWI, M. Alaa et al. Interplay between inflammation and pathological bone resorption: insights into recent mechanisms and pathways in related diseases for future perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1786, 2022.

TSIKAS, Dimitrios; MIKUTEIT, Marie. N-Acetyl-L-cysteine in human rheumatoid arthritis and its effects on nitric oxide (NO) and malondialdehyde (MDA): analytical and clinical considerations. **Amino Acids**, v. 54, n. 9, p. 1251-1260, 2022.

- TSUKASAKI, Masayuki. RANKL and osteoimmunology in periodontitis. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 39, p. 82-90, 2021.
- UDAGAWA, Nobuyuki et al. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. **Journal of bone and mineral metabolism**, v. 39, p. 19-26, 2021.
- VAN DYKE, Thomas E. The management of inflammation in periodontal disease. **Journal of periodontology**, v. 79, p. 1601-1608, 2008.
- VAN STRAALLEN, Jan P. et al. Bone-alkaline phosphatase as indicator of bone formation. **Clinica chimica acta**, v. 201, n. 1-2, p. 27-33, 1991.
- VARELA-LÓPEZ, Alfonso et al. Non-nutrient, naturally occurring phenolic compounds with antioxidant activity for the prevention and treatment of periodontal diseases. **Antioxidants**, v. 4, n. 3, p. 447-481, 2015.
- VIMALRAJ, Selvaraj. Alkaline phosphatase: Structure, expression and its function in bone mineralization. **Gene**, v. 754, p. 144855, 2020.
- VO, Thi Thuy Tien et al. O papel promissor dos fitoquímicos antioxidantes na prevenção e tratamento da doença periodontal através da inibição das vias do estresse oxidativo: insights atualizados. **Antioxidantes**, v. 9, n. 12, pág. 1211, 2020.
- WALTZ, Paul et al. Nitrate/nitrite as critical mediator of oxidative injury and inflammation. **Antioxidants & redox signaling**, v. 23, n. 4, p. 328-339, 2015.
- WANG, Q.-L. et al. Rutin prevents the ovariectomy-induced osteoporosis in rats. **European Review for Medical & Pharmacological Sciences**, v. 21, n. 8, 2017b.
- WANG, Yan; HUANG, Xiangdao; HE, Fuming. Mechanism and role of nitric oxide signaling in periodontitis. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, n. 5, p. 3929-3935, 2019.
- WANG, Yue; ANDRUKHOV, Oleh; RAUSCH-FAN, Xiaohui. Oxidative stress and antioxidant system in periodontitis. **Frontiers in physiology**, v. 8, p. 910, 2017.
- WEI, Yu et al. Quercetin prevents oxidative stress-induced injury of periodontal ligament cells and alveolar bone loss in periodontitis. **Drug Design, Development and Therapy**, p. 3509-3522, 2021.
- WU, Zeni et al. Associations of periodontal disease and tooth loss with all-cause and cause-specific mortality in the Sister Study. **Journal of clinical periodontology**, v. 48, n. 12, p. 1597-1604, 2021.
- XIAO, Yuhong et al. Rutin suppresses FNDC1 expression in bone marrow mesenchymal stem cells to inhibit postmenopausal osteoporosis. **American Journal of Translational Research**, v. 11, n. 10, p. 6680, 2019.
- XIN, Xuan et al. Biocatalytic synthesis of acylated derivatives of troxerutin: their bioavailability and antioxidant properties in vitro. **Microbial cell factories**, v. 17, p. 1-11, 2018.

XING, Che; XIANG, Dai; CAIYING, Li. Effects of troxerutin on vascular inflammatory mediators and expression of microRNA-146a/NF- κ B signaling pathway in aorta of healthy and diabetic rats. *Korean J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Korean Physiol. Soc. Korean Soc. Pharmacol.*, v. 24, p. 395-402, 2020.

YANG, Bo et al. Immunomodulation in the treatment of periodontitis: Progress and perspectives. *Frontiers in immunology*, v. 12, p. 781378, 2021a.

YANG, Ji Yeong et al. Oat seedlings extract inhibits RANKL-induced c-Fos/NFATc1 transcription factors in the early stage of osteoclast differentiation. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2022, 2022.

YANG, Xiao et al. Troxerutin stimulates osteoblast differentiation of mesenchymal stem cell and facilitates bone fracture healing. *Frontiers in Pharmacology*, v. 12, p. 723145, 2021b.

ZEESHAN, Rabia et al. Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) crosslinkedchitosan (CH) basedscaffoldscontainingbioactiveglass (BG) andzinc oxide (ZnO) for alveolar bonerepair. *Carbohydratepolymers*, v. 193, p. 9-18, 2018.

ANEXO - APROVAÇÃO NA COMISSÃO ÉTICA EM PESQUISA ANIMAL



UNIVERSIDADE
FEDERAL DO CEARÁ

Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da administração bucal de gel com bioativos - troxerrutina e polissacarídeos do cogumelo *Agaricus blazei* Murill - na doença periodontal induzida em camundongos swiss", protocolada sob o CEUA nº 3806290622 (ID 002296), sob a responsabilidade de **Renata Ferreira de Carvalho Leitão e equipe; Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro; Andre Tavares de Freitas Figueredo Dias; Rafaela Franco Moreira; Matheus da Silva Campelo; Conceição da Silva Martins Rebouças** - 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 16/09/2022.

We certify that the proposal "Effect buccal administration of gel with bioactive - troxerutin and polysaccharides from the mushroom *Agaricus blazei* Murill - on induced periodontal disease in swiss mice", utilizing 48 Heterogenics mice (48 males), protocol number CEUA 3806290622 (ID 002296), under the responsibility of **Renata Ferreira de Carvalho Leitão and team; Maria Elenir Nobre Pinho Ribeiro; Andre Tavares de Freitas Figueredo Dias; Rafaela Franco Moreira; Matheus da Silva Campelo; Conceição da Silva Martins Rebouças** - 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 09/16/2022.

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

Vigência da Proposta: de **10/2022 a 10/2023** Área: **Departamento de Morfologia**

Origem: **Biotério Central da UFC**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **5 a 8 semanas**

Quantidade: **48**

Linhagem: **Swiss**

Peso: **20 a 25 g**

Fortaleza, 13 de janeiro de 2024

Prof. Dra. Camila Ferreira Roncari
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Karuza Maria Alves Pereira
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Ceará



ANEXO – DEPÓSITO DE PATENTE DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO TROXERRUTINA



14/11/2023 870230100364
09:40
29409162311716197

Pedido nacional de invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2023 023821 1

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 07272636000131

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av da universidade, 2853 - Benfica

Cidade: Fortaleza

Estado: CE

CEP: 60020-181

País: Brasil

Telefone: (85) 3366-9434

Fax: (85) 3366-9941

Email: patentes@ufc.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 14/11/2023 às 09:40, Petição 870230100364

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** COMPOSIÇÃO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS CONTENDO POLISSACARÍDEOS DO COGUMELO *Agaricus blazei* Murill E TROXERRUTINA, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DA COMPOSIÇÃO E SEUS USOS**Resumo:** A presente invenção se aplica ao campo da farmácia, química e medicina e biomedicina, onde a mesma descreve o processo de obtenção dos polissacarídeos do cogumelo *Agaricus blazei* Murill e o ativo troxerrutina, além da composição, métodos de produção e usos de formas farmacêuticas do tipo membranas, hidrogel e scaffolds ou esponjas, mas que não se limita a elas, sendo estendidas para outras formulações farmacêuticas sólidas, líquidas e semissólidas. Assim, os polissacarídeos isolados do cogumelo e o ativo troxerrutina desempenham atividade com ação cicatrizante, antioxidante, antiinflamatória e vascular frente ao modelo experimental de ferida cutânea excisional em camundongos e o modelo de indução de periodontite com fio de algodão (sutura) em 1º molar bilateral da mandíbula. A inovação da presente invenção reside no desenvolvimento de formas farmacêuticas com a associação desses dois ativos em matrizes poliméricas naturais e/ou sintéticas, gerando efeito restaurador da integridade epitelial, com aceleração da cicatrização da inflamação. Dessa forma, confere formulações eficientes e econômicas para a prevenção e o tratamento de lesões teciduais e doenças periodontais usando ingredientes biocompatíveis e naturais, integrando multifuncionalidade como propriedades mecânicas e bioaderência no ambiente das injúrias. Onde, o efeito anti-inflamatório, antioxidante e vascular dos polissacarídeos do cogumelo *Agaricus blazei* Murill e do ativo troxerrutina, de acordo com o processo descrito na presente invenção, fomenta principais requisitos para um processo eficiente de recuperação do tecido lesado. Assim, resultando em uma opção terapêutica de baixo custo e de melhor adesão ao tratamento pelo usuário, com potencial utilização para a prevenção e o tratamento de lesões teciduais e doenças periodontais.**Figura a publicar:** 12

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 14/11/2023 às 09:40. Petição 870230100364

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 6**Nome:** MARIA ELENIR NOBRE PINHO RIBEIRO**CPF:** 62856138349**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fielca:** Pesquisador**Endereço:** RUA UM, Nº 228, CONJ. SÍTIO CÓRREGO. BAIRRO MONDUBIM**Cidade:** Fortaleza CE**Estado:** CE**CEP:****País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:** elenir.ribeiro@ufc.br**Inventor 2 de 6****Nome:** ANA BEATRIZ NOGUEIRA LIMA**CPF:** 07477909309**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Fielca:** Pesquisador**Endereço:** o Rua José Façanha, 538; Rodolfo Teófilo**Cidade:** Fortaleza CE**Estado:** CE**CEP:****País:** BRASIL**Telefone:****Fax:****Email:** beatriznog16@gmail.com**Inventor 3 de 6**

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
14/11/2023 às 09:40, Petição 870230100364

Nome: ANDRÉ TAVARES DE FREITAS FIGUEREDO DIAS

CPF: 05654488384

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielca: Pesquisador

Endereço: Rua Osimo de Alencar Lima, nº 32. Bairro Novo Maranguape,

Cidade: Fortaleza CE

Estado: CE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: andretvs@alu.ufc.br

Inventor 4 de 6

Nome: MATHEUS MORAIS SARAIVA

CPF: 06105820380

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielca: Pesquisador

Endereço: Avenida Central Sul, 796, Acaracuzinho, Maracanaú, Ceará 6

Cidade: Fortaleza CE

Estado: CE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: matheus-_-moraiss@outlook.com

Inventor 5 de 6

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em
14/11/2023 às 09:40, Petição 870230100364

Nome: RAFAELA FRANCO MOREIRA

CPF: 54902029391

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielix: Pesquisador

Endereço: Av. Padre Antônio Tomaz, 3579/apto 1401 - Cocó

Cidade: fortaleza

Estado: CE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: rafaela.moreira@gmail.com

Inventor 6 de 6

Nome: RENATA FERREIRA DE CARVALHO LEITÃO

CPF: 43088139304

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Fielix: Pesquisador

Endereço: Rua Delmiro de Farias, 1331

Cidade: Fortaleza CE

Estado: CE

CEP:

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: renata.carvalho@ufc.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em
14/11/2023 às 09:40, Petição 870230100364